Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier

SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET QUANTIFICATION DE MÉTABOLITES URINAIRES DE LA DHEA

Par Josianne Roy

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

Jury d'évaluation

Président du jury et Dr François Lépine

examinateur interne INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur interne Dr F.T. Delbeke

Ghent University

Directrice de recherche Dr Christiane Ayotte

INRS-Institut Armand-Frappier

Co-directeur de recherche Dr Donald Poirier

CHUL et Université Laval

© droits réservés de Josianne Roy, 2004

RÉSUMÉ

La déhydroépiandrostérone (DHEA) est un stéroïde dont l'utilisation par les sportifs est interdite par le Comité international olympique et qui est accessible au public depuis quelques années en raison de sa vente libre aux États-Unis et à travers le réseau Internet. Jusqu'à ce jour, quelques méthodes analytiques ont été développées pour détecter son usage illicite dans l'urine, mais elles sont imparfaites et peu efficaces. Nous avons travaillé à la validation d'une sonde fiable mesurée par CG/SM (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) et pouvant déceler la présence de DHEA exogène dans l'urine jusqu'à 25 heures suivant sa prise orale.

Notre groupe de recherche a observé précédemment que la prise par voie orale de DHEA affectait pendant une vingtaine d'heures d'une manière caractéristique l'excrétion de certains métabolites sulfoconjugués déjà présents dans l'urine (Lévesque et Ayotte, 1999). Notamment, une suppression de la concentration en $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-one (16α -OH-androstérone) opposée à une augmentation marquée de la concentration en 3β - 7β -dihydroxy-5-androstèn-17-one (7β -OH-DHEA) avait été observée chez des volontaires à qui l'on avait administré une dose unique de 200 mg de DHEA orale. Le rapport de la concentration de ces deux métabolites semblait donc ouvrir une piste intéressante pour le développement d'une sonde.

Les résultats de cette étude nous permettront de proposer une méthode de détection de la DHEA par CG/SM basée sur l'obtention d'un paramètre biochimique dont la valeur différera de celles mesurées généralement chez l'humain. Cette méthode implique l'analyse quantitative des métabolites urinaires sulfoconjugués.

La détermination des concentrations urinaires des métabolites d'intérêt requiert en premier lieu la synthèse des composés de référence. Puisque la 7β-OH-DHEA n'était pas disponible commercialement, il a fallu dans un premier temps la synthétiser. Ensuite, l'identification et la caractérisation des composés de référence ont été réalisées par des analyses CG/SM, incluant celles des dérivés TMS-éther et TMS-énol qui seront utilisés pour les mesures biochimiques effectuées sur les échantillons urinaires. Après avoir choisi un standard interne approprié, la quantification de la 7β-OH-DHEA et de la 16α-OH-androstérone a pu être réalisée à l'aide de courbes d'étalonnage dérivées de l'addition des standards en concentration variable à une matrice urinaire exempte de ces stéroïdes. Les valeurs du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone ont été mesurées dans des échantillons d'athlètes et de volontaires après ou sans administration d'un produit commercial contenant de la DHEA. La distribution statistique, la moyenne et la limite supérieure du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone ont été déterminées par la suite pour ces trois groupes (volontaires, population de référence, athlètes).

Nous avons également analysé par spectrométrie de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI) la teneur en ¹³C (δ ¹³C ⁰/₀₀) des métabolites urinaires sulfoconjugués. Les résultats nous ont permis de vérifier que l'augmentation des concentrations urinaires de DHEA et de ses métabolites caractéristiques était bien liée à l'administration d'un supplément. En effet, les valeurs obtenues étaient caractéristiques de produits synthétiques et différaient de celles mesurées chez les métabolites urinaires de référence non affectés par l'administration du stéroïde.

Josianne Roy

Dr Christiane Ayotte

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'achèvement de mes études de maîtrise. Je tiens à remercier en tout premier lieu :

- Dr Christiane Ayotte, ma directrice de recherche, pour avoir dirigé ce mémoire, pour m'avoir accordé sa confiance et pour avoir su orienter mes recherches grâce à ses conseils judicieux.
- Dr Donald Poirier, mon co-directeur de recherche, pour son appui quotidien, sa disponibilité et ses conseils avisés.
- Toute l'équipe des techniciens, des assistants et des étudiants du laboratoire antidopage pour leur accueil chaleureux et leur aide quotidienne.
- Toute l'équipe du Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique (CRGMO) du CHUL pour leur serviabilité et leur gentillesse.
- Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude à Nathalie, qui a donné de son temps et de son énergie en recueillant de nombreux échantillons urinaires pour ma population de référence.
- Un merci tout spécial à Jérémi, qui a contribué aussi à la réalisation de mes recherches.
- Finalement, je voudrais adresser un remerciement très particulier à mon père pour ses encouragements, ses conseils et son support depuis toujours, qui ont joué un rôle majeur dans la réussite de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIÈRES	
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	
Chapitre I : INTRODUCTION	1
1.1 DHEA: Rôle et origine	1
1.2 Effets secondaires	
1.3 Utilisation de la DHEA comme agent dopant	5
1.3.1 L'accessibilité de la DHEA	
1.3.2 La DHEA et la performance sportive	5
1.4 Métabolisme de la DHEA	
1.5 Biotransformation et conjugaison	
1.5.1 Biotransformation de type phase I	
1.5.2 Biotransformation de type phase II	
1.5.3 Hydrolyse du lien DHEA-Sulfate	
1.5.3.1 Hydrolyse enzymatique	
1.5.3.2 Solvolyse chimique	
1.6 Biodisponibilité de la DHEA	
1.7 Métabolites excrétés suite à l'administration de la DHEA	
1.8 Paramètres diagnostiques de l'administration de DHEA orale	

1.9 Hydroxylation de la DHEA: 7-OH-DHEA27
1.10 Étude de l'altération du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone29
1.11 La spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone30
1.12 Sommaire des objectifs32
Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES34
2.4
2.1 Matériel34
2.1.1 Stéroïdes34
2.1.2 Produits chimiques35
2.1.2.1 Produits utilisés pour la synthèse35
2.1.2.2 Produits utilisés pour l'isolement des stéroïdes de l'urine35
2.1.2.3 Produits utilisés pour la dérivation des extraits stéroïdiens36
2.1.3 Échantillons biologiques36
2.1.4 Instrumentation37
2.1.4.1 Détecteur sélectif de masse couplé à un chromatographe en
phase gazeuse (CG/SM)37
2.1.4.2 Spectrométrie de masse d'isotopes stables : Combinaison
Chromatographe en phase gazeuse /four à combustion /
spectromètre de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI)39
2.1.4.3 Résonance magnétique nucléaire de l'hydrogène et du
carbone (RMN ¹ H, ¹³ C)
2.1.4.4 Spectrométrie de masse à basse résolution (SMBR)39
2.1.4.5 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)40
2.1.4.6 Spectroscopie infrarouge (IR)40
2.2 Méthode41
2.2.1 Synthèse de la 3β,7β-dihydroxy-5-androstèn-17-one4

2.2.1.1 Voie de synthèse A	41
2.2.1.2 Voie de synthèse B	
2.2.2 Isolement et hydrolyse des stéroïdes sulfoconjugués de l'urine	
2.2.3 Analyse des métabolites par CG/SM	
2.2.4 Quantification de la 7β-OH-DHEA et de la 16α-OH- androstérone	
2.2.5 Analyse des rapports isotopiques du carbone par CG/C/SMRI	
Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	60
3.1 Introduction	60
3.2 Synthèse de la 3β,7β-dihydroxy-5-androstèn-17-one	61
3.2.1 Voie de synthèse A	61
3.2.2 Voie de synthèse B	
3.2.3 Conclusion	
3.3 Quantification du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone	
3.3.1 Caractérisation des métabolites et choix de l'étalon interne	
3.3.2 Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone che	
population de référence	
3.3.3 Variation du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone causée	
l'administration de DHEA par voie orale	
3.3.4 Mesure des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone	
d'échantillons recueillis auprès d'athlètes	86
3.3.5 Conclusion	
7	

3.4 Spectrométrie de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI)90
3.4.1 Distribution des valeurs de rapports isotopiques chez les volontaires91
3.4.2 Comparaison des deux sondes : a) le rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH
androstérone et b) les teneurs en ¹³ C97
3.4.3 Conclusion
Chapitre IV : CONCLUSION GÉNÉRALE103
Chapitre V: RÉFÉRENCES

LISTE DES FIGURES

	PAGE
Figure 1.1	: DHEA1
Figure 1.2	: Squelette des androstanes1
Figure 1.3	: Sulfate de DHEA8
Figure 1.4	: Régulation des stéroïdes surrénaliens par l'axe hypothalamo- hypophyso-endocrinien
Figure 1.5	: Biosynthèse des hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales
Figure 1.6	: Biosynthèse des hormones stéroïdiennes12
Figure 1.7	: Mode d'action intracellulaire des hormones stéroïdiennes ; minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, androgènes et oestrogènes.13
Figure 1.8 a	: Conversion de la DHEA en androgènes14
Figure 1.8 b	: Métabolites finaux de la DHEA15
Figure 1.9	: Oxydation de la DHEA par une biotransformation type phase I16
Figure 1.10	: Conjugaison de la testostérone par l'acide glucuronique,

Figure 1.11 : Conjugaison de la DHEA par le sulfate, type phase II
Figure 1.12 : Oxygénation en position C-7 de la DHEA28
Figure 3.1 : Protocole de synthèse de la 7β-OH-DHEA, voie A62
Figure 3.2 : Protocole de synthèse de la 7β-OH-DHEA, voie B65
Figure 3.3 : Modification caractéristique des chromatogrammes reconstitués de l'analyse CG/SM des dérivés TMS des métabolites sulfoconjugués de la DHEA et de l'étalon interne avant et après la prise orale de 200 mg de DHEA
Figure 3.4 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther, TMS-énol de la 7β-OH- DHEA73
Figure 3.5 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther, TMS-énol de la 16α-OH- androstérone74
Figure 3.6 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther, TMS-énol de la 6α-OH- étiocholanolone, l'étalon interne
Figure 3.7 : Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone individuels dans la fraction sulfate de l'urine chez une population de référence (N=70)

Figure 3.8 : Distribution des rapports 7 β -OH-DHEA/16 α -OH-androstérone en

	fonction de la prise orale de 200 mg de DHEA chez trois
	volontaires84
Figure 3.9	: Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone
riguic 3.9	
	dans la fraction sulfate de l'urine chez une population d'athlètes
	(N=110)87
Figure 3.10	: Variation des rapports isotopiques ($\delta^{13}C^{0}/_{00}$) de la 7 β -OH-DHEA-
6	S, de la DHEA-S et du précurseur (cholestérol-S) en fonction de
	l'heure avant et suivant la prise orale de 200 mg de DHEA chez 3
	•
	volontaires (M-1; M-2; F-1)93
Eigung 2 11	: Rapport teneur en ¹³ C des métabolites sur celle du stéroïde de
rigure 3.11	**
	référence (cholestérol-S) en fonction de l'heure avant et suivant la
	prise orale de 200 mg de DHEA chez trois volontaires96
Figure 3.12	: Variation des teneurs en ¹³ C des métabolites urinaires
	sulfoconjugués vs cholestérol d'échantillons dont le rapport 7β-
	OH-DHEA/16α-OH-androstérone est élevé98
Figure 3.13	: Comparaison des deux sondes d'utilisation de la DHEA : 7β-OH-
	DHEA/16α-OH-androstérone en CG/SM et rapports isotopiques
	des métabolites/Cholestérol en CG/C/SMRI100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	: Résumé des effets causés au profil stéroïdien par l'administration de
	DHEA orale chez des volontaires
Tableau 1.2	: Résumé des objectifs de recherche33
Tableau 2.1	: Résumé des données RMN ¹ H (CDCl ₃) des produits intermédiaires et finaux obtenus de la voie A de synthèse
Tableau 2.2	: L'ensemble des données RMN ¹³ C (CDCl ₃) des produits
	intermédiaires et finaux obtenus de la voie A de synthèse48
Tableau 2.3	: Résumé des données RMN ¹ H (CDCl ₃) des produits intermédiaires et finaux obtenus de la voie B de synthèse52
Tableau 2.4	: L'ensemble des données RMN ¹³ C (CDCl ₃) des produits intermédiaires et finaux obtenus de la voie A de synthèse53
Tableau 3.1	: Ions caractéristiques des dérivés TMS de la 7β-OH-DHEA, de la 16α-OH-androstérone et de la 6α-OH-étiocholanolone (étalon interne)
Tableau 3.2a	: Concentrations absolues et rapports de la 7β-OH-DHEA et la 16α- OH-androstérone dans la fraction sulfate de l'urine chez une

	population de référence80
Tableau 3.2b	: Étude des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone dans la fraction sulfate de l'urine chez une population de référence et ses deux sous-populations (hommes et femmes)80
Tableau 3.3	: Étude des rapports 7 β -OH-DHEA /16 α -OH-androstérone dans la fraction sulfate de l'urine chez trois volontaires ayant consommé une dose de 200 mg de DHEA par voie orale82
Tableau 3.4	: Étude des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone dans la fraction sulfate de l'urine chez une population de référence et une population d'athlètes
Tableau 3.5	: Valeurs des rapports isotopiques (δ ¹³ C ⁰ / ₀₀) et temps de rétention (secondes) de la 7β-OH DHEA-S, de la DHEA-S et du stéroïde urinaire de référence (cholestérol-S) lors de l'analyse par GC/C/SMRI d'extraits non dérivés
Tableau 3.6	: Variations absolues des rapports isotopiques ($\delta^{13}C^{0}/_{00}$) de la 7 β -OH-DHEA-S et de la DHEA-S en fonction du temps après l'administration de DHEA chez les trois volontaires95
Tableau 3.7	: Rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone et rapports des

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 DHEA: rôle et origine

C'est 1931 **DHEA** (3β-hydroxy-5-androstèn-17-one: que la en déhydroépiandrostérone ou prastérone) (figure 1.1) fut isolée pour la première fois de l'urine humaine par le médecin Adolf Butenandt. Ses découvertes sur les hormones sexuelles lui valurent le prix Nobel de chimie en 1939 et lui permirent de déduire la structure générale des stéroïdes (figure 1.2). En 1944, la DHEA sous forme sulfoconjuguée (DHEA-S) fut également isolée de l'urine humaine et, en 1958, le biochimiste Max Fernand Jayle réussit à doser de façon précise la décroissance graduelle de la DHEA au cours du vieillissement chez l'humain. C'est par contre son élève le Dr Étienne-Émile Baulieu qui découvrit en 1960 que cette hormone stéroïdienne était sécrétée par la glande corticosurrénale et qu'elle était produite majoritairement sous la forme sulfoconjuguée et non libre (Baulieu, 1960).

Figure 1.1 DHEA

Figure 1.2 Squelette des androstanes

Un intérêt particulier fut porté au cours des années 60 à l'étude du métabolisme et à l'élucidation du rôle de la DHEA chez l'humain. C'est ainsi que la biotransformation de la DHEA en androgènes, oestrogènes et DHEA-S fut corroborée. Il fut également établi que la DHEA sulfoconjuguée engendrait les mêmes métabolites que ceux de la DHEA en raison de leur interconversion et l'implication d'une sulfatase hydrolysant la DHEA-S, surtout au niveau du foie et de l'intestin (Vande Wiele, 1963).

Par la suite, plusieurs études effectuées sur des modèles animaux laissèrent présumer que cette hormone pourrait procurer des effets bénéfiques à forte dose, tels que la prévention de certains cancers, de l'obésité, la prolongation de l'existence, etc.. Au début des années 90, les résultats de travaux portant sur l'évaluation de ses effets biologiques, physiologiques et psychologiques potentiellement bénéfiques ont amené certains à en promouvoir l'utilisation généralisée dans la population. Notamment, certaines études sur l'administration de DHEA par voie orale, intraveineuse et transdermale ont suggéré qu'elle semblait procurer divers effets bénéfiques comme l'augmentation de la masse musculaire, de la libido, du sentiment de bien-être (Arlt et al, 1998; 1999), de la profondeur du sommeil, de la mémoire et l'amélioration de la qualité de la peau (Labrie et al, 1998).

De plus, des effets antioxydants de la DHEA dans le foie et les reins furent rapportés chez l'animal (Schauer et al, 1990 ; Aragno et al, 2001). Certaines études laissèrent également supposer que cette hormone pourrait contrecarrer et retarder certains effets naturels reliés au vieillissement.

De surcroît, des études réalisées au cours des années 80-90 semblaient impliquer une certaine action thérapeutique dans le traitement de plusieurs maladies telles que le diabète (Coleman et al, 1982), l'ostéoporose (Takayanagi et al, 2002; Baulieu et al, 2000), la maladie d'Alzeimer, la maladie de Parkinson, les désordres du système immunitaire (Williams, 2000), les maladies cardio-vasculaires (Khalil et al, 2000) et certains cancers (Schwartz et al, 1988). D'autres études soulevèrent également l'hypothèse d'une certaine utilité pour atténuer les symptômes désagréables de la ménopause et pour combattre certains virus. Malgré tout, il semble que les bienfaits présumés de la DHEA fassent toujours l'objet de controverses dans le milieu scientifique et les résultats des études sont souvent contradictoires (Porsova-Dutoit et al, 2000; Allolio et Arlt, 2002; Kahn et Halloran, 2002).

1.2 Effets secondaires

Des comprimés de DHEA étant maintenant disponibles commercialement pour une administration non supervisée, plusieurs scientifiques s'inquiètent de l'absence d'étude concernant les effets adverses de la DHEA administrée dans ces conditions. Principalement en ce qui a trait aux répercussions d'une administration à long terme (Corrigan, 1999). À des doses de 50 mg et moins, la plupart des effets indésirables relatés à court terme sont habituellement prévisibles tels que bouffées de chaleur, insomnie, dysménorrhée, acné, hirsutisme, aggravation de la voix, virilisation de la femme et autres effets androgènes, etc. (Caulin et al. 2001).

Dans les cas de prises prolongées, un effet à faible dose relevé dans plusieurs études est la pertubation du rapport HDL: LDL cholestérol par la diminution du cholestérol HDL (Costill et al, 1984) et l'accroissement du cholestérol LDL (Okamoto, 1996), ce qui représente un facteur susceptible d'accentuer les risques de maladies cardio-vasculaires (Alexandersen et al, 1996). Un risque de stimulation de la croissance de cancers hormono-dépendants est également craint (Armsey et Green, 1997), en plus de modifications du développement génital. D'autres études ont tenté d'anticiper les effets de la DHEA en extrapolant les résultats d'études épidémiologiques conduites sur des animaux et seraient donc peu applicables aux humains.

En résumé, aucune évidence scientifique ne permet de corroborer les vertus attribuées à la DHEA; tant pour rajeunir, que pour guérir certaines maladies, ou encore pour optimiser les performances sportives. Considérant la possibilité d'effets secondaires irréversibles et de risques sérieux pour la santé, la plupart des chercheurs s'entendent pour recommander la prudence et estiment que les gens ne devraient pas utiliser la DHEA sans supervision médicale tant que des études approfondies sur les conséquences d'une consommation à long terme ne seront pas menées (Sirrs et Bebb, 1999; Skerret, 1996; Arlt et al, 1998; Tummala et Svec, 1999).

1.3 Utilisation de la DHEA comme agent dopant

1.3.1 L'accessibilité de la DHEA

La DHEA dont l'importation et le trafic sont illégaux au Canada, est disponible commercialement sans contrôle médical en tant que « supplément alimentaire » dans certains pays, notamment aux États-Unis et sur le réseau Internet. Paradoxalement, les préparations pharmaceutiques de DHEA avaient pourtant été retirées en 1985 aux États-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) en raison du manque d'études cliniques démontrant son efficacité chez les humains, la plupart des données biologiques disponibles concernant uniquement les animaux. Aujourd'hui, bien que les études sur les effets de la DHEA sur l'humain soient un peu plus nombreuses, elles sont encore insuffisantes pour permettre de bien comprendre toutes les implications métaboliques d'une supplémentation en DHEA.

1.3.2 La DHEA et la performance sportive

Des études semblent indiquer que l'exercice chez les athlètes provoque un accroissement significatif du taux de DHEA plasmatique (Arlt et al, 1998; Keizer et al, 1989). L'administration de DHEA procurerait un effet anabolisant chez l'homme non-entraîné (Nestler et al, 1988) et provoquerait une diminution de la masse lipidique et une légère augmentation de la masse corporelle, tel que mentionné dans une recherche effectuée sur un petit groupe de jeunes hommes (Welle et al, 1990). Quelques études ont traité de l'effet anticatabolique de la DHEA qui permettrait au corps de récupérer plus rapidement après l'entraînement.

En fait, la DHEA semblerait bloquer l'effet catabolique des corticostéroïdes qui sont amplifiés suite au stress et à la fatigue causés par un entraînement intensif (Loria, 1997; Kalimi et al, 1994; Regelson et Kalimi, 1994; Fleshner et al, 1997).

La testostérone, ses précurseurs et les substances possédant des propriétés chimiques ou pharmacologiques qui lui sont reliées, sont interdits aux sportifs par le Comité international olympique (CIO) depuis 1976. Les autorités sportives ont réagi rapidement à la vente libre de DHEA et d'androstènedione en les inscrivant formellement à la liste des substances interdites en 1997. Quoique l'on ne connaisse pas la prévalence d'utilisation de la DHEA, l'une des raisons qui pourraient en légitimer la consommation par certains athlètes serait la croyance populaire qui voudrait que puisqu'une substance est « naturelle », elle ne peut être dangereuse et ne peut être facilement détectable lors des tests de dopage (Bowers, 1999).

En dépit du manque d'information objective sur l'apport de la DHEA dans la performance sportive, le principal effet recherché par les athlètes qui en consomment est certainement son potentiel anabolisant présumé, provenant du fait qu'un faible pourcentage de cette hormone se transforme en testostérone et autres puissants stéroïdes (Corrigan, 2002). Théoriquement, la DHEA pourrait contribuer indirectement et faiblement à la formation de la musculature en favorisant la synthèse des protéines et la rétention de l'azote. En pratique, son potentiel anabolisant après administration par voie orale n'a pas encore été établi chez l'homme. Nous savons par ailleurs que les athlètes qui consomment des agents anabolisants le font également en vue d'augmenter la récupération post-exercice.

Aucune étude sur les effets à long terme de l'usage de DHEA n'a été réalisée jusqu'à maintenant, pas plus que sur ses interactions possibles avec d'autres agents dopants ou sur les doses supraphysiologiques consommées par les athlètes (Corrigan, 1999). Même s'il semble raisonnable de penser que la DHEA puisse accroître le taux de testostérone sanguin chez certains individus, les diverses études réalisées jusqu'à aujourd'hui sur les effets réels de la DHEA dans les performances sportives n'ont rien prouvé du tout (Johnson, 1999; Nestler et al., 1988; Bosy et al., 1998).

Aucune donnée n'a réussi à prouver qu'elle constituait un important régulateur d'énergie et de métabolisme des protéines chez l'être humain (Clarkson et Rawson, 1999; Welle et al, 1990). Une autre étude a aussi démontré que la supplémentation de 100 mg/jour en DHEA n'augmentait pas statistiquement la masse musculaire, la force et la testostérone chez des hommes d'âge moyen sur une période de 12 semaines (Wallace et al, 1999). D'autres résultats ont aussi suggéré que l'ingestion de DHEA n'augmentait pas la testostérone et la résistance à l'entraînement chez les jeunes hommes (Brown et al, 1999).

1.4 Métabolisme de la DHEA

De toutes les hormones stéroïdes produites par le corps humain, la DHEA est de loin la plus abondante et est produite à plus de 15 à 30 mg / jour (Kazlauskas, 1998). Synthétisée à partir du cholestérol, elle est présente sous la forme de son dérivé sulfate (DHEA-S) dans le plasma sanguin (Figure 1.3), où elle est généralement liée à l'albumine (~ 90-97%) et aussi faiblement à la globuline de fixation de l'hormone sexuelle (SHBG). (Caulin et al, 2001; Dunn et al, 1981). Ses formes libres et sulfoconjuguées sont en interconversion métabolique permanente (Longcope, 1996). Cette production importante de DHEA et de DHEA-S est caractéristique des humains et des primates (Leblanc et al, 2002).

Figure 1.3 Sulfate de DHEA

La DHEA est essentiellement sécrétée par les glandes surrénales, et dans une moindre mesure, par les gonades (testicules et ovaires). Dans les surrénales, elle est produite à partir de la zone réticulée, suite à la stimulation de la corticotrophine (ACTH) (Figure 1.4). Cette dernière est une hormone hypophysaire régulée par le stress et par contrôle rétronégatif.

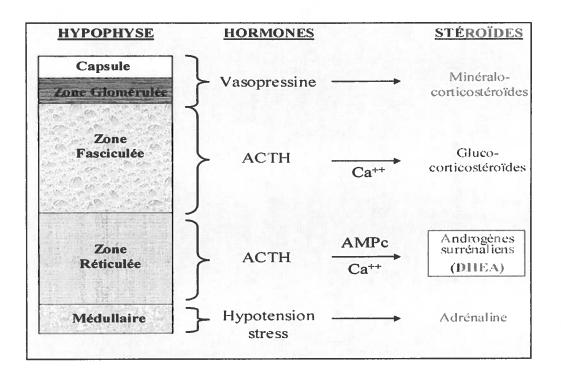


Figure 1.4 <u>Régulation des stéroïdes surrénaliens par l'axe hypothalamo-hypophyso-</u> endocrinien (Raisonnier et Wright, 1999).

On observe d'importantes variations inter- et intra-individuelles des concentrations sanguines de DHEA et DHEA-S, même à l'intérieur d'un même groupe d'âge. Il semblerait aussi que 20% de la population puisse en certaines circonstances sécréter/excréter des taux environ 50 fois supérieurs aux autres (*Caulin et al, 2001 ; Thomas et al, 1994*). En plus de varier selon les individus, le taux de DHEA sanguin fluctue en fonction du moment de la journée chez un même sujet (rythme cicardien), atteignant son maximum vers l'heure du midi (*Pfeifer et Spiteller, 1981; Filicori et al, 1984*).

On a démontré que la sécrétion de DHEA augmenterait au moment de l'adrénarche chez l'enfant de 6 à 8 ans et continuerait graduellement de s'intensifier pour atteindre un taux maximal vers l'âge de 25 ans (Labrie et al., 1998 ; Nestler et al., 1988). Par la suite, les niveaux de DHEA libre et sulfoconjuguée chuteraient progressivement, plus fortement chez les hommes, pour disparaître presque complètement vers l'âge de 80 ans (Bélanger et al.; 1994 Pahlavani, 1995). Par contre, la concentration en DHEA-S plasmatique ne semble pas varier en fonction du sexe chez les adultes de moins de 50 ans (Orentreich et al., 1984). Les concentrations en DHEA et DHEA-S circulantes sont sujettes à des fluctuations irrégulières et spontanées dues à la maladie, au stress, à l'âge et à des facteurs héréditaires (Barbé, 1995; Ludwig et al, 1977; Araneo et Daynes, 1995; Oberbeck et al. 1998: Browne et al. 1993). Bien que la circulation de la DHEA dans le plasma sanguin soit connue depuis une trentaine d'années, son rôle physiologique et ses effets pharmacologiques demeurent encore aujourd'hui largement inexpliqués (Nestler et al, 1988). On sait cependant qu'elle a, en tant que précurseur hormonal, un effet pharmacologique relié à sa transformation en hormones sexuelles (Caulin et al, 2001) (Figure 1.5).

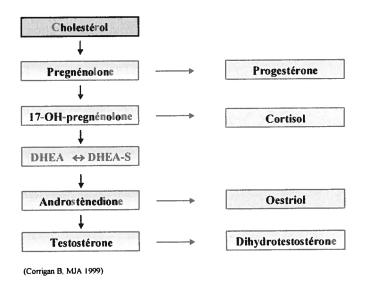


Figure 1.5 <u>Biosynthèse des hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales</u> (Corrigan, 1999).

On sait aussi que tout bouleversement du taux de DHEA sanguin, soit par dérèglement naturel ou par prise exogène, influencera le métabolisme des hormones qui en sont dérivées ou qui lui sont reliées (Figure 1.6). La transformation en stéroïdes actifs s'effectue dans les glandes enocrines comme les testicules et les ovaires, dans les tissus périphériques et également dans le cerveau (Baulieu et Robel, 1998). Plusieurs enzymes sont impliquées, dont la sulfatase, qui libère la DHEA du groupement sulfate. On estime qu'environ 50% des androgènes chez l'homme sont synthétisés à partir de la DHEA et DHEA-S alors que chez la femme, cette proportion est évaluée à 75% avant la ménopause et presque à 100% après la ménopause (Labrie et al, 1988).

La DHEA est le précurseur des oestrogènes actifs comme l'estrone, l'estradiol et l'estriol à la suite de l'aromatisation du cycle A par l'aromatase. La DHEA-S est aussi à l'origine de la production de testostérone chez la femme sous contrôle d'une hormone folliculo-stimulante à l'intérieur du follicule ovarien (Haning et al, 1991). Chez la femme enceinte par contre, il semblerait que la sécrétion de DHEA et DHEA-S soit accentuée et qu'elle constituerait une importante source d'œstrogènes dans le placenta (Longcope, 1996).

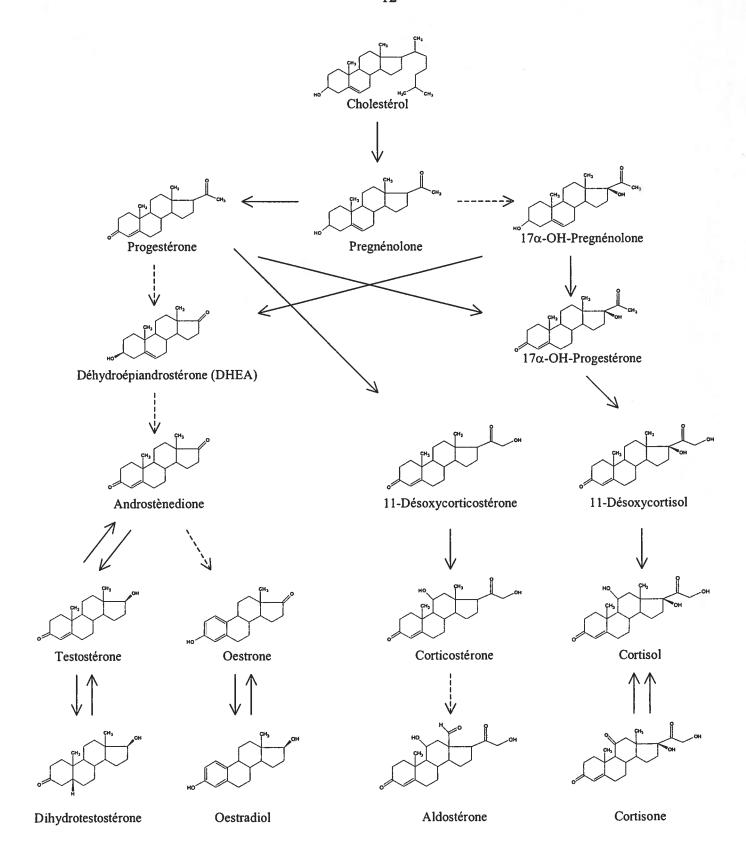


Figure 1.6 Biosynthèse des hormones stéroïdiennes.

La DHEA, synthétisée dans le cytosol à partir du cholestérol, est de nature lipophile (donc hydrophobe), ce qui lui confère la propriété de traverser sans difficulté la bicouche lipidique des cellules de l'organisme. À l'inverse, ce même caractère lipophile lui enlève la possibilité de circuler librement dans le flux sanguin, c'est donc pourquoi elle se lie avec des protéines plasmatiques comme l'albumine (Longcope, 1996). Le complexe stéroïde-protéine sanguin est inactif et la DHEA doit être libérée par sa protéine de « transport » au niveau des capillaires sanguins qui irriguent les organes cibles (ex : testicules). Une fois relâchée, elle traverse la paroi du capillaire à travers la membrane plasmatique des cellules et elle interagit avec des récepteurs intracellulaires afin de modifier l'expression génique de la cellule cible (Figure 1.7).

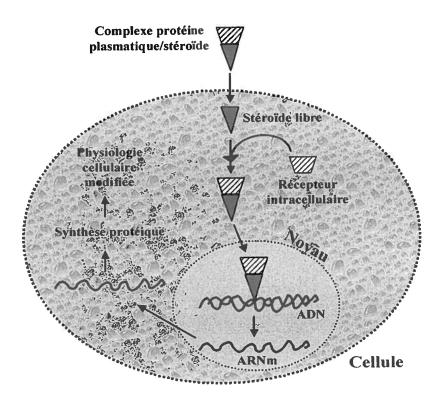


Figure 1.7 <u>Mode d'action intracellulaire des hormones stéroïdiennes</u>

(minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, androgènes et oestrogènes)

proposé par Bartolami (Bartolami, 2002).

Bien que le récepteur spécifique de la DHEA n'ait pas encore été identifié, ses effets exclusifs et distinctifs suggèrent que son récepteur soit indépendant des autres récepteurs intracellulaires hormonaux, tels que ceux des glucocorticoïdes, androgènes, oestrogènes, minéralocorticoïdes, progestérone, et autres (Meikle et al, 1992; Kroboth et al, 1999).

Figure 1.8 a <u>Conversion de la DHEA en androgènes.</u>

1.5 Biotransformation et conjugaison

La DHEA est excrétée principalement sous la forme sulfoconjuguée et lorsque prise par voie orale, elle est rapidement transformée en ses principaux métabolites finaux que sont l'étiocholanolone (3α-OH-5β-androstane-17-one), l'androstérone (3α-OH-5α-androstan-17-one), le 5α-androstan-3α,17β-diol, le 5β-androstan-3α,17β-diol (Kazlauskas, 1998; Baulieu et al, 1965). Les métabolites de la DHEA sont éliminés tels quels, transformés chimiquement et conjugués à une molécule polaire afin de faciliter leur excrétion. On distingue généralement deux types de biotransformations cataboliques classées en phase I et II. La première phase englobe les biotransformations dont le mécanisme réactionnel implique des réactions d'oxydo-réduction, tandis que la deuxième comporte des réactions de conjugaison.

androstérone
$$5\alpha$$
-androstan- 3α , 17β -diol étiocholanolone

Figure 1.8 b <u>Métabolites finaux de la DHEA</u>

1.5.1 Biotransformation de type phase I

La grande majorité des réactions d'oxydation de la phase I sont catalysées par le cytochrome P-450, cette super-famille d'enzymes comprenant un grand nombre d'isoformes classées selon leur degré d'homologie de séquences et leur spécificité

de substrat. Le fonctionnement du cytochrome P-450 nécessite la présence d'une enzyme associée, la cytochrome P-450 réductase, dont l'action consiste à prélever deux électrons d'une flavoprotéine réduite pour les transférer à la DHEA qui sera oxydée. La flavoprotéine reçoit quant à elle les électrons du NADPH + H⁺ (**Figure 1.9**).

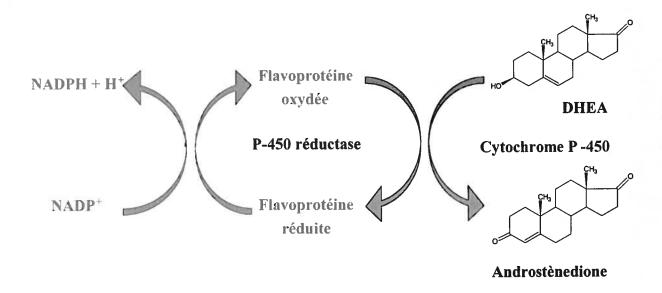


Figure 1.9 Oxydation de la DHEA par une biotransformation de type phase I
(Allain, 2000).

1.5.2 Biotransformation de type phase II

Les deux réactions de conjugaison qui nous intéressent principalement sont celles de glucuroconjugaison (conjugaison avec l'acide glucuronique: $R-OH \rightarrow R-O-$ acide glucuronique) et de sulfoconjugaison (conjugaison avec l'acide sulfurique: $R-OH \rightarrow R-O-SO_3$), des groupements hydroxyles par exemple, des métabolites d'androgènes. La sulfoconjugaison est la voie exclusive de conjugaison des

stéroïdes possédant une fonction 3β-OH (*Träger*, 1977; Baulieu et Kelly, 1990). Les métabolites de la DHEA dont la fonction 3β-OH a été transformée lors du métabolisme enzymatique sont quant à eux majoritairement glucuroconjugués, comme par exemple l'androstérone et l'étiocholanolone, toutes deux possédant un groupement 3α-OH. La sulfoconjugaison jouerait un double rôle en facilitant l'élimination des métabolites et en créant un réservoir de DHEA. C'est d'ailleurs pour cette raison que le mécanisme de sécrétion de la DHEA a mis du temps avant d'être élucidé, le sulfate ne se retrouvant pas dans la phase organique des extraits lipidiques, mais plutôt dans la phase aqueuse (*Baulieu et Robel*, 1998).

La réaction de glucuroconjugaison, qui consiste en la création d'un groupement O-glucuronide, est principalement catalysée par des UDP-glucuronyl-transférases qui sont liées au réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et rénales (*Lautala*, 2000) (**Figure 1.10**). Lors de cette réaction, le groupe hydroxyle du stéroïde se lie par réaction de substitution nucléophile (SN₂) au dérivé uridine diphosphate de l'acide glucuronique (UDP – glucuronic acid). La glucuroconjugaison prédomine pour les stéroïdes hydroxylés en position C-3α, quelque soit l'orientation de l'hydrogène en C-5 (*Baulieu et Kelly, 1990*; *Leunissen, 1979*).

Figure 1.10 Conjugaison de la testostérone par l'acide glucuronique, type phase II (Allain, 2000).

La formation du sulfate de DHEA survient dans le cytosol du foie, des testicules, des tissus surrénaux et fœtaux. L'estérification de la fonction 3β-OH se produit en trois étapes enzymatiques complémentaires nécessitant l'apport d'ions magnésium (Mg²+) et de deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP). La première étape consiste à réduire et activer l'ion sulfate (SO₄²-) par hydrolyse de l'ATP et formation de l'adénosine-5'-phosphate (APS). Il y a par la suite relâchement d'une molécule de pyrophosphate (P-Pi) (Steimer, 2001). La seconde étape requiert elle aussi une molécule d'ATP afin de transformer l'APS en 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS). Enfin, le PAPS se conjugue à l'oxygène du groupe hydroxyle de la DHEA et libère une molécule de 3',5'-phosphoadénosine (PAP), ainsi qu'un cation (H⁺). Ces trois réactions sont catalysées par un groupe d'enzymes cytosoliques appelées sulfotransférases, que l'on retrouve surtout dans le foie, les intestins, la peau, les ovaires et le placenta (Figure 1.11) (Lebeau et al, 1964; Baulieu et Kelly, 1990).

Figure 1.11 Conjugaison de la DHEA par le sulfate, type phase II (Steimer, 2001).

1.5.3 Hydrolyse du lien DHEA-sulfate

Tel que mentionné plus haut, la DHEA et son dérivé sulfate (DHEA-S) sont en permanente inter-conversion, au gré des besoins de l'organisme. Toutefois, comme le processus de sulfoconjugaison demande une grande quantité d'énergie à la cellule, il s'effectue dans de moindres proportions comparativement au processus de déconjugaison. Aussi, il semblerait qu'environ 6% de la DHEA serait convertie en sulfate, tandis que 60-70% de la DHEA-S serait hydrolysée en DHEA et relarguée dans la circulation sanguine sous sa forme active (Longcope, 1996). C'est aussi pour cette raison que la demi-vie de la DHEA-S est supérieure (environ 20 heures) à celle de la DHEA libre (environ 30 minutes), même si leur vitesse de sécrétion dans le sang est presque identique (Legrain et al, 2000).

1.5.3.1 Hydrolyse enzymatique

La transformation de la DHEA-S en DHEA s'effectue dans l'organisme à l'intérieur des fractions microsomales du foie, des testicules, des ovaires et du placenta. Cette hydrolyse du lien sulfate est catalysée par la stéroïde sulfatase, une enzyme qui coupe sélectivement le lien O-sulfate des 3-hydroxy stéroïdes (Boivin et al, 2000; Purohit et al, 1994). Il est à noter que certaines espèces, dont l'escargot Helix pomatia, possèdent de telles enzymes capables d'hydrolyser les liens O-glucuronides ou sulfates. Ses sucs digestifs, dont les extraits plus ou moins purifiés sont disponibles commercialement, contiennent des glucuronidases et une aryle sulfatase pouvant être utilisées à cette fin.

Cependant, l'utilisation de ces préparations peut altérer l'intégrité des extraits stéroïdiens et être inefficace avec certains substrats. En effet, l'activité de l'aryle sulfatase ne permet pas l'hydrolyse de stéroïdes sulfoconjugués en position C-17 et ceux de configuration 5α-androstane-3α-ol (Leunissen, 1979). En plus de contenir des aryles sulfatases, certaines préparations non purifiées contiennent également des 3β-hydroxystéroïde oxydase et 5,4-ène-isomérase, ce qui donne lieu à plusieurs réactions secondaires indésirables (Vanluchène et al, 1982; Ayotte et al, 1996; Lévesque, 1998).

1.5.3.2 Solvolyse chimique

Bien que l'hydrolyse et la solvolyse chimiques sont décrites comme permettant d'hydrolyser tous les groupements O-sulfate, nous savons que les conditions drastiques de ces réactions altèrent la structure des stéroïdes. La méthode que nous privilégions pour l'hydrolyse des groupements O-sulfate des stéroïdes est la solvolyse chimique dont les conditions ont été mises au point par J-F Lévesque en 1998 à partir des conditions décrites par Burstein et Lieberman en 1958 (Lévesque, 1998; Lévesque et Ayotte, 1999; Burstein et Lieberman, 1958). Cette réaction est effectuée par l'addition d'acide sulfurique aux extraits stéroïdiens purifiés et remis en solution dans le tétrahydrofurane.

1.6 Biodisponibilité de la DHEA

Le mode d'administration (comprimés, injections intramusculaires, crèmes, timbres) joue un rôle prépondérant sur la durée et la nature des effets engendrés par la DHEA dans le corps humain. Avant sa vente libre, les adeptes de stéroïdes se procuraient la DHEA par importation et trafic illégaux de préparations mixtes d'esters de testostérone et d'acétate de DHEA administrés par injections intramusculaires. Depuis la fin des années 90, la DHEA peut être prise par voie orale. Étant en vente libre aux USA et par Internet, il y a fort à parier que ce mode d'administration soit maintenant largement répandu chez ses adeptes (Corrigan, 1999).

Les effets anabolisants et androgéniques engendrés par la prise orale de DHEA dépendent du métabolisme et de l'état hormonal de base de chaque individu, mais ils sont principalement liés au taux d'élimination élevé de l'hormone dans le foie et la paroi intestinale, où le taux d'absorption serait d'environ 50% (Morales et al., 1994). Lorsqu'elle est consommée par voie orale, l'effet de premier passage lors de la détoxification hépatique diminue dramatiquement le taux de DHEA circulante (Araneo et Daynes, 1995; Sturmi et Diorio, 1998). Par contre, lorsque la DHEA est administrée sous forme d'ester injectable par voie intramusculaire, sa durée d'action est prolongée. L'énanthate de DHEA (un ester à chaîne longue) étant plus liposoluble que l'hormone mère, celle-ci est ainsi retenue plus longuement dans les matières lipidiques des tissus. L'activité biologique de la DHEA peut être exprimée après hydrolyse et libération dans la circulation sanguine (Wilson, 1988; Arlt et al, 2002).

1.7 Métabolites excrétés suite à l'administration de DHEA

Bien que les résultats de plusieurs études aient été publiés au sujet de la biotransformation de la DHEA, l'administration orale de ce stéroïde maintenant possible sans contrôle médical a nécessité la reprise des études d'identification des métabolites urinaires produits par cette voie.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, chez l'humain, la DHEA est le précurseur majeur de la plupart des androgènes et oestrogènes (Arlt et al, 1999; Callies et al, 2000); elle est notamment convertie en testostérone via l'androstènedione et l'androstènediol. C'est d'ailleurs en raison de cette conversion que la DHEA est considérée comme étant faiblement androgénique.

Chez l'homme, l'administration orale de DHEA provoque entre autres d'importantes variations du taux excrété de DHEA, d'androstérone (A), d'étiocholanolone (Et), de leur rapport, ainsi que de celui des 5α/5β-androstanediols dans la fraction glucuronide de l'urine (Dehennin et al, 1998; Lévesque et Ayotte, 1999; Kazlauskas, 1998; Uralets et Gilette, 2000; Callies et al, 2000). Il a également été observé que les concentrations plasmatiques de la testostérone, de l'oestradiol, et de plusieurs androgènes glucuroconjugués s'élevaient suite à l'administration orale de DHEA (Leblanc et al, 2002; Caulin et al, 2001). Peu d'études ont cependant porté sur l'analyse des modifications de l'excrétion des stéroïdes sulfoconjugués.

Une augmentation de l'excrétion de la DHEA-S et de l'épiétiocholanolone-S suite à l'administration de DHEA orale ont tout d'abord été rapportées dans la littérature (Uralets et Gillette, 2001 ; Ueki et Okano, 1999 ; Tummala et Svec, 1999). Des analyses plus poussées ont cependant permis à J.F. Lévesque d'observer la présence de métabolites caractéristiques de l'administration de la DHEA. En effet, un accroissement de l'excrétion des métabolites hydroxylés en position 3- et 7- a été observé dans la fraction sulfate de l'urine soit de l'épiandrostérone, l'étiocholanolone, la DHEA, la 7α - et 7β -OH-DHEA, la 4ϵ -OH-DHEA, lesquels sont déjà tous présents naturellement dans la fraction sulfate de l'urine. À l'opposé, une diminution de l'excrétion de la 16α -OH-androstérone, de la 16α -OH-étiocholanolone et de la 16α -OH-DHEA a été observée. Parmi ces métabolites, seuls les sulfates possédant trois groupements hydroxyles se sont révélés caractéristiques de la prise de DHEA orale ; la 7α - et 7β -OH-DHEA, la 4ϵ -OH-DHEA, la 16α -OH-DHEA et la 16α -OH-androstérone (Lévesque et Ayotte, 1999 ; Lévesque, 1998).

Kazlauskas et son équipe ont également observé que la DHEA glucuroconjuguée et la DHEA libre n'étaient excrétées que dans les 6 premières heures suite à une administration sous forme orale ou injectable (Kazlauskas, 1998). Une autre étude a démontré que le rapport DHEA-S/DHEA-G était altéré de manière significative durant quelques heures après la prise de DHEA orale chez des volontaires (Setiawati et al, 2001). Une suppression temporaire de la production de corticostéroïdes a aussi été signalée dans la littérature (Uralets et Gillette, 2001; Ueki et al, 1998). Récemment, Uralets et Gillette ont rapporté une concentration élevée en épiétiocholanolone dans la fraction sulfate de l'urine, proposant qu'il s'agisse d'un métabolite spécifique à long terme de l'usage de DHEA (Uralets et Gillette, 2001).

1.8 Paramètres diagnostiques de l'administration de DHEA orale

Le critère diagnostique de la prise de testostérone exogène est l'augmentation du rapport testostérone-G/épitestostérone-G (T/E) urinaire. Ce paramètre est donc mesuré de routine, ainsi que la concentration de testostérone, d'épitestostérone, d'androstérone et d'étiocholanolone lors des tests visant à détecter l'utilisation de stéroïdes anabolisants androgènes. La DHEA étant précurseur de la testostérone, il était logique d'étudier la modification de l'excrétion de ces paramètres urinaires. Des études ont toutefois démontré que l'excrétion de la testostérone glucuroconjuguée n'était pas augmentée chez tous les individus après l'administration par voie orale de DHEA (Van der Merwe, 1999; Dehennin et al, 1998; Bosy et al, 1998; Kazlauskas, 1998). Dehennin et son équipe ont également démontré que l'augmentation de la testostérone était accompagnée d'une élévation en épitestostérone chez le cheval castré et la jument, ce qui rendait le rapport T/E inopérant suite à une prise de 1 mg/kg de DHEA orale, l'épitestostérone agissant comme produit masquant (Dehennin e al, 2001). Les travaux de J.F. Lévesque ont montré que l'altération du rapport dépendait de sa valeur initiale, c'est pourquoi il ne peut servir de marqueur spécifique pour diagnostiquer l'administration exogène de DHEA (Uralets et Gillette, 2001; Lévesque et Ayotte, 1999; Bowers, 1999).

Les sondes de détection basées sur l'utilisation de la combinaison chromatographie et spectrométrie de masse (CG/SM) proposées à ce jour semblent à toutes fins pratiques inefficaces. *Dehennin et al.* ont tout d'abord proposé un seuil de 300 ng/mL pour l'excrétion de la DHEA-glucuronide (*Dehennin et al, 1998*), alors que *Ueki et al* ont proposé l'étude de la modification du rapport de la DHEA sur les métabolites de la cortisone, DHEA/THC (DHEA/tétrahydrocortisol) et DHEA/THE (DHEA/tétrahydrocortisone) (*Ueki et al, 1998*). L'augmentation

marquée de l'excrétion de l'androstérone et de l'étiocholanolone glucuroconguées à des niveaux excédant ceux mesurés normalement chez l'humain, et qui se traduit généralement par une augmentation suivie d'une diminution globale du rapport A/Et, a aussi été recommandée comme une sonde potentielle (*Uralets et Gillette*, 2001; Kazlauskas, 1998). Malheureusement, aucun de ces paramètres n'est réellement efficace au-delà de 8 heures après l'absorption et ils sont peu informatifs, c'est pourquoi ils doivent être appuyés par des analyses complémentaires.

Plusieurs équipes ont rapporté des changements du rapport isotopique ¹³C/¹²C de métabolites urinaires suite à l'administration de testostérone ou de précurseurs tels que la DHEA chez des volontaires (Shackleton et al, 1997; Ueki et Okano, 1999; Ueki et al, 2001; Ayotte et al, 2001a); Flenker et al, 1999; Horning et al, 1997). Ces résultats ont amené le développement de sondes faisant appel à la spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone afin de confirmer l'administration de DHEA d'origine exogène. L'altération des valeurs des rapports isotopiques de métabolites comme la DHEA-S et -G, l'androstérone-G et l'étiocholanone-G, métabolites urinaires finaux, semblerait suffisamment soutenue et constitue un outil diagnostique valable lorsque l'analyse est possible, i.e. au-delà des contraintes techniques inhérentes (Horning et al, 1997; Ayotte et al, 2001a; Ueki et al, 2001) (Tableau 1.1).

EFFETS	DURÉE	RÉFÉRENCES
100 et 300 ng/ ml max DHEA-G	6-8 h	Dehennin et al, 1998
DHEA-G	0-0 H	Lévesque et Ayotte, 1999
↑ Androstérone-G		Kazlauskas, 1998
↑ Étiocholanolone-G	0-7 h	Dehennin et al, 1998
↓ A/Et		Uralets et Gillette, 2001
↑ DHEA/THC > 1	pas applicable	Ueki et Okano, 1999
↑ DHEA/THE > 1		
		Bowers, 1999
T/E > 1	pas efficace*	Lévesque, 1998
		Uralets et Gillette, 2001
		Horning et al, 1997
↓ ¹³ C/ ¹² C		Horning et al, 1997
Androstérone-G	40 à 70 h	Ueki et al, 2001
Étiocholanolone-G	en développement	Ayotte et al, 2001a
DHEA-S et -G		

^{*} Pas efficace: non universelle T/E et rapport isotopique: lorsque possible; contraintes techniques

Tableau 1.1 <u>Résumé des effets causés au profil stéroïdien par l'administration de</u>

<u>DHEA orale chez des volontaires.</u>

Autres considérations :

Les métabolites issus de l'administration orale de DHEA peuvent se trouver normalement dans l'urine humaine. L'élucidation du métabolisme doit être basée sur la comparaison des variations de concentrations des métabolites caractéristiques. Par ailleurs, la DHEA étant excrétée avec d'importantes variations intra- et inter-individuelles, il est illusoire de tenter d'utiliser comme

seul paramètre biochimique une concentration urinaire excédant des valeurs normales déterminées chez des populations de référence.

En plus des difficultés inhérentes de détection, le manque de contrôle sur la pureté des capsules de DHEA vendues commercialement complique la mise au point d'une méthode pouvant être appliquée à la détection de l'utilisation par les sportifs. En effet, la mise en marché de la DHEA étant régie par la loi des aliments naturels aux États-Unis, elle ne se trouve par conséquent soumise à aucun contrôle de qualité. Des analyses effectuées sur des préparations commerciales de DHEA ont d'ailleurs révélé que la teneur réelle en DHEA de produits disponibles commercialement pouvait varier de façon importante, 0 à 150% de l'étiquetage (Parasrampuria et al, 1998). De plus, certains produits et suppléments nutritionnels vendus sur le marché contiennent parfois des stéroïdes tels que la DHEA, sans qu'il en soit fait mention sur l'étiquette, ce qui rend encore plus difficile le contrôle de son utilisation (Pipe et Ayotte, 2002).

1.9 Hydroxylation de la DHEA: 7-hydroxy-DHEA

L'hydroxylation en position C-7 de la DHEA est effectuée dans les cellules épithéliales de nombreux tissus et organes, notamment dans le foie et dans l'intestin (Starka et Kutova, 1962; Doostzadeh et Morfin, 1996). On observe plus spécifiquement, à l'intérieur des cellules de la muqueuse intestinale la transformation de ce 3β -hydroxystéroïde en ses dérivés 7-oxo, 7α - et 7β -hydroxy-DHEA (Hampl et al, 1997; Morfin et Courchay, 1998; Khémis et al, 1998; Dootszadeh et al, 1998) (Figure 1.12).

$$CH_3$$
 CH_3
 CH_3

(Morfin et Courchay, 1998; Khémis et al, 1998; Dootstzadeh et al, 1998)

Figure 1.12 Oxygénation en position C-7 de la DHEA.

Ces dérivés oxygénés en position 7 pourraient possiblement être à l'origine de plusieurs effets bénéfiques attribués à la DHEA (Sulcova et al, 2001). Il semblerait en effet que certains de ces métabolites seraient plus actifs que la DHEA ellemême et qu'ils agiraient à titre de médiateurs métaboliques et d'immunomodulateurs dans le corps humain (Lardy et al, 1995). En particulier, la 7β-OH-DHEA aurait des propriétés d'immunomodulateur et d'antiglucocorticoïde que certains aimeraient utiliser en hormonothérapie (Hampl et al, 2000) et même des effets neuroprotecteurs (Morfin et Starka, 2001).

1.10 Étude de l'altération du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OHandrostérone

Les travaux de JF Lévesque et collaborateurs ont montré que l'excrétion des métabolites 7-hydroxylés était augmentée dans la fraction sulfate de l'urine après l'administration de DHEA orale (Lévesque et Ayotte, 1999). Plus particulièrement, l'augmentation de la concentration en 7β-OH-DHEA était prolongée sur une période allant de 12 à 23 heures après l'administration d'un comprimé contenant une dose de 200 mg de DHEA (au-dessus de la dose thérapeutique de 50 mg) chez trois volontaires. Conjointement à cette augmentation, une suppression de la concentration en 16α-OH-androstérone avait été notée, ce qui a amené les auteurs à proposer d'utiliser la modification du rapport [7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone] mesuré par CG/SM comme outil diagnostique de la prise orale de DHEA. Nos travaux visent à vérifier que l'altération de l'excrétion de ces deux stéroïdes soit bien due à l'administration de ce stéroïde et de tester cette sonde afin de mettre à l'épreuve son efficacité et sa fiabilité.

Afin d'effectuer la quantification des métabolites, nous avons dû obtenir les standards authentiques de ces stéroïdes dont certains n'étaient pas disponibles commercialement. La 7 β -OH-DHEA a été synthétisée par deux voies différentes impliquant respectivement 5 et 6 étapes. Les métabolites ont été caractérisés par CG/SM en comparaison avec les données décrites dans la littérature. Les dérivés triméthylsilyles (TMS-éther, TMS-énol) ont été préparés et quantifiés dans la fraction contenant les stéroïdes sulfoconjugués en utilisant la 6α -OH-étiocholanolone comme étalon interne. Afin de valider l'utilisation de la modification du rapport 7 β -OH-DHEA / 16α -OH-androstérone comme sonde de l'administration de DHEA, nous avons recueilli et analysé des échantillons provenant de volontaires n'ayant rien consommé (population de référence),

recueillis auprès d'athlètes et analysés dans le cadre de programmes de contrôle du dopage (la DHEA étant une substance bannie), ainsi que de volontaires ayant ingéré un comprimé commercial de DHEA. La moyenne géométrique du rapport 7β -OH-DHEA / 16α -OH-androstérone a été calculée pour chaque groupe, les limites statistiques, ont pu être établies et un seuil a été déterminé au-delà duquel l'administration de DHEA pourrait être prouvée.

L'utilité des méthodes permettant de déceler l'administration de stéroïdes naturels n'est pas restreinte au sport. En effet, ces stéroïdes étant disponibles commercialement, leur utilisation par la population doit pouvoir être mesurée dans certaines circonstances, notamment en toxicologie et en pathologie. De plus, les pressions commerciales subies par les producteurs de viande font que certains recourent à l'utilisation d'anabolisants qui étant réglementée doit pouvoir être vérifiée. Dans ce domaine également, l'utilisation de stéroïdes naturels n'est pas surveillée, les laboratoires invoquant la difficulté de tester de telles substances.

1.11 La spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone

La spectrométrie de masse de rapports isotopiques s'est révélée être très utile à la reconnaissance des métabolites caractéristiques et conséquemment, à la détection de stéroïdes de type endogène, tels la testostérone et ses précurseurs biochimiques, l'androstènedione et la DHEA. Cette approche analytique est basée sur la détermination du rapport ¹³C/¹²C caractéristique de chaque substance organique (Becchi, et al, 1994, Horning et al, 1997). Le mélange purifié est séparé par chromatographie en phase gazeuse, ses composants sont convertis par combustion en CO₂ dont la teneur en ¹³ C est déterminée par le spectromètre de masse. On

obtient ainsi des valeurs qui sont par convention exprimées en delta *per* mille (δ 13 C 0 / $_{00}$) et qui sont spécifiques à chaque stéroïde et ses métabolites d'excrétion (Becchi et al, 1994).

$$\delta = \left(\frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}} \frac{\text{ech}}{\text{réf}} - 1\right) \quad \text{x} \quad 1000$$

Dans un premier temps, on a proposé que des valeurs de -29 et moins sont généralement considérées comme des évidences d'administration de l'analogue synthétique (Becchi et al, 1994; Aguilera et al, 1996; Horning et al, 1997). Dans le cas de la DHEA et des suppléments nutritionnels, les valeurs de delta faibles (δ^{13} C $^{0}/_{00}$ -29 à -34) pour les métabolites urinaires comme le 5-androstène-3 β ,17 β -diol, la testostérone, l'androstérone, l'étiocholanolone, les $\delta\alpha$ - et $\delta\beta$ -androstane-3 α ,17 β -diol semblent pouvoir indiquer clairement une prise de DHEA exogène (Shackleton et al, 1997; Horning et al, 1997).

Il demeure cependant que des variations individuelles ainsi que la diète peuvent intervenir et modifier ce rapport. Shackleton a donc proposé l'analyse simultanée de métabolites urinaires non affectés par l'administration du stéroïde. L'établissement du rapport des valeurs de δ 13 C $^{0}/_{00}$ des métabolites urinaires provenant de l'administration du stéroïde sur celui des stéroïdes de référence permet d'en comparer l'origine. C'est ainsi qu'un rapport supérieur à 1.1 produit par une teneur diminuée en 13 C des métabolites urinaires diagnostiques sera caractéristique de leur origine synthétique et non endogène.

La différence entre le rapport ¹³C/¹²C des molécules d'origine végétale et animale vient du fait que la source de carbone des plantes résulte de la fixation du CO₂ de l'atmosphère, tandis que pour les animaux la source de carbone provient de leur diète (Horning et al, 1997; Becchi et al, 1994; Ueki et al, 2001). En effet, les fractionnements isotopiques de la matière organique sont causés chez les organismes vivants par des réactions enzymatiques, photosynthétiques et biosynthétiques, ce qui tend à réduire la teneur en ¹³C des molécules qui les composent.

Pour les humains, la principale source de DHEA endogène semble provenir du cholestérol alimentaire contenu dans le bœuf, le porc, le poulet et le poisson (Ueki et Okano, 1999), tandis que la DHEA commerciale est fabriquée à partir d'un stérol isolé d'une plante nommée Yam. Elle est obtenue par hémi-synthèse en extrayant la diosgénine, une molécule de la famille des sapogénines qui est par la suite transformée chimiquement. La DHEA synthétique est disponible en comprimés, en capsules liquides ainsi qu'en véhicules en permettant l'administration sublinguale (Van Hollenhoven et al, 1998).

1.12 Sommaire des objectifs

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire visent à vérifier l'altération du rapport des métabolites urinaires 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone suite à l'administration de DHEA par voie orale. Nous en vérifierons également l'origine synthétique et donc exogène en mesurant la teneur en ¹³C et en la comparant à celle d'autres stéroïdes urinaires non affectés par son administration. Ces travaux nous permettront ultimement de proposer une méthode de détection fiable de la DHEA dans l'urine par CG/SM, qui implique la quantification des métabolites sulfoconjugués.

	Résumé des objectifs de recherche					
1	Synthèse de la 7β-OH-DHEA					
2	Caractérisation de 7β-OH-DHEA et de 16α-OH-androstérone par CG/SM					
3	Extraction des stéroïdes sulfoconjugués de l'urine					
4	Quantification: - Choix de l'étalon interne					
	- Courbes d'étalonnage					
	- Développement de la méthode					
5	Détermination des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone					
6	Comparaison des rapports dans la population de référence, d'athlètes et de volontaires					
7	Analyse CG/C/SMRI					

Tableau 1.2 Résumé des objectifs de recherche.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 MATÉRIEL

2.1.1 Stéroïdes

La majorité des stéroïdes utilisés provient de chez Steraloids Inc. (Newport, RI, USA), soient; la 3β -hydroxy-5-androstèn-17-one (DHEA), la 3β , 16α dihydroxy-5-androstèn-17-one (16 α -OH-DHEA), la 3α , 6α -dihydroxy-5 β androstan-17-one (6α -OH-étiocholanolone, étalon interne), la 5α -androstan- 7α , 17β -dihydroxy-4-(16α-OH-androstérone), la 3α , 16α -diol-17-one 16α-OH-épiétiocholanolone, $(7\alpha$ -OH-testostérone), androstèn-3-one cholestérol, le pregnanediol, le pregnanetriol, le 5α -androstandiol, le 5β androstandiol, le 17α-méthylandrostandiol et l'androstérone. La 5β-androstanl'épiétiocholanolone, (11β-OH-étiocholanolone), 3α , 11β -diol-17-one l'étiocholanolone ont été achetées chez Sigma (St-Louis, MO, USA). La 3β,7βdihydroxy-5-androstèn-17-one (7β-OH-DHEA) a été synthétisée au Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologie du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) à Québec. La $3\beta,7\alpha$ -dihydroxy-5-androstèn-17-one (7α-OH-DHEA) a été généreusement donnée par le Professeur Robert Morfin (Paris, France). Les comprimés de DHEA (déhydroepiandrosterone, Ultimate Nutrition ®, Farmington état, USA) ont été achetés avec une autorisation de Santé Canada (permis d'importation no 8572.090.98)

2.1.2 Produits chimiques

2.1.2.1 Produits utilisés pour la synthèse

Les solvants, les réactifs, les sels et les acides utilisés proviennent tous de chez Aldrich-Sigma (Oalkland, ON, Canada), soient la pyridine, l'hexanes, le toluène, le dichlorométhane, le 1,4-dioxane, le méth nol, l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, la diisopropylamine, le méthanol deutéré, le chloroforme deutéré (CDCl₃), le trioxyde de chrome (CrO₃) l'anhydride acétique, le cyanoformate de méthyle (NCCOOCH₃), l'éthylène glycol, le bicarbonate de sodium (NaHCO₃), le chlorure de sodium, le sulfate de magnésium, le borohydrure de sodium, le sulfate de cuivre, le chlorure de cérium heptahydraté, le carbonate de potassium, l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique et l'acide *para*-toluène-sulfonique. Le gel de silice (35-70 μm) utilisé pour chromatographie en colonne provient de chez Silicycle Inc. (Québec, QC, Canada).

2.1.2.2 Produits utilisés pour l'isolement des stéroïdes de l'urine

Les solvants utilisés étaient de qualité CLHP ou distillés dans le verre. L'hexane, l'éther, le méthanol, le tétrahydrofurane et l'éther diéthylique proviennent de chez Caledon (Montréal, QC, Canada). L'acide sulfurique 4M, le tampon acétate pH 5,2 et le tampon carbonate pH 9 ont été préparés au laboratoire. Le tampon acétate est préparé par l'addition de 11,55 ml d'acide acétique dans 1000 ml d'eau filtrée millipore (solution A) et 16,4 g d'acétate de sodium dans 1000 ml d'eau (solution B). 105 ml de la solution A ont été ajoutés à 395 ml de solution B et portés à 1000 ml. Le pH doit être vérifié et ajusté à 5,2. La solution tampon carbonate 0,5 % est préparée en ajoutant 5 g de bicarbonate de sodium dans un volume total de 1000 ml d'eau. Le pH doit être

vérifié et ajusté à 9. Les cartouches Sep-Pak ® Plus C₁₈ ont été achetées chez Waters, l'eau a été déionisée et filtrée par un système Milli-Q (Millipore). L'azote de qualité zéro provient de chez Air Liquide Canada (Montréal, QC, Canada).

2.1.2.3 Produits utilisés pour la dérivation des extraits stéroïdiens

Le méthanol, l'hexanes et le dichlorométhane proviennent de la compagnie Caledon (Montréal, QC, Canada). L'iodotriméthylsilane (TMIS), la triéthylamine, la N-méthyl-N-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (MSTFA) et l'éthanethiol 99% ont été achetés chez Aldrich (Milwaukee, WY, USA).

2.1.3 Échantillons biologiques

Les échantillons analysés ont été recueillis dans le cadre des travaux effectués par Jean-François Lévesque en 1998 (Lévesque, 1998). Trois volontaires, deux hommes et une femme, informés et consentants, ont accepté de recueillir leurs spécimens urinaires 24 heures avant et 72 heures après l'ingestion d'un comprimé de DHEA (dose unique, 200 mg). Les échantillons d'urine analysés en vue de décrire les valeurs normales de référence ont été recueillis par 72 adultes sains et volontaires, hommes et femmes, n'ayant consommé aucune substance dopante. Ces valeurs ont également été déterminées chez une population de sportifs par le recueil des données provenant de l'analyse de 122 échantillons urinaires sélectionnés au hasard parmi ceux reçus dans le cadre de programmes de contrôle du dopage. Les matrices urinaires utilisées pour les analyses quantitatives sont constituées de spécimens combinés provenant d'enfants pré-pubères. Tous les échantillons ont été congelés et conservés à une température d'environ – 20°C. Les solutions urinaires utilisées pour les courbes d'étalonnage et les contrôles de quantification (QC) ont été préparées par

l'addition aux spécimens d'urine vierge de volumes précisément prélevés de 11 solutions méthanoliques stocks contenant des concentrations variables de 7β -OH-DHEA, de 16α -OH-androstérone et une concentration fixe de l'étalon interne, la 6α -OH-étiocholanolone.

2.1.4 Instrumentation

2.1.4.1 Détecteur sélectif de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG/SM)

L'analyse des extraits urinaires a été effectuée par un détecteur sélectif de masse (SM) modèle HP 5970B, couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG) modèle HP-5890, série 2 (Agilent Technologies, Mississauga, Canada). Les palliers de pression ont été calculés avec le logiciel HP Pressure/flow Calculator de Hewlett-Packard et le traitement des données a été opéré avec logiciel MS ChemStation de HP.

Les diverses composantes et conditions instrumentales sont les suivantes :

1. Injecteur: - Automatique HP 7673

- Mode de débit non partagé - Gaz vecteur : He

- Température de l'injecteur : 150 °C

2. Colonne: - Débit d'hélium: 0,77 ml/min ou 37,7 cm/sec

- Longueur : 25 m

- Diamètre interne : 0,2 mm

- HP-5; phase constituée de 5% de phényle polyméthyle

siloxane

- 33 μm d'épaisseur de phase

3. Détecteur : - Filtre quadrupolaire, Impact électronique 70 éV (EI)

- Température de l'interface entre le CG et le SM: 310 °C

4. Programmation de température du four :

5. Programmation manuelle de la pression sur le module EPC 100 All-tech relié au chromatographe :

2.1.4.2 Spectrométrie de masse d'isotopes stables : Combinaison chromatographe en phase gazeuse / four à combustion / spectromètre de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI)

L'analyse des extraits urinaires a été effectuée par un appareil PDZ Europa, modèle Anca-GSL (Cheshire, Angleterre), couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG) modèle HP-5890, série 2. L'appareil CG/C/SMRI est équipé d'un piège à eau (Nafion). Le gaz de référence est le CO₂ et le débit du gaz de combustion (hydrogène) ou «make-up gas» est d'environ 25-30 ml/min. Les données sont traitées par les logiciels Anca-GC et GC-Graph développés par PDZ Europa. Les diverses composantes et conditions instrumentales de chromatographie sont les mêmes que celles décrites préalablement.

2.1.4.3 Résonance magnétique nucléaire de l'hydrogène et du carbone (RMN ¹H, ¹³C)

Toutes les analyses des spectres RMN du proton et du carbone 13 effectuées sur les produits intermédiaires et finaux de synthèse ont été réalisées à température ambiante par un spectromètre de résonance magnétique nucléaire Brucker (Billirica, CA, USA) modèle AC300, opérant à 300 MHz. Les solvants utilisés pour les analyses RMN sont le chloroforme deutéré (CDCl₃) ou le méthanol deutéré (CD₃OD).

2.1.4.4 Spectrométrie de masse à basse résolution (SMBR)

Les spectres de masse à basse résolution ont été enregistrés avec un appareil Perkin Elmer, modèle Sciex API-150ex (Foster City, CA, USA), équipé d'une source « electrospray » en mode positif. La matrice utilisée était une solution méthanolique de formate d'ammonium.

2.1.4.5 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La pureté des produits de synthèse a été vérifiée par chromatographie liquide à haute performance. Chromatographe Waters Alliance 2690 (Milford, MA, États-Unis), muni d'un injecteur automatique et d'une colonne NovaPak, C₁₈, lot # W92401M136 de 150 mm de longueur par 3,9 mm de diamètre interne; détecteur UV Waters PDA 996 (barrette de diode) opérant à une longueur d'onde d'absorption de 205 nm. Le volume d'injection des analytes était de 20,00 μl, avec un débit de 1 ml/min pour la phase mobile et un temps d'acquisition de 45,0 minutes. La phase mobile était composée des solvants suivants :

- Solvant A: MeOH + $H_2O(9:1)$ + AcN $H_4(20 \text{ mM})$

- Solvant B: $H_2O + AcNH_4$ (20 mM)

Temps (min)	A	В
0	0	100
25	100	0
32	100	0
35	0	100
45	0	100

2.1.4.6 Spectroscopie infrarouge (IR)

La détermination de la présence de groupements fonctionnels sur les produits de synthèse a été réalisée par analyse infrarouge. Les analyses ont été effectuées à température ambiante par un spectromètre infrarouge à transformée de Fourrier (FTIR). L'appareil est un Perkin Elmer de série 1600 (Normalk, CT, USA). Les échantillons ont été dispersés dans une pastille de NaCl et analysés dans une zone de fréquence entre 1000 et 4000 cm⁻¹.

2.2 MÉTHODE

2.2.1 Synthèse de la 3β,7β-dihydroxy-androst-5-èn-17-one

2.2.1.1 Voie de synthèse A

3β-acétoxy-5-androstèn-17-one (1)

À une solution de 3β-hydroxy-5-androstèn-17-one (DHEA) (2,500 g, 8,67 mmoles) dans 33,4 ml de pyridine est ajouté de l'anhydride acétique (16,76 ml, 1,77 mmoles). La solution est agitée toute la nuit à la température de la pièce. Elle est ensuite traitée successivement avec de l'acide chlorhydrique (10 %) froid et une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO₃). L'extraction du produit brut est faite avec de l'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur sulfate de magnésium et filtrée sur buchner. L'évaporation du solvant donne 3,006 g d'un solide blanc qui est ensuite séché sous vide. Le produit brut n'est pas purifié avant de passer à l'étape suivante. Les caractéristiques spectrales sont semblables à celles décrites dans la littérature pour un produit similaire, la 3β-acétoxy-4,4-diméthyl-5-androstèn-17-one (Ruddock et al, 1999).

<u>IR $v(film)/cm^{-1}$ </u>: 1731 (C=O, cétone + ester), 1247 (C-O, ester).

<u>RMN ¹H δ (CDCl₃)/ppm</u>: 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 1.04 (s, 3H, 19-CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃CO₂), 2.45 (dd, J₁= 8.6 Hz J₂=8.8 Hz, 1H, 16-CH₂), 4.61 (m, 1H, 3 α -CH), 5.41 (d, J=5.0 Hz, 1H, 6-CH).

RMN ¹³C δ (CDCl₃)/ppm : 13.45, 19.24, 20.21, 21.32, 21.78, 27.58, 30.66, 31.31 (2x), 35.72, 36.62, 36.83, 37.96, 47.39, 50.03, 51.58 (C-14), 73.59 (3-C), 121.76 (6-C), 139.80 (5-C), 170.37 (CH₃CO₂), 220.84 (17-C=O).

3β-acétoxy-17,17-éthylènedioxy-5-androstène (2)

De l'éthylène glycol (10,2 ml , 181,96 mmoles) et de l'acide para-toluène-sulfonique (234,6 mg , 1,82 mmoles) sont ajoutés à une solution de 3β-acétoxy-androst-5-èn-17-one (1) (3,006 g , 9,09 mmoles) dans le toluène (150 ml). La solution est agitée à la température du reflux (110°C) toute la nuit avec un montage Dean-Stark. Le mélange réactionnel est amené à la température de la pièce et est ensuite lavé à l'eau et à la saumure. L'extraction du produit 2 est faite à l'acétate d'éthyle, la phase organique est séchée et évaporée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie «flash » sur gel de silice avec comme éluant un mélange acétate d'éthyle : hexanes (1:4 V:V). Deux fractions contenant respectivement 1,798 g du produit désiré pur (solide blanc) et 0,674 g d'un deuxième produit ont été recueillies. Un autre produit résiduel a été recueilli (0,471 g) en plus de ces deux fractions, ce qui donne un rendement 71 % pour les deux étapes (1 et 2) (Kim et al, 2000; Tchédam Ngatcha, 1999, Pouzar et Cerny, 1998).

<u>IR v(film)/cm⁻¹</u>: 1732 (C=O, ester), 1305 (-OCH₂CH₂O-, acétal), 1243

(C-O, ester).

RMN ¹H & (CDCl₃)/ppm: 0.86 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 2.03 (s, 3H,

CH₃CO), 3.90 (m, 4H, -OCH₂CH₂O-), 4.57 (m, 1H, 3α -

CH), 5.37 (d, J=4.7 Hz, 1H, 6-CH).

<u>RMN ¹³C δ (CDCl₃)/ppm</u>: 14.17, 19.29, 20.41, 21.41, 22.73, 27.72, 30.48, 31.20,

32.10, 34.15, 36.58, 36.96, 38.07, 45.66, 49,83, 50.52,

64.52, 65.17, 73.84 (3-C), 119.42 (17-C), 122.37 (6-C),

139.57 (5-C), 170.47 (ester)

SMBR: calculé pour $C_{23}H_{34}O_4$: 374.25, trouvé: 375.3 [M + H]⁺

3β-acétoxy-17,17-éthylènedioxy-5-androstèn-7-one (3)

A une solution de 3β-acétoxy-17,17-éthylènedioxy-5-androstène (2) (1,05 g, 2,67 mmoles) dans 60 ml de dichlorométhane anhydre sont ajoutés 57 ml (90,06 mmoles) d'une solution de réactif de Collins 1,6 M (10,680 g de CrO₃, 17,36 ml de pyridine et 200 ml de dichlorométhane anhydre. Le mélange réactionnel est introduit à l'aide d'une aiguille séchée à l'étuve dans un ballon à trois cols de 500 ml, séché à l'étuve et maintenu sous atmosphère d'argon. Le mélange est agité à la température de la pièce toute la nuit et maintenu sous argon. Du dichlorométhane anhydre est rajouté à l'occasion pour compenser la perte par évaporation. Le mélange est ensuite traité avec du sulfate de cuivre aqueux 1 M et extrait avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau et de la saumure, puis séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous vide. Un mélange de trois produits est obtenu, dont la purification est faite par chromatographie «flash» sur gel de silice (AcOEt/hexanes, (1:4 V:V)), tel que décrit précédemment. La masse du produit 3 est de 576 mg (solide blanc), pour un rendement de 68 %. 120 mg du produit de départ 2 est également recueilli, ainsi que 59 mg d'un produit inconnu. Les données spectrales se rapprochent de la littérature pour un composé similaire (Krafft et al, 1999) et sont décrites ci-dessous :

<u>IR v (film)/cm⁻¹</u>: 1733 (C=O, ester), 1672 (C=O, énone), 1243 (C=O,

ester).

RMN ¹**H δ(CDCl₃)/ppm**: 0.86 (s, 3H, 18-CH₃), 1.20 (s, 3H, 19-CH₃), 2.04 (s, 3H,

CH₃CO), 3.85 (m, 4H, -OCH₂CH₂O-), 4.71 (m, 1H, 3α -

CH), 5.69 (s, 1H, 6-CH).

 $RMN^{13}C \delta(CDCl_3)/ppm$: 14.40, 17.32, 20.63, 21.24, 25.04, 27.31, 29.58, 34.11,

35.99, 37.75, 38.26, 44.36, 45.35, 46.13, 49.74, 64.44,

65.20, 72.08 (3-C), 118.54 (17-C), 126.60 (6-C), 164.12

(5-C), 170.24 (ester), 201.23 (7-C).

SMBR: calculé pour $C_{23}H_{32}O_5$: 388.22, trouvé: 389.2 [M+ H]⁺

3β-acétoxy-7β-hydroxy-17,17-éthylènedioxy-5-androstène (4)

À une solution de 3β-acétoxy-17,17-éthylènedioxy-5-androstèn-7-one (3) (205 mg , 0,515 mmoles) dans 5 ml de THF et 5 ml de méthanol est ajouté du chlorure de cérium heptahydraté (191,8 mg , 0,515 mmoles). Du borohydrure de sodium (19,48 mg , 0,515 mmoles) est ensuite ajouté lentement et le mélange réactionnel est agité 1 heure à la température de la pièce. Le mélange est traité avec du chlorure d'ammonium et l'extraction du produit se fait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment et purifiée par chromatographie «flash » sur gel de silice avec comme éluant un mélange d'AcOEt/hexanes (2:5 V:V). Le poids du produit 4 est de 192 mg (solide blanc), pour un rendement de 96 %. 17 mg d'un composé inconnu est également recueilli. Les données spectrales se rapprochent de celles décrites dans la littérature pour un composé similaire (Labaree et al, 1997) et sont décrites ci-dessous :

<u>IR v(film)/cm⁻¹</u>: 3481 (OH), 1732 (C=O, ester), 1245 (C-O, ester).

RMN ¹**H δ(CDCl₃)/ppm**: 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 1.06 (s, 3H, 19-CH₃), 2.03 (s, 3H,

CH₃CO), 3.87 (m, 5H, -OCH₂CH₂O- et 7α-CH), 4.6 (m,

1H, 3α -CH), 5.30 (s, 1H, 6-CH).

RMN ¹³C δ(CDCl₃)/ppm: 14.17, 18.99, 20.33, 21.29, 24.84, 27.57, 30.03, 34.19,

36.50, 36.59, 37.49, 40.76, 45.98, 47.88, 49.78, 64.43,

65.11, 73.08 73.29, 118.84 (17-C), 126.52 (6-C), 142.01

(5-C), 170.41 (ester).

SMBR: calculé pour $C_{23}H_{34}O_5$: 390.24, trouvé: 391.3 [M+H]⁺

3β-acétoxy-7β-hydroxy-5-androstèn-17-one (5)

À une solution de 3β-acétoxy-7β-hydroxy-17,17-éthylènedioxy-5-androstène (4) (130 mg , 0,333 mmoles) dans 25 ml de 1,4-dioxane sont ajoutés 5 ml d'acide sulfurique aqueux 5% V:V. Le mélange réactionnel est agité 2 heures à la température de la pièce. Le mélange est ensuite traité avec du bicarbonate de sodium saturé jusqu'à pH 7 et l'extraction est faite avec de l'acétate d'éthyle. Après un lavage à l'eau, un lavage à la saumure et un séchage sur sulfate de magnésium, le solvant est séché et évaporé sous vide. Une purification n'est pas nécessaire car la réaction semble donner un seul produit sur CCM (AcOEt/hexanes (2:5 V:V)). Les données spectrales se rapprochent de celles décrites dans la littérature pour un composé similaire (Tchédam Ngatcha, 1999) et sont décrites ci-dessous :

<u>IR $v(film)/cm^{-1}$ </u>: 3436 (OH), 1732 (C=O, ester + cétone), 1246 (C-O, ester).

<u>RMN ¹H δ (CDCl₃)/ppm</u>: 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.09 (s, 3H, 19-CH₃), 2.01 (s, 3H, CH₃CO), 2.47 (dd, J₁=9.1 Hz J₂=9.1 Hz, 1H, 16-CH₂), 3.96(s, 1H, 7 α -CH), 4.6 (m, 1H, 3 α -CH), 5.33 (s, 1H, 6-CH).

RMN ¹³C δ (CDCl₃)/ppm : 13.51, 19.02, 20.27, 21.29, 24.12, 27.53, 31.12, 35.91, 36.53, 36.65, 37.49, 40.17, 47.67, 48.07, 51.06, 72.55, 73.17, 126.37 (6-C), 142.35 (5-C), 170.44 (ester), 221.06 (cétone).

<u>SMBR</u>: calculé pour $C_{21}H_{30}O_4$: 346.21, trouvé : 364.3 $[M+NH_4]^+$

3β,7β-dihydroxy-5-androstèn-17-one (7β-OH-DHEA) (6)

À une solution de 3β-acétoxy-7β-hydroxy-5-androstèn-17-one (5) (95 mg, 0,274 mmoles) dans 10 ml de méthanol est ajouté du carbonate de potassium en solution aqueuse 0,5 M (2,2 ml, 1,097 mmoles). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à la température de la pièce et traité avec de l'acide chlorhydrique 10 % jusqu'à pH 7. L'extraction est faite avec de l'acétate d'éthyle. Après un lavage à l'eau, un lavage à la saumure et un séchage sur sulfate de magnésium, le solvant est évaporé et séché. La purification du produit brut se fait par chromatographie « flash » sur gel de silice. Les produits non polaires sont élués avec un mélange d'acétate d'éthyle:hexanes (3:5 V:V) et le produit 6 est recueilli en éluant avec de l'acétate d'éthyle:hexanes (1:2 V:V). Le solvant est évaporé tel que précédemment décrit. La masse du produit 6 est de 59 mg (solide blanc), pour un rendement de 61 % pour les deux étapes (4 et 6). Les caractéristiques spectrales sont identiques à celles décrites dans la littérature (Pouzar et Cerny, 1998) et sont décrites ci-dessous :

IR v (film)/cm⁻¹: 3369 (OH), 1732 (C=O, cétone).

RMN 1H δ(CDCl₃)/ppm: 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07 (s, 3H, 19-CH₃), 2.44 (dd,

 $J_1=8.7$ Hz, $J_2=10.2$ Hz, 1H, 16-CH₂), 3.6 (m, 1H, 3 α -CH), 3.95 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 7 α -CH), 5.31 (s, 1H, 6-

CH).

RMN ¹³C δ(CDCl₃)/ppm : 13.99, 19.51, 21.56, 25.20, 32.26, 32.51, 36.87, 37.78,

38.15, 40.79, 42.54, ≈49 (deux pics sous le solvant), 52.64, 72.04, 73.29, 127.23 (6-C), 144.15 (5-C), 224.16

(cétone).

SMBR: calculé pour $C_{19}H_{28}O_3$: 304.20, trouvé: 305.4 [M+H]⁺,

322.4 [M+NH₄]⁺

	18-CH ₃	19-CH ₃	3α-СН	7α-СН	6-CH	CH ₃ COO	-OCH ₂ CH ₂ O-
1	0.89	1.05	4.61		5.41	2.04	
2	0.86	1.02	4.57		5.37	2.03	3.90
3	0.86	1.20	4.71		5.69	2.04	3.85
4	0.87	1.06	4.6	3.87	5.30	2.03	3.87
5	0.87	1.06	4.6	3.96	5.31	2.01	
6	0.89	1.07	3.6	3.95	5.31		

Tableau 2.1 : <u>Résumé des données RMN ¹H (CDCl₃) des produits intermédiaires et finaux obtenus de la voie A de synthèse</u>

7β-ОН-DHEA

	1	2	3	4	5	6
			a control of the cont		NE CONTRACTOR	
		H.E.				
1-C	36.83	36.96	37.74	37.49	36.53	38.15
2-C	27.58	27.72	27.31	27.57	27.53	32.26
3-C	73.59	73.84	72.08	73.08	72.55	72.04
4-C	37.96	38.07	44.36	40.76	40.17	40.79
5-C	139.80	139.57	164.12	142.01	142.35	144.15
6-C	121.76	122.37	126.60	126.52	126.37	127.23
7-C	31.31	32.10	201.23	73.30	73.17	73.30
8-C	30.66	31.20	35.99	36.50	37.50	42.54
9-C	50.03	49.83	45.35	47.88	48.07	49
10-C	65.62	36.58	38.26	?	36.65	37.78
11-C	20.21	20.41	20.63	20.33	20.27	21.56
12-C	31.31	34.15	34.12	34.19	31.12	32.51
13-C	47.39	45.67	46.13	45.98	47.67	48.16
14-C	51.58	50.52	49.74	49.78	51.06	52.64
15-C	21.77	22.73	25.04	24.83	24.12	25.20
16-C	35.72	30.49	29.59	30.03	35.91	36.87
17-C	220.84	119.42	118.54	118.84	221.06	224.16
18-C	13.45	14.17	14.40	14.17	13.51	13.99
19-C	19.24	19.29	17.33	18.99	19.02	19.51
<i>CH₃<u>C</u>00</i>	170.37	170.47	170.24	170.41	170.44	
<u>C</u> H₃COO	21.32	21.40	21.24	21.29	21.29	
O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₂ O	***	64.52-65.47	64.44-65.20	64.43-65.11		

^{*} Le produit 6 a été dissous dans du CD₃OD pour les analyses RMN ¹³C.

Tableau 2.2 : <u>L'ensemble des données RMN ¹³C (CDCl₃) des produits</u> <u>intermédiaires et finaux obtenus de la voie A de synthèse</u>

2.2.1.2 Voie de synthèse B

3β-acétoxy-5-androstèn-7,17-dione (7)

Dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (section 2.2.1.1), à une solution de 3β-acétoxy-5-androstèn-17-one (1) (1,00 g , 3,03 mmoles) dans 60 ml de dichlorométhane anhydre sont ajoutés 56 ml (90,35 mmoles) d'une solution de réactif de Collins 1,6 M. Après agitation toute la nuit à la température ambiante et sous atmosphère d'argon, on ajoute du sulfate de cuivre et extrait avec du dichlorométhane. La purification est faite par chromatographie «flash» sur gel de silice avec un mélange d'acétate d'éthyle:hexane (1:10 V:V) pour débuter l'élution et (1:4 V:V) pour éluer le dernier composé. La masse du produit désiré 7 est de 580 mg (solide blanc), pour un rendement de 56 %. Une partie du produit de départ 1 est également récupérée (235 mg), ce qui augmente le rendement global à 69 % pour cette réaction. Les données spectrales se rapprochent de celles décrites dans la littérature pour la 3,3-éthylènedioxy-17β-acétoxy-5-androstèn-7-one (Krafft et al, 1999) et sont décrites ci-dessous :

IR v (film)/cm⁻¹: 1737 (C=O, ester + cétone), 1669 (C-O, énone), 1242

(C=O, ester).

RMN ¹**H \(\delta(CDCl_3)/ppm\)**: 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-CH₃), 2.06 (s, 3H,

CH₃CO), 4.73 (m, 1H, 3 α -CH), 5.75 (s, 1H, 6-CH).

RMN ¹³C δ(CDCl₃)/ppm: 13.73, 17.37, 20.54, 21.23, 24.15, 27.27, 30.67, 35.63,

35.94, 37.81, 38.44, 44.34, 45.71, 47.85, 49.94, 71.93,

126.52 (6-C), 164.78 (5-C), 170.26 (ester), 199 (7-C),

202, 220 (17-C).

SMBR: calculé pour $C_{21}H_{28}O_4$: 344.20, trouvé: 345.2 [M + H]⁺

3β -acétoxy- 17α -cyano- 17β -méthoxycarbonyloxy-5-androstèn-7-one (8)

À une solution de 3β-acétoxy-5-androstèn-7,17-dione (7) (0,150 mg , 0,436 mmoles) dans 6 ml de tétrahydrofurane, sont ajoutés de la diisopropylamine (1,2 ml , 4,355 mmoles) et du cyanoformate de méthyle (NCCOOCH₃) (200 mg , 2,178 mmoles). Le mélange réactionnel est introduit dans un ballon de 10 ml et agité à la température de la pièce toute la nuit. La solution passe du jaune au rouge après quelques heures. La réaction est ensuite arrêtée avec de l'eau et de l'acide chlorhydrique 10 % V:V est ajouté jusqu'à pH 7. L'extraction du mélange est faite à l'acétate d'éthyle et la phase organique est séchée et évaporée tel que décrit précédemment. La purification est faite par chromatographie «flash » sur gel de silice avec un mélange d'acétate d'éthyle:hexanes (1:4 V:V). La masse du produit désiré 8 est de 129 mg (solide blanc), pour un rendement de 69 %. Les données spectrales se rapprochent de celles décrites dans la littérature pour un composé similaire (*Berthiaume et Poirier*, 2000) et sont décrites ci-dessous :

<u>IR v(film)/cm⁻¹</u>: 1761 (C=O, carbonate), 1736 (C=O, ester), 1672 (C=O, énone)

RMN ¹H δ(CDCl₃)/ppm: 0.94 (s, 3H, 18-CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃COO), 3.84 (s, 3H, 17-OCOOCH₃), 4.7 (m, 1H, 3α-CH), 5.74 (s, 1H, 6-CH).

RMN ¹³C δ(CDCl₃)/ppm : 12.97, 17.25, 20.54, 21.14, 25.61, 27.14, 32.48, 35.54, 35.85, 37.70, 38.21, 43.45, 45.02, 48.14, 48.97, 55.30, 71.64, 84.25 (C-17), 117.99 (C=N), 126.18 (6-C), 153.75 (carbonate), 164.60 (5-C), 170.13 (ester), 199.78 (7-C).

<u>SMBR</u>: calculé pour $C_{24}H_{31}NO_6$: 429.22, trouvé: 430.4 [M+ H]⁺, 447.2 [M+NH₄]⁺, 532.2 [M+A+NH₄]⁺ (où A = CH₃OCOCN)

3β-acétoxy-7β-hydroxy-17α-cyano-17β-méthoxycarbonyloxy-5androstène (9)

3β-acétoxy-17α-cyano-17β-méthoxycarbonyloxy-5solution de androstèn-7-one (8) (124 mg, 0,289 mmoles) dans 10 ml de THF et 10 ml de méthanol, est ajouté du chlorure de cérium heptahydraté (108 mg, 0,289 mmoles). Du borohydrure de sodium (21,84 mg, 0,578 mmoles) est ensuite introduit lentement et le mélange réactionnel est agité 2 heures à la température de la pièce. La solution est traitée avec du chlorure d'ammonium et l'extraction du produit est réalisée avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée, séchée et évaporée tel que décrit précédemment. Une purification n'est pas nécessaire pour cette étape, car un seul produit est visible sur CCM (AcOEt/hexanes (2:5 V:V)). La masse du produit désiré brut 9 est de 104 mg (huile transparente). Les données spectrales se rapprochent de celles décrites dans la littérature pour un composé similaire (Labaree et al, 1997) et sont décrites ci-dessous :

 $IR \ v(film)/cm^{-1}$:

~3500 (OH), 1762 (carbonate), 1732 (C-O, ester), 1245

(C=O, ester).

 $RMN^{1}H \delta(CDCl_{3})/ppm$:

0.94 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07 (s, 3H, 19-CH₃), 2.03 (s, 3H,

CH₃CO), 2.90 (m, 1H), 3.83 (m, 3H, OCOOCH₃), 3.90 (d, J=10.0 Hz, 7α -CH), 4.7 (m, 1H, 3α -CH), 5.30 (s, 1H,

6-CH).

RMN ^{13}C δ (CDCl₃)/ppm : 12.80, 18.96, 20.33, 21.28, 25.55, 27.48, 33.04, 35.66,

36.50 (2 x), 37.43, 40.58, 47.20, 47.93, 48.91, 55.29,

72.68, 73.14, 84.71 (C-17), 118.31 (C \equiv N), 126.34 (6-C),

142.14 (5-C), 153.83 (carbonate), 170.40 (ester).

3β,7β-dihydroxy-5-androstèn-17-one (7β-OH-DHEA) (6)

À 3β-acétoxy-7β-hydroxy-17α-cyano-17β-méthoxyune solution carbonyloxy-5-androstène (9) utilisé tel qu'obtenu précédemment (88 mg, 0,204 mmoles) dans 8 ml de méthanol, est ajouté du carbonate de potassium en solution aqueuse 0.5 M (1,6 ml, 0,816 mmoles). Le mélange réactionnel est agité 1h30 à la température de la pièce et est ensuite traité avec de l'acide chlorhydrique 10 % jusqu'à pH 7. L'extraction du mélange est faite à l'acétate d'éthyle, puis la phase organique est séchée et évaporée tel que précédemment décrit. La purification du produit brut se fait par chromatographie « flash » sur gel de silice et le système d'éluants utilisé pour la purification est un mélange d'acétate d'éthyle:hexanes (3:5 V:V). La masse du produit désiré 6 est de 24 mg, en plus de 7 mg d'une fraction à 50 % non purifiée, pour un rendement de 68 % pour les deux dernières étapes (8 à 6). Les caractéristiques spectrales sont identiques à celles obtenues pour la voie A et à celles décrites dans la littérature (Lévesque, 1998). La pureté de 94,5 % a été déterminée par CLHP.

							OCH ₂ CH ₂ O
7	0.89	1.24	4.73		5.75	2.06	****
8	0.94	1.24	4.70		5.74	2.06	3.81
9	0.94	1.07	4.70	3.90	5.30	2.06 2.06 2.03	3.83

Tableau 2.3: <u>Résumé des données RMN ¹H (CDCl₃) des produits intermédiaires et</u> <u>finaux obtenus de la voie B de synthèse</u>

	7	8	9
	**************************************	P CONS	A CHAIR CHAI
1-C	37.81	37.70	37.43
2-C	27.27	27.14	27.48
3-C	71.93	71.64	72.68
4-C	44.34	43.45	40.58
5-C	164.78	164.60	142.14
6-C	126.52	126.18	126.34
7-C	199	199.78	73.14
8-C	35.94	35.85	36.50
9-C	45.71	45.02	47.20
10-C	38.44	38.21	36.50
11 -C	20.54	20.54	20.33
12-C	30.67	32.48	33.04
13 - C	47.85	48.14	47.93
14-C	49.94	48.97	48.91
15-C	24.15	25.61	25.55
16-C	35.63	35.54	35.66
17 -C	220	118.00	118.31
18-C	13.73	12.97	12.80
19-C	17.37	17.25	18.96
<i>CH₃<u>C</u>00</i>	170.26	170.13	170.40
<u>C</u> H₃C00	21.23	21.14	21.28
О <u>С</u> ООСН₃		153.75	153.83
0С00 <u>С</u> Н3		55.30	55.29
CN		84.25	84.71

Tableau 2.4 : <u>L'ensemble des données RMN ¹³C (CDCl₃) des produits</u> <u>intermédiaires et finaux obtenus de la voie B de synthèse</u>

2.2.2 Isolement et hydrolyse des stéroïdes sulfoconjugués de l'urine

L'isolement des stéroïdes sulfoconjugués est effectué tel que précédemment décrit (Ayotte et al, 1996; Lévesque, 1998). Typiquement, des volumes d'urine de 1,5 à 10 ml prélevés précisément en fonction de la gravité spécifique (ρ_É) du spécimen sont dilués avec un volume équivalent de tampon acétate 0,2 M (pH 5,2) (les concentrations urinaires sont corrigées pour une ρ_É moyenne de 1.020). Ensuite, 50 μl d'une solution méthanolique de l'étalon interne (6α-OH-étiocholanolone, 10,56 μg/ml) sont ensuite ajoutés dans chaque tube. Les échantillons sont passés sur une cartouche Sep-Pak ® Plus C₁₈ préalablement conditionnée avec 5 ml de méthanol et 5 ml d'eau déionisée. Les colonnes sont lavées avec 5 ml d'eau et 5 ml d'hexanes puis les stéroïdes sont élués avec 5 ml de méthanol. Le solvant est évaporé à sec sous un jet d'azote à 40°C.

La solvolyse est effectuée par l'addition aux culots de 2 µl d'acide sulfurique 4 M et 1 ml de THF, en chauffant 60 minutes à 50 °C. Après l'addition de 1 ml d'une solution aqueuse de NaHCO₃ 0,5% P:V amenant le pH à 9 (préparation mentionnée à la section 2.1.2.2.), l'extraction est effectuée deux fois avec 5 ml d'éther diéthylique. Le solvant est évaporé sous jet d'azote, les résidus sont repris dans 200 µl de méthanol, transférés dans des vials coniques qui sont bouchés après évaporation du solvant.

Les échantillons préparés en vue de l'analyse par CG/C/SMRI ont été repris dans 10 µl de méthanol et analysés comme tel. Ceux analysés par CG/SM en vue d'identifier et de quantifier les métabolites urinaires, l'ont été après l'obtention des dérivés TMS-éther et TMS-énol.

Tel que décrit plus haut, les dérivés TMS-éther, TMS-énol sont préparés et analysés par CG/SM (Ayotte et al, 1996). Typiquement, par une légère modification de la méthode proposée par Donike et Zimmerman (1980), le

réactif de dérivation est préparé dans un vial bouché sous un jet d'azote par l'addition de 3 ml de MSTFA, 60 μ l d'éthanethiol et 60 μ l d'une solution de TMIS; elle-même préparée par l'addition de 70 μ l de TMIS, 1 μ l de triéthylamine dans 180 μ l de dichlorométhane.

La réaction est complétée par l'addition aux culots de 50 µl de ce réactif et chauffage à 70°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont analysés comme tel.

2.2.3 Analyse des métabolites par CG/SM

Les métabolites urinaires, 7β-OH-DHEA, 16α-OH-androstérone ont été identifiés sous la forme de leur dérivé TMS-éther, TMS-énol par l'analyse CG/SM en mode de balayage continu (scan de 50 à 700 amu) des extraits obtenus et préparés précédemment. La comparaison des temps de rétention et des spectres de masse a été effectuée avec ceux obtenus de l'analyse des standards authentiques. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus des études antérieurement effectuées (Lévesque, 1998).

Les spectres de masse des dérivés TMS-énol, qui sont les plus informatifs, sont caractérisés par la présence des ions à m/z 430 (M-TMSOH: -90), 415 (M-TMSOH-CH3:-15), 325 (M-2TMSOH-CH3) et 520 (M $^+$) pour la 7 β -OH-DHEA et à m/z 507 (M-CH3), 417 (M-TMSOH-CH3), 147 (TMSO=Si(CH3)) et 522 (M $^+$) pour la 16 α -OH-androstérone. Le temps de rétention relatif de la 7 β -OH-DHEA est à 0,24 min de la 16 α -OH-androstérone et à 0,5 min de l'étalon interne. La 6 α -OH étiocholanolone a été choisie comme étalon interne pour la quantification en raison de sa structure similaire aux deux métabolites d'intérêt (6 α -OH + 3 β -OH-5 β -androstan-17-one) et son temps de rétention similaire.

2.2.4 Quantification de la 7β-OH-DHEA et de la 16α-OHandrostérone

Les concentrations des métabolites sont déterminées par l'obtention des rapports de la surface de leur pic sur celle de l'étalon interne et en référence aux courbes d'étalonnage préparées et analysées simultanément. Typiquement, 19 échantillons urinaires sont préparés et analysés avec les huit échantillons nécessaires à la préparation de la courbe d'étalonnage et les trois échantillons contrôle (QC).

Un seul ion par produit est utilisé pour calculer les rapports de surface, soit l'ion à m/z 430 (M-TMSOH) pour la 7 β -OH-DHEA, à m/z 507 (M-CH₃) pour la 16 α -OH-androstérone et à m/z 522 (ion moléculaire) pour la 6 α -OH-étiocholanolone (étalon interne). Pour être retenues, les droites obtenues doivent toujours avoir un coefficient de corrélation linéaire (R²) supérieur à 0,950, ainsi qu'une équation de type (Concentration = 1*Ratio + 0).

Les 8 échantillons urinaires utilisés pour les courbes d'étalonnage, qui contiennent les deux métabolites en concentrations variables et l'étalon interne, ont été préparés à l'avance une seule fois et conservés congelés. Ils sont fabriqués à partir de solutions méthanoliques stocks contenant de 0.8 à 15 ng/ μ l de 7β -OH-DHEA et de 16α -OH-androstérone. 50 μ l de ces 8 solutions sont prélevés et dilués dans un volume fixe de blanc urinaire (5 ml) dont la gravité spécifique a été préalablement ajustée à 1.020 par l'ajout d'eau déionisée. La concentration de l'étalon interne (6α -OH-étiocholanolone) est quant à elle fixée à 10.56 ng/ μ l.

Les échantillons urinaires utilisés comme contrôle (QC) contiennent respectivement 1.32, 6.6 et 14.3 ng/ μ l de 7 β -OH-DHEA et 1.30 , 6.48 et 14.04 ng/ μ l de 16 α -OH-androstérone. Afin qu'une courbe d'étalonnage soit validée,

les résultats obtenus ne doivent pas varier de plus de 10% de leur valeur théorique. De plus, l'identité des pics est vérifiée systématiquement par la précision des temps de rétention (+ ou - 0,5 min) et des rapports relatifs des ions comparés à l'ion le plus abondant ; m/z 430 (100%), 415 (71%), 325 (47%) pour la 7 β -OH-DHEA, m/z 507 (100%), 522 (26%) pour la 16 α -OH-androstérone et m/z 522 (100%), 327 (90%), 417 (32%) pour la 6 α -OH-étiocholanolone.

Le rapport des concentrations mesurées de 7 β -OH-DHEA (ion m/z 430) sur celles de la 16 α -OH-androstérone (ion m/z 507) constitue le rapport 7 β -OH-DHEA/16 α -OH-androstérone qui est obtenu pour des échantillons faisant partie d'une population de référence, une population d'athlètes et de volontaires à la DHEA.

2.2.5 Analyse des rapports isotopiques du carbone par CG/C/SMRI

Afin de confirmer l'origine exogène des métabolites dont l'excrétion est altérée par l'administration orale de DHEA, nous avons analysé des extraits urinaires purifiés, mais non dérivés, par CG/C/SMRI. Nous avons mesuré la teneur en 13 C des métabolites principaux, soient la DHEA-S et la 7β -OH-DHEA-S et d'un stéroïde urinaire de référence, le cholestérol-S, non affecté par la prise du supplément.

Les rapports isotopiques sont exprimés en delta (δ) per mille et sont calculés selon la formule :

$$\delta (\%) = (^{13}\underline{C/^{12}C})_{\text{\'echantillon}} \times 1000$$
$$(^{13}C/^{12}C)_{\text{\'ef\'erence}}$$

La notation standard du rapport est exprimée en delta pour mille (δ^{13} C ‰) par rapport à une référence internationale, qui est un carbonate de fossile (CaCO₃) provenant de la ville de Pee-Dee aux États-Unis (v-PDB). Les rapports (13 C/ 12 C) ont été calculés pour la DHEA-S, la 7 β -OH-DHEA-S, ainsi que pour le cholestérol-S. Les analyses ont été effectuées sur des extraits urinaires de volontaires à la DHEA ainsi que sur des échantillons d'athlètes choisis pour leur rapport [7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone] élevé. Les extraits urinaires ont été analysés directement sans être dérivés afin de ne pas altérer la teneur en 13 C des stéroïdes par l'addition d'atomes de carbone synthétique.

Les mêmes paramètres de pression et de température par paliers ont été conservés pour la méthode programmée manuellement sur le chromatographe en phase gazeuse, sauf que la durée d'acquisition a été allongée de deux minutes afin de permettre l'élution complète du pic de cholestérol (Lévesque, 1998).

Les conditions analytiques n'ont pas permis la séparation de la 7β -OH-DHEA d'un autre métabolite de la DHEA, la 4ϵ -OH-DHEA. L'excrétion de ces deux métabolites étant augmentée simultanément après l'administration de DHEA et la 7β -OH-DHEA étant nettement plus abondante que la 4ϵ -OH-DHEA, nous avons décidé de considérer les deux métabolites co-éluants comme un seul lors des calculs de delta.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus lors de la synthèse de la 3β , 7β -dihydroxy-5-androstèn-17-one (7β -OH-DHEA), en analysant et comparant les rendements des deux voies de synthèse utilisées. Les données spectrales (RMN 1 H, 13 C, IR et SMBR) de chaque composé intermédiaire seront également décrites et commentées lorsque nécessaire. Par la suite, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus de la détermination du rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone dans des échantillons urinaires de diverses provenances afin d'en établir ultimement l'efficacité en tant qu'outil diagnostique de l'administration orale de DHEA.

Les spectres de masse des métabolites d'intérêt ainsi que les chromatogrammes représentatifs des profils d'excrétion urinaire pré- et post-administration seront aussi présentés. Les données compilées et analysées nous permettront de décrire les valeurs normales mesurées dans des populations de référence et altérées chez les « positifs » ; nous en décrirons les caractéristiques en établissant les moyennes, les écart-types et proposerons des seuils limites.

Finalement, les résultats des déterminations des teneurs en ^{13}C effectuées sur certains métabolites sulfoconjugués de la DHEA seront présentés. Les valeurs de δ ^{13}C $^{0}\!/_{00}$ de ces métabolites ayant été clairement altérées par l'administration de

DHEA en conformité avec son origine synthétique, nous avons ainsi pu valider leur caractère diagnostique. En effet, la teneur en ¹³C mesurée chez la DHEA et la 7β-OH-DHEA excrétées dans l'urine sous leur forme sulfoconjuguée était diminuée de façon similaire à celle mesurée chez la DHEA synthétique présente dans les comprimés et différait significativement du cholestérol présent dans le même extrait. Ces résultats nous permettront d'exclure des contributions naturelles exacerbées par des facteurs de stress notamment.

3.2 Synthèse de la 3β,7β-dihydroxy-5-androstèn-17-one

3.2.1 Voie de synthèse A

Tel que présenté à la **figure 3.1**, la première approche utilisée était basée sur l'hydroxylation directe de la DHEA après protection des groupements hydroxyle en C-3 et cétonique en C-17 par la formation de dérivés acétyle et éthylènedioxy respectivement. La cétone en C-7 est introduite par l'utilisation du réactif de Collins, puis réduite, avant d'effectuer la déprotection de l'alcool et de la cétone aux positions 3 et 17, respectivement.

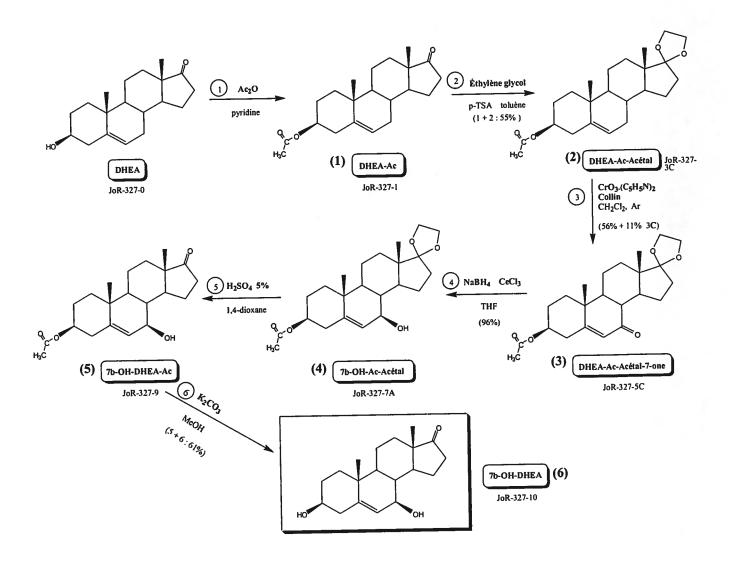


Figure 3.1 : <u>Protocole de synthèse de la 7β-OH-DHEA</u>, voie <u>A</u>.

1) Ac₂O, pyridine; 2) Éthylène glycol, p-TSA, toluène, THF, (71 %); 3) CrO₃,(C₅H₅N)₂, réactif de Collins, CH₂Cl₂ Ar, (68 %); 4) NaBH₄, CeCl₃, THF, MeOH, (96 %); 5) H₂SO₄ aq, 1,4-dioxane; 6) K₂CO₃ 0,5 M aq, MeOH, (61 % de 4 à 6).

Tel que décrit par *Ruddock et al* en 1999, la première étape consistait en une réaction très classique qui visait la protection de l'alcool en position C-3β de la DHEA par l'emploi d'anhydride acétique. La conversion de la cétone du produit 1 en acétal cyclique a ensuite été réalisée à l'aide de l'éthylène glycol dans le toluène, en présence d'un catalyseur acide, l'acide p-toluène sulfonique, selon le protocole légèrement modifié décrit par *Pouzar et al*, 1998.

Par la suite, on utilise le réactif de Collins qui agit à titre de puissant oxydant en présence d'une double liaison. Ayant lieu dans le dichlorométhane, cette oxydation allylique en position C-7 exige des conditions anhydres, car le réactif de Collins perd sa réactivité en présence de traces d'eau.

La solution finale est traitée avec du sulfate de cuivre aqueux 1M pour éliminer le surplus de réactif de Collins (Krafft et al, 1999). L'addition nucléophile du borohydrure de sodium sur le groupement carbonyle est réalisée en présence du trichlorure de cérium, tout en laissant la double liaison intacte, selon la méthode décrite par Labaree et al, 1997. Une réduction de l'énone en position C-7 pour un produit similaire a été décrite dans la littérature pour les mêmes conditions de réaction (NaBH₄/CeCl₃/THF/MeOH), où l'épimère β avait été obtenu de façon très stéréospécifique au détriment de l'épimère α (Kumar et al, 1987).

Finalement, le groupement acétal protecteur du carbonyle est facilement hydrolysé en milieu acide pour générer la cétone en position C-17 (*Tchédam Ngatcha*, 1999) alors que l'hydrolyse du groupement acétate en milieu basique permet de retrouver le groupement hydroxyle à la position C-3β (*Berthiaume et Poirier*, 2000).

La synthèse de la 7β-OH-DHEA (6) par cette voie classique est satisfaisante, le produit ayant été obtenu avec un rendement global de 59 %. Les pertes ont été causées lors de la réaction d'oxydation qui a occasionné la formation de plusieurs produits secondaires de polarité similaire et dont la séparation s'est révélée être plus difficile. Les rendements finaux étaient cependant acceptables.

3.2.2 Voie de synthèse B

Tel que présenté à la **figure 3.2**, la deuxième approche employée était basée sur l'oxydation de la DHEA par le réactif de Collins pour former une énone en C-7, après protection du groupement hydroxyle en C-3. La protection régiosélective en C-17 par le groupement protecteur O-méthoxycarbonyl cyanohydrine permettait ensuite d'effectuer la réduction de l'énone en C-7 avec le borohydrure de sodium, laquelle était suivie de la libération des deux fonctions protégées en milieu basique.

Figure 3.2: <u>Protocole de synthèse de la 7β-OH-DHEA</u>, voie B.

1) Ac₂O, pyridine; 2) CrO₃.(C₅H₅N)₂ Réactif de Collins, CH₂Cl₂, Ar, (69 %); 3) NCCOOCH₃, DIPA, THF (69 %); 4) NaBH₄, CeCl₃, THF; 5) K_2CO_3 0,5 M aq, MeOH, (68 % de 9 à 6).

La synthèse de la voie B a débuté par l'oxydation en position allylique de la 3β -5-androstèn-17-one (1) réalisée par le réactif de Collins, selon le même protocole utilisé à la section précédente pour le produit 3 (Krafft et al, 1999).

La protection du groupement carbonyle a été réalisée par l'emploi de cyanoformate de méthyle, en présence de la diisopropylamine dans le THF, selon le protocole décrit par Berthiaume et Poirier en 2000. Le but de cette réaction était de protéger uniquement la cétone en C-17, tout en laissant la cétone α,β-insaturée intacte. Comme la réaction n'avait jamais été tentée sur ce composé, la régiosélectivité d'attaque sur cette cétone était inconnue. Malgré la formation de deux produits secondaires mineurs, le rendement de 69 % du produit 8 indique que la sélectivité de l'attaque est grande et que le groupement protecteur O-méthoxycarbonyl cyanohydrine est, tel qu'escompté, peu réactif face à une cétone α,β-insaturée. L'analyse du spectre IR révèle la présence d'une bande à 1761 cm⁻¹, tandis que le signal à 153.75 ppm en RMN ¹³C, jumelé à la disparition des signaux de la cétone, indiquent bien la présence d'un groupe carbonate qui protège le carbonyle en C-17. Quant aux signaux de l'énone (IR 1672 cm⁻¹, RMN ¹H 5.74 ppm (s, 1H, 6-CH), RMN ¹³C 199,78 ppm (C-7), ils sont encore présents, ce qui signifie qu'elle est intacte.

Après avoir vérifié par un essai préliminaire la stabilité du groupement O-méthoxycarbonyle cyanohydrine dans les conditions employées pour la réduction de la cétone insaturée, la réduction de l'énone 8 par le borohydrure de sodium et le CeCl₃ a donc été tentée pour une première fois. Nous avons constaté avec satisfaction que les rendements de la réaction étaient presque quantitatifs et que le groupement protecteur O-méthoxycarbonyl cyanohydrine demeurait intact.

Tel que décrit par Labaree et al, 1997, le principe de cette réaction est basé sur l'emploi du cérium (III) qui, étant un acide de Lewis fortement oxophilique, hydrate sélectivement les groupements carbonyles comme les aldéhydes et les esters, plus électrophiles que les cétones. Donc, le CeCl₃ sert dans ce cas d'agent masquant temporaire du carbonate O-méthoxycarbonyl cyanohydrine pour permettre la réduction sélective de la cétone par l'hydrure. Le carbonate est ensuite libéré par le « work-up », qui consiste à traiter le milieu d'une solution aqueuse d'ammonium saturée et extraire le produit 9 à l'acétate d'éthyle.

Tout comme à l'étape finale de la voie A, l'acétate est hydrolysé par le bicarbonate de potassium, de même que le l'O-méthoxycarbonyl cyanohydrine. Après deux chromatographies successives du produit 6, la pureté de ce composé, déterminée par CLHP, est de 94,5 %.

Les rendements de cette deuxième voie de synthèse sont tous très bons (plus de 68 % à chaque étape), les réactions ont lieu à la température ambiante et il n'y a généralement pas plus d'un produit secondaire formé.

La réaction clé de cette approche de synthèse consistait en la protection sélective de la cétone vs la cétone conjuguée et la réduction également sélective de la cétone conjuguée par le borohydrure de sodium en présence de trichlorure de cérium. À l'étape de formation du groupement protecteur O-méthoxycarbonyle cyanohydrine, qui était la réaction nouvelle de cette synthèse, la sélectivité de l'attaque sur la cétone au détriment de l'énone a été réussie. Cette régiosélectivité s'explique par le fait que les cétones sont moins réactives que les énones face au méthyle cyanoformate pour former la cyanohydrine carbonate (Berthiaume et Poirier, 2000).

3.2.3 Conclusion

La structure du produit final 6 (la 7β-OH-DHEA) obtenu par les deux voies de synthèse a été confirmée par comparaison des données spectrales avec celles de la littérature (Lévesque et Ayotte, 1999 ; Morfin et Starka, 2001). L'analyse du spectre IR indique la présence d'un alcool par une bande caractéristique à 3369 cm⁻¹ et également d'une cétone par le signal à 1732 cm⁻¹. Quant aux signaux RMN 1 H (3.40 ppm (m, 1H, 3 α -CH), 3.87 ppm (d, 1H, 7 α -CH)) et RMN 13 C (224.16 (cétone)), ils indiquent la présence d'une cétone et l'absence d'autres groupements fonctionnels tels que le carbonate, l'ester ou l'énone, preuve que la molécule ne contient pas d'autres fonctions chimiques que celles du produit final voulu. Il est intéressant de souligner que le signal RMN ¹H du proton vinylique (C-6) pour un produit similaire de configuration 7β-OH est à 5.29 ppm, ce qui est très près du signal du même proton pour la 7β-OH-DHEA, qui est à 5.31 ppm. Le signal pour l'isomère 7α -OH étant à 5.61 ppm, la configuration β de notre produit final s'en trouve donc confirmée (Kumar et al, 1987). L'analyse du spectre de masse (SMBR) nous a confirmé la masse du composé non dérivé qui est de 304.20. De plus, les spectres de masse ainsi que les temps de rétention sont identiques à ceux que nous avions obtenus lors des analyses précédentes effectuées avec le standard authentique fourni par R. Morfin (Lévesque et Ayotte, 1999).

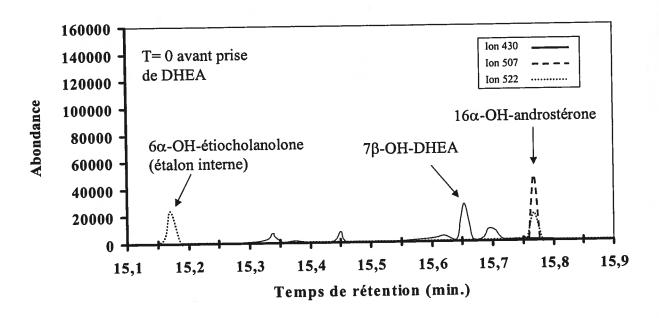
3.3 Quantification du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone

3.3.1 Caractérisation des métabolites et choix de l'étalon interne

Tel que démontré par J-F Lévesque, les principaux métabolites glucuro- et sulfoconjugués excrétés suite à l'administration orale d'une dose unique de DHEA

principalement la 7β-OH-DHEA, la 7α-OH-DHEA, la 16α-OHsont androstérone, la 4ε-OH-DHEA et la 16α-OH-DHEA. Ce dernier a également 7β -OH-DHEA/ 16α -OHqualitativement l'altération du rapport observé androstérone dans la fraction sulfate urinaire suivant l'administration de DHEA, et ce principalement au cours des 20 premières heures. Cette altération semblait être causée par une augmentation drastique de la 7β-OH-DHEA conjointe à une importante diminution de la 16α-OH-androstérone. Tel que montré par J-F Lévesque, la 7β-OH-DHEA est excrétée dans l'urine sous forme de sulfate en raison de l'orientation β de son groupement C-3 hydroxyle (Träger, 1977). Quant à la 16\alpha-OH-androstérone, elle est excrétée à la fois sous forme de sulfate et de glucuronide, conséquemment à une conformation C-3 a de son groupement hydroxyle (Baulieu et Kelly, 1990; Leunissen, 1979).

De tous les métabolites dont l'excrétion est altérée suite à l'administration orale de DHEA, la 7β -OH-DHEA et la 16α -OH-androstérone sulfoconjuguées ont été choisies pour constituer une sonde permettant de diagnostiquer l'utilisation de DHEA. Les principales raisons de ce choix s'expliquent par le fait que les altérations du rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone sont particulièrement importantes, surtout dans les premières heures suivant l'administration, mais aussi très persistantes. Les chromatogrammes suivants illustrent la modification apparente du rapport (**Figure 3.3**).



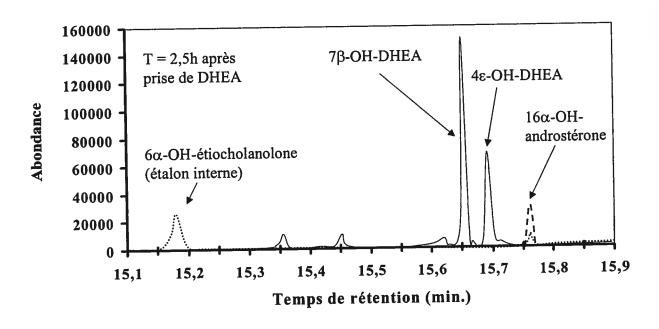


Figure 3.3 <u>Modification caractéristique des chromatogrammes reconstitués de l'analyse CG/SM des dérivés TMS des métabolites sulfoconjugués de la DHEA et de l'étalon interne avant et après la prise orale de 200 mg de DHEA.</u>

Selon de récentes études, cette inversion du rapport des concentrations pourrait possiblement être causée par une compétition entre les réactions de 7-hydroxylation et de 16α -hydroxylation qui surviennent lors du métabolisme de la DHEA (Hampl et Starka, 2000 a). Jusqu'à présent, la voie métabolique conduisant à la 16α -hydroxylation de la DHEA a été peu étudiée et sa signification biologique est mal comprise. Une corrélation semble par contre avoir été faite entre une concentration élevée en métabolites 16α -hydroxylés observée conjointement à une concentration faible en DHEA chez des patients atteints d'une maladie autoimmune (Merril et al, 1996).

Suite à ces derniers résultats et étant donné que la 7α et la 7β -OH-DHEA agissent à titre d'agents immunoprotecteurs locaux (Hampl et al, 1997), Hampl et son équipe ont émis l'hypothèse que la voie de la 16α -hydroxylation de la DHEA pourrait conduire à des composés produisant des effets biochimiques opposés à ceux de la DHEA et ses métabolites 7-hydroxylés. En d'autres mots, ces deux voies d'hydroxylation pourraient être directement concurrentes (Hampl et Starka, 2000 a).

Autrement dit, si l'on reporte cette hypothèse au cadre de notre étude, l'élévation temporaire de la concentration en 7 β -OH-DHEA causée par la prise exogène de DHEA pourrait peut-être ralentir la production de métabolites 16α -hydroxylés (dont la 16α -OH-androstérone fait partie) jusqu'au retour à des concentrations normales dans la circulation sanguine. Il serait intéressant de faire le lien entre la concurrence de ces deux voies d'hydroxylation.

Comme nous avons pu l'observer chez les trois volontaires, une hausse radicale des métabolites 7-hydroxylés dans le profil stéroïdien est survenue suite à l'administration de DHEA. Entre autres observations, nous avons noté des augmentations jusqu'à 19 fois plus élevées de la 7β-OH-DHEA dans l'urine par rapport aux valeurs normales. Le spectre de masse du dérivé TMS de ce métabolite est caractérisé par la présence d'ions à m/z 520 [M·]⁺, 430 [M-TMS-OH·]⁺, 415 [M-TMS-OH-CH₃·]⁺, 325 [M-2(TMS-OH)-CH₃·]⁺, 169 (caractéristique des 17-one) et 129 (caractéristique des 3-ol et 5-ène), tels que décrits précédemment par J-F Lévesque (*Lévesque*, 1998).

Après optimisation des conditions analytiques, i.e. changement des paramètres de température et de pression, nous avons obtenu une séparation optimale de la 7β -OH-DHEA et de son co-éluant la 4ϵ -OH-DHEA, dont le spectre de masse est très similaire à celui de la 7β -OH-DHEA, conséquemment à une structure moléculaire analogue. L'ion sélectionné pour la quantification est celui à m/z 430 [M-TMS-OH·]⁺, le plus abondant des ions, comme en témoigne le spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 7β -OH-DHEA (**Figure 3.4**).

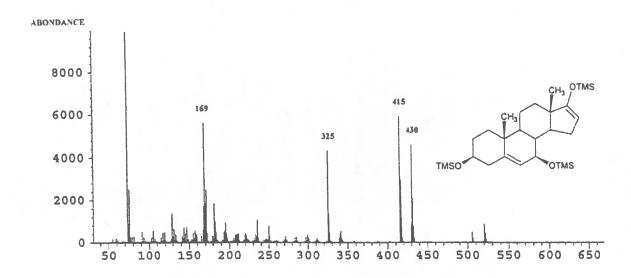


Figure 3.4: Spectre de masse du dérivé TMS-éther, TMS-énol de la 7β-OH-DHEA

Pour obtenir la quantification du deuxième métabolite d'intérêt, la 16α -OH-androstérone, l'analyse CG/SM de son dérivé TMS-énol a été effectuée sans aucun problème de co-élution dans les mêmes conditions analytiques que la 7β -OH-DHEA. Les principaux ions caractéristiques sont à m/z 522 [M·]⁺, 507 [M-CH₃·]⁺, 417 [M-TMS-OH-CH₃·]⁺, et 147. L'ion 507 a été choisi pour la quantification, puisqu'il est l'ion le plus abondant formé lors de la fragmentation (**Figure 3.5**).

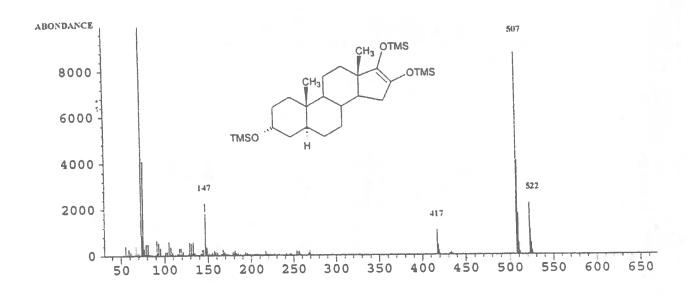


Figure 3.5 <u>Spectre de masse du dérivé TMS-éther, TMS-énol de la 16α-OH-androstérone.</u>

Le choix de l'étalon interne, la 6α -OH-étiocholanolone ou 3α , 6α -dihydroxy- 5β -androstane-17-one, a été basé en premier lieu sur la similarité de sa structure moléculaire avec celle des deux autres métabolites de quantification. Le patron de fragmentation résultant est similaire à ceux de la 7β -OH-DHEA et de la 16α -OH-androstérone (les ions obtenus sont du même ordre de grandeur) et de plus son temps de rétention est avoisinant. De plus, ce stéroïde est de façon générale uniquement présent dans la fraction glucuronide de l'urine conformément à sa structure C- 3α hydroxylée (*Lévesque*, 1998).

Nous avons vérifié qu'il n'était pas présent dans la fraction sulfate de l'urine, même après la prise de DHEA. Les ions caractéristiques du dérivé TMS-éther, TMS-énol ont été identifiés à m/z 522 [M·]⁺, 417 [M-TMS-OH-CH₃·]⁺, 327 [M-2(TMS-OH)-CH₃·]⁺, et 169. Nous avons choisi l'ion 522 pour la quantification, encore une fois l'ion le plus abondant du spectre de masse (**Figure 3.6**).

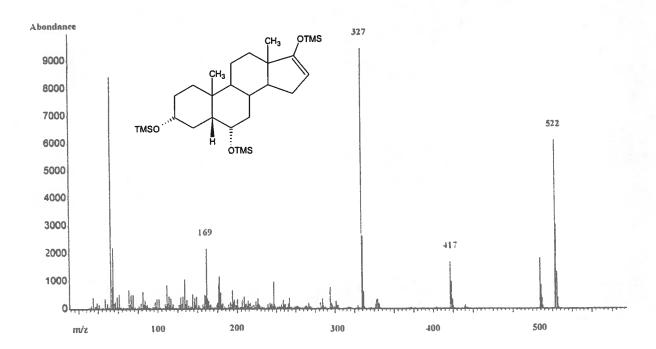


Figure 3.6 <u>Spectre de masse du dérivé TMS-éther, TMS-énol de la 6α-OH</u> <u>étiocholanolone, l'étalon interne.</u>

Les données spectrales, soit les ions caractéristiques de la 7β -OH-DHEA, de la 16α -OH-androstérone et de l'étalon interne ainsi que les temps de rétention sont résumés au **Tableau 3.1**.

Métabolites		Ions caractéristiques					
TMS-énols	T _R (min)	Ions (m/z)	Fragmentation	Abondance relative (%)			
		430	[M-TMS-OH·] [†]	100			
7β-ОН-DНЕА	15,66	520	$[M\cdot]^{\dagger}$				
C ₁₉ H ₂₈ O ₃		415	[M-TMS-OH-CH ₃ ·] ⁺	71			
		325	[M-2(TMS-OH)-CH ₃ ·] ⁺	47			
		169					
		507	[M-CH ₃ ·] ⁺	100			
16α-OH-androstérone		522	$[M\cdot]^{+}$	26			
C ₁₉ H ₃₀ O ₃	15,79	417	[M-TMS-OH-CH ₃ ·] [†]	11			
La criscaladad distribution in security in the contract of the	and a	147					
6α-OH-étiocholanolone		522	[M·] ⁺	100			
(étalon interne)		417	[M-TMS-OH-CH ₃ ·] ⁺	32			
$C_{19}H_{30}O_3$	15,17	327	[M-2(TMS-OH)-CH ₃ ·]	90			
Claristos	erente.	169					

Tableau 3.1 <u>Ions caractéristiques des dérivés TMS de la 7β-OH-DHEA, de la 16α-OH-androstérone et de la 6α-OH-étiocholanolone (étalon interne).</u>

3.3.2 Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone chez une population de référence

Nous avons sélectionné au hasard 70 adultes sains (34 hommes et 36 femmes) qui ont consenti au don d'échantillons urinaires en vue de nous permettre de constituer une population de référence pour cette étude. Nous avons vérifié par questionnaire que ces personnes n'avaient consommé aucun produit dopant durant les jours précédant la collecte des urines. La fraction contenant les stéroïdes sulfoconjugués a été isolée et analysée tel que décrit à la section 2.2.2 en vue de déterminer la concentration des métabolites caractéristiques de l'administration par voie orale de la DHEA ; la 7β -OH-DHEA et la 16α -OH-androstérone. Ces résultats nous ont permis de qualifier la fourchette de valeurs « normales » du rapport de ces deux stéroïdes dont l'altération pourrait être diagnostique lors de l'administration de DHEA.

Les concentrations absolues des deux métabolites urinaires sulfoconjugués ont été corrigées pour tenir compte de la gravité spécifique de chaque spécimen ($\rho_{\rm E}$) de façon à en normaliser l'expression pour une gravité spécifique moyenne de 1,020 en appliquant la formule suivante (Donike et al, 1993):

Concentration_{corrigée 1.020} =
$$(1,020 - 0,998)$$
 * Concentration mesurée $(\rho_{\text{\'e}} - 0,998)$

Nous avons établi, par l'analyse des valeurs obtenues, les 95 et 99 percentiles de la population étudiée (**Figure 3.7**). Les valeurs de concentrations absolues pour la 7β -OH-DHEA et la 16α -OH-androstérone et les données statistiques s'y rattachant sont présentées aux **tableaux 3.2 a** et **3.2 b**.

200	7B-OH-DHE	Rapport	rt 7β-OH-DHEA 16α-OH-andros-			Rapport	la jak	7β:OH-DHE	EA 16α-OH-andros- Rappor		
	(ng/ml)	térone,(ng/ml)	7B/16a		(ng/ml)	terone (ng/ml)	7B/16a		(ng/ml)	térone (ng/ml)	78/16a
Н	39.9	115.8	0,3	H	77.7	63,2	1.2	F	26,8	33,5	0,8
H	33.1	102.7	0.3	Н	51.9	44,6	1,2	Н	44,4	96,6	0,5
H	144,1	118.1	1,2	F	44,9	42,7	1,1	H	15,4	27,5	0,6
F	33,1	55,7	0.6	F	40,1	49,6	0,8	Н	26,4	56,8	0,5
H	78	289.2	0.3	H	57.1	159.8	0,4	F	22,8	80.8	0,3
H	26.6	122.8	0.2	F	41,4	29,6	1,4	H	25,8	35,3	0,7
H	68,1	131.7	0,5	F	58.3	44.8	1.3	F	40,1	41,5	1,0
H	145,29	. 302	0.5	F	35,1	31,9	1,1	F	28,4	52,8	0,5
H	70,89	315,6	0.2	H	49.1	125,4	0,4	Н	26,5	67,2	0,4
H	65.4	25,2	2.6	F	57.8	154.9	0,4	F	19,8	15	1,3
H	36.1	56,4	0.6	H	37.7	336,6	0.1	F	18,6	33,8	0,6
F	31,4	99.9	0.3	H	48.8	27,1	1,8	F	34,2	17,9	1,9
F	60,66	97.7	0.6	H	147,6	112.4	1,3	F	36,3	44,8	0,8
F	25.6	59,9	0,4	F	44,5	52,8	0,8	H	52,45	149,1	0,4
H	42,7	83.9	0,5	F	32.8	154,9	0,2	F	23.7	18,5	1,3
F	28.9	41,3	0,7	H	82.3	304,8	0,3	F	40,2	97.2	0,4
H	55,6	87.8	0.6	F	29	26.4	1,1	H	41,5	37,4	1,1
E	28.7	38,4	0.7	F	113.2	81,5	1,4	F	16,2	54	0,3
F	47.4	146.7	0.3	F	18.9	31,2	0,6	F	32.3	51.2	0,6
H	77.3	156,8	0,5	H	62,26	311.3	0.2	F	39.2	90,3	0,4
F	39.4	59.9	0.7	Ħ	25,5	26,5	1,0	F	28,9	44.6	0,6
H	40.2	55,7	0,7	T F	23,6	59	0,4	F	39,6	79,5	0,5
Н	33.73	120,6	0,3	T H	47.8	173,7	0,3	H	38,2	98,8	0,4
F	38,3	34,9	1.1	TF	35.3	16,3	2,2			A construction	

Tableau 3.2 a : <u>Concentrations absolues et rapports de la 7β-OH-DHEA et la 16α-OH-androstérone dans la fraction sulfate de l'urine chez une population de référence.</u>

Données statistiques	Population totale N = 70	Hommes N = 34	Femmes N = 36
Moyenne	0.7	0.7	0.8
Écart-type	0.4	0.5	0.4
Valeur minimale	0.1	0.1	0.2
Valeur maximale	2.6	2.6	2.2
95% percentile	1.6	1.6	1.6
99,0 % percentile	2.5	2.5	2.4

Tableau 3.2 <u>Étude des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone dans la fraction sulfate de l'urine chez une population de référence et ses deux sous-populations (Hommes et Femmes).</u>

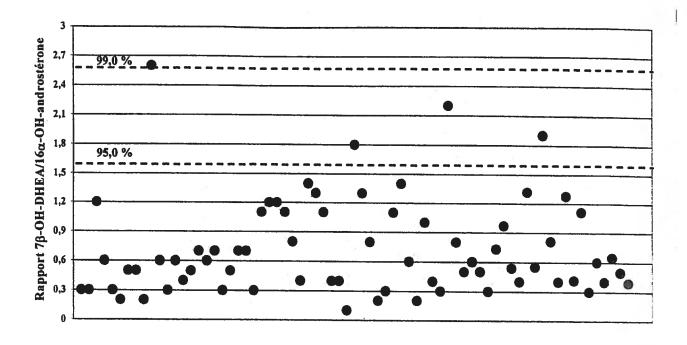


Figure 3.7 : <u>Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone</u> individuels dans la fraction sulfate de l'urine chez une population de référence (N=70).

Les rapports 7β -OH-DHEA / 16α -OH-androstérone obtenus pour la population de référence varient de 0,1 à 2,6 avec une moyenne de 0,7 et un écart-type de 0,4. (**Tableau 3.2 b**) Nous avons pu observer que 95,0% des valeurs sont inférieures à 1,6 et que 99,0% sont inférieures à 2,5. Les valeurs des rapports semblent donc relativement homogènes dans une population donnée et seuls quelques échantillons s'écartent de la distribution statistique. Pour palier à cet écart statistique, les échantillons présentant des rapports élevés devraient être analysés paralèllement par la méthode CG/C/SMRI lors de tests de routine, afin de s'assurer que ces valeurs sont causées par une excrétion naturellement forte en 7β -OH-DHEA ou faible en 16α -OH-androstérone et non pas par une prise exogène de DHEA.

Par ailleurs, tel que résumé au tableau 3.2 b, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les valeurs chez les hommes et chez les femmes, les moyennes et les écart-types étant similaires. Ainsi, bien que des différences importantes aient aux profils d'excrétion des stéroïdes urinaires observées quant été l'étiocholanolone, la testostérone, l'androstérone, glucuroconjugués tels l'épitestostérone, ainsi que leur rapport, il semble que le rapport des deux métabolites sulfoconjugués soit plus homogène que ces derniers.

3.3.3 Variation du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone causée par l'administration de DHEA par voie orale.

Plusieurs groupes ont analysé les variations du profil des stéroïdes urinaires suite à l'administration per os de DHEA disponible commercialement (Lévesque et Ayotte, 1999; Setiawati et al, 2001; Uralets et Gillette, 2001; Van der Merwe, 1999). J.-F. Lévesque a étudié en détail l'excrétion des stéroïdes glucuro et sulfoconjugués et procédé à l'identification des principaux métabolites formés suite à l'administration per os de DHEA (Lévesque et Ayotte, 1999).

Se basant sur des observations qualitatives, ce dernier a également proposé d'utiliser l'altération du rapport des deux métabolites sulfoconjugués, 7β -OH-DHEA et 16α -OH-androstérone comme une sonde diagnostique de l'utilisation de DHEA. Nous avons poursuivi ces travaux en procédant à l'évaluation quantitative de ce rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone chez des populations de

référence, d'athlètes ainsi que chez des volontaires sains ayant accepté de recevoir une dose unique de DHEA (deux hommes, une femme). Ayant mesuré les valeurs de ce rapport de 72 échantillons urinaires prélevés de volontaires sédentaires, nous avons par la suite quantifié la variation du rapport chez les volontaires ayant reçu de la DHEA.

Tel que présenté au **tableau 3.3** suivant et à la **figure 3.8**, bien que des différences individuelles soient observées dans les valeurs « basales » du rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone mesuré dans la fraction isolée de l'urine contenant les stéroïdes sulfoconjugués, celles-ci se trouvent toutes significativement altérées suite à l'administration de DHEA. En effet, dès les deux premières heures, les valeurs excèdent celles mesurées chez la population de référence atteignant un maximum 2 à 10 heures post-administration et rejoignant les valeurs de départ en 24 heures.

Temps après ingestion	Concentration 7α-OH-DHEA (ng/μl)	Concentration 16β-OH-androstérone (ng/ μl)	7α/16β
	Volontair	re Homme 1	
-18h30	1.1	1.1 2.9	
- 15h30	1.3	3.5	0,4
	Prise de 1	DHEA orale	2,0
2h30	7,4	7,4 3.7	
4h00	6,3	1.1	5,6
6h00	4.4	1.5	2,9
9h00	2,7	2.0	1,4
12h00	2,3	2.8	0,8
14h00	1.4	2.1	0,6
24h00	2.4	6.2	0,4
744424, 773545, 34	Volontaiı	re Homme 2	
-12h30	0.9	1.2	0,7
- 11h00	0.8	1.0	0,9
	Prise de .	DHEA orale	
2h30	2.4	0.5	5,0
3h35	14.0	0.9	15,4
5h15	13.2	2.0	6,5
6h40	8.7	2.6	3,4
8h05	4.0	1.9	2,1
13h45	5.3	3.0	1,7
16h15	1.6	1.2	1,3
23h00	0.8	1,1	0,9
	Volonta	ire Femme	
- 21h05	1.1	1.0	1,0
- 17h00	0.4	0.5	0,9
	Prise de	DHEA orale	
2h05	18.8	1.7	11,4
3h55	16.4	1.5	10,9
6h25	6.6	1.3	5,0
8h15	1.3	0,4	3,9
10h30	4.9	1.8	2,8
12h25	3.1	1.7	1,8
13h25	3.4	2.2	1,5
18h15	4.3	4.5	0,9

Tableau 3.3 <u>Étude des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone dans la</u>

<u>fraction sulfate de l'urine chez trois volontaires ayant consommé une</u>

<u>dose de 200 mg de DHEA par voie orale.</u>

L'allure de la distribution des rapports est semblable chez les deux volontaires masculins, à la différence que les valeurs sont beaucoup plus grandes chez le deuxième. En effet, cette personne présente un profil d'excrétion dont la moyenne du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone est initialement plus élevée, soit 0,8 au départ, et l'augmentation des valeurs est aussi plus grande. Les rapports se démarquent également beaucoup plus de la limite de référence que chez le premier volontaire. Passant d'une moyenne de 0,8 à 5,0 dès 2h30 après la prise orale, le rapport subit une hausse pour atteindre un maximum de 15,4 après seulement 3h35, soit une concentration presque 19 fois plus élevée qu'au départ, pour finalement revenir à la normale 23 heures plus tard.

Quant au volontaire féminin, la moyenne initiale du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone est de 0,95 et grimpe jusqu'à un maximum de 11,4 dès les deux premières heures, soit une augmentation d'un facteur 12 comparativement à la valeur de départ. Les valeurs reviennent à la normale après environ 18h00 et demeurent au-dessus de la limite de référence durant 13h00.

La distribution présentée à la **figure 3.8** illustre les variations des profils urinaires chez les trois volontaires dans le temps, avant et après l'administration du stéroïde. Nous croyons que ce type de distribution est très utile, car elle permet de déceler visuellement les concentrations anormalement élevées du rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone durant une vingtaine d'heures suivant la prise orale de DHEA.

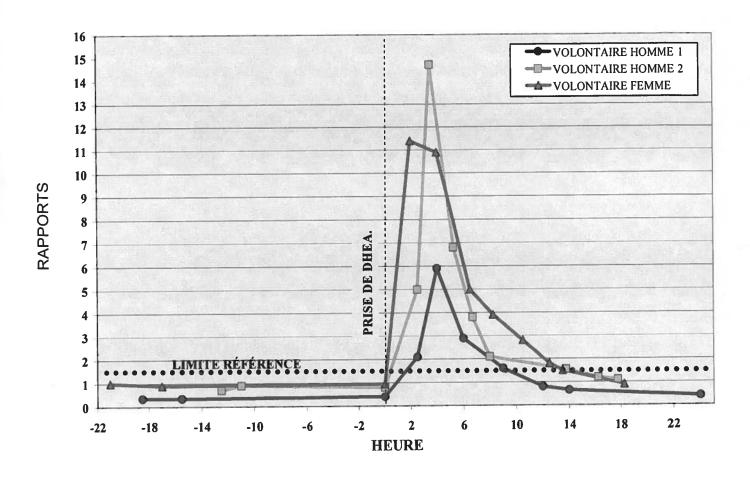


Figure 3.8 <u>Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone en</u> fonction de la prise orale de 200 mg de DHEA chez trois volontaires.

L'ensemble des données recueillies lors de cette étude quantitative semble indiquer l'altération de l'excrétion des stéroïdes urinaires 7β-OH-DHEA et 16α-OH-androstérone suite à l'administration de DHEA en inversant les proportions relatives; l'utilisation de ce rapport pourrait servir de sonde permettant un premier dépistage. Il semble que l'hypothèse de J-F. Lévesque (Lévesque et Ayotte, 1999) et l'étude de Hampl et Starka (Hampl et Starka, 2000 a), qui stipulent que la présence de concentrations supra-physiologiques de DHEA dans l'organisme

favoriserait la formation de métabolites sulfoconjugués hydroxylés en C-7 au détriment de la position C-16α par compétition entre les deux mécanismes soit acceptable d'après les résultats obtenus de cette étude. En effet, il semblerait que la 16-hydroxylation soit une voie métabolique concurrente à la formation de la DHEA, ses précurseurs et ses métabolites, et en particulier les 7-hydroxystéroïdes, selon un mécanisme encore inexpliqué (Baulieu, 1996; Halliwell et al, 1992; Hampl et Starka, 2000 a et b).

Il semble bien que la prise de DHEA per os favoriserait la formation de métabolites 7-hydroxylés au détriment des 16α -hydroxylés. Inversement, il semblerait qu'une augmentation en métabolites 16a-hydroxylés pourrait être reliée à un niveau plus bas de DHEA (Merril et al, 1996). Nous ne pouvons cependant à ce stade trouver une hypothèse pour expliquer la durée de la baisse d'excrétion en 16α -OH-androstérone qui est plus importante que chez la 16α -OH-DHEA notamment (Lévesque, 1998).

3.3.4 Mesure des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone d'échantillons recueillis auprès d'athlètes

Nous avons analysé le profil d'excrétion en 7β -OH-DHEA et 16α -OH-androstérone sulfoconjuguées de 110 échantillons d'urine d'athlètes choisis au hasard parmi ceux envoyés pour analyse dans le cadre de programmes de dépistage du dopage. Nous devons noter que ces échantillons ne sont pas produits sous strict contrôle et qu'ainsi, nous ne pouvons exclure la prise de stéroïdes androgènes ni de DHEA. Tel que précédemment décrit pour la population de référence, nous avons ajusté les concentrations en stéroïdes de chaque spécimen urinaire en mesurant leur gravité spécifique. Nous avons ensuite établit une distribution statistique des rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone, une moyenne géométrique ainsi qu'une limite maximale pour l'ensemble de ces échantillons (**Figure 3.9**).

Selon nos calculs statistiques, la moyenne des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone de la population d'athlètes est de 1,1. Si on compare ces valeurs à celles obtenues pour la population de référence dont la moyenne est de 0,7, on constate qu'elles sont significativement plus élevées. Nous ne pouvons qu'observer ces différences sans les expliquer, les échantillons n'ayant pas été obtenus sous supervision. Une hypothèse pourrait être tel que proposé par Arlt et Keizer que l'exercice physique amènerait un accroissement significatif du taux de DHEA plasmatique chez les sportifs (Arlt et al, 1998; Keizer et al, 1989). Cependant, cette augmentation ne devrait pas résulter en des doses supraphysiologiques. Nous ne pouvons exclure que certains de ces résultats aient pu être causés par l'administration de stéroïdes, notamment de DHEA. Nous avons choisi neuf échantillons parmi ceux ayant présenté des valeurs élevées du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone et les avons soumis à l'analyse CG/C/SMRI.

En effet, la détermination de la teneur en ¹³C des métabolites urinaires devrait nous permettre d'en identifier l'origine endogène ou synthétique.

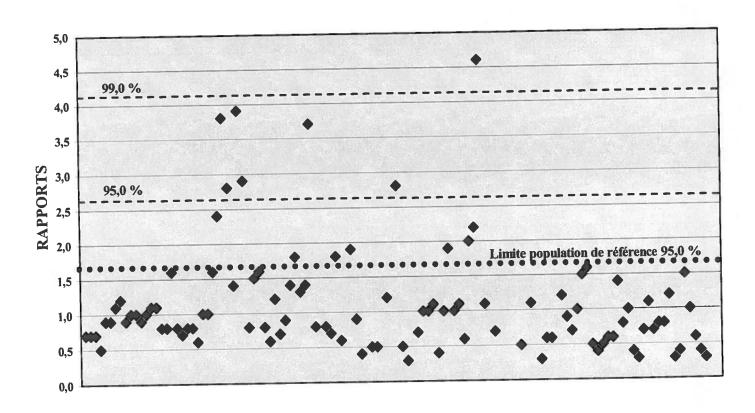


Figure 3.9: <u>Distribution des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone dans la</u> <u>fraction sulfate de l'urine chez une population d'athlètes (N=110).</u>

Selon nos calculs, la majorité des données statistiques concernant la distribution des rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone chez la population d'athlètes sont significativement plus élevées que chez la population de référence et les valeurs sont beaucoup moins stables. En termes de comparaisons, l'écart-type est deux fois plus élevé chez les athlètes que chez les non-athlètes, avec 0.8

comparativement à 0,4 en référence, ce qui semble annoncer de grands écarts entre les sujets. De plus, 95 % des échantillons présentent des valeurs inférieures à 2,7, ce qui est largement supérieur à celle de la population de référence qui est de 1,6. Les autres données comparatives sont présentées dans le **tableau 3.4** et dévoilent clairement les écarts qui existent entre les valeurs pour ces deux populations. Ces différences notoires entre athlètes et non athlètes pourraient être la conséquence d'une consommation illicite de DHEA pour certains des athlètes.

RESULTER THE WINDS	7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone			
Données statistiques	Population de référence N = 70	Population d'athlètes N = 110		
Moyenne	0.7	1.1		
Écart-type	0.4	0.8		
Valeur minimale	0.1	0.3		
Valeur maximale	2.6	4.6		
2e déviation (95 %)	1.6	2.7		
4e déviation (99 %)	2.5	4.2		

Tableau 3.4 <u>Étude des rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone dans la</u>

<u>fraction sulfate de l'urine chez une population de référence et une population d'athlètes.</u>

3.3.5 Conclusion

Nous avons réalisé l'étude du profil stéroïdien auprès d'une population de référence et aucune différence significative n'a été notée entre les rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone chez les hommes et les femmes. Nous avons également analysé le profil d'excrétion en 7β -OH-DHEA et 16α -OH-androstérone sulfoconjuguées chez trois volontaires ayant ingéré une capsule de DHEA par voie orale, ce qui nous a permis de constater que l'augmentation évidente du rapport, allant d'un facteur 11 à 19 fois plus élevé, était bel et bien causée par l'administration du stéroïde et non pas par des facteurs naturels.

Enfin, nous avons effectué ces mêmes analyses quantitatives auprès d'une population d'athlètes afin de vérifier si certains points s'écartaient anormalement de la distribution. Nous avons de fait observé d'importantes divergences par rapport aux valeurs obtenues pour la population de référence, notamment une moyenne et un écart-type beaucoup plus élevés. Ces résultats nous ont amené à sélectionner quelques cas présentant des valeurs anormalement élevés et nous les avons recueillis pour des analyses complémentaires SMRI afin de vérifier l'origine endogène ou exogène de ces métabolites.

3.4 Spectrométrie de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI)

Dans cette section, nous présenterons les résultats obtenus lors de l'analyse par spectrométrie de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI) de deux métabolites urinaires sulfoconjugués de la DHEA soit la DHEA-S et la 7β-OH-DHEA-S, ainsi que d'un précurseur biochimique, le cholestérol-S présent dans le même extrait urinaire. N'étant pas altéré par l'administration de la DHEA, le cholestérol est utilisé comme stéroïde de référence. Dans un premier temps, nous présenterons les teneurs en ¹³C, exprimées en delta per mille i.e. δ (¹³C ⁰/₀₀) de ces métabolites isolés à partir de spécimens recueillis avant et après l'administration d'une dose orale de 200 mg de DHEA chez les trois volontaires sains, ce qui nous permettra d'établir les variations des profils stéroïdiens pré- et post-administration pour chaque volontaire. Ces résultats nous permettront de confirmer la présence de métabolites dont la teneur en carbone 13 devrait logiquement être similaire à celle des capsules commerciales de DHEA et conséquemment différente du stéroïde urinaire de référence, ce qui nous permettra de démontrer l'altération du métabolisme conséquent à l'administration de DHEA.

Par la suite, nous aborderons la discussion des résultats d'analyses de neuf échantillons urinaires recueillis auprès d'athlètes lors des contrôles de dopage et dont l'analyse CG/SM avait révélé des rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone élevés pouvant laisser supposer la prise de DHEA (voir section 3.3.4).

3.4.1 Distribution des valeurs de rapports isotopiques chez les volontaires

Les deux métabolites caractéristiques sulfoconjugués, 7β-OH-DHEA-S et DHEA-S, étaient présents en concentration suffisante pour en permettre l'analyse par CG/C/SMRI et ainsi de déterminer leur teneur en ¹³C. L'analyse de la fraction isolée contenant les métabolites sulfoconjugués nous a permis de choisir le stéroïde urinaire de référence, soit le cholestérol-S. En effet, considérant que les variations individuelles ainsi que la diète pourraient possiblement modifier la teneur en ¹³C des stéroïdes et ainsi influencer les résultats, l'analyse concomitante d'un stéroïde subissant les mêmes modifications biochimiques que l'ensemble des métabolites permet de contourner ces variables (Shackleton et al, 1997).

En premier lieu, nous avons observé un net effet de fractionnement isotopique chez les métabolites sulfoconjugués. En effet, alors que les δ (13 C 0 / $_{00}$) des stéroïdes glucuroconjugués sont généralement d'une valeur moyenne de -23 (variant de -20 à -25.8) (Ayotte et al, 2001), nous avons observé dans cette étude des valeurs moyennes de rapports isotopiques d'environ -19 à -20 (**Tableau 3.5**). Suite à l'administration de DHEA, les stéroïdes glucuroconjugués voient leur teneur en 13 C passer à environ -32, tandis que celle des sulfoconjugués descend à environ -28.

	Valeur moyenne d	e 13C (δ ¹³ C ⁰ / ₀₀)	Limite supérieure	T _R (sec)	
Métabolites	Standard synthétique Métabolite naturel		99%	IR (Sec)	
7β-OH-DHEA-S		-19.9	-23.1	1027	
DHEA-S	-31.2	-19.2	-21.3	950	
Cholestérol-S	-25.8	-20.1		1220	

Tableau 3.5: <u>Valeurs des rapports isotopiques (δ ¹³C ⁰/₀₀) et temps de rétention (secondes) de la 7β-OH-DHEA-S, de la DHEA-S et du stéroïde urinaire de référence (Cholestérol-S) lors de l'analyse par CG/C/SMRI d'extraits non dérivés.</u>

Malgré quelques différences individuelles, le profil de variation des valeurs de δ (13 C 0 / $_{00}$) des deux métabolites urinaires et du stéroïde de référence en fonction du temps pré- et post-administration demeure similaire chez les volontaires étudiés. Dans les heures précédant l'administration du stéroïde, les valeurs de delta de la 7 β -OH-DHEA-S et la DHEA-S avoisinent celles du cholestérol, entre -19 et -21. Par contre, dès la première heure suivant l'ingestion du comprimé, les valeurs chutent radicalement et atteignent un minimum de -27/-29 entre 4 et 9 heures après l'administration. Il est cependant intéressant de noter que les deux métabolites ne prennent pas le même temps avant de revenir à la normale. La 7β -OH-DHEA-S présente des valeurs isotopiques de type « synthétique » durant 15 à 30 heures, dépendamment du sujet, tandis que la DHEA-S conserve des valeurs synthétiques tout le long de la collecte des données, c'est-à-dire durant plus de 33 à 51 heures.

Comme nous pouvons l'observer à la figure 3.10, les rapports isotopiques des deux métabolites sulfoconjugués diminuent significativement suite à la prise de DHEA chez les trois volontaires.

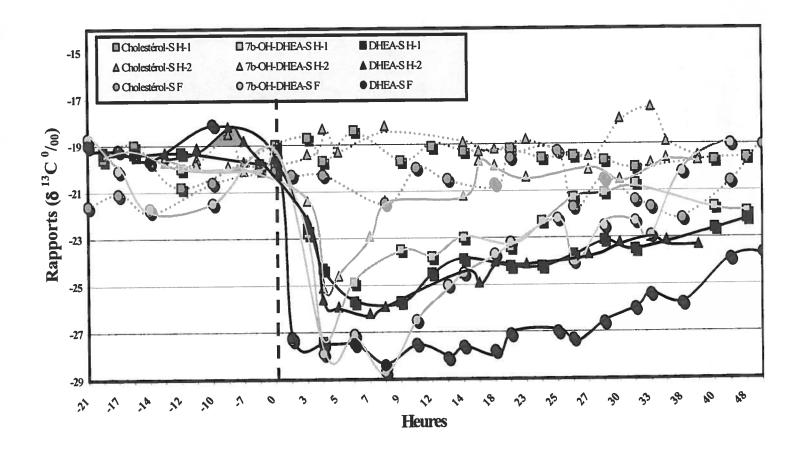


Figure 3.10 <u>Variation des rapports isotopiques (δ ¹³C ⁰/₀₀) de la 7β-OH-DHEA-S, de la DHEA-S et du précurseur (cholestérol-S) en fonction de l'heure avant et suivant la prise orale de 200 mg de DHEA chez 3 volontaires (M-1; M-2; F-1).</u>

En somme, une tendance claire et générale se dégage de ces trois profils stéroïdiens. On peut tout d'abord remarquer que, dans l'ensemble, les valeurs moyennes naturelles en ¹³C de la 7β-OH-DHEA-S, de la DHEA-S et du cholestérol-S sont similaires et qu'elles sont distribuées entre -18 et -21. Dès la première heure suivant la prise de DHEA, les valeurs de delta pour les deux métabolites chutent radicalement et atteignent un pic minimum après 8 heures en moyenne. Dans les trois cas, les valeurs du stéroïde de référence demeurent stables et non affectées par la présence de DHEA synthétique dans l'urine. Par contre, les valeurs de la DHEA-S sont très affectées et elles prennent beaucoup plus de temps avant de revenir à la normale. Il semble donc que la DHEA-S soit un meilleur indicateur à long terme de la prise de DHEA orale chez ces trois volontaires.

Les variations absolues de ces rapports isotopiques, constituées de la différence entre la moyenne pré-administration et les valeurs post-administration, sont présentées au **tableau 3.6** pour les trois volontaires.

Homme 1 (H-1)			Homme 2 (H-2)			Femme (F)			
	7β-OH-DHEA	DHEA-S		7β-OH-DHEA	DHEA-S		7β-OH-DHEA	DHEA-S	
Heures	moy (-19,6)	moy (-19,5)	Heures	moy (-19,7)	moy (-19,0)	Heures	moy (-20,3)	moy (-19,2	
0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	
3	3,2	3,1	3	1,7	3,2	2	7,0	8,0	
4	7,8	4,8	4	5,4	6,6	4	7,6	8,3	
6	5,3	6,2	5	4,9	6,9	6	6,8	8,3	
9	3,9	6,2	7	3,2	7,2	8	8,4	9,2	
12	4,2	5,0	8	1,7	6,9	11	6,2	8,3	
14	3,4	4,4	14	1,5	5,5	13	4,7	8,9	
21	3,8	4,7	16	0,0	5,9	14	4,2	8,4	
24	2,7	4,7	18	0,2	5,0	18	3,4	8,6	
26	1,7	4,2	23	0,7	5,1	21	2,9	7,9	
29	1,5	3,6	27	0,4	4,7	25	1,9	7,8	
31	1,1	4,0	30	0,8	4,2	26	3,7	8,1	
40	2,1	3,1	33	0,1	4,0	29	2,2	7,4	
48	2,3	2,7	37	-0,1	4,1	31	2,0	6,8	
BC SE	-,-		39	0,0	4,3	33	2,6	6,2	
						38	-0,1	6,6	
						47	-1,3	4,8	
						51	8.	4,5	

Tableau 3.6: <u>Variations absolues des rapports isotopiques (δ ¹³C ⁰/₀₀) de la 7β-OH-DHEA-S et de la DHEA-S en fonction du temps après l'administration de DHEA chez les trois volontaires.</u>

Une autre façon de présenter ces mêmes données est de constituer le rapport des valeurs de chaque métabolite sulfoconjugué sur celles du cholestérol, le stéroïde de référence. De cette façon, il est plus facile d'observer l'effet réel que la DHEA a produit sur chaque métabolite indépendamment des apports du régime alimentaire et des variations particulières à chaque individu. C'est ainsi que lorsque ces valeurs diffèrent suffisamment pour que leur rapport soit supérieur à 1.1, signe d'une teneur diminuée en ¹³C des métabolites urinaires diagnostiques caractéristique de leur origine synthétique et non endogène (**Figure 3.11, Tableau 3.6**).

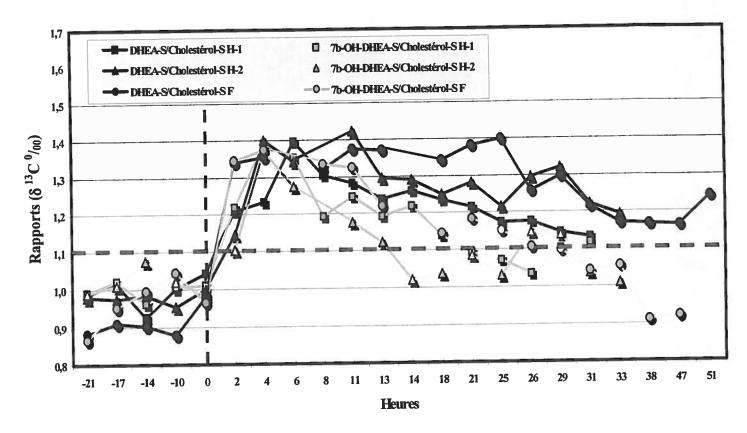


Figure 3.11: Rapport teneur en ¹³C des métabolites sur celle du stéroïde de référence (cholestérol-S) en fonction de l'heure avant et suivant la prise orale de 200 mg de DHEA chez trois volontaires.

Alors que le rapport des concentrations 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone mesuré par CG/SM était altéré durant une vingtaine d'heures, nous constatons que les teneurs en 13 C des métabolites sulfoconjugués principaux sont caractéristiques de celles de la DHEA synthétique durant près de 50 heures. Parallèlement, les valeurs du cholestérol restent stables du début à la fin de la collecte des urines.

3.4.2 Comparaison des deux sondes : a) le rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone et b) les teneurs en ¹³C.

Nous avons mesuré les rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone d'urines d'athlètes sélectionnées au hasard dans le cadre du programme de contrôle du dopage. Nous avons analysé de nouveau les échantillons présentant des valeurs « anormales » d'un point de vue statistique afin de mesurer la teneur en 13 C des métabolites urinaires. Pour ce faire, nous avons sélectionné neuf des 110 échantillons analysés dont le rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone avoisinait ou dépassait les 95% percentile de la population soit 2.6 (obtenu de la moyenne + 2 X écart-type).

L'analyse par CG/C/SMRI des métabolites urinaires 7β -OH-DHEA et DHEA-S et du stéroïde de référence de ces neuf urines a démontré la présence de différences des valeurs de delta indiquant clairement leur origine synthétique et non endogène dans 5 de ces cas. Les résultats sont présentés à la **figure 3.12** et au **tableau 3.7**.

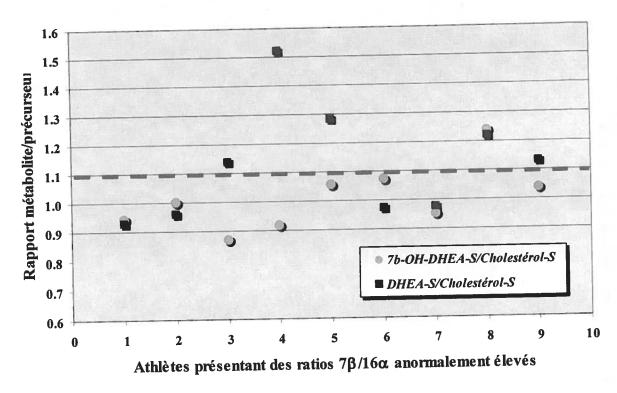


Figure 3.12: <u>Variation des teneurs en ¹³C des métabolites urinaires sulfoconjugués vs cholestérol-S d'échantillons dont le rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone est élevé.</u>

Cas	Rapport [7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone] Population Moyenne + X std : 2.6	Rapport [DHEA-S/Cholestérol-S]
1	2.4	0.9
2	3.8	1.0
3	2.8	1.1
4	3.9	1.5
5	2.9	1.3
6	3.7	1.0
7	2.2	1.0
8	2.8	1.2
9	4.6	1.1

Tableau 3.7: <u>Rapports 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone et rapports des teneurs</u> en ¹³C DHEA-S/Cholestérol-S.

Il est intéressant de noter que, comme nous l'avons observé lors des études d'excrétion performées avec des volontaires, dans les 5 cas ayant présenté des teneurs en ¹³C caractéristiques de métabolites synthétiques (i.e. dont la teneur en ¹³C est inférieure à celle du stéroïde urinaire de référence, le cholestérol), le rapport DHEA-S/Cholestérol-S est altéré significativement. Dans un seul autre cas, le métabolite hydroxylé était également d'origine synthétique. Nous pouvons supposer, admettant qu'il y ait eu administration d'une dose unique de DHEA, que la consommation datait de plus d'une vingtaine d'heures, puisque la teneur en ¹³C de la DHEA-S excrétée demeurant affectée plus longtemps que celle de la 7β-OH-DHEA-S.

La comparaison des deux sondes d'utilisation de la DHEA, i.e. le rapport de la 7β -OH-DHEA-S/ 16α -OH-androstérone en CG/SM vs le rapport de la teneur isotopique des métabolites de la 7β -OH-DHEA-S et DHEA-S/Cholestérol-S en CG/C/SMRI est exposée à la **figure 3.13**.

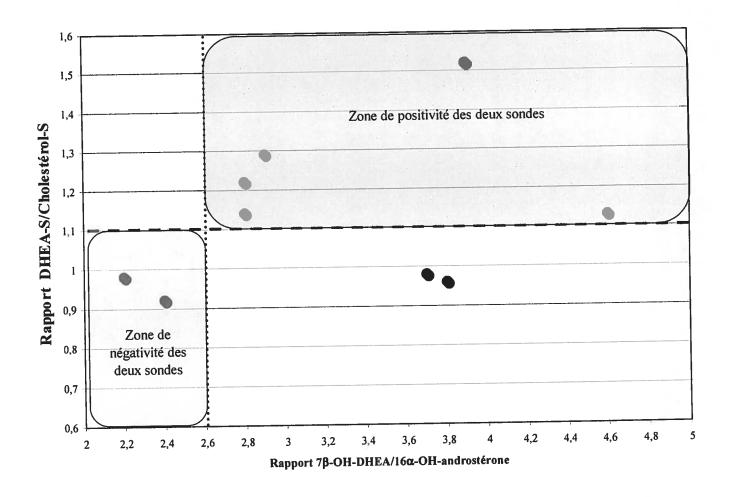


Figure 3.13: <u>Comparaison des deux sondes d'utilisation de la DHEA: 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone en CG/SM et rapports isotopiques des métabolites/Cholestérol-S en CG/C/SMRI.</u>

3.4.3 Conclusion

Les résultats obtenus lors de l'analyse par spectrométrie de masse d'isotopes stables des métabolites excrétés, soient la DHEA-S et la 7 β -OH-DHEA-S, ainsi que du cholestérol-S utilisé comme stéroïde de référence, nous ont permis d'en vérifier l'origine synthétique, i.e. qu'ils étaient caractéristiques de l'administration de DHEA et non les produits d'une voie endogène. Les teneurs en ^{13}C exprimées en delta per mille (^{13}C $^{0}/_{00}$) de ces métabolites urinaires ont clairement affiché des valeurs fortement négatives et caractéristiques du produit synthétique ingéré. En étudiant les variations des profils stéroïdiens avant et après l'administration de 200 mg de DHEA chez des volontaires, nous avons pu observer que les rapports isotopiques demeurent significativement altérés au-delà d'une vingtaine d'heures pour la 7 β -OH-DHEA-S et d'une cinquantaine d'heures pour la DHEA-S, tandis que les valeurs du stéroïde de référence demeurent inaltérées. Ce faisant, nous croyons que le rapport des valeurs isotopiques de la DHEA-S établit sur celui des valeurs du cholestérol apparaît être un outil diagnostique fiable de l'utilisation de la DHEA, qui pourrait être efficace sur une période d'au moins 48 heures.

Lorsqu'on compare les deux sondes de détection de la DHEA que nous avons testées dans le cadre de cette recherche, soient : la valeur du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone analysé par CG/SM et la valeur du rapport isotopique DHEA-S/Cholestérol-S mesuré par CG/C/SMRI, nous pouvons en conclure qu'elles sont toutes deux fiables et complémentaires, la première étant diagnostique pendant environ 20 heures et la deuxième pendant plus de 50 heures. Pour ce qui est de la sonde du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone, un seuil maximal au-delà duquel la prise de DHEA exogène pourrait être suspectée a été fixé à 2.6. À partir de cette limite établie, nous avons sélectionné à travers les

échantillons d'une population d'athlètes analysée, 7 cas considérés « positifs », selon le seuil de détection proposé pour la sonde. Lorsque ces mêmes échantillons ont été analysés avec la sonde CG/C/SMRI, nous avons pu vérifier l'origine exogène des métabolites d'excrétion de 5 d'entre eux, ces derniers affichant des valeurs excédentaires à 1.1, seuil maximal établit pour les rapports isotopiques DHEA-S/Cholestérol-S.

À la lumière de ces résultats, nous pensons que les deux méthodes de détection proposées sont complémentaires et que la combinaison des deux est essentielle à la détection de l'usage illicite de la DHEA. La sonde mesurée par CG/SM est relativement fiable sur une période d'environ 25 heures et s'avère être un bon indicateur d'utilisation de ce stéroïde. Elle nécessite néanmoins une confirmation par CG/C/SMRI visant à s'assurer de l'origine synthétique de ses métabolites d'excrétion, cette méthode étant efficace pendant au moins 50 heures. De cette façon, nous croyons que les deux sondes combinées pourraient constituer un outil diagnostique fiable et utilitaire de détection de la DHEA, pouvant être employé dans le cadre des analyses de contrôle du dopage.

CHAPITRE IV

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au cours de cette étude, nous avons travaillé à la validation d'une sonde potentiellement diagnostique de l'administration de DHEA per os, basée sur la modification du rapport 7β-OH-DHEA/16α-OH-androstérone et dont la mesure par CG/SM permet de détecter la présence de DHEA exogène dans la fraction sulfate de l'urine jusqu'à environ 25 heures suivant sa prise orale. Lorsque combinée à l'analyse CG/C/SMRI du métabolite DHEA-S et du stéroïde de référence, le cholestérol dans ce cas, cette sonde nous est apparue être un outil diagnostique fiable de l'utilisation de la DHEA.

J.F. Lévesque et collaborateurs (Lévesque et Ayotte, 1999), avaient observé lors de travaux effectués précédemment, la suppression de la concentration en 3α , 16α -dihydroxy- 5α -androstan-17-one (16α -OH-androstérone) opposée à une nette augmentation de la concentration en 3β - 7β -dihydroxy-5-androstèn-17-one (7β -OH-DHEA) dans la fraction sulfate de l'urine suite à l'administration d'une dose unique de DHEA. Nous avons repris cette étude en mesurant cette fois de façon quantitative l'altération d'excrétion sous forme de rapport de ces métabolites sulfoconjugués.

Dans un premier temps, nous avons effectué la synthèse d'un des composés de référence, la 7β-OH-DHEA, qui n'était pas disponible commercialement. Deux voies comprenant respectivement 5 et 6 étapes ont été empruntées pour réaliser sa

synthèse ; une voie A dite « classique » et une voie B basée sur l'emploi d'un nouveau groupement protecteur sélectifs pour les cétones saturées. Nous avons constaté que les deux étapes limitantes étaient l'oxydation allylique en position C-7 pour la voie A, ainsi que la formation du groupe protecteur O-méthoxycarbonyle cyanohydrine sur la cétone au détriment de l'énone pour la voie B, causant des pertes par la formation de produits secondaires. Comme tous les rendements obtenus pour chaque étape étaient supérieurs à 68 %, nous en concluons que les deux voies de synthèse de la 7β-OH-DHEA étaient équivalentes et efficaces.

Nous avons ensuite identifié par analyse CG/SM les dérivés TMS-éther et TMS-énol des standards de référence qui ont été utilisés pour les diverses mesures biochimiques des échantillons urinaires tout au long de l'étude. Nous avons vérifié encore une fois que les stéroïdes dont l'altération d'excrétion était suffisante et persistante étaient bien ceux dont la structure avait été proposée au préalable. La caractérisation a été faite par la comparaison des données spectrales et chromatographiques des métabolites sulfoconjugués présents dans les urines avec celles des standards authentiques. Nous avons ensuite développé une méthode de quantification appropriée du rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone de la fraction sulfate en utilisant la 6α -OH-étiocholanolone comme étalon interne.

Par la suite, des analyses du rapport de concentrations de ces deux métabolites sulfoconjugués ont été réalisées auprès i) d'une population de référence; ii) de volontaires sains après ou sans administration d'un produit commercial contenant de la DHEA. Ces mesures nous ont permis de déterminer la distribution statistique, une moyenne, le 99% percentile de la population (2.6) obtenu pour des valeurs dites « normales ». De ces analyses, nous avons pu observer dans un premier

temps qu'il n'y avait aucune différence significative entre les rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone mesurés chez les hommes et les femmes. De plus, nous avons constaté que l'administration de DHEA chez les volontaires altérait significativement ce rapport en augmentant jusqu'à 19 fois sa valeur initiale et que le retour à la normal prenait entre 13 et 25 heures. Ces résultats nous ont amené à vérifier l'hypothèse de Hampl et Starka (Hampl et Starka, 2000 (1 et 2)) qui stipule que la voie de 7-hydroxylation serait concurrente à celle de 16α -hydroxylation dans le métabolisme de la DHEA; autrement dit en présence de concentrations supra-physiologiques de DHEA, la formation des métabolites 7-hydroxylés serait favorisée au détriment de ceux hydroxylés en 16α , selon un mécanisme encore inexpliqué.

Lorsque ces mêmes analyses ont été effectuées au sein d'une population d'athlètes, nous avons constaté que les valeurs absolues de concentrations étaient plus élevées, influençant de même les données statistiques s'y rattachant. Cette différence à la hausse du rapport 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone nous a laissé supposer que quelques cas parmi ces athlètes auraient pu être considérés « positifs » à la DHEA, la valeur de leurs rapports excédant le seuil maximal proposé. C'est donc pour palier à cet écart que les échantillons présentant des rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone élevés ont été sélectionnés pour des analyses complémentaires en spectrométrie de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI), afin de s'assurer que ces valeurs excessives étaient causées soit par une excrétion naturellement forte en 7β -OH-DHEA ou faible en 16α -OH-androstérone, ou soit par une prise exogène de DHEA.

Nous avons débuté l'analyse par CG/C/SMRI de la teneur en 13 C (exprimée en δ 13 C $^{0}/_{00}$) des métabolites urinaires sulfoconjugués de spécimens recueillis suite à l'administration de DHEA. Nous avons pu vérifier que l'augmentation des concentrations urinaires en DHEA-S et en 7β -OH-DHEA-S était bel et bien liée à l'administration du supplément. En effet, les valeurs obtenues étaient affectées, atteignant un pic minimum de -27/-29, comparativement à des valeurs initiales de -19/-21 et différaient de celles mesurées chez le cholestérol, le stéroïde de référence non affecté par la prise de DHEA synthétique, dont les valeurs se situaient entre -18 et -20. De ces analyses, nous avons observé que la teneur en 13 C de la DHEA-S était affectée beaucoup plus longtemps par la prise de DHEA que la 7β -OH-DHEA-S, soit environ 50 heures comparativement à 20 heures. En somme, le rapport de δ 13 C $^{0}/_{00}$ de la DHEA-S sur le cholestérol-S constituerait l'outil diagnostique le plus approprié pour détecter la présence de DHEA synthétique dans l'urine.

L'utilisation de cette sonde du rapport DHEA-S/Cholestérol-S nous a ensuite permis de confirmer 5 cas positifs sur les 9 échantillons d'athlètes sélectionnés au cours des analyses CG/SM en raison de leurs rapports 7β -OH-DHEA/ 16α -OH-androstérone dépassant (7) ou avoisinant (2) le seuil maximal de 2.6. Deux de ces cas étaient inexplicablement élevés, d'où la nécessité de combiner les deux techniques afin d'éviter les faux positifs et de confirmer l'origine synthétique de la DHEA présente dans les échantillons « suspects ».

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire visant à élaborer une méthode de détection fiable de la DHEA dans l'urine par CG/SM ont donc conduit à des résultats concluants. La mise au point d'une sonde basée sur la détermination d'un rapport de métabolites sulfoconjugués nous a permis de différencier les profils urinaires chez les individus ayant consommé ou non de la DHEA par voie orale depuis une période allant jusqu'à 25 heures. La stabilité et l'efficacité de cette sonde ont été validées par des analyses de spectrométrie de masse d'isotopes stables (CG/C/SMRI) en mesurant le rapport de DHEA-S/Cholestérol-S sur une période de plus de 50 heures. Il semble donc que cette méthode analytique combinée puisse être un outil diagnostique prometteur permettant de détecter l'usage illicite de DHEA orale.

CHAPITRE V

RÉFÉRENCES

AGUILERA R, Becchi M, Casabianca H, Hatton CK, Catlin DH, Starcevic B, Pope HG (1996), Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids, J Mass Spectrometry, 31:169-177.

ALEXANDERSEN P, Haarbo J, Christiansen C (1996), The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review, Artheriosclerosis, 125: 1-13.

ALLAIN P (2000), Les médicaments, Éditions CdM, Paris, 500 p.

ALLOLIO B, Arlt W (2002), <u>DHEA treatment: myth or reality?</u>, Trends in Endocrinology and Metabolism, Issue 7, 13: 288-294

ARAGNO M, Parola S, Brignardello E, Manti R, Betteto S, Tamagano E, Danni O, Boccuzzi G (2001), Oxidative stress and eicosanoids in the kidneys of hyperglycemic rats treated with dehydroepiandrosterone, Free Radic Biol Med 15: 935-942.

ARANEO B, Daynes R (1995), Dehydroepiandrosterone functions as more than an antiglucocorticoid in preserving immunocompetence after thermal injury, Endocrinology, 136: 393-401.

ARLT W, Schneider S, Zenker S, Bender G, Zurth C, Mühe B et Allolio B (2002), Pharmacokinetics and biotransformation of a depot preparation of DHEA enanthate plus estradiol valerate (Gynodian Depot ®), Experimental and clinical endo and diabetes, 70-72.

ARLT W, Justl H-G, Callies F, Reincke M, Hübler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B (1998), Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression, J Clin Endrocrinol Metab, 83: 1928-1932.

ARLT W, Haas J, Callies F, Reincke M, Hubler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B (1999), Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens, J Clin Endocrinol Metab, 84 (6): 2170-2176.

ARMSEY TD, Green GA (1997), <u>Nutrition supplements</u>: science vs hype, Phys Sportsmed, 25 (6): 77-92.

AYOTTE C, Goudreault D, Charlebois A (1996), Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine, J Chromatography, 687: 3-25.

- a) AYOTTE C, Goudreault D, Lajeunesse A, Cléroux M, Richard Y, Charlebois A, Couture JP, Fakirian A (2001), GC/C/IRMS and GC/MS in "natural" steroids testing, In Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (9). Proceedings of the Manfred Donike 19th Cologne workshop on dope analysis, Cologne Sport und Buch Strauβ 2001, 133-143.
- b) AYOTTE C, Lévesque JF, Cléroux M, Lajeunesse A, Goudreault D, Fakirian A (2001), Sport nutritional supplements: quality and doping controls, Can J App Physiol, 26: 120-129.

BARBÉ J (1995), <u>Déhydroépiandrostérone</u>: un nouveau moyen pour une nouvelle vie ?, Ann Pharm Belg, 46 (6-7): 27-30.

BARTOLAMI S (2002), <u>Cours d'introduction à l'endocrilogie</u>, Université de Montpellier II, France, http://schwann.free.fr/coursendocrinologie.html.

BAULIEU EE (1960), Esters-sulfates de stéroïdes hormonaux. Isolement de l'ester-sulfate de 5-androstène 3b-ol 17-one (Déhydroépiandrostérone) dans une tumeur cortico-surrénalienne. Absence du stéroïde libre, C.R. Acad Sci, 251 : 1421-1423.

BAULIEU EE, Corpéchot C, Pray F, Emiliozzi R, Lebeau M, Mauvais-Jarvis P, Robel P (1965), An adrenal-secreted « androgen » : dehydroepiandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in men, Rec Prog Horm Res, 2: 411-500.

BAULIEU EE, Kelly PA (1990), Mechanism of steroid hormone action, dans Hormones - from molecules to disease, Hermann Publishers in Arts and Science, Chapman and Hall, New-York et Londre, 405-419.

BAULIEU EE, Robel P (1990), Neurosteroids: a new brain function?, J Steroid Biochem Molec Biol, 37 (3): 395-403.

BAULIEU EE (1996), Dehydroepiandrosterone (DHEA): A fountain of youth, J Clin Endocrinol Metab, 81: 3147-3151.

BAULIEU EE, Robel P (1998), <u>DHEA and DHEA sulfate as neuroactive neurosteroids</u>, Proceedings of the National Academy of Science, USA, 95 (8): 4089-4091.

BAULIEU EE Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, et al. (2000), DHEA, DHEA Sulfate and aging: Contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue, Proc Natl Acad Sci USA, 97 (8): 4279-4284.

BECCHI M, Aguilera R, Farizon Y, Flament MM, Casabianca H, James P (1994), Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport, Rap Com Mass Spectrom, 8: 304-308.

BÉLANGER A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Labrie F (1994), Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40 to 80-year old men, J Clin Endocrinol Metab, 79: 1086-1090.

BERTHIAUME D et Poirier D (2000), O-Methoxycarbonyl cyanohydrin as a new protective group for carbonyls, Tetrahedron, 56: 5995-6003.

BOIVIN RP, Luu-The V, Lachance R, Labrie F, Poirier D (2000), Structure-activity relationships of 17-alpha-derivatives of estradiol as inhibitors of steroid sulfatases, J Med Chem, 43: 4465-4478.

BOSY TZ, Moore KA, Poklis A (1998), The effect of oral dehydroepiandrosterone on the urine testosterone/epitestosterone (T/E) ratio in human male volunteers, J Anal Toxicol, 22: 455-459.

BOWERS LD (1999), Oral dehydroepiandrosterone supplementation can increase the testosterone/epitestosterone ratio, Clinical Chemistry, 45: 295-297.

BROWN GA, Vukovich MD, Sharp RL, Reifenrath TA, Parsons KA, King DS (1999), Effect of oral DHEA on serum testosterone and adaptations to resistance training in young men, Journal of Applied Physiology, 87 (6): 2274-2283.

BROWNE ES, Porter JR, Correa G, Abadie J, Svec F (1993),

Dehydroepiandrosterone regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the zucker

rat. The obesity research program, J Steroid Biochem Molec Biol., 45 (6): 517-524.

BURSTEIN S, Lieberman, S (1958), Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedure, J Biol Chem, 233.

CALLIES F, Arlt W, Siekmann L, Hubler D, Bidlingmaier F, Allolio B (2000), Influence of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on urinary steroid metabolites in males and females, Steroids, 65 (2): 98-102.

CAULIN C, Berthezene F, Bruckert E, Caron J, Chanson P, Chassany O, Claver F, Costagliola D, Debaert M, Diquet B, Marty M, Marzin D, Mazue G, Piette F, Revuz J, Roux C, Tremblay D, Young J (2001), Rapport sur la DHEA Groupe Ad Hoc, Direction de l'évaluation des médicaments et des produits biologiques, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, 1-12.

CLARKSON PM, Rawson ES (1999), <u>Nutritional supplements to increase muscle mass</u>, Critical Review in Food Science and Nutrition, 39 (4): 317-328.

COLEMAN DL, Leiter EH, Schwizer RW (1982), Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in diabetic mice, Diabetes, 31:830-833.

CORRIGAN AB (1999), Dehydroepiandrosterone and sport, Med J Aust, 171: 206-208

CORRIGAN AB (2002), DHEA and sport, Clin J Sport Med, 12 (4): 236-41.

COSTILL DL, Pearson DR, Fink WJ (1984), Anabolic steroid use among athletes: changes in HDL-C levels, Phys Sportsmedicine, 12:112-117.

DEHENNIN L, Ferry M, Lafarge P, Peres G, Lafarge JP (1998), Oral administration of dehydroepiandrosterone to healthy men: alteration of the urinary androgen profile and consequences for the detection of abuse in sport by gas chromatography-mass spectrometry, Steroids, 63: 80-87.

DEHENNIN L, Bonnaire Y, Plou P (2001), <u>Human nutritional supplements in the horse</u>. Dehydroepiandrosterone versus androstenedione: comparative effects on the androgen profile and consequences for doping analysis, J Anal Toxicol, 25 (8): 685-690.

DONIKE M, Zimmermann (1980), Preparation of trimethylsilyl-, triethylsilyl- and tert-butyldimethylsilyl enol ethers of oxo steroids for gas chromatographic and mass spectrometric studies, J Chromatogr 202: 483-486.

DONIKE M, Rauth S, Sample B (1993), Excretion of ephedrine and endogenous steroids under conditions of controlled water intake and of water diuresis, Proceedings of the 10th Cologne Workshop on Dope Analysis, 7th to 12th June 1992, M. Donike, H, Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, S. Rauth eds, Sport und Buch Strauss ed. Sport, Koln 1993: 163.

poostzadeh J, Cotillon AC, Morfin, R (1996), Studies of the enzyme complex responsible for pregnenolone and dehydroepiandrosterone 7 alpha-hydroxylation in mouse tissues, Steroids, 61: 613-620.

DOOSTZADEH J, Morfin, R (1998), Hydroxylation of pregnenolone at the 7 alphaand 7 beta-positions by mouse liver microsomes. Effects of cytochrome p450 inhibitors and structure-specific inhibition by steroid hormones, Steroids, 63 (7-8): 383-92.

DUNN JF, Nisula BC, Rodbard D (1981), <u>Transport of steroid hormones</u>: <u>Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and cortiosteroid-binding globulin in human plasma</u>, J Clin Endocrino Metab, 53: 58-68.

FILICORI M, Butler JP, Crowley WF Jr (1984), Neuro-endocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion, J Clin Invest, 73:1638-1647.

FLENKER U, Horning S, Nolteernsting H, Geyer H, Schänzer (1999), Measurement of 13C/12C-ratios to confirm misuse of endogenous steroids, , Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (6). Proceedings of the Manfred Donike 16th Cologne workshop on dope analysis 1998, Cologne Sport und Buch Strauβ, 243-256.

FLESHNER M, Pugh CR, Tremblay D, Rudy JW (1997), <u>DHEA-S</u> selectively impairs contextual-fear conditioning: support for the antiglucocorticoid hypothesis, Behav Neurosci, 111:512-527.

HALLIWELL B, Gutteridge J, Cross C (1992), Free radicals, antioxidant, human disease: where we are now?, J Lab Clin Med, 119: 598-620.

HAMPL R, Morfin R, Starka L (1997), 7-hydroxylated derivatives of dehydroepiandrosterone: what are they good for?, Endocrine Regulations, 31:211-218.

HAMPL R, Lapcik O, Hill M, Klak J, Kasal A, Novacek A, Sterzl I, Sterzl J, Starka (2000), 7-Hydroxydehydroepiandrosterone-a natural antiglucocorticoid and a candidate for steroid replacement therapy? Physiol Res, 49 (Suppl): 107-112.

- (a) HAMPL R, Starka L (2000), <u>16α-hydroxylated metabolites of</u> <u>déhydroépiandrostérone and their biological significance</u>, Endocrine Regulations, 34: 161-163.
- (b) HAMPL R, Starka L (2000), <u>Hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone</u> New steroid markers of immune function?, Biomarkers and Environments, 3:1-2.

HANING RV Jr, Carlson IH, Flood CA, et al. (1991), Metabolism of dehydroepiandrosterone sulfate (DS) in normal women and women with high DS concentrations, J Clin Endocrinol Metab 73: 1210-1215.

HORNING S, Geyer H, Flenker U, Schanzer W (1997), Detection of exogenous steroids by ¹³C/¹²C analysis, Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (4). Proceedings of the Manfred Donike 14th Cologne workshop on dope analysis 1996, Cologne Sport und Buch Strauβ, 135-148.

JOHNSON R (1999), Abnormal testosterone : epitestosterone ratios after dehydroepiandrosterone supplementation, Clinical Chemistry, 45 : 163-164.

KAHN AJ, Halloran B (2002), <u>Dehydroepiandrosterone supplementation and bone turnover in middle-aged to elderly men</u>, J Clin Endocrinol Metab, 87 (4): 1544-1549.

KALIMI M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W (1994), Antiglucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA), Mol Cell Biochem, 131: 99-104.

KAZLAUSKAS R (1998), <u>Effects of dehydroepiandrosterone on urinary steroids</u>, Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (5). Proceedings of the Manfred Donike 15th Cologne workshop on dope analysis, Cologne Sport und Buch Strauβ, 83-90.

KEIZER H, Janssen GM, Menheere P, Kranenburg G (1989), Changes in basal plasma testosterone, cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate in previously untrained males and females preparing for a marathon, Int J Sports Med, 10 (Suppl 3): 139-145.

KHALIL A, Fortin JP, Lehoux JG, Fulop T (2000), Age related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in low density lipoproteins and its role in the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation, J Lipid Res, 41 (10): 1552-1561.

KHEMIS-Attal S, Dalmeyda V, Michot JL, Roudier M, Morfin R (1998), Increased total 7 alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in serum of patients with Alzheimer's disease, Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences (USA), 53 (2): 125-132.

KIM HS, Choi BS, Kwon KC, Lee SO, Kwak HJ, Lee CH (2000), Synthesis and antimicrobial activity of squalamine analogue, Bioorg Med Chem, 8: 2059-2065.

KRAFFT ME, Dasse OA, Fu Z (1999), Synthesis of the C/D/E and A/B rings of Xestobergsterol-(A), J Org Chem, 64: 2475-2485.

KROBOTH PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF (1999), DHEA and DHEA-S: a review, J Clin Pharmacol, 39: 327-48.

KUMAR (1987), Stereospecific 7β and 7α -hydroxycholesterol syntheses, synth comm, 17:1279-1286

LABAREE D, Hoyle RM, Hochberg RB (1997), A direct stereoselective synthesis of 7β-hydroxytestosterone, Steroids, 62: 482-486.

LABRIE C, Bélanger A, Labrie F (1988), Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate, Endocrinology, 123: 1412-1417.

LABRIE F, Bélanger A, Simard J, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez JL, Candas B (1998), <u>DHEA</u> and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging, Steroids, 63: 322-328.

LARDY H, Partridge B, Kneer N, Wei Y (1995), Ergosteroids: induction of thermogenic enzymes in liver of rats treated with steroids derived from dehydroepiandrosterone, Proc Natl Acad Sci USA, 92:6617-6619.

LAUTALA P (2000), Cathechol O-methyltransferase: glucuronidation of inhibitors and methylation of substrates, University of Helsinki, Division of Pharmaceutical Chemistry.,http://farmacologiasif.unito.it/risorse/pharmgen_eng.htm.

LEBEAU MC, Alberga A, Baulieu EE (1964), Adrenal biosynthesis of dehydroisoandrosterone sulfate, Biochem Biophys Res, 17: 570-572.

LEBLANC M, Labrie C, Bélanger A, Candas Band Labrie F (2002), Pharmacokinetics of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) in the ovariectomised cynomolgus monkey, J Steroid Biochem Mol Biol, (81): 159-164.

LEGRAIN S, Massien C, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Diquet B, Chatellier G, Azizi M, Faucounau V, Porchet H, Forette F, Baulieu EE (2000), Dehydroepiandrosterone replacement administration : pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in healthy elderly subjects, J Clin Endocrinol Metab, 85 : 3208-3217.

LEUNISSEN WJJ (1979), Quantitative aspects of the determination of steroid profiles from urine by capillary gas chromatography, thèse doctorale, Eindhoven, Pays-Bas.

LÉVESQUE JF (1998), L'importance clinique de l'excrétion urinaire des stéroïdes sulfoconjugués lors de contrôles antidopage, mémoire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, 136 p.

LÉVESQUE JF, Ayotte C (1999), The oral administration of DHEA: The efficiency of steroid profiling, Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (7). Proceedings of the Manfred Donike 17th Cologne workshop on dope analysis 1999, Cologne Sport und Buch Strauβ, 213-221.

LONGCOPE C (1996), <u>Dehydroepiandrosterone metabolism</u>, J Endocrinology, 150: 125-127.

LORIA RM (1997), Antiglucocorticoid function of androstenediol, Psychoneuroendocrinology, 22 (suppl 1): 103-108.

LUDWIG H, Spiteller M, Egger HJ, Spiteller G (1977), Correlation of emotional stress and physical exertions with urinary metabolite profiles, Israel J Chem, 16: 7-11.

MEIKLE WA, Dorchuck RW, Araneo BA, Stringham JD, Evans TG et al. (1992), The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T-Cells, J Steroid Biochem Molec Biol, 42 (3-4): 293-3304.

MERRIL JT, Dinu AR, Lahita RG (1996), <u>Autoimmunity: The female connection</u>., Medscape Womens Health, 1:5.

MORALES AJ, Nolan JJ, Nelson JC (1994), Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age J Clin Endocrinol Metab 78: 1360-1367.

MORFIN R, Courchay G (1994), <u>Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as</u> precursors of native 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice, J Steroid Biochem Molec Biol, 50: 91-100.

MORFIN R, Starka L (2001), Neurosteroid 7-hydroxylation products in the brain, Int Rev Neurobiol, 46: 79-95.

NESTLER JE, Barlascini CO, Clore JN, Blackard WG (1988), Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men, J Clin Endocrinol Metab, 66: 57-61.

OBERBECK R, Benschop RJ, Jacobs R, Hosch W, Jetschmann JU, Schumeyer TH, Schmidt RE, Schedlowski M (1998), Endocrine mechanisms of stress-induced DHEA-secretion, Endocrinol. Invest, 21: 148-153.

OKAMOTO K (1996), Relationship between dehydroepiandrosterone sulfate and serum lipid levels in Japenese men, J Epidemiol, 6: 63-67.

ORENTREICH N, Brind JL, Rizer RL, Vogelman JH (1984), Age changes and sex diffences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood, J Clin Endo Metab, 59 (3): 551-555.

PAHLAVANI MA (1995), Therapeutic potential of dehydroepiandrosterone in various diseases, Drugs of Today, 31: 47-56.

PARASRAMPURIA J, Schwartz K, Petesch R (1998), Quality control of dehydroepiandrosterone dietary supplement products, JAMA, 280: 1565.

PFEIFER P, Spiteller G (1981), Steroid profiles of healthy individuals, J Chromato Biomed Appl, 223: 21-32.

PIPE A, Ayotte C, (2002), <u>Nutritional Supplements and Doping</u>, Clinical Journal of Sport Medicine, 12: 245-249.

PORSOVA-DUTOIT I, Sulcova J, Starka L (2000), <u>Do DHEA/DHEAS play a</u> protective role in coronary heart disease?, Physiol Res, 49: 43-56.

POUZAR V, Cerny I (1998), Synthesis of (19E)-3β,7α-dihydroxy-17-oxoandrost-5-en-19-al 19-(O)carboxymethyl)oxime, a new hapten for 7α -hydroxydehydroepiandrosterone (3β,7α-dihydroxyandrost-5-en-17-one), Czechoslovak Chemical Communications, 63 (10): 1623-1634.

PUROHIT A, Dauvois S, Parker MG, Potter BVL, Williams GJ, Reed MJ (1994), The hydrolysis of oestrone sulphate and dehydroepiandrosterone sulfate by human steroid sulfatase expressed in transfected COS-1 cells, J Steroid Biochem Molec Biol, 50: 101-104.

RAISONNIER P, Wright F (1999), Cours de Biochimie PCEM2, Biochimie métabolique et régulations C-1, Faculté de médecine, Pitié-Salpêtrière, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, http://www.chups.jussieu.fr

REGELSON W, Kalimi M (1994), Dehydrodepiandrosterone (DHEA) – the multifunctional steroid. II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. Mechanism of action?, Ann NY Acad Sci, 719: 564-575.

RUDDOCK Peter LD, Reese Paul B (1999), The effect of 4β and 19 ester functionalities on some electrophilic addition reactions of Δ^5 -steroids, Steroids, 64:812-819.

SCHAUER JE, Schelin A, Hanson P, Stratman, FW (1990), <u>Dehydroepiandrosterone</u> and a beta-agonist, energy transducers, alter antioxidant enzyme systems: influence of chronic training and acute exercice in rats, Arch Biochem Biophys 283: 503-511.

SCHWARTZ AG, Whitcomb JM, Nyce JW, Lewbart ML, Pashko LL (1988), Dehydroepiandrosterone and structural analogs: a new class of cancer chemopreventive agents, Adv Cancer Res, 51: 391-424.

SCHWARTZ AG, Fairman DK, Pashko LL (1988), The Biologic Role of DHEA, Carcinogenesis, 10: 1809.

SETIAWATI E, Suyatna FD, Wiria MS, Ulamsari D (2001), Profile of urinary excretion in Indonesian volunteers after DHEA administration, Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (9). Proceedings of the Manfred Donike 19th Cologne workshop on dope analysis 2001, Cologne Sport und Buch Strauβ, 287-292.

SHACKLETON CHL, Roitman E, Phillips A, Chang T (1997), Androstanediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry, Steroids, 62: 665.

SIRRS SM, Bebb RA (1999), DHEA: panacea or snake oil?, Can Fam Physician, 45: 1723-1728.

SKERRET PJ (1996), La DHEA : ignorez toute la publicité, http://www.quackwatch.com.

STARKA L et Kutova J (1962), 7-Hydroxylation of dehydroepiandrosterone in rat liver homogenate, Biochim Biophys Acta 56: 76-82.

STEIMER Th (2001), Steroid Hormone Metabolism, Division of Clinical Psychopharmacology, University Institute of Psychiatry, Switzerland, 1-13.

STURMI JE, DIORIO DJ (1998), Anabolic agents, Clin Sports Med, 17: 261-282.

SULCOVA J, Hill M, Masek R, Ceska R, Novacek A, Hampl R, Starka L (2001), Effects of transdermal application of 7-oxo-DHEA on the levels of steroids hormones, gonadotropins and lipids in healthy men, Physiol Res, 50: 9-18.

TAKAYANAGI R, Goto K, Suzuki S, Tanaka S, Shimoda S, Nawata H, (2002) Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a possible source for estrogen formatoin in bone cells: correlation between bone mineral density and serum DHEA-sulfate concentration in postmenopausal women, and the presence of aromatase to be enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblasts, Mech Ageing Dev, 123: 1107-14.

TCHÉDAM Ngatcha B (1999), Les dérivés de l'androstérone substitués en position 16, 3α et/ou 3β et les stéroïdes χ-lactones : synthèse chimique et inhibition des isoformes 3 et 5 de la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase, thèse de doctorat, faculté de médecine, Université Laval.

THOMAS G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu EE, Debuire B (1994), Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker, J Clin Endocrinol Metab, 79: 1273-1276.

TRAGER L (1977), Steroidhormone. biosynthese stoffwechsel wirkung, Berlin, Springer-Verlag, 166-177.

TUMMALA S, Svec F (1999), Correlation between the administered dose of DHEA and serum levels of DHEA and DHEA-S in human volunteers: analysis of published data, Clin Biochem, 32 (5): 355-61.

UEKI M, Okano M (1999), Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, Rapid Communication in Mass Spectrometry, 13: 2237-2243.

UEKI M, Takao Y, Okano M, Ikekita A, Sato M (2001), <u>Differentiation of endogenous and exogenous steroids in urine by means of isotope ratio mass spectrometry</u>, Schänzer W ed. Recent Advances in Doping Analysis (9). Proceedings of the Manfred Donike 19th Cologne workshop on dope analysis 2001, Cologne Sport und Buch Straub, 145-154.

UEKI M, Okano M, Ikekita A (1998), Nagano strategy against natural hormone doping testosterone, DHT, androstènedione and DHEA, Schänzer W ed. Recent Advances in Doping Analysis (6). Proceedings of the Manfred Donike 16th Cologne workhop on dope analysis, 1999. Cologne Sport und Buch Straub, 1999, 145-146.

URALETS VP, Gillette PA (2000), Over-the-Counter Δ^5 anabolic steroids 5-androsten-3,17-dione, 5-androsten-3b,17b-diol, dihydroepiandrosterone and 19-nor-5-androstan-3,17-dione; excretion studies in men, J Anal Toxicol, 24: 188-193.

URALETS VP, Gillette PA (2001), Individual variations of urinary steroid profiles in glucuronide and sulfate fractions after DHEA oral administration, Schänzer W ed. Recent Advances in Doping Analysis (9). Proceedings of the Manfred Donike 19th Cologne workhop on dope analysis, 2001, Cologne Sport und Buch Straub, 85-89.

VAN HOLLEHOVEN RF, Morabito LM, Engleman EG, McGuire JL (1998), Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months, J Rheumatol, 25: 285–89.

VANDE WIELE RL, MacDonald PC, Gurpide E, Lieberman S (1963), Studies on the secretion and intervention, Recent Progress in Hormone Research, 19: 275-310.

VAN DER MERWE PJ (1999), The influence of the use of multiple doses of DHEA on the steroid profile, Schanzer W, ed. Recent Advances in Doping Analysis (7). Proceedings of the Manfred Donike 17th Cologne workshop on dope analysis 1999, Cologne Sport und Buch Strauβ: 203-211.

VANLUCHENE E, Eechaute W, Vandekerckhove D (1982), Conversion of free 3b-hydroxy-5-ene-steroids by incubation with Helix Pomatia, J Steroid Biochem, 16: 701-703.

WALLACE MB, Lim J, Cutler A, Bucci L (1999), Effects of dehydroepiandrosterone vs androstenedione supplementation in men, Medicine and Science in Sports and Exercise, 31 (12): 1788-1792.

WELLE S, Jozefowicz R, Statt M (1990), Failure of dehydroepiandrosterone to influence energy and protein metabolism in humans, J Clin Endrocrinol Metab, 71: 1259-1264.

WILLIAMS JR (2000), The effects of dehydroepiandrosterone on carcinogenesis, obesity, the immune system, and aging, Lipids, 35 (3): 325-331.

WILSON JD (1988), Androgen abuse by athletes, Endocr Rev, 9: 81-199.