

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude du métabolisme de stéroïdes anabolisants androgènes à l'aide de
modèles *in vitro* d'hépatocytes humains

Par

Julie Gauthier

Thèse présentée

Pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph. D.)

en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne François Lépine, INRS- Institut

Armand-Frappier

Examineur externe

Karen Waldron, Université de Montréal

Examineur externe

Pierre Lavallée, Université de Montréal

Directrice de recherche

Christiane Ayotte, INRS-Institut Armand-
Frappier

RÉSUMÉ

Depuis quelques années, plusieurs stéroïdes anabolisants androgènes de synthèse se sont retrouvés sur le marché et pourraient être utilisés par les athlètes pour améliorer leur performance physique. Des modifications structurales ont été faites sur la testostérone et en découlent de nouvelles molécules qui sont indétectables lors des contrôles de dopage, la détection des substances d'utilisation interdite reposant sur leur identification et celles de leurs métabolites spécifiques. La caractérisation de ces nouveaux produits et de leurs métabolites est donc essentielle à leur détection.

L'étude du métabolisme de stéroïdes anabolisants androgènes repose sur l'analyse d'échantillons urinaires recueillis suite à leur administration à des volontaires sains. Ceci présente certains inconvénients, entre autre la complexité de la matrice urinaire compliquant l'élucidation des structures inconnues des métabolites. Dans le cas des nouveaux stéroïdes de synthèse, il n'existe aucune donnée quant à leur innocuité, qualité, degré de pureté et propriétés pharmacologiques. Ceci complique les études d'excrétion chez les humains, mais il est malgré tout important de déterminer leurs voies de biotransformations.

Pour cette classe de xénobiotiques, la majorité des biotransformations se fait au niveau du foie par des réactions de phase I comprenant des oxydations, réductions et hydroxylations, tandis que celles de phase II sont majoritairement des glucuro- et sulfoconjuguaisons. Les sites de biotransformations varient selon la structure des stéroïdes, les métabolites d'excrétion doivent être caractérisés pour chaque nouvelle molécule introduite. Les voies de biotransformation des SAA (stéroïdes anabolisants androgènes) « classiques » sont connues, ce qui guidera la proposition de structures pour les métabolites urinaires des nouveaux composés.

Dans le cadre de ce projet, nous avons eu recours à des modèles hépatiques *in vitro* tel que les hépatocytes humains cryopréservés et frais en suspension, ainsi que leurs fractions subcellulaires afin de générer et de caractériser les principaux métabolites de nouveaux stéroïdes de synthèse. Les métabolites produits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Certains métabolites ont été isolés d'incubations à grande échelle afin d'en déterminer plus finement la stéréochimie par l'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN). La caractérisation des métabolites a été effectuée par la synthèse chimique des composés de référence. Ce projet a permis d'élucider les métabolites de deux nouveaux stéroïdes soit la 17 β -hydroxy-2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-3-one (méthyldrostanolone) et la 17 β -hydroxy-17 α -méthyl-5 α -androst-2-ène (DMT) ainsi que de caractériser de façon plus détaillée ceux de la 17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-3-one (drostanolone). Les propriétés androgènes de ces composés et leur utilisation par des athlètes ont été préalablement démontrées. Nous avons prouvé l'utilité de ces outils *in vitro* qui permettent d'identifier plus rapidement les marqueurs métaboliques devant être utilisés pour la détection de produits dopants chez les athlètes.

Julie Gauthier

Christiane Ayotte

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Christiane Ayotte, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un projet de recherche stimulant et innovateur. L'aspect pluridisciplinaire de ce projet m'a permis de toucher à une multitude de techniques et d'explorer plusieurs domaines de la chimie et de la biologie. Elle a su renforcer mes connaissances scientifiques, me communiquer une rigueur scientifique et me pousser à dépasser mes limites. Pour tout ceci, je la remercie.

J'aimerais aussi remercier mon jury d'évaluation d'avoir consacré du temps à l'évaluation de ma thèse.

Pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire de synthèse chimique, j'aimerais remercier Donald Poirier et son équipe. Je les remercie pour leur temps, leur collaboration et l'espace qu'ils m'ont réservé.

J'aimerais aussi remercier tous mes amis et collègues du laboratoire de Christiane Ayotte pour leur aide. Une mention spéciale pour Danielle Goudreault, Paule-Emilie Groleau et Mary Gregory de l'INRS Institut Armand-Frappier qui m'ont beaucoup aidée en début de projet. Un merci tout spécial à Philippe Räss pour son aide précieuse.

Un énorme merci à mes parents, mon conjoint, mes grands-parents et mes amis proches qui m'ont encouragée, écoutée et conseillée tout au long de mes études dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles. Merci pour leur soutien, leur aide et leur appui qui m'ont été essentiels.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| Résumé..... | iii |
| Remerciements..... | v |
| Table des matières..... | vi |
| Liste des figures et des tableaux..... | viii |
| Liste des abréviations..... | xi |
| Introduction..... | 1 |
| Chapitre 1 : REVUE DE LITTÉRATURE..... | 4 |
| 1. Stéroïdes anabolisants androgènes..... | 5 |
| 1.1 Nomenclature..... | 5 |
| 1.2 Mécanisme de fonctionnement des hormones stéroïdiennes..... | 6 |
| 1.3 Usage médical et détourné des stéroïdes anabolisants androgènes..... | 10 |
| 1.4 Modifications structurelles par synthèse de SAA..... | 11 |
| 1.5 Biotransformations des stéroïdes anabolisants androgènes..... | 13 |
| 1.6 Nouveaux stéroïdes anabolisants androgènes de synthèse..... | 21 |
| 2. Modèles utilisés pour l'étude de la biotransformation des stéroïdes anabolisants androgènes..... | 22 |
| 2.1 Modèles <i>in vivo</i> | 22 |
| 2.2 Modèles <i>in vitro</i> | 24 |
| 3. Techniques analytiques employées pour la détection des agents dopants..... | 28 |
| 3.1 Protocole d'extractions des stéroïdes anabolisants et analyse par CG-SM..... | 30 |
| 3.2 Fragmentation..... | 32 |
| 3.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire..... | 33 |
| 4. But du travail..... | 34 |
| Chapitre 2 ARTICLES SCIENTIFIQUES ET COMPLÉMENTS D'ARTICLE..... | 36 |
| Section 1 : Identification of Drostanolone and 17-Methyldrostanolone Metabolites Produced by Cryopreserved Human Hepatocytes..... | 37 |
| 1.1 Résumé de l'article en français..... | 37 |
| 1.2 Description de l'article et contribution de l'étudiante..... | 38 |
| 1.3 Article..... | 39 |
| 1.4 Complément, discussion et conclusion..... | 73 |
| Section 2 : Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes..... | 113 |
| 2.1 Résumé de l'article en français..... | 113 |
| 2.2 Description de l'article et contribution de l'étudiante..... | 113 |
| 2.3 Article..... | 115 |
| 2.4 Conclusion..... | 146 |
| Chapitre 3 CONCLUSION ET CONTRIBUTIONS À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES..... | 148 |
| Chapitre 4 RÉFÉRENCES..... | 152 |
| Annexes..... | 168 |
| Annexe A : Structures des stéroïdes présentés dans la thèse..... | 169 |
| Annexe B : Schéma des manipulations pour la production de métabolites à l'aide d'hépatocytes cryopréservés..... | 184 |

Annexe C :Spectre RMN du métabolite 17 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -
androstane (76).....185

LISTE DE FIGURES ET DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Figure 1.1: Structures de a) la testostérone (1) ; b) 5 α -dihydrotestostérone (2a) (5 α -DHT) et c) 5 β -dihydrotestostérone (2b) (5 β -DHT) | 6 |
| Figure 1.2: Schéma du mécanisme d'action des stéroïdes anabolisants androgènes : A) diffusion passive du stéroïde dans la cellule, B) liaison au récepteur androgène, C) translocation du complexe récepteur-stéroïde dans le noyau de la cellule, D) liaison du complexe à la chromatine d'ADN, E) transcription en ARN messenger, F) traduction de l'ARN messenger en protéines..... | 7 |
| Figure 1.3 : Exemple du positionnement du stéroïde dans la cavité du site actif du récepteur androgène (Fragkaki, Angelis, Koupparis <i>et al.</i> , 2009) | 8 |
| Figure 1.4: Exemples de modifications structurelles possible des SAA où R=H, CH ₃ , -COCH ₃ , etc..... | 12 |
| Figure 1.5 : Principales voies de réactions de métabolisme de phase I des stéroïdes anabolisants androgènes..... | 16 |
| Figure 1.6 : Voies de réactions de phase I de l'éthinylestradiol (18), de l'estrone (14) (haut) et de la progestérone (19) (bas) par les cytochromes P450 | 18 |
| Figure 1.7 : Biotransformation de phase II de stéroïdes anabolisants androgènes : a) glucuroconjugaison, b) sulfoconjugaison | 19 |
| Figure 1.8 : Structures de quelques nouveaux stéroïdes | 22 |
| Figure 1.9 : Fragmentations caractéristiques du cycle D d'un stéroïde hydroxylé et méthylé en position C-17 (a) et portant un groupement hydroxyle en position C-16 (b) | 33 |
| Figure 2.1: Synthesis of methylrostanolone (4) from drostanolone (6). Reagents and conditions: (a) ethylene glycol, triethyl orthoformate, p-TSA, CH ₂ Cl ₂ , rt; (b) Dess-Martin periodinane, CH ₂ Cl ₂ , rt; (c) MeLi, CeCl ₃ , THF, -78 °C; (d) HCl 10 % / acetone (4:6, V:V), rt. | 53 |
| Figure 2.2: Total ion chromatogram of the GC/MS analysis (full scan mode) of metabolites (TMS-derivatives) isolated from incubations of cryopreserved human hepatocytes with methylrostanolone (4). | 54 |
| Figure 2.3: Mass spectrum and proposed structures of the pertrimethylsilyl derivative of methylrostanolone 16-hydroxylated metabolites 4E (upper panel) and 4G (lower panel) produced from incubations with cryopreserved human hepatocytes. | 56 |
| Figure 2.4: Mass spectrum of the pertrimethylsilyl derivative of the major isomer of methylrostanolone metabolite 4C (upper panel) and drostanolone metabolite 6C (lower panel) produced from incubations with cryopreserved human hepatocytes. ... | 57 |
| Figure 2.5: Synthesis of 2 α -hydroxymethyl-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (49), the corresponding 3 α -OH and 3 β -OH derivatives (50A and 50B) and 2 β ,17 α -dimethyl-5 α -androstane-2 α ,3 β ,17 β -triol (44) from oxymetholone (41). Reagents and conditions: (a) NaBH ₄ , MeOH, rt; (b) LiAlH ₄ , dioxane/THF (1:1, V:V), reflux; (c) m-CPBA, CHCl ₃ /benzene (1:1, V:V), rt; (d) LiAlH ₄ (1.0 M in THF), diethylether/THF/dioxane (3:2:2, V:V:V), rt. | 59 |
| Figure 2.6: Structure and mass spectrum of the pertrimethylsilyl derivative of 2 α -hydroxymethyl-17 α -methyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (50A) obtained by chemical synthesis from oxymetholone (41)..... | 60 |

| | |
|---|-----|
| Figure 2.7: Mass spectrum and proposed fragmentation pathways of the pertrimethylsilyl derivative of 2 β ,17 α -dimethyl-5 α -androstane-2 α ,3 β ,17 β -triol (44) produced by chemical synthesis from oxymetholone (41)..... | 61 |
| Figure 2.8: Proposed structures and fragmentation pathways for the pertrimethylsilyl derivatives of drostanolone and methyl drostanolone 2-hydroxylated metabolites 6C and 4C (major isomers) extracted from incubations with cryopreserved human hepatocytes..... | 62 |
| Figure 2.9: Proposed pathways and structures of metabolites 4A to 4H for the biotransformation of methyl drostanolone (4) in cryopreserved human hepatocytes. . | 64 |
| Figure 2.10: Mass spectrum of the pertrimethylsilyl 2,3,16,17-tetrol metabolite 4H of methyl drostanolone (4) obtained from the incubation with cryopreserved human hepatocytes (upper panel) and excreted in human urine (lower panel), the latter being interfered by coeluting substances (corticosteroids metabolites)..... | 66 |
| Figure 2.11 : Ions extraits du chromatogramme de l'analyse CG-SM des métabolites pertriméthylsilylés produits de l'incubation de la drostanolone avec les hépatocytes cryopréservés | 75 |
| Figure 2.12: Spectre de masse et fragmentation proposée du dérivé pertriméthylsilylé de la drostanolone (6) (de Boer <i>et al.</i> , 1992)..... | 87 |
| Figure 2.13 : Spectres de masse des dérivés pertriméthylsilylés de : a) 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (54) correspondant au métabolite M2 ; et de b) 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55) correspondant au métabolite M5. | 89 |
| Figure 2.14 : Schéma de synthèse des isomères 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (54 ; M2) et 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55 ; M5) | 91 |
| Figure 2.15 : Relation entre les protons C-2, C-3 et C-4 des isomères 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (54 ; M2) et 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55 ; M5)..... | 92 |
| Figure 2.16 : Spectres de masse des dérivés pertriméthylsilylés de la 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (60 ; M1) (a) et de la 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (59 ; M3)(b)..... | 94 |
| Figure 2.17 : Schéma de synthèse des 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (59 ; M3) et 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (60 ; M1)..... | 96 |
| Figure 2.18: Schéma de préparation de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (61) (M4) à partir de la drostanolone (6)..... | 98 |
| Figure 2.19 : Spectre de masse et fragmentation proposée du dérivé pertriméthylsilylé de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (61 ; M4) (Goudreault & Massé, 1991)..... | 99 |
| Figure 2.20: Schéma de synthèse du 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68) à partir de la 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one (62). | 101 |
| Figure 2.21: Schéma de synthèse du 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73) à partir du 3 β -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranoloxo-5 α -androstane (65)..... | 103 |
| Figure 2.22 : Spectre de masse du dérivé pertriméthylsilylé et fragmentation proposée pour le 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68)..... | 105 |
| Figure 2.23 : Spectre de masse du dérivé pertriméthylsilylé et fragmentation proposée pour le 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73)..... | 106 |

| | |
|---|-----|
| Figure 2.24: Spectre de ¹ H RMN du 2α-méthyl-2β,3α,17β-trihydroxy-5α-androstane (74 ; M6) | 108 |
| Figure 2.25: Spectre NOESY du 2α-méthyl-2β,3α,17β-trihydroxy-5α-androstane (74 ; M6)..... | 109 |
| Figure 2.26: Synthèse de 1α,17β-dihydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène (86) et 1β,17β-dihydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène (88)..... | 134 |
| Figure 2.27: Spectres de masse et voies de fragmentation proposées des dérivés TMS de 17β-hydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène-1-one (87) (panneau supérieur) et 1α,17β-dihydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène (86), structure proposée (panneau inférieur)..... | 135 |
| Figure 2.28: Synthèse de 4ξ,17β-dihydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène (94 ; M3)..... | 136 |
| Figure 2.29: Spectres de masse des dérivés TMS de 17β-hydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène-4-one (93 ; M2) (panneau supérieur), 17β-hydroxy-5α-androst-2-ène-4-one (78) (panneau intermédiaire) et 4ξ,17β-dihydroxy-17α-méthyl-5α-androst-2-ène (94 ; M3) (panneau inférieur)..... | 137 |
| Figure 2.30: Spectre de masse du dérivé TMS de 17α-méthyl-2β,3α,17β-trihydroxy-5α-androstane (76 ; M4)..... | 139 |
| Figure 2.31 : Structure du métabolite proposé de la DMT : 17α-méthyl-2β,3α,17β-trihydroxy-5α-androstane (76 ; M4) | 147 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

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

SAA : Stéroïde anabolisant androgène

FDA : Food and Drug Administration

THG : Tétrahydrogestrinone

DMT : Désoxyméthyltestostérone

5 α -DHT : 5 α -dihydrotestostérone

3-HSD : 3-hydroxystéroïde déshydrogénase

UDP : uridine diphosphate

UGT : UDP-glucuronosyltransférase

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

RMN : Résonance magnétique nucléaire

TMS : triméthylsilyle

MSTFA : N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide

ITMS : iodotriméthylsilane

CL-SM : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

NOESY : Spectroscopie de l'effet nucléaire d'Overhauser

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

UDPGA : Acide d'uridine 5'-diphosphate glucuronique

INTRODUCTION

L'utilisation de stimulants et de produits dopants, tels les stéroïdes anabolisants androgènes (SAA), est perçue par certains comme étant un phénomène non seulement restreint aux athlètes mais faisant partie d'une conduite dopante s'exprimant dans les sociétés occidentales. L'atteinte de hauts niveaux de performance et l'importance du facteur économique associé au sport spectacle amènent certains athlètes à être prêts à tout pour atteindre leurs objectifs, même si cela va parfois à l'encontre de l'éthique sportive et est au détriment de leur santé (Quaglio *et al.*, 2009). En 2003, le scandale des laboratoires « BALCO » aux États-Unis a mis au jour une distribution secrète de nouveaux stéroïdes anabolisants androgènes, fort probablement indétectables. Certains de ces produits se sont retrouvés en vente libre aux États-Unis et sur le réseau internet. Aucune étude clinique préalable n'était pourtant disponible quant à leur innocuité, leur qualité, leur degré de pureté et leurs propriétés pharmacologiques. De plus, l'étiquetage de ces produits est généralement trompeur, leur composition souvent mal définie et les noms utilisés ne permettent pas d'en déterminer la structure chimique ni l'activité potentielle ou réelle. Les agences de réglementation comme Santé Canada et la FDA aux États-Unis interdisent la distribution de ces produits lorsqu'elles en sont informées et qu'elles ont obtenu des données leur permettant de le faire. Il est donc essentiel d'identifier rapidement ces produits et d'en étudier les propriétés pharmacologiques. Dans le contexte du dopage sportif, il faut également caractériser les métabolites ou les marqueurs d'administration afin d'en détecter l'utilisation lors des contrôles antidopage.

Ces nouveaux stéroïdes illicites comprennent entre autre la tétrahydrogestrinone (THG ou 17 β -hydroxy-18 α -homo-pregna-4,9,11-trien-3-one) (Catlin *et al.*, 2004), la désoxyméthyltestostérone (DMT, 17 β -hydroxy-17 α -méthyl-5 α -androst-2-ène) (Ayotte *et al.*, 2006 ; Sekera *et al.*, 2005), la norboléthone (18,19-dinor-13-éthyl-17-hydroxy-17 α -pregn-4-èn-3-one) (Catlin *et al.*, 2002) et la méthylrostanolone (2 α ,17 α -diméthyl-17 β -hydroxy-

5 α -androstan-3-one) (Ayotte *et al.*, 2006). Des propriétés androgènes importantes ont été associées à certains de ces stéroïdes *a posteriori* (Bahrke & Yesalis, 2004; Hartgens & Kuipers, 2004; Kutscher *et al.*, 2002). Depuis 2005, la distribution de ces produits est illégale au Canada comme aux États-Unis, mais il demeure possible de s'en procurer comme le démontrent les saisies effectuées aux douanes canadiennes.

Dans le but de promouvoir et coordonner la lutte au dopage sportif, l'Agence Mondiale Antidopage (AMA) a été fondée en 1998 par le Comité international olympique. Depuis 2004, celle-ci émet une liste annuelle des substances et méthodes interdites en et hors compétition et effectue un classement des substances selon leurs propriétés pharmacologiques pressenties ou démontrées. Pour inclure une substance à cette liste, il suffit d'estimer sur la base des données scientifiques, que son utilisation a le potentiel d'améliorer la performance sportive ou est susceptible de masquer l'usage de composés dopants, peut induire un risque pour la santé du sportif et est contraire à l'esprit sportif (Agence Mondiale Antidopage, 2009). La présence de la substance interdite ou de ses métabolites dans l'urine constitue une violation du Code Mondial Antidopage et peut mener à la suspension de l'athlète. Lors des contrôles antidopage, les substances bannies, tels que les SAA, et leurs métabolites spécifiques sont recherchés principalement dans l'urine ; ainsi, une bonne connaissance du métabolisme de ces substances est requise. Pour se faire, on a généralement recours à des études d'excrétion chez l'humain permettant d'élucider les voies de biotransformation majeures de phase I et II. En analyse de routine, les métabolites diagnostiques sont détectés principalement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple ou en tandem (CG-SMⁿ) (Ayotte *et al.*, 1996) ou par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SMⁿ) (Deventer *et al.*, 2006).

Il y a par contre certains désavantages aux études d'excrétion. Tout d'abord, une matrice d'analyse urinaire complexe est obtenue ce qui complique

l'isolement, la détection et l'élucidation des structures de métabolites inconnus. Finalement, les études d'excrétion doivent être limitées à l'essentiel dans le cas de nouvelles molécules, car ces produits ne font pas l'objet de contrôle de qualité et leur innocuité est inconnue ce qui pose des questions éthiques évidentes. Un modèle permettant une élucidation rapide et efficace des métabolites des stéroïdes de synthèse est souhaitable.

Le but du présent travail est donc d'élucider les structures des métabolites de trois stéroïdes soient la méthyltestostérone, la drostanolone et la désoxyméthyltestostérone (DMT) à l'aide de modèles *in vitro*. Pour se faire, des fractions cellulaires et subcellulaires de foies humains ont été utilisées pour la production des métabolites. Suite à des analyses par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse ainsi que des analyses de résonance magnétique, des structures ont été proposées. Dans l'optique de les caractériser, la synthèse de ces molécules a été menée. Ces étapes ont donc permis d'ajouter les métabolites propres à ces substances lors des contrôles antidopage tout en minimisant les études d'excrétion chez l'humain.

Chapitre 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1. Stéroïdes anabolisants androgènes

Les SAA constituent un groupe d'agents agissant biologiquement en tant qu'hormone et incluent la testostérone (17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one) (**1**) et ses nombreux dérivés structuraux naturels et synthétiques. Les hormones sont élaborées et sécrétées par une glande ou un organe et exercent une action spécifique sur un tissu ou un autre organe par transport sanguin. La testostérone (**1**) est une hormone stéroïdienne du groupe des androgènes, ayant été isolée pour la première fois de testicules; elle intervient dans le processus de virilisation de l'individu en contrôlant le développement et le maintien des caractères masculins chez les vertébrés (David, 1935; Laqueur, 1935). Sa première synthèse chimique a été réalisée par Ruzicka et Wettstein ainsi que par Butenandt et Hanisch (Butenandt, 1935; Ruzicka, 1935). Adolf Friedrich, Johann Butenandt et Leopold Ruzicka ont d'ailleurs reçu le Prix Nobel de chimie en 1939 pour leurs travaux portant sur les hormones sexuelles.

1.1 Nomenclature

Comme montré à la figure 1.1 par la testostérone (**1**) et son métabolite la dihydrotestostérone (17 β -hydroxy-5-androstan-3-one) (**2**), les stéroïdes de la famille des androstanes sont constitués d'un squelette de cyclopentanoperhydro[a]phenanthrène possédant des groupements méthyles en position C-10 et C-13.

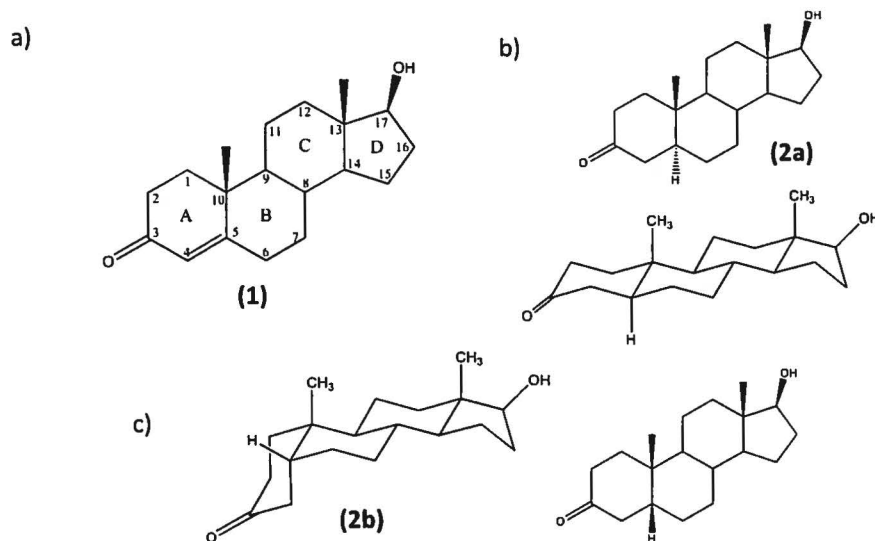


Figure 1.1: Structures de a) la testostérone (1) ; b) 5 α -dihydrotestostérone (2a) (5 α -DHT) et c) 5 β -dihydrotestostérone (2b) (5 β -DHT)

Chaque carbone du stéroïde est numéroté et les cycles présents sont décrits par une lettre (figure 1.1). Le squelette adopte habituellement une configuration de type chaise. Les groupements méthyles angulaires attachés en position C-10 et C-13 sont d'orientation β et se trouvent au dessus du plan de la molécule. Ils sont un point de référence pour décrire la configuration spatiale des autres substituants du noyau stéroïdien (Saunders, 1982). L'orientation des autres atomes ou des groupements attachés sur le squelette du stéroïde est définie comme étant bêta (β , biseau plein gras \blacktriangledown) s'ils sont du même côté que ces groupements méthyles, donc au-dessus. Les substituants alpha (α , biseau en pointillé \dashv) sont quant à eux considérés être en dessous du plan (figure 1.1)(Moss, 1989). Une orientation dans l'espace des groupements planaires au cycle est dite équatoriale tandis que celle perpendiculaire au plan est nommée axiale. Lorsque la configuration n'est pas définie, un trait vague est utilisé.

1.2 Mécanisme de fonctionnement des hormones stéroïdiennes

Le rôle des stéroïdes anabolisants androgènes est double. Les effets androgènes sont essentiels au maintien du système reproducteur et au

développement des caractéristiques sexuelles secondaires tel que la virilisation, l'augmentation de la pilosité, de la libido et de l'agressivité. Les utilisateurs de stéroïdes anabolisants recherchent plutôt les effets anaboliques impliqués dans le développement des muscles squelettiques et des os par une augmentation de la synthèse des protéines (Kuhn, 2002). Malgré les modifications structurelles apportées à la testostérone (1) pour accentuer son caractère anabolique, il est impossible de complètement le différencier des effets androgènes. Le mécanisme d'action des stéroïdes est le même peu importe le caractère androgène ou anabolique et ne varie que par la localisation des stéroïdes dans l'organisme (Graham *et al.*, 2008). Tel que montré à la figure 1.2, le mécanisme d'action des stéroïdes est modulé au niveau cellulaire.

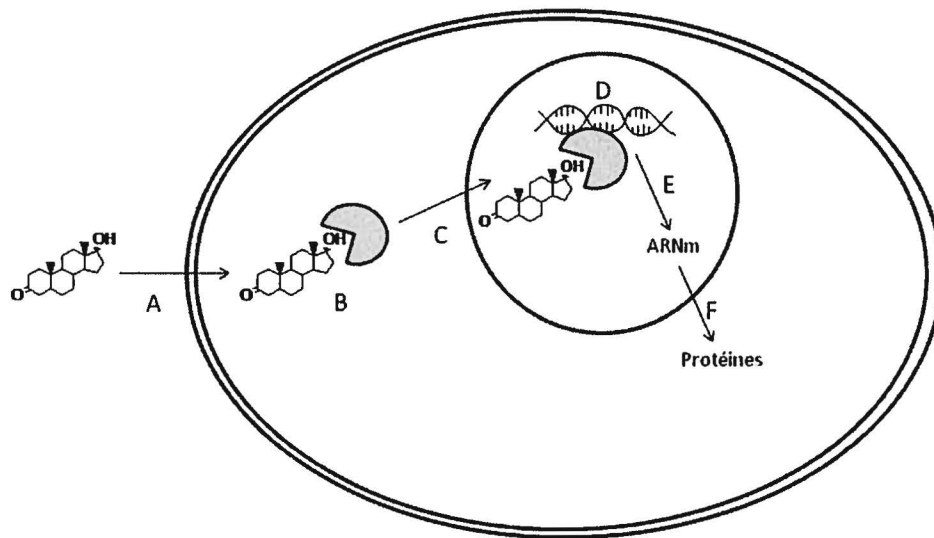


Figure 1.2: Schéma du mécanisme d'action des stéroïdes anabolisants androgènes : A) diffusion passive du stéroïde dans la cellule, B) liaison au récepteur androgène, C) translocation du complexe récepteur-stéroïde dans le noyau de la cellule, D) liaison du complexe à la chromatine d'ADN, E) transcription en ARN messager, F) traduction de l'ARN messager en protéines

Le stéroïde diffuse passivement à travers la double paroi cellulaire à cause de sa faible masse et son caractère lipophile pour se rendre au cytoplasme de la cellule (étape A de la figure 1.2) (Kicman, 2008; Muntane, 2009). Il se lie ensuite à un récepteur androgène du cytoplasme, ce qui modifie la

conformation du récepteur (étape B de la figure 1.2). Ce complexe activé se déplace rapidement vers le noyau cellulaire (étape C de la figure 1.2) pour se lier à l'aide de corégulateurs à un site spécifique de l'ADN (étape D de la figure 1.2) (Chang *et al.*, 1995). Cette liaison à la chromatine promeut la transcription du gène et stimule la production d'ARN messager (étape E de la figure 1.2) ce qui ultimement augmente la production de protéines (étape F de la figure 1.2) (Bahrke & Yesalis, 2004).

L'affinité du stéroïde pour le récepteur affecte grandement son activité et dépend du positionnement de ses groupements fonctionnels pouvant interagir avec les acides aminés dans la cavité tel que montré à la figure 1.3.

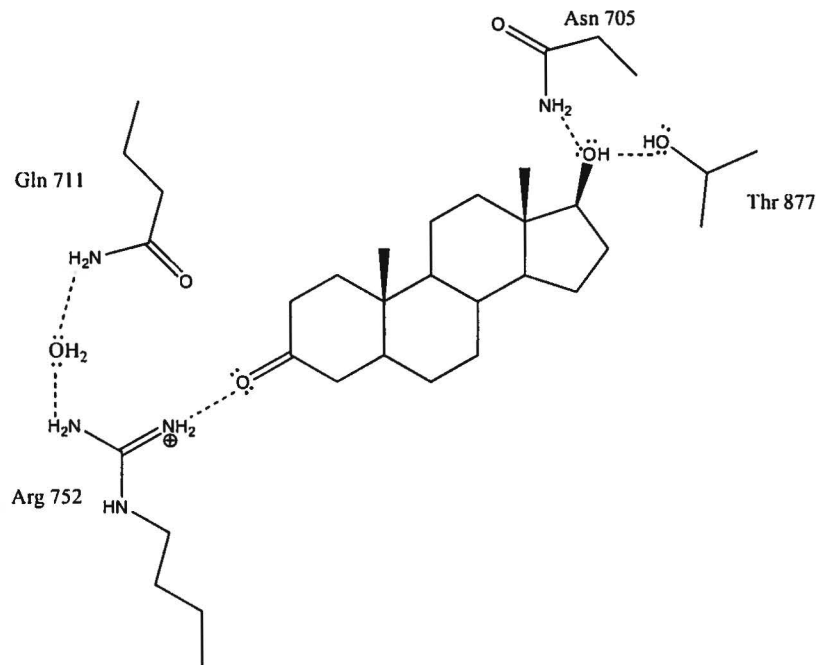


Figure 1.3 : Exemple du positionnement du stéroïde dans la cavité du site actif du récepteur androgène (Fragkaki, Angelis, Koupparis *et al.*, 2009)

Les chaînes latérales des acides aminés du domaine de liaison peuvent adopter des positions variables pour stabiliser le squelette de la molécule stéroïdienne par des interactions principalement hydrophobiques (Pereira de Jesus-Tran *et al.*, 2006). La cavité du récepteur contient aussi des acides aminés polaires

établissant des ponts hydrogènes avec les groupements se trouvant habituellement à chaque extrémité du stéroïde (C-3 et C-17). Ces liaisons hydrophiles sont entre autre formées entre la paire d'électrons libres de l'oxygène du groupement cétonique en C-3 et l'azote des résidus glutamine 711 et arginine 752 du récepteur avec l'aide ou non d'une molécule d'eau (figure 1.3) (Fragkaki, Angelis, Koupparis *et al.*, 2009). À l'autre extrémité du stéroïde, des interactions entre le groupement hydroxyle en C-17 β et les résidus asparagine 705 et thréonine 877 maintiennent le ligand en place (Pereira de Jesus-Tran *et al.*, 2006). Toute modification ou élimination du groupement alcool en C-17 β causera une plus grande perte d'affinité avec le récepteur qu'une modification de la cétone en C-3 (Fang *et al.*, 2003). Le pont hydrogène formé à partir de l'hydroxyle en C-17 est donc plus significatif pour l'affinité de la molécule avec les récepteurs.

Tel que mentionné précédemment, les effets androgènes et anaboliques des stéroïdes sont modulés selon le lieu où ils exerceront leur fonction dans l'organisme. L'action biologique de la testostérone (**1**) dépend aussi de la conversion enzymatique de celle-ci en son métabolite actif. Par exemple, la dihydrotestostérone (5 α -DHT) (**2a**), obtenue par l'action de la 5 α -réductase réduisant la liaison double entre les carbones 4 et 5 de la testostérone (**1**), se lie plus fortement aux récepteurs androgènes que cette dernière (Sundaram *et al.*, 1995). La stéréochimie de la réduction influence la force de cette liaison, la 5 α -DHT (**2a**) possédant une affinité 173 fois supérieure à celle de la 5 β -DHT (**2b**) (figure 1.1) (Fang *et al.*, 2003). Son action androgène est amplifiée dans les organes comprenant un niveau élevé de 5 α -réductase soit les glandes sexuelles, la prostate, le cerveau et les os (Toth & Zakar, 1982; C. Wang & Swedloff, 2003), alors que pour les organes démontrant une très faible activité tels le cœur et les muscles squelettiques, la réponse provient plutôt de l'action de la testostérone (**1**) (Gustafsson & Pousette, 1975; Hartgens & Kuipers, 2004; Krieg & Voigt, 1976; Toth & Zakar, 1982).

1.3 Usage médical et détourné des stéroïdes anabolisants androgènes

Les SAA peuvent être utilisés dans un contexte médical légitime pour le traitement de la cachexie associée à des maladies chroniques, la régénérescence postopératoire des muscles ou brûlures sévères et la perte de masse musculaire chez les personnes atteintes du virus d'immunodéficience humaine (Sjovall & Vihko, 1966, Deventer *et al.*, 2006; Kicman, 2008; Wolf *et al.*, 2003). Des préparations de stéroïdes anabolisants androgènes sont également mises à profit pour des thérapies hormonales ou l'hypogonadisme chez les hommes (Bain, 2007), pour supprimer la lactation chez la femme (Mottram & George, 2000) et chez les femmes atteintes du syndrome de Turner (Quaglio *et al.*, 2009). Les patients se faisant prescrire des SAA à long terme peuvent ressentir certains effets secondaires, les plus communément rapportés découlent d'hépatotoxicité suivant l'usage de stéroïdes 17 α -alkylés comme par exemple des niveaux élevés d'enzymes du foie, des jaunisses, des lésions et hémorragies au foie (Shahidi, 2001). Chez les enfants et les femmes devant faire l'usage de ces produits, une virilisation peut être observée. Certains proposent l'administration de testostérone (1) à des fins de prévention du vieillissement (andropause), mais à de fortes doses, celle-ci est associée à une hypertrophie de la prostate et à la formation de caillots sanguins. Des déséquilibres des niveaux des lipides dans le sérum et des intolérances à l'insuline ont aussi été rapportés (Jockenhövel *et al.*, 1999; Woodard *et al.*, 1981). Les SAA de provenance pharmaceutique ont été conçus pour palier à des problèmes de santé, mais leur usage peut être détourné à des fins d'amélioration de l'apparence physique et de la performance.

Plusieurs problèmes de santé ont par contre été associés à un usage non médical et autonome de SAA et l'importance de ceux-ci est généralement sous-estimée par les utilisateurs. Certains athlètes rapportent l'administration de décanoate de nandrolone (17 β -hydroxydecanoate-estr-4- α -en-3-one) (3) ou de testostérone (1) pour réduire le temps de récupération de leur entraînement (Hartgens & Kuipers, 2004). Les effets bénéfiques régénérateurs recherchés n'ont pas été démontrés scientifiquement chez l'humain et un déséquilibre

du niveau de testostérone (1) dans le sérum a été rapporté suite à la prise de faibles doses de ces stéroïdes (Bhasin *et al.*, 2001). Par contre, chez des culturistes, l'administration souvent chronique de combinaisons d'anabolisants et de médicaments de toute sorte se fait à des doses supra-pharmacologiques ce qui rend difficile l'étude clinique des effets secondaires qui ont été répertoriés à partir de témoignages et de données rapportées par les cliniciens (Botre & Pavan, 2008; Bowers *et al.*, 2009; Kam & Yarrow, 2005; Kutscher *et al.*, 2002; Wu, 1997). Ces effets peuvent être permanents ou réversibles à l'arrêt. Des problèmes d'acné sévère, de gynécomastie, de dérèglements du système reproducteur et du système nerveux central, de virilisation chez les femmes et de fermeture prématurée des épiphyses osseuses chez les adolescents ont été rapportés (Bahrke & Yesalis, 2004; Franke & Berendonk, 1997; Hartgens & Kuipers, 2004 ; Giannitrapani *et al.*, 2006; Hageloch *et al.*, 1988; Sjoqvist *et al.*, 2008). De plus, des dérèglements hépatiques sont communément associés à la prise de stéroïdes alkylés en position C-17 (Kicman, 2008). Dernièrement, la consommation de méthyldrostanolone (4), un stéroïde de synthèse illicite, a été associée chez des culturistes à des problèmes d'hépatite cholestatique, de jaunisse, de prurit et de néphropathie (Health Canada, 2006; Jasiurkowski *et al.*, 2006; Nasr & Ahmad, 2009). Des problèmes cardiaques, une élévation de la pression sanguine, une hypertrophie du cœur, de l'hypertension et même des morts subites par arrêt cardiaque ont aussi été rapportés (Kennedy & Lawrence, 1993; Madea & Grellner, 1998; Nieminen *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1998; Thiblin *et al.*, 2009). Une dépendance a été répertoriée chez les adeptes de musculation et est associée à une insatisfaction des gains physiques encourus (Brower *et al.*, 1991).

1.4 Modifications structurelles par synthèse de SAA

Dans le but d'améliorer les propriétés pharmacologiques des SAA, de multiples modifications structurelles ont été appliquées, avec l'objectif de prolonger la demi-vie métabolique du produit de départ, de produire des composés oralement actifs, d'augmenter la biodisponibilité et les effets anaboliques tout en diminuant les effets androgènes. Certaines de ses modifications sont résumées à la figure 1.4.

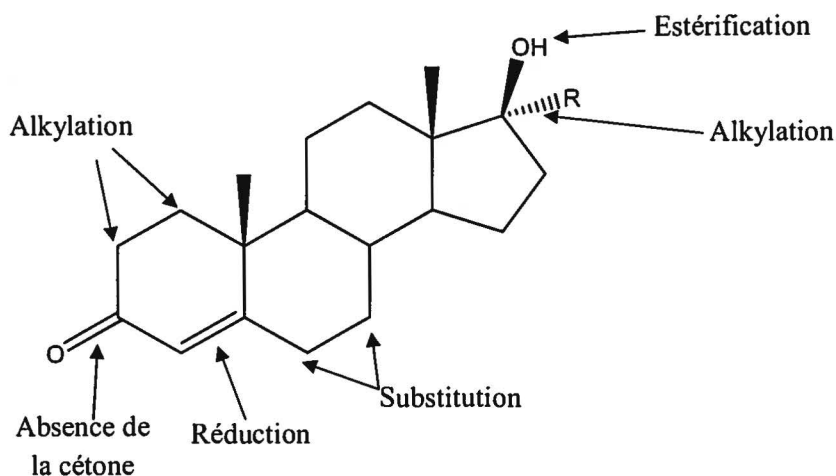


Figure 1.4: Exemples de modifications structurales possible des SAA où R=H, CH₃, -COCH₃, etc.

Chacune de ces modifications structurales influence l'activité hormonale et les métabolites produits. Par exemple, l'alkylation en position C-17 α du stéroïde empêche l'oxydation, ralentissant ainsi significativement la transformation en évitant le métabolisme de premier passage observé lorsqu'administré oralement et augmentant sa biodisponibilité (Kicman, 2008; Kicman & Gower, 2003; Schänzer *et al.*, 1992). Cette modification peut aussi être effectuée en position C-1 ou C-2 (ex. mestérolone (17 β -hydroxy-1 α -méthyl-5 α -androstane-3-one) (5), drostanolone (6)) (Fragkaki, Angelis, Tsantili-Kakoulidou *et al.*, 2009). L'estérification du groupement C-17-OH avec une longue chaîne aliphatique (ex. cypionate, undécanoate, undécylénate) retarde aussi l'inactivation du stéroïde (Shahidi, 2001).

Des modifications sur le cycle A telles que l'absence de la liaison double en C-4 ou l'ajout de groupements alkyles retardent aussi l'inactivation du produit (Goudreault & Massé, 1991). La cétone en position C-3 peut être totalement absente et céder la place à une liaison double en C-2 comme dans le cas de la désoxyméthyltestostérone (7) (Ayotte *et al.*, 2006; Huffman, 1961; Kincl & Dorfman, 1963, Sekera *et al.*, 2005). Des alkylations ou substitutions en position C-4, C-6 et C-7 (ex. clostébol (4-chloro-17 β -hydroxy-androst-4-èn-3-one) (8), mibolérone (7 α ,17 α -diméthyl-17 β -hydroxy-estr-4-èn-3-one) (9)) ont

été tentées en plus de l'ajout d'hétérocycles attachés en C-2, C-3 tel que des groupements pyrazole ou isoxazole comme le stanozolol (17 β -hydroxy-17 α -méthyl-5 α -androst-2-eno[3,2-c]pyrazole) (**10**) et le prostanazol (**11**), ce dernier étant une création de l'industrie du supplément sportif (Parr, Gutschow *et al.*, 2009; Thevis *et al.*, 2009). Des groupements halogènes et des insaturations conjuguées ont aussi été ajoutés à la structure de certains stéroïdes pour modifier leurs profils d'excrétion (Kicman & Gower, 2003).

1.5 Biotransformations des stéroïdes anabolisants androgènes

Suivant l'administration, le xénobiotique sera distribué vers les cellules cibles, métabolisé et éliminé. Ainsi, les SAA sont fortement transformés par l'organisme et le produit de départ n'est que peu ou pas excrété par rapport à ses métabolites. La première étape, l'absorption, peut se faire sous différentes voies soit oralement (*per os*), par injection intramusculaire (i.m.) ou topique (suppositoires, gels, timbres). Lors de l'administration par voie orale, le produit peut être inactivé par l'effet de premier passage où il est directement transporté de l'intestin vers le foie par la veine porte hépatique et subit des réactions enzymatiques de biotransformation avant même qu'il n'ait atteint la circulation sanguine (Ansede & Thakker, 2004).

L'administration par injection intramusculaire permet d'éviter cette désactivation rapide du stéroïde. Ainsi, le xénobiotique traverse les membranes biologiques et est distribué vers les organes et tissus cibles *via* la circulation systémique en se liant à des protéines plasmatiques. Une fois leur action effectuée, ces stéroïdes sont transportés vers le foie pour être métabolisés. Les réactions de biotransformation ont pour but d'augmenter l'hydrophilicité des composés et du même coup d'accroître leur solubilité pour faciliter leur excrétion via la bile ou l'urine.

Bien que le foie soit le responsable principal de la biotransformation des composés dans l'organisme, certains organes tels les poumons et le cerveau contiennent des enzymes de biotransformation (Casarett, 2008; Muntane, 2009). Pour ce qui est des SAA, celles-ci sont présentes majoritairement dans le foie, mais aussi dans les intestins et les reins. Lors de l'ingestion par voie orale, ces composés lipophiliques peuvent traverser la membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin (A. P. Li, 2001). Celles-ci contiennent une quantité relativement importante d'enzymes métaboliques oxydatives tel des cytochromes P450 et des enzymes de conjugaison (Komura & Iwaki, 2008; Thummel *et al.*, 1997; van Herwaarden *et al.*, 2009). Ces catalyseurs, particulièrement dans le petit intestin, sont en proportion importante allant jusqu'à 50% du niveau retrouvé dans le foie pour certaines des enzymes CYP3A (Thummel *et al.*, 1997). Ce premier passage intestinal pourrait donc avoir une influence sur le métabolisme des stéroïdes.

Tel que mentionné précédemment, le foie est le principal centre de triage du corps et représente le site majeur des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme (Lewis *et al.*, 1998; Voet, 1998). Les enzymes de biotransformation des cellules hépatiques parenchymateuses ont pour but de limiter l'exposition des molécules étrangères absorbées par l'intestin au système sanguin. Les voies de biotransformations hépatiques se divisent en deux grandes catégories, soit les réactions de phase I qui convertissent le xénobiotique à l'aide de réactions enzymatiques d'oxydation, de réduction et d'hydroxylation, alors que celles de phase II impliquent des conjugaisons notamment à des groupements d'acide glucuronique ou sulfate (Levsen *et al.*, 2005). Ces réactions seront décrites à la prochaine section.

Bien que les reins soient responsables de l'élimination, certaines enzymes métaboliques y sont présentes. Il a été démontré que les cellules rénales contiennent la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase impliquée dans la transformation de l'androstènedione (androst-4-ene-3,17-dione) (**12**) en testostérone (**1**) (Benghuzzi & Mohamed, 2007) et des enzymes de

biotransformation de phase II telle l'UDP-glucuronosyltransférase (Soars *et al.*, 2001).

1.5.1 Réaction de biotransformation de phase I

Les enzymes spécifiques effectuant des réactions d'oxydo-réduction et d'hydroxylation sont impliquées dans la biotransformation de phase I tel que montré à la figure 1.5. Pour les stéroïdes possédant une double liaison en C-4 et C-5, une réduction non réversible est effectuée par les 5- α et 5- β -réductases (EC 1.3.99.5 et 1.3.99.6) (Wilson, 2001). La 5 α -réductase est une protéine microsomale insérée dans la double membrane lipidique du réticulum endoplasmique. Son action est dépendante du cofacteur NADPH; elle convertit la testostérone (**1**) en 5- α -DHT (**2a**) ayant une activité androgénique supérieure (Bauman *et al.*, 2004; Jin & Penning, 2001; Russell & Wilson, 1994). Les réductions enzymatiques se font selon une stéréochimie spécifique. Ainsi, dans le cas d'un stéroïde possédant un groupement alcool en position C-17, une réduction en 5 β sera observée six fois plus souvent qu'en 5 α (Engel *et al.*, 1958; Schänzer, 1996).

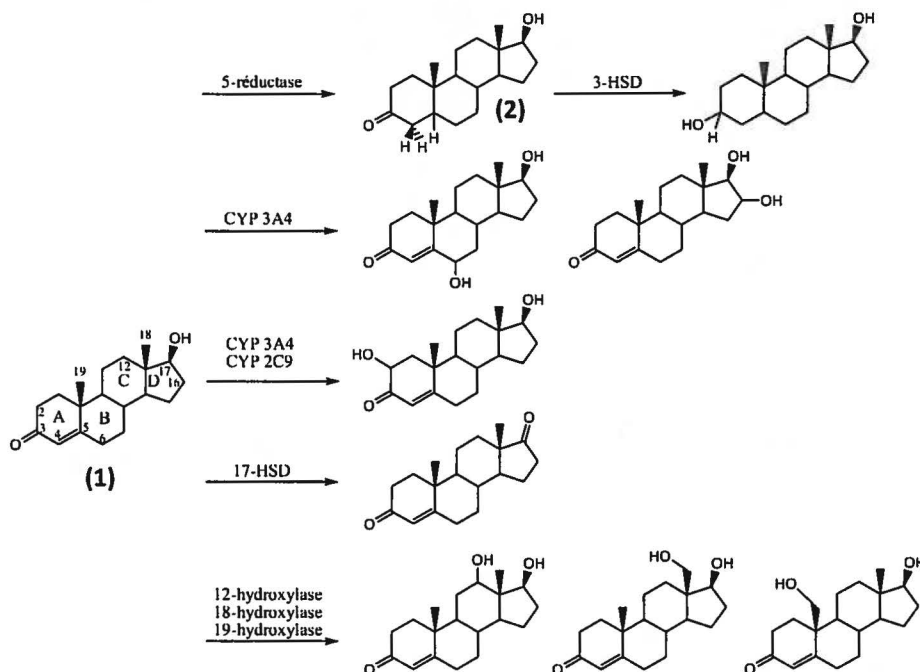


Figure 1.5 : Principales voies de réactions de métabolisme de phase I des stéroïdes anabolisants androgènes

Dans le cas de la 17 α -méthyltestostérone (17 β -hydroxy-17 α -méthyl-androst-4- α -en-3-one) (13), le rapport des métabolites réduits en 5 β par rapport à 5 α est de 10 : 1 (Rongone & Segaloff, 1962). Par contre, si le groupement fonctionnel en position C-17 est cétonique, le ratio de réduction entre 5 α et 5 β sera de 1 : 1. Une majorité de 5 α sera observée uniquement en présence d'un hydroxyle en C-11.

Suite à cette réduction non réversible, la 3-hydroxystéroïde déshydrogénase (3-HSD, 3 α -HSD EC 1.1.1.213), une enzyme cytosolique des cellules du foie, réduit réversiblement la cétone en position C-3 en alcool, mais nécessite une liaison saturée entre les carbones 4 et 5 pour se produire (Jin & Penning, 2001; Steckelbroeck *et al.*, 2004). En présence d'un isomère d'orientation 5 α , la cétone en C-3 sera réduite soit par la 3 α ou 3 β -HSD alors qu'en 5 β , seule la réduction en 3 α sera observée. À titre d'exemple, suite à une administration orale de la testostérone (1), la réduction de la cétone en position 3 α est

majoritaire alors qu'avec un groupement hydroxyle secondaire en C-17, la formation de l'isomère 3 β -OH est favorisée (Parr, *et al.*, 2010; Shahidi, 2001).

Plusieurs réactions d'hydroxylation sont aussi catalysées par le groupe d'enzymes des cytochromes P450 qui introduisent des groupements polaires sur des systèmes non réactifs tel que le montrent les exemples fournis à la figure 1.6. Constituant majeur du foie, ces protéines sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Des expériences menées avec des microsomes de foie humain ont montré que le cytochrome CYP3A4 est responsable majoritairement des hydroxylations en position C-6 β , 16 α et 16 β de stéroïdes (Brian *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 2005; Niwa *et al.*, 1998; Rendic *et al.*, 1999). La formation de 6 β -hydroxytestostérone par cette enzyme est d'ailleurs souvent utilisée comme contrôle en présence du substrat de testostérone (**1**) (Sinz, 1999; Zuber *et al.*, 2002). Les proportions des métabolites hydroxylés en C-16 α par rapport au C-16 β varie selon les SAA ; pour l'estrone (**14**), ce rapport est de 4 :1 (Lee *et al.*, 2002). De plus, certains stéroïdes notamment ceux alkylés en C-17 comme la 4-chlor-1,2-dehydro-17 α -méthyltestostérone (**15**) peuvent être hydroxylés en C-12; la stéréochimie de cette hydroxylation n'a pas été déterminée (Clouet-Dumas *et al.*, 2000; Dürbeck & Bükler, 1980). Par ailleurs, la 17-hydroxystéroïde déshydrogénase permet une oxydation réversible de l'alcool en position C-17 sur le cycle D (Lukacik *et al.*, 2006). Des hydroxylations sur les carbones 18 ou 19 ont aussi été rapportées pour la mestérolone (**5**), de la méthénolone (17 β -hydroxy-1-méthyl-5 α -androst-1-èn-3-one) (**16**) et la stenbolone (17 β -hydroxy-2-méthyl-5 α -androst-1-èn-3-one) (**17**) (Massé & Goudreault, 1992).

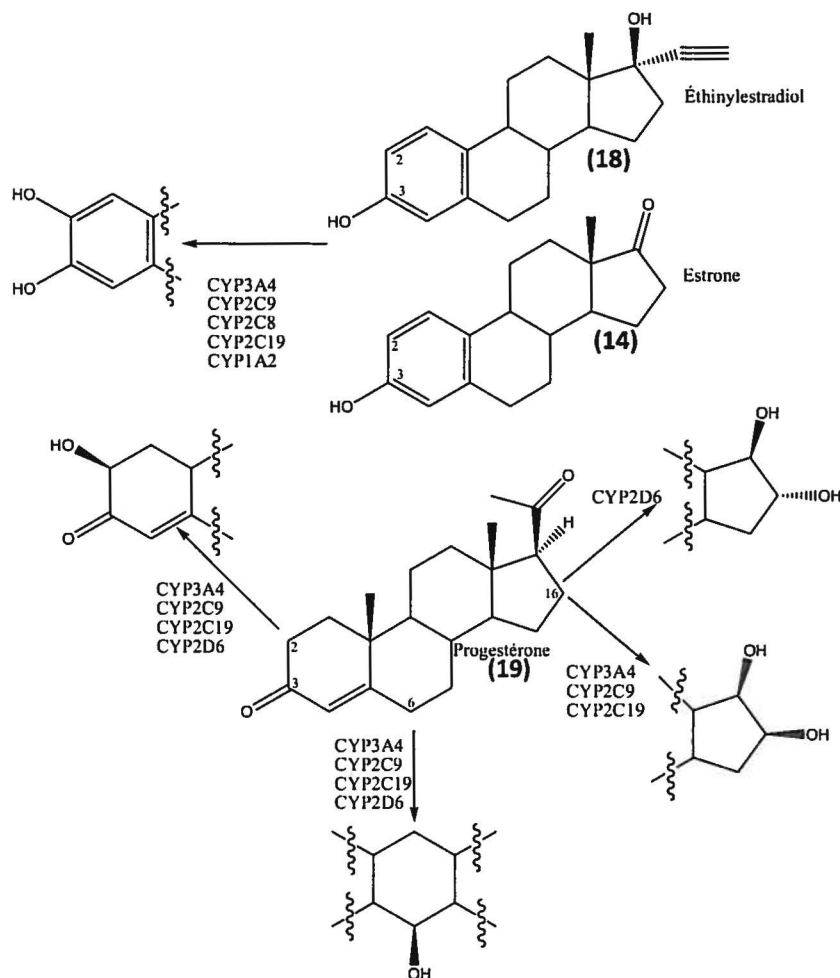


Figure 1.6 : Voies de réactions de phase I de l'éthinylestradiol (18), de l'estrone (14) (haut) et de la progestérone (19) (bas) par les cytochromes P450

En plus du CYP3A4, le CYP2C9 contribue de façon majeure à l'hydroxylation en position C-2 de l'éthinylestradiol (3,17 β -dihydroxy-17 α -éthynyl-estr-1,3,5(10)-triène) (18) et l'estrone (14) tandis que les cytochromes CYP 2C8, 2C19 et 1A2 y contribuent de façon mineure (figure 1.6) (Lee *et al.*, 2002; B. Wang *et al.*, 2004). Les enzymes CYP3A4, CYP2C9 et CYP2C19 ont quant à elles été associées à la catalyse de l'oxydation de la testostérone (1), de la progestérone (pregn-4-èn-3,20-dione) (19) et de l'androstènedione (12) pour former des métabolites hydroxylés en position C-2 β , 6 β et 16 β (Choi *et al.*, 2005; Yamazaki & Shimada, 1997). Le cytochrome CYP2D6 a été associé à

la catalyse des hydroxylations C-2 β , 6 β et 16 α de la progestérone (19) (Hiroi *et al.*, 2001).

1.5.2 Réactions de biotransformation de phase II

Dans le but d'augmenter la masse molaire et faciliter l'excrétion, plusieurs enzymes de phase II catalysent des réactions de conjugaison comme par exemple l'acétylation et la glycoconjugaison, mais pour les SAA, il s'agit plus spécifiquement de glucuroconjugaison et sulfatation tel que présenté à la figure 1.7. Des cofacteurs ainsi que de l'énergie sous forme d'ATP sont nécessaires pour effectuer ces réactions.

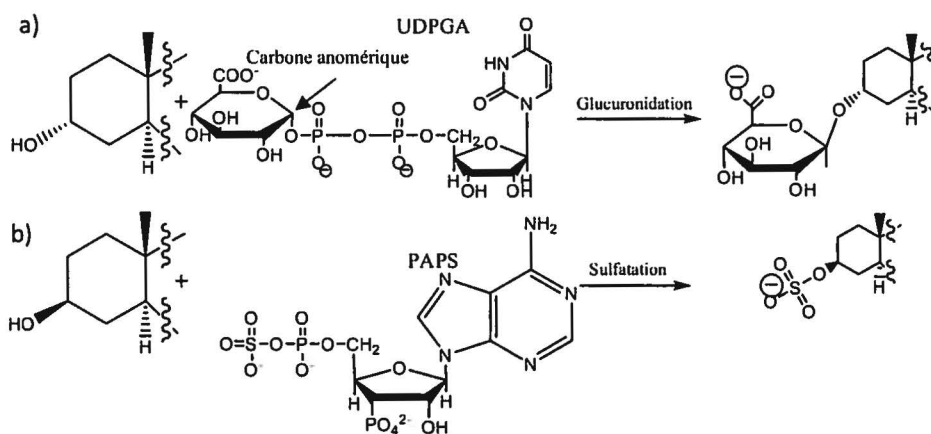


Figure 1.7 : Biotransformation de phase II de stéroïdes anabolisants androgènes : a) glucuroconjugaison, b) sulfoconjugaison

Comme l'indique la figure 1.7a, la glucuronidation de xénobiotiques est catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT; EC 2.4.1.17) qui transfèrent la partie polaire acide de l'UDP-5'-acide glucuronique (le cofacteur) par une réaction de substitution nucléophile de type S_N2 (King *et al.*, 2000). L'UGT (uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase) se trouve insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique faisant face à sa partie

luminale et se situe principalement dans les tissus hépatiques ainsi que dans certains tissus extrahépatiques dont les reins, les poumons et les voies gastrointestinales (King *et al.*, 2000; Taskinen *et al.*, 2003; Turgeon *et al.*, 2001). La glucuronidation se fait entre autre sur les acides biliaires, les xénobiotiques, les endobiotiques et les stéroïdes (Tephly & Burchell, 1990). Lors de cette réaction, le cofacteur UDP-acide glucuronique se lie à l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase, ce qui déstabilise la liaison α entre l'UDP et le carbone anomérique de l'acide glucuronique (Mackenzie *et al.*, 1992). Cette liaison est alors convertie en un lien covalent entre la partie glucuronosyle et le nucléophile d'orientation β . Ce transfert peut s'effectuer sur plusieurs groupements fonctionnels tels que les hydroxyles, les carboxyles, les amines et les thiols ; ceux typiquement privilégiés pour les SAA sont les hydroxyles en position C-3 et C-17 (Mackenzie *et al.*, 1992 ; Levsen *et al.*, 2005). La réaction catalysée par ces enzymes est une étape irréversible qui cause un encombrement stérique sur la molécule initiale, abolissant son affinité pour le récepteur cellulaire.

La sulfoconjugaison, dont un exemple est donné à la figure 1.7b, joue un rôle majeur dans la détoxification des xénobiotiques et dans la modulation de l'activité biologique de certains composés chimiques. La famille des sulfotransférases (EC 2.8.2) comprend onze différentes enzymes qui ont toutes comme cofacteur la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), donneur de la portion sulfate au substrat accepteur (Coughtrie & Johnston, 2001). Ces enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

L'enzyme cytosolique SULT2A1, communément appelée la déhydroépiandrostérone sulfotransférase, est responsable du métabolisme de celle-ci, de la testostérone (**1**), des sels biliaires, de la prégnénolone (3 β -hydroxy-pregn-5- α -20-one) (**20**) et de divers autres stéroïdes (Falany, 1991; Falany, 1997; Radomska *et al.*, 1990). Les sites de sulfatation les plus souvent ciblés par cette enzyme sont les groupements hydroxyles aux

positions C-3 β et C-17 β du stéroïde (Radomska *et al.*, 1990; Weinshilboum *et al.*, 1997 ; Guay *et al.*, 2009). Le manque relatif de spécificité pour la sulfatation des stéroïdes diffère du haut degré de sélectivité observé par les différentes formes d'UDP-glucuronosyltransférase du foie qui sont très spécifiques quant à la localisation et l'orientation des groupements hydroxyles (Falany *et al.*, 1989).

Le métabolisme des stéroïdes anabolisants est donc complexe et plusieurs réactions enzymatiques sont possibles pour un même composé. Les voies de biotransformation des SAA « classiques » sont connues, ce qui guidera la proposition de structure pour les métabolites urinaires de nouveaux composés.

1.6 Nouveaux stéroïdes anabolisants androgènes de synthèse

Tel que mentionné préalablement, les composés stéroïdiens provenant des compagnies pharmaceutiques ont fait l'objet d'étude clinique, donc leurs effets, leur innocuité et leurs métabolites sont connus. Par ailleurs, plusieurs stéroïdes illicites ont été mis sur le marché dans l'optique de contourner les contrôles antidopage tout en cherchant une amélioration des performances (Botre & Pavan, 2008; Maravelias *et al.*, 2005). Plusieurs de ces molécules ayant fait leur apparition au cours des dernières années sont inspirées de publications scientifiques des années 1960 (A. D. Cross *et al.*, 1963; Edwards *et al.*, 1963). Certains de ces nouveaux stéroïdes d'intérêt en dopage sportif sont montrés à la figure 1.8 et comprennent entre autre la désoxyméthyltestostérone (DMT ou 17 β -hydroxy-17 α -méthyl-5 α -androst-2(3)-ène) (7) (Ayotte *et al.*, 2006), la méthylrostanolone (17 β -hydroxy-2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-3-one) (4) (Ayotte *et al.*, 2006), la tétrahydrogestrinone (THG ou 17 β -hydroxy-18 α -homo-pregna-4,9,11-trien-3-one) (21) (Catlin *et al.*, 2004), la norboléthane (13-éthyl-18,19-dinor-17-hydroxy-17 α -pregn-4-èn-3-one) (22) (Catlin *et al.*, 2002) et la 17 β -hydroxyandrostanol(3,2-c)isoxazole (23). La connaissance des métabolites qui

leur sont associés est nécessaire pour en permettre le dépistage dans les échantillons recueillis.

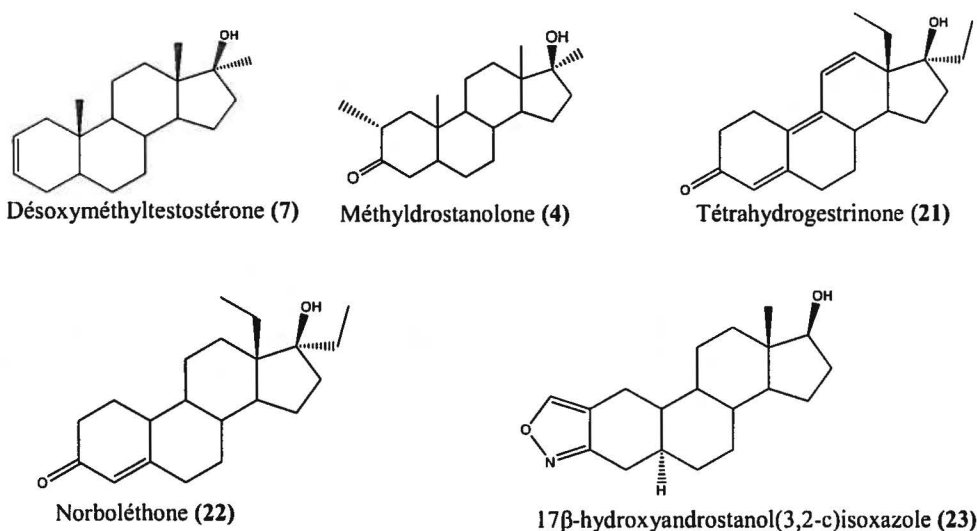


Figure 1.8 : Structures de quelques nouveaux stéroïdes

2. Modèles utilisés pour l'étude de la biotransformation des stéroïdes anabolisants androgènes

2.1 Modèles *in vivo*

Le recours à des volontaires humains est nécessaire à la détermination des propriétés pharmacocinétiques et à l'identification des métabolites des SAA et, dans le cadre du contrôle du dopage sportif, au développement de méthodes de détection efficaces. On a ainsi par exemple identifié les métabolites de la 19-nortestostérone (17β-hydroxyestra-4-èn-3-one) (24) (Engel *et al.*, 1958; Strahm *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2006), de l'acétate de méthénolone et de sténbolone (16 et 17) (Goudreault & Massé, 1990; Goudreault & Massé, 1991), du stanozolol (10), de la méthandiène (17β-hydroxy-17α-méthylandro-1,4-dièn-3-one) (25), de l'andro-4-ène-3,6,17-trione (26), de la mestérolone (5) et de la drostanolone (6) (de Boer *et al.*, 1992; Deventer *et al.*, 2005; Schänzer *et al.*, 1991; Schänzer *et al.*, 1990). Dans le cas de

stéroïdes illicites, aucune donnée n'est disponible quant à la toxicité et l'innocuité, la composition diffère selon les préparations et en l'absence de contrôle de la qualité, le recours aux volontaires humains doit être réduit à l'absolu nécessaire. Des modèles permettant d'éviter l'implication de volontaires humains ont récemment fait l'objet d'études exhaustives.

Les modèles *in vivo* ont l'avantage de représenter un organisme complet comprenant toutes les étapes pharmacocinétiques soient l'administration, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du composé. Par exemple, des études d'excrétion chez les petits rongeurs tels que le lapin, le rat et la souris sont communément effectuées (Fotherby, 1972; Templeton & Kim, 1977). Cependant, les métabolites et les proportions obtenus varient par rapport à ce qui est observé chez l'humain. Il est primordial de toujours tenir compte des différences métaboliques interspèces venant des disparités entre les voies métaboliques et les niveaux d'enzymes et de leurs isoformes présentes (Albert P. Li & Albert, 1997; Zuber *et al.*, 2002). Des primates ont récemment été utilisés pour obtenir des métabolites urinaires de nouveaux stéroïdes, notamment le babouin pour la THG (21) et la DMT (7) (Sekera *et al.*, 2005). Des modèles *in vivo* invertébrés tel que la crevette *N. interger* ont aussi produit des résultats encourageants mais manquant de reproductibilité pour le métabolisme bovin (Verslycke *et al.*, 2002). Il est de plus possible d'utiliser des modèles *in vivo* modifiés tel que des souris chimériques transplantées avec des hépatocytes humains pour mimer le métabolisme humain. À l'aide de ce modèle, Van Eeno et ses collègues ont rapporté la formation de métabolites de la méthyltestostérone (4), du méthylclostebol (4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthyl-androst-4-èn-3-one) (27), de la méthandiène (25) et de la 19-norandrost-4-ène-3,17-dione (28) (Leen Lootens, Meuleman *et al.*, 2009; Leen Lootens, Van Eeno *et al.*, 2009; Pozo *et al.*, 2009). Toutes les étapes pharmacocinétiques semblent présentes, mais les métabolites doivent tout de même être extraits d'une matrice urinaire et sont formés en quantité minuscule rendant difficile la caractérisation.

2.2 Modèles *in vitro*

Le foie étant l'organe contenant le plus d'enzymes métaboliques, des modèles *in vitro* hépatiques humains sont fréquemment utilisés pour l'étude du métabolisme de drogues et de médicaments (Ansedè & Thakker, 2004). Les fractions subcellulaires dont les microsomes, les S9 et les enzymes recombinantes sont des modèles partiels, tandis que les fractions cellulaires cryopréservées ou fraîches sont plus complètes. Les incubations avec de telles cellules présentent plusieurs avantages tels que la diminution des interférences dans la matrice analytique comparativement à l'urine et la possibilité de produire des métabolites en quantité suffisante pour en permettre la caractérisation poussée. Les systèmes *in vitro* étant toutefois isolés, ils ne comprennent pas la complexité des systèmes multi-organes travaillant de concert comme chez l'humain (Anderson *et al.*, 2009).

2.2.1 Fractions subcellulaires, microsomes, et enzymes recombinantes

Les microsomes et les fractions subcellulaires de foies sont fréquemment utilisés comme modèles lors des premières analyses métaboliques au moment du développement de composés pharmaceutiques et par la suite pour déterminer les organelles qui en sont responsables. Les microsomes comprennent seulement des vésicules artéfactuelles formées par le réticulum endoplasmique après la rupture de la paroi cellulaire (Voet, 1998). Les fractions subcellulaires S9 proviennent de l'homogénat des cellules du foie et sont plus complètes que les microsomes, car elles comprennent toutes les organelles de la cellule excepté le noyau et les mitochondries. L'intégrité de la cellule est bien sûr perdue dans ces deux modèles, tout comme certaines enzymes cytosoliques, ainsi que le métabolisme séquentiel requérant des interrelations structurales entre les organelles (Albert P. Li & Albert, 1997 ; A. P. Li, 2001). Les fractions subcellulaires sont toutefois considérées comme hautement concentrées en enzymes, faciles à manipuler, conservables sur une

longue période dans les conditions adéquates, peu dispendieuses et offrant une flexibilité des conditions d'incubation (pH, température, cofacteurs, tampon) pour l'obtention d'une catalyse optimale. Ces hautes concentrations enzymatiques font en sorte que les microsomes ne peuvent être utilisés pour des estimations quantitatives de métabolisme, car les cytochromes sont enrichis et qu'il y a absence de compétition avec les autres enzymes (Brandon *et al.*, 2003).

Des enzymes recombinantes sont aussi utilisées pour étudier des voies métaboliques précises. Par exemple, Kuuranne *et al.* ont utilisé les enzymes de phase II pour produire des métabolites glucuroconjugués de SAA. (Hintikka *et al.*, 2008; Kuuranne *et al.*, 2003). Aussi, des cytochromes P450 recombinants ont été utilisés pour étudier spécifiquement l'hydroxylation en position C-6 de la testostérone (**1**), la boldénone (17 β -hydroxyandrost-1,4-dièn-3-one) (**29**) et la méthandiène (**25**) (Rendic *et al.*, 1999). Le désavantage de ces systèmes est qu'une seule activité enzymatique est étudiée à la fois (Gomez-Lechon *et al.*, 2007).

L'utilisation de fractions subcellulaires requiert l'ajout des cofacteurs nécessaires aux réactions enzymatiques et l'optimisation des conditions d'incubation. Ces portions subcellulaires ont permis la production de certains métabolites de phase I et II de SAA dont la méthyltestostérone (**13**) et la méthandiène (**25**) (Kuuranne *et al.*, 2006). Par le passé, plusieurs ont eu recours aux microsomes autant de rats que d'humains pour l'étude du métabolisme de SAA, montrant encore une fois des différences interspèces (J. A. Gustafsson & B. P. Lisboa, 1970; J. A. Gustafsson *et al.*, 1968). En effet, une comparaison du métabolisme de la testostérone (**1**) et de l'estradiol (3 β ,17 β -dihydroxy-estr-1,3,5-triène) (**30**) obtenu avec des microsomes de rats et d'humains montre d'importantes différences qualitatives et quantitatives de niveaux d'enzymes CYP450 (Kremers *et al.*, 1981). De plus, une étude métabolique comparative de l'estra-4,9-diène-3,17-dione (**31**) chez l'humain, le chien et le cheval utilisant des fractions subcellulaires S9 a montré des

disparités entre les métabolites et leur concentration (Scarth, Clarke *et al.*, 2010). Chez les bovins, les métabolites de la testostérone (**1**), de la méthandiène (**25**), du stanozolol (**10**), de la boldénone (**29**) et de la boldione (androst-1,4-diène-3,17-dione) (**32**) ont été identifiés rapidement grâce à des modèles *in vitro* de fractions cellulaires et subcellulaires (Clouet *et al.*, 1998; Coldham *et al.*, 1995; Hooijerink *et al.*, 1998; Merlanti *et al.*, 2007; Scarth, Spencer *et al.*, 2010; Van Puymbroeck *et al.*, 1998). Si des métabolites sont communs à l'humain, des microsomes d'origine animale peuvent être utilisés pour en produire une grande quantité en vue de les caractériser.

2.2.2 Cellules intactes

Un modèle *in vitro* plus complet est constitué d'hépatocytes humains intacts. Par le maintien de la membrane, ces cellules ont conservé les niveaux d'enzymes, la compartimentation de celles-ci et les concentrations intra et extracellulaires des cofacteurs (Floby *et al.*, 2009; Gomez-Lechon *et al.*, 2007; Hallifax *et al.*, 2005; A. P. Li, 2007; Soars *et al.*, 2007). De la même façon que pour les systèmes *in vivo*, les xénobiotiques doivent traverser les membranes, interagir avec les organelles et les récepteurs cellulaires et entrer en compétition avec les substrats endogènes présents pour la biotransformation (Sinz, 1999). Dans le cas présent, il est préférable d'utiliser les hépatocytes humains en suspension et de ne pas en faire la culture, ceci afin d'éviter la perte de la différenciation des fonctions cellulaires du foie, notamment les niveaux des CYP 450.

Les cellules parenchymateuses fraîchement isolées sont reconnues comme étant un modèle fiable qui est couramment utilisé dans les évaluations précliniques. Leur utilisation est toutefois limitée par leur disponibilité restreinte et la perte rapide d'activité enzymatique (A. P. Li, 2008; Skett *et al.*, 1995). Lévesque *et al.* ont obtenu des métabolites de phases I et II de stéroïdes anabolisants (norandrostènedione (estr-4-ène-3,17-dione) (**33**),

androstènedione (**12**) et tétrahydrogestrinone (**21**)) à partir de cellules fraîches de foies humains, rapportant selon les auteurs une bonne corrélation avec le profil *in vivo* obtenu chez l'humain (J. F. Lévesque, Gaudreault *et al.*, 2005; J. F. Lévesque *et al.*, 2002; J. F. Lévesque, Templeton *et al.*, 2005). L'amélioration des techniques de conservation lors du transport a depuis peu permis leur commercialisation.

Par ailleurs, des hépatocytes humains cryopréservés sont disponibles et présentent aussi un maintien de l'intégrité cellulaire ainsi que de l'architecture enzymatique tout en démontrant une activité catalytique comparable à celle des cellules fraîches (Guillouzo *et al.*, 1999; Hengstler, Ringel *et al.*, 2000; Hengstler, Utesch *et al.*, 2000; Ostrowska *et al.*, 2000). Ce modèle est décrit comme étant approprié pour des incubations de courte durée de xénobiotiques et des évaluations de cytotoxicité, tout en évitant les différences métaboliques interspèces (A. P. Li, Gorycki *et al.*, 1999; A. P. Li, Lu *et al.*, 1999; Skett *et al.*, 1999). En théorie, lorsque la cryopréservation est adéquate, il est possible de conserver les hépatocytes durant plus d'une année sans que l'intégrité morphologique ou l'activité fonctionnelle n'en soit affectées (Ostrowska *et al.*, 2000). Ceci permet de planifier ou de reproduire une expérience à tout moment avec des hépatocytes déjà caractérisés ou de faire des incubations à grande échelle pour pousser l'analyse d'un métabolite (A. P. Li, Gorycki *et al.*, 1999; A. P. Li, Lu *et al.*, 1999). La sélection d'un seul ou d'un groupe de donneurs permet d'obtenir le métabolisme représentatif d'une population (A. P. Li, 2007).

Les hépatocytes cryopréservés sont fréquemment utilisés par les compagnies pharmaceutiques pour des études métaboliques et toxicologiques (D. M. Cross & Bayliss, 2000). Ainsi, les métabolites du Prazosin (2-[4-(2-furanoyl)-piperazin-1-yl]-4-amino-6,7-dimethoxyquinazoline), un agent antihypertenseur, et ceux de la 1-(3-2-pyrazinyl)-2(R)-méthylpiperazine, un composé pour le traitement de l'obésité, ont été obtenus à partir d'hépatocytes humains cryopréservés afin d'en confirmer les voies métaboliques *in vivo*

(Edlund & Baranczewski, 2004; Erve *et al.*, 2007). Dans une autre application, des cellules cryopréservées adhérentes ont servi à évaluer les métabolites de la testostérone (**1**), ce type d'incubation nécessitant par contre des manipulations plus longues (G. Wang *et al.*, 2006).

En résumé, plusieurs modèles sont disponibles pour l'étude de la biotransformation de xénobiotiques et les hépatocytes et fractions subcellulaires S9 sont généralement reconnus comme étant des systèmes plus complets au niveau des enzymes comparativement aux microsomes (Dalvie *et al.*, 2009).

3. Techniques analytiques employées pour la détection des agents dopants

Tout comme en toxicologie ou en sciences judiciaires, les analyses effectuées pour la détection et l'identification de substances et méthodes prohibées chez les athlètes demandent une spécificité et une sensibilité élevées. Les critères d'identification imposés par l'Agence mondiale antidopage requièrent principalement l'emploi de techniques combinées à la spectrométrie de masse qui rencontrent ces exigences. Les SAA étant fortement métabolisés, ils sont souvent indétectables et leur administration est décelée par leurs produits de biodégradation. Dans le contexte spécifique du dopage sportif, ces substances pouvant avoir été utilisées plusieurs mois avant les tests et les utilisateurs cherchant à masquer l'emploi de pratiques dopantes, les métabolites sont souvent présents à l'état de trace dans cette matrice biologique complexe que constitue l'urine qui contient un grand nombre de métabolites endogènes interférents en fortes concentrations allant jusqu'au microgramme par mL (Staack & Hopfgartner, 2007, Graham *et al.*, 2008). Les critères d'identification demandent la correspondance des spectres de masse et temps de rétention des métabolites urinaires avec ceux du matériel de référence.

Des méthodes sensibles et performantes ont été développées pour la détection des agents anabolisants sur des instruments de CL-SM, de CG-SM et également de spectrométrie de masse en tandem (SMⁿ) remplaçant fort avantageusement les méthodes immunométriques utilisées dans les années 1970 (R. V. Brooks *et al.*, 1979; Hampl & Stárka, 1979). La CG-SMⁿ présente un grand pouvoir de séparation et de spécificité (Maurer *et al.*, 2004). Les travaux originaux ayant porté sur la caractérisation des métabolites urinaires des SAA ont été effectués par l'analyse de fractions purifiées. Les fonctions chimiques ont été déterminées par l'emploi de dérivés pertriméthylsilyles des fonctions cétoniques formant des énols et des fonctions alcool formant des éthers (TMS-d₀ ou TMS-d₉), ou méthoxymes mixtes ou non (Dettmer *et al.*, 2007; McCloskey *et al.*, 1968; Segura *et al.*, 1998). Les voies métaboliques de plusieurs stéroïdes ont été résumées par Schänzer en 1993 (Schänzer & Donike, 1993). D'autres groupes ont également contribué à l'identification des métabolites caractéristiques de la méthénolone (**16**) (Goudreault & Massé, 1990), la stenbolone (**17**) (Goudreault & Massé, 1991), l'androstano-1,4,6-triène-3,17-dione (**34**) (M. K. Parr, Fusholler *et al.*, 2009), l'androstènedione (**12**) et la norandrostènedione (**33**) (J. F. Lévesque *et al.*, 2002), par exemple. Ces techniques sont aussi couramment utilisées pour la détection de suppléments hormonaux de croissance dans l'industrie bovine (De Brabander *et al.*, 2007; Impens *et al.*, 2007; Van Poucke *et al.*, 2005). L'emploi de la CG-SM est toutefois limité aux composés suffisamment volatiles et stables dans les conditions requises par la chromatographie en phase gazeuse.

L'usage de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) permet l'analyse directe de molécules de poids moléculaires élevés tels les métabolites glucuro ou sulfoconjugués, ne requiert habituellement pas de dérivation et nécessite une préparation de l'échantillon moins élaborée. Contrairement à la CG-SM, la technique requiert la vaporisation de la phase mobile avant l'introduction à l'analyseur. Peu de fragmentation est habituellement obtenue en CL-SM, mais la spectrométrie de masse en tandem permet d'augmenter l'information structurale de la

molécule par la sélection d'un ion précurseur et la fragmentation subséquente avec un gaz inerte dans une chambre de collision de celui-ci. Ces nouveaux fragments sont alors analysés dans un deuxième sélecteur ce qui permet d'avoir des informations supplémentaires sur la structure (Griffiths, 2003). Les limitations de cette technique sont liées à la possible suppression d'ion par coélution et le peu d'informations structurales obtenues par l'ionisation par nébulisation électrostatique ou par ionisation chimique à pression atmosphérique en comparaison de ce qui est obtenu de l'analyse avec ionisation par impact électronique en CG-SM (Maurer, 2004).

3.1 Protocole d'extractions des stéroïdes anabolisants et analyse par CG-SM

Les échantillons de matrices biologiques pour analyse par CG-SM doivent être purifiés afin de maximiser l'extraction des analytes recherchés et diminuer les interférences (Dettmer *et al.*, 2007). Des extractions sur phase solide (SPE) et liquide-liquide sont typiquement effectuées permettant ainsi de retirer les sels et autres molécules interférentes à l'analyse subséquente ou pouvant inhiber l'activité enzymatique nécessaire à la libération des groupements glucuroconjugés qui ne peuvent être directement analysés (Kushnir *et al.*, 2010). Une hydrolyse reproductible et spécifique des métabolites glucuroconjugés principalement recherchés est obtenue avec une préparation purifiée de β -glucuronidase extraite d'*Escherichia coli*. D'autres préparations enzymatiques mixtes, telles que celles provenant d'extraits de sucs de *Helix pomatia* donnent parfois lieu à des réactions secondaires indésirables telle la transformation de l'androstènediol (3 β ,17 β -dihydroxyandrost-5-ène) (35) en testostérone (1) faussant ainsi le profil des stéroïdes urinaires (Buisson *et al.*, 2005; Kicman & Gower, 2003). Dans le cas de stéroïdes sulfoconjugés, une solvolysse chimique acide est souvent nécessaire, les préparations enzymatiques d'arylsulfatases ne possédant pas l'activité nécessaire à l'hydrolyse des sulfates de plusieurs métabolites (Ayotte *et al.*, 1996; Lévesque *et al.*, 1999). Des conditions d'extraction sélective des métabolites

libres, glucuroconjugués et sulfoconjugués ont également été mises au point pour identifier les métabolites différemment conjugués. La CL-SM permet bien sûr l'analyse directe des métabolites conjugués dont on attend les pertes caractéristiques de 176 u.m.a ($C_6H_8O_6$) pour les groupements d'acide glucuronique et de 80 u.m.a. (SO_3) pour les sulfates (Griffiths, 2003). L'analyse CL-SM procure en soi moins d'informations structurelles du noyau stéroïdien que la CG-SM qui demeure la technique de référence pour la caractérisation des SAA (Dettmer *et al.*, 2007).

L'analyse CG-SM des métabolites urinaires des SAA est effectuée principalement de routine sur les dérivés éther et énol-TMS (triméthylsilyle) (Ayotte *et al.*, 1996). Les composés pertriméthylsilylés sont plus volatils, montrent une meilleure stabilité thermique et leur analyse procure un spectre de masse distinct par rapport aux précurseurs non dérivés. L'ion moléculaire ou l'ion provenant de la perte d'un groupement méthyle sont souvent présents ce qui permet la détection efficace. Les éthers-TMS sont obtenus par l'emploi de N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) alors que la formation régiospécifique d'énols-TMS est possible par l'ajout d'une catalyse d'iodotriméthylsilane selon la procédure développée par Donike *et al.* en 1969 et toujours utilisée dans les laboratoires antidopage (Donike, 1969; Donike, 1984). L'iodotriméthylsilane est très sensible à la lumière et à la présence d'oxygène et c'est pourquoi un mercaptan, agent réducteur, est ajouté pour piéger l'iode formé et retarder la dégradation du mélange de dérivation. La réaction de dérivation étant sensible à l'humidité, elle doit se faire en milieu anhydre en présence de triéthylamine ajoutée au mélange pour faciliter le départ du proton des groupements alcool et neutraliser le pH du milieu (formation de HI). Les fonctions O-TMS ont tendance à diriger la fragmentation du noyau stéroïdien et ceci résulte en la formation de fragments diagnostiques (Diekman & Djerassi, 1967). L'obtention de dérivés deutérés de triméthylsilyle (TMS- d_9) s'avère également utile à l'élucidation des voies de fragmentation des métabolites analysés (McCloskey *et al.*, 1968; Yoon *et al.*, 1990).

Les propriétés de rétention d'un stéroïde par CG-SM dépendent des contributions des groupements attachés au noyau stéroïdien, de la surface de contact du composé et de la composition de la phase stationnaire de la colonne (Knights & Thomas, 1962). En ce qui a trait à leur spectre de masse, dans certains cas, deux isomères d'une même molécule auront des patrons de fragmentation presque identiques qui ne se différencieront que par l'abondance relative des fragments. Le temps de rétention et les ions caractéristiques des composés sont nécessaires à leur identification.

3.2 Fragmentation

La majorité de l'information structurelle provient des patrons de fragmentation des spectres de masse. Les voies de fragmentation des dérivés triméthylsilylés des androstanes possédant des fonctions hydroxyles et cétoniques ont été étudiées en détail et certains ions diagnostiques sont fort utiles. Les ions moléculaires sont souvent présents ainsi qu'un fragment correspondant à la perte d'un groupement méthyle du TMS et du squelette androstane (Diekman & Djerassi, 1967). La présence et la perte d'un ion à m/z 129 est observée chez les stéroïdes Δ^5 -3-hydroxylés par la fragmentation des liens en C-1, 2 et 3 du cycle A (Eneroth *et al.*, 1964 ; Diekman & Djerassi, 1967). Ce même ion peut aussi provenir de la fragmentation du cycle D possédant un groupement C-17-OTMS (Diekman & Djerassi, 1967, Sjovall & Vihko, 1966). Tel que montré à la figure 1.9, la présence d'un groupement méthyle en C-17 donne lieu aux ions à m/z 130 et 143 par une fragmentation typique du cycle D (C. J. W. Brooks *et al.*, 1971; Dürbeck & Bükler, 1980). Lorsque le stéroïde est également hydroxylé en position C-16, la fragmentation du cycle D demeure la même, les ions caractéristiques observés respectivement à m/z 218 et 231 (Dürbeck *et al.*, 1983; Schubert & Schumann, 1970).

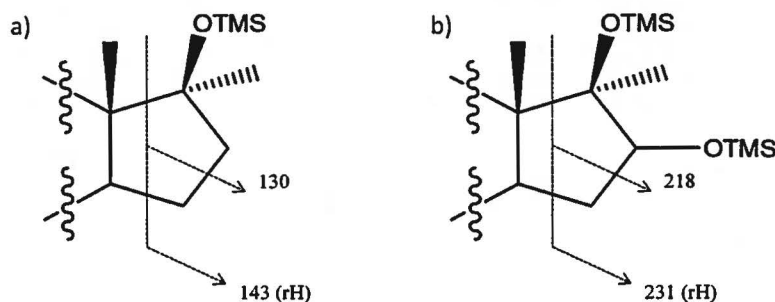


Figure 1.9 : Fragmentations caractéristiques du cycle D d'un stéroïde hydroxylé et méthylé en position C-17 (a) et portant un groupement hydroxyle en position C-16 (b)

Une hydroxylation en position C-12 produit un ion important à m/z 170 par un mécanisme complexe de fragmentation du cycle C (Dürbeck *et al.*, 1983), alors qu'un réarrangement des groupements -OTMS peut aussi avoir lieu lorsque ceux-ci sont à proximité conduisant à la formation d'un ion à m/z 147 (TMSO-CH=OTMS^+) (Diekman *et al.*, 1968; Sloan *et al.*, 1971). Ce réarrangement intramoléculaire se produit pour des molécules de structure semi-rigide, tel que les stéroïdes polyhydroxylés et est dépendant de la séparation et de la stéréochimie des groupements fonctionnels impliqués (Sloan *et al.*, 1971). La perte d'un fragment de m/z 90 est équivalente à la perte d'eau d'un composé hydroxylé non dérivé et est due à la perte d'un groupement triméthylsilanol ($(\text{CH}_3)_3\text{-SiOH}$) (Diekman & Djerassi, 1967).

3.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est aussi utilisée pour obtenir davantage d'information structurale, entre autre au sujet de la stéréochimie des groupements fonctionnels. Cette technique nécessite cependant une plus grande quantité d'analyte que la spectrométrie de masse. La spectrométrie de RMN repose sur le principe suivant : un noyau atomique exposé à un champ magnétique extérieur absorbe ce rayonnement électromagnétique à une fréquence précise qui dépend de sa nature et de son environnement. La résonance magnétique procure les déplacements

chimiques et les constantes de couplage des protons et des atomes de carbone de la molécule et ainsi permet non seulement l'élucidation de la structure, mais aussi de la stéréochimie.

Pour les molécules plus complexes, il est possible de procéder à certaines analyses particulières telles que la spectroscopie de l'effet nucléaire Overhauser (NOESY) qui permettent d'analyser la proximité des atomes dans l'espace. En effet, un spectre NOESY montre la corrélation en deux dimensions de la résonance de spins d'atomes rapprochés et permet entre autre de déterminer la stéréochimie des groupements fonctionnels de la molécule. L'utilisation de ces techniques d'analyse nous a permis de proposer des structures pour les métabolites de stéroïdes de synthèse inconnus.

4. But du travail

Nous avons voulu étudier l'utilité des incubations cellulaires et subcellulaires d'hépatocytes humains en vue de produire les métabolites de SAA nouveaux, de procéder à leur analyse par CG-SM et RMN et de synthétiser les composés de référence afin d'en assurer la caractérisation. Les stéroïdes étudiés sont la $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 17β -hydroxy- 5α -androstane-3-one (méthyldrostanolone) (4), son analogue la 17β -hydroxy- 2α -méthyl- 5α -androstane-3-one (drostanolone) (6) et la 17β -hydroxy- 17α -méthyl- 5α -androst-2-ène (DMT) (7). Nous avons opté pour l'utilisation d'hépatocytes humains cryopréservés et frais en suspension. Pour permettre une analyse plus poussée par RMN de certains métabolites, des fractions subcellulaires de foie humain ont été utilisées afin de les obtenir en plus grande quantité. La caractérisation des métabolites a été effectuée par synthèse chimique des composés de référence.

La première section du chapitre deux présente un article publié en 2009 dans la revue Steroids portant sur les métabolites proposés pour la méthyldrostanolone. Dans l'optique de compléter ces travaux, un complément

d'article portant sur la synthèse chimique des métabolites de la drostanolone est présenté. La section suivante présente le second article publié en 2012 portant sur la caractérisation de métabolites de la DMT. Un chapitre final permet de conclure et de mettre de l'avant les contributions à l'avancement des connaissances. En annexe sont présentés un tableau des structures des stéroïdes mentionnés dans cette thèse, un schéma des manipulations des cellules cryopréservées et le spectre RMN du produit (76).

Chapitre 2 ARTICLES SCIENTIFIQUES ET COMPLÉMENTS
D'ARTICLE

Section 1 : Identification of Drostanolone and 17-Methyldrostanolone Metabolites Produced by Cryopreserved Human Hepatocytes

Julie Gauthier, Danielle Goudreault, Donald Poirier, Christiane Ayotte

Steroids 74 (2009) 306-314

1.1 Résumé de l'article en français

Nous avons synthétisé la méthyldrostanolone ($2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 17β -hydroxy- 5α -androstan-3-one) (**4**) à partir de la drostanolone (17β -hydroxy- 2α -méthyl- 5α -androstan-3-one) (**6**) et l'avons identifiée dans les urines de compétiteurs ainsi que dans certains produits illicites offerts sur le réseau internet. Des incubations avec des hépatocytes humains cryopréservés ont été utilisées pour étudier la biotransformation de la méthyldrostanolone (**4**) et de l'analogue non méthylé, la drostanolone (**6**) pour fins de comparaison. Pour chacun de ces stéroïdes, les métabolites majeurs issus de la réduction de la cétone en C-3 ont été obtenus (hydroxyle en position 3α (majeur) et 3β) et ont été identifiés par analyse par CG-SM suite à l'extraction des métabolites du milieu de culture. La stéréochimie du groupement hydroxyle en position C-3 fût confirmée par des incubations en présence de 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase. Des structures correspondant aux métabolites hydroxylés en position C-12 (mineur) et en C-16 ont été proposées sur la base des patrons de fragmentation caractéristiques de la présence de ces groupements fonctionnels pertriméthylsilylés (TMS- d_0 et TMS- d_9). Un nouveau métabolite hydroxylé en C-2 a été obtenu et synthétisé ; les spectres de RMN et de masse sont décrits. Tous les métabolites extraits du milieu de culture cellulaire sont présents dans une urine provenant d'une étude d'excrétion sur un volontaire humain, cependant dans des proportions différentes.

1.2 Description de l'article et contribution de l'étudiante

Lorsque l'utilisation d'un nouveau produit est suspectée, il faut tout d'abord l'identifier, le synthétiser et ensuite, caractériser ses métabolites. Les travaux dont il est fait état dans l'article décrivent l'utilité des cultures d'hépatocytes et de fractions cellulaires pour déterminer rapidement la structure de métabolites inconnus de nouvelles substances. En effet, l'obtention de métabolites de la méthyltestostérone ($2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 17β -hydroxy- 5α -androstane-3-one) (**4**) et de la drostanolone (17β -hydroxy- 2α -méthyl- 5α -androstane-3-one) (**6**) à partir d'incubations d'hépatocytes cryopréservés en suspension, pour la première fois utilisés dans le cadre de la détection d'agents dopants, en a permis la caractérisation.

Un nouveau métabolite hydroxylé en position C-2, jamais décrit auparavant, a été caractérisé durant ce projet. Un complément à l'article est présenté à la fin de cette section et présente plusieurs synthèses chimiques ayant mené à la caractérisation complète de métabolites de la drostanolone produits *in vitro*.

L'étudiante a participé à l'élaboration de ce projet, a développé et effectué les incubations cellulaires, les analyses par CG-SM et les isolations par HPLC. L'étudiante a aussi participé à l'analyse des spectres de masse menant aux propositions de structures de métabolites et à la synthèse chimique de métabolites proposés pour la drostanolone (**6**) présentés dans la partie complémentaire de l'article.

1.3 Article

Identification of drostanolone and 17-methyldrostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes.

Julie Gauthier, INRS – Institut Armand-Frappier, Laval, Canada

Danielle Goudreault, INRS-Institut Armand-Frappier

Donald Poirier, CHUQ-CHUL Research Center and Université Laval, Québec, Canada

Christiane Ayotte, INRS – Institut Armand-Frappier

Corresponding Author:

Christiane Ayotte,

INRS-Institut Armand-Frappier

531, boul. des Prairies

Laval, Québec H7V 1B7

Abstract

Methyldrostanolone ($2\alpha,17\alpha$ -dimethyl- 17β -hydroxy- 5α -androstan-3-one) (**4**) was synthesized from drostanolone (17β -hydroxy- 2α -methyl- 5α -androstan-3-one) (**6**) and identified in commercial products. Cultures of cryopreserved human hepatocytes were used to study the biotransformation of drostanolone and its 17-methylated derivative. For both steroids, the common 3α - (major) and 3β -reduced metabolites were identified by GC/MS analysis of the extracted culture medium and the stereochemistry confirmed by incubation with 3α -hydroxysteroid dehydrogenase. Structures corresponding to hydroxylated metabolites in C-12 (minor) and C-16 were proposed for other metabolites based upon the evaluation of the mass spectra of the pertrimethylsilyl (TMS- d_0 and TMS- d_9) derivatives. Finally, on the basis of the GC/MS and ^1H NMR data and through chemical synthesis of the 17-methylated model compounds, structures could be proposed for metabolites hydroxylated in C-2. All the metabolites extracted from hepatocyte culture medium were present although in different relative amounts in urines collected following the administration to a human volunteer, therefore confirming the suitability of the cryopreserved hepatocytes to generate characteristic metabolites and study biotransformation of new steroids.

Keywords: Methyldrostanolone, drostanolone, metabolites, hepatocytes, GC-MS

Introduction

The list of anabolic agents including anabolic androgenic steroids, prohibited in sports is published by the World Anti-Doping Agency [1]. In order to detect their utilization, urine samples collected from athletes are tested utilizing comprehensive GC-MS [2-4] or LC-MS [5, 6] methods targeting characteristic, long-lasting metabolites. Those metabolites were generally identified from specimens collected following the administration of pharmaceutical preparations to healthy volunteers.

In nearly ten years, as a perverse consequence of the Dietary Supplement Health and Education Act adopted in the mid-nineties in the USA, new substances openly appeared on the market in products labelled with a rather confusing nomenclature, using new terminology such as “pro-hormone” or “designer supplement”. Steroids such as androstenedione (androst-4-en-3,17-dione) (**12**), dehydroepiandrosterone (DHEA) (**36**) were referred to as testosterone pro-hormones, while others such as boldione (androsta-1,4-dien-3,17-dione) (**32**) and norandrostenedione (estr-4-en-3,17-dione or the delta-5 isomer) (**33**) were related respectively to *boldenone* (17 β -hydroxyandrost-1,4-dien-3-one) (**29**) and to *nandrolone* (nortestosterone) (**24**). Others, such as tetrahydrogestrinone (13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17-pregna-4,9,11-trien-3-one) (**21**) [7], DMT (a mixture of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en and the 3-en isomer) (**7**) [8], norbolethone (13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17-pregn-4-en-3-one) (**22**) [9] and methyldrostanolone (17 β -

hydroxy-2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-3-one) (4) [10] more clandestinely shared, were characterised by anti-doping laboratories following seizures, denunciations or through the analysis of athletes' samples. No clinical data are available for such molecules; hormonal properties and health problems [11-14] are discovered *a posteriori*. As the adverse effects of these compounds are not known, it is difficult to justify on ethical grounds the administration of these steroids to humans for the purpose of investigating their metabolism.

Freshly isolated human hepatocytes were successfully utilized to produce metabolites of androstenedione (12), norandrostenedione (33), tetrahydrogestrinone (21) and gestrinone (37) [15-17], correlating positively with the results of human excretion studies. Microsomal and S9 fractions of human liver homogenates have been utilized for the formation of phase I and II metabolites of 17-alkylated steroids such as methyltestosterone (17 β -hydroxy-17 α -methylandrosta-4-en-3-one) (13) and methandienone (17 β -hydroxy-17 α -methylandrosta-1,4-dien-3-one) (25) [18]. Even so, as microsomes are artefacts, these being vesicles formed by the endoplasmic reticulum after rupture of the cell, some enzymes and cofactors can be lost [19]; in this respect, the use of human hepatocytes for biotransformation offer a distinct advantage.

Human hepatocytes have been successfully cryopreserved, thus maintaining their viability and showing comparable drug-metabolizing enzyme activities to freshly isolated ones; they are reported to afford under the right conditions,

reliable results for short-term metabolic studies and evaluation of cytotoxicity [20-23]. The identification of metabolites of new steroid molecules could be greatly simplified in the incubation medium of cryopreserved hepatocytes, given the absence of interfering substances present in urine matrices.

Having worked on the identification of unknown metabolites in an athlete's sample already containing the metabolites of several anabolic agents, we postulated that a 17-methylated derivative of drostanolone could now be available. In fact, a few months later, we identified the presence of 17-methylandrostanolone (4) in hormonal supplements named *Superdrol* and *Methasterone*. Already, a case of cholestatic jaundice and IgA nephropathy in a bodybuilder has been associated with that substance [24].

The metabolites of drostanolone (6) have been partially identified [25, 26], while only major reduced metabolites of methylandrostanolone (4) were described from human excretion studies [27, 28].

The goals of this study were to characterize 17-methylandrostanolone (4) and investigate its biotransformation (phase I metabolites) and that of drostanolone (6) *in vitro* with human cryopreserved hepatocytes.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada): trypan blue, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (without red phenol), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate NADPH, trimethylsilyliodide (TMIS), N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA), pyridine, trimethylsilylchloride (TMCS) and triethylamine. N,O-bis(trimethyl-d₉-silyl) acetamide (BSA-d₉) and trimethyl-d₉-silylchloride (TMCS-d₉) were obtained from C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Distilled water was purified on a Milli-Q Gradient system from Millipore (Fisher Scientific, Whithy, Canada). Ethanethiol was obtained from Fisher Scientific (Whithy, Canada), acetonitrile, diethyl ether, methanol, hexane, and dichloromethane from Caledon (Georgetown, Canada). Sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), sodium bicarbonate (NaHCO₃) ACS grade and sodium carbonate (Na₂CO₃) were obtained from VWR (Batavia, USA). The Krebs-Henseleit buffer and the cryopreserved cells were purchased from Celsis-In Vitro Technologies (Baltimore, USA). The 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (EC-1.1.1.50) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). The authentic standards of estr-4-en-17 β -ol-3-one (19-nortestosterone) and of 17 β -hydroxy-2 α -methyl-5 α -androstan-3-one (drostanolone) were obtained from Steraloids Inc. (Newport, USA).

Anhydrous reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure using commercially available anhydrous solvents (Gibbstown, USA), except THF distilled from sodium/benzophenone ketyl under argon. Chemical reagents for synthesis were purchased from Aldrich Chemical Co (Milwaukee, USA). Flash chromatography was performed on Silicycle 60 230-400-mesh silica gel (Québec, Canada).

GC-MS

Analyses in full scan mode (50 to 750 amu) were performed on Agilent 6890 gas chromatograph coupled to a 5973 mass selective detector equipped with an 5973 auto-sampler with instrument control and data analysis by the Enhance ChemStation software (Agilent Technologies, New Castle, USA) with EI ionization at 70 eV. A DB-5MS column (SGE) (30 m X 0.22 mm id X 0.25 μ m film thickness) (Agilent, New Castle, USA) was utilized with the following temperature program of the oven: 100 °C (0.5 min) to 240 °C at 20 °C/min to 278 °C at 6 °C/min and 320 °C (10 °C/min, held 4 min). The temperature of the injector and the transfer line were respectively 270 °C and 310 °C. The carrier gas was helium BIP (BOC, Montréal, Canada).

NMR

¹H spectra were recorded at 400 MHz using a Bruker AVANCE 400 spectrometer (Billerica, MA, USA). The chemical shifts (δ) are expressed in ppm and referenced to chloroform (7.26 ppm).

Synthesis of 2 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (4)

3,3-Ethylenedioxy-2 α -methyl-5 α -androstan-17 β -ol (38)

To a solution of drostanolone (**6**) (200 mg, 0.657 mmol) in anhydrous dichloromethane (3 mL) at room temperature under argon were added anhydrous ethylene glycol (240 μ L, 4.30 mmol), triethyl orthoformate (370 μ L, 2.22 mmol) and p-toluene sulfonic acid monohydrate (13 mg, 0.07 mmol). The solution was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was then poured in water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The resulting crude product was purified by flash chromatography (silica gel) using ethyl acetate:hexane (3:7, V:V) as eluent to give (**38**) (179 mg, 78 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.72 (s, 3H, CH₃-19), 0.83 (s, 3H, CH₃-18), 0.83 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃-2 α), 0.70-2.10 (residual CH and CH₂), 3.62 (t, J = 8.5 Hz, 1H, CH-17 α), 3.93 (m, 4H, 2 x CH₂O).

3,3-Ethylenedioxy-2 α -methyl-5 α -androstan-17-one (39)

To a solution of alcohol (**38**) (68 mg, 0.195 mmol) in anhydrous dichloromethane (20 mL) at 0 °C was added Dess-Martin periodinane (91 mg, 0.215 mmol). The solution was stirred for 40 min at room temperature. The reaction mixture was then poured in water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The resulting crude product was purified by flash chromatography (silica gel) using ethyl acetate:hexane (15:85, V:V) as eluent to give (**39**) (56 mg, 82 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.83 (d, J = 6.7 Hz, 3H,

CH₃-2 α) 0.85 (s, 6H, CH₃-19 and CH₃-18), 0.70-2.10 (residual CH and CH₂), 2.43 (dd, J₁ = 8.6 Hz and J₂ = 19.4 Hz, 1H of CH₂-16), 3.93 (m, 4H, 2 x CH₂O).

3,3-Ethylenedioxy-2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-17 β -ol (40)

A solution of anhydrous cerium (III) chloride (260 mg, 1.05 mmol) in anhydrous THF (4.5 mL) was stirred overnight under argon at room temperature before the addition of a 1.6 M solution of methyl lithium in diethyl ether (650 μ L, 1.05 mmol) at -78 °C. The resulting solution was stirred for 30 min and the ketone (39) (38 mg, 1.09 mmol) was added in THF at -78 °C and the mixture stirred for an additional 50 min. The resulting solution was then poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The resulting crude product was purified by flash chromatography (silica gel) using ethyl acetate:hexane (15:85, V:V) as eluent to give (40) (20 mg, 51 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.83 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃-2 α), 0.84 and 0.85 (2s, 3H, CH₃-19 and CH₃-18), 1.20 (s, 3H, CH₃-17 α), 0.70-1.95 (residual CH and CH₂), 3.93 (m, 4H, 2 x CH₂O).

2 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (methyldrostanolone) (4)

To a solution of compound (40) (14 mg, 0.04 mmol) in acetone (700 μ L) was added a 10 % V:V aqueous solution of HCl (280 μ L). The solution was stirred for 1 h at room temperature and sodium bicarbonate was then added up to

neutralisation. The reaction mixture was extracted three times with dichloromethane, dried with MgSO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The resulting crude product was purified by flash chromatography (silica gel) using ethyl acetate:hexane (10:90, V:V) as eluent to give **(4)** (11 mg, 90 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.87 (s, 3H, CH₃-18), 1.00 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃-2 α), 1.08 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, 17 α -CH₃), 0.70-2.20 (residual CH and CH₂), 2.32 (t, J = 14.0 Hz, 1H), 2.47 (m, 1H).

Synthesis of 2 β ,17 α -dimethyl-5 α -androstane-2 α ,3 β ,17 β -triol (44)

2-Methylene-17 α -methyl-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (42)

This compound was prepared from commercially available oxymetholone (**(41)**) as reported by Counsell and Klimstra [29] except that the acetylation step was omitted and a solution of LiAlH₄ in THF (1.0 M) was used instead of LiAlH₄ powder in dioxane.

17 β -hydroxy-17 α -methyl-2-oxirane-5 α -androstane-3-one (43)

To a solution of alkene (**(42)**) (45 mg, 0.143 mmol) in chloroform (3 mL) and benzene (3 mL) was added a solution of *m*-chloroperbenzoic acid (35 mg, 0.172 mmol) in chloroform (1 mL) and the mixture stirred overnight. The resulting solution was diluted with chloroform (20 mL) and then successively washed with a solution of sodium bisulfite (10 %), sodium bicarbonate (10 %) and brine. The organic phase was dried using a phase separator (Biotage) and

evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel) using ethyl acetate/hexane (3:7, V:V) as eluent to give **(43)** (23 mg, 50 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.84 (s, 3H, CH₃-18), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, CH₃-17α), 0.70-1.85 (residual CH and CH₂), 2.56 and 3.17 (2d, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂O of oxirane), 3.85 (dd, 1H, CH-3α, J₁ = 5.3 Hz, J₂ = 11.3 Hz).

2β,17α-dimethyl-5α-androstane-2α,3β,17β-triol (44)

Oxirane **(43)** (25 mg, 0.075 mmol) was suspended in a solution of anhydrous diethylether, tetrahydrofurane and dioxane (3:2:2, V:V:V) (7 mL) and LiAlH₄ (315 μL, 1.0 M THF) was added under atmosphere of argon at room temperature. The solution was stirred at room temperature for 24 h. The organic layer was diluted with ethyl acetate (20 mL), washed with a Rochelle salt solution (10 %), brine, dried with MgSO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel) using ethyl acetate / hexane (1:1, V:V) as eluent to give **(44)** (8 mg, 32 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.84 (s, 3H, CH₃-18), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, CH₃-17α), 1.27 (s, 3H, CH₃-2β), 0.60-1.85 (residual CH and CH₂), 1.91 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 3.56 (dd, J₁ = 4.6 Hz and J₂ = 11.5 Hz, CH-3α).

Production of metabolites by incubation of cryopreserved hepatocytes

According to the instructions of the supplier, the cells were thawed in a thermostatic water bath at 37 °C, washed and suspended in 2.5 mL of Krebs-

Henseleit buffer (KHB). Viability was assessed by trypan blue uptake and the vials contained at least 5×10^6 cells [30].

Stock methanolic solutions (0.01 M in solvent) of nortestosterone, methyldrostanolone and drostanolone were diluted in KHB just before the incubations to 100 μM . Typically, a volume of 250 μL of the cell suspension was sampled in 24-well plates to which 250 μL of the solution of steroid were added (final concentration of steroid: 50 μM). Incubations were carried out for 4 h or 5 h at 37 °C under an atmosphere of $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95 : 5). The enzymatic reactions were stopped by adding 500 μL of acetonitrile in each well. Once transferred in Eppendorf tubes, the samples were vortexed and centrifuged for 10 min at 14 000 rpm. The metabolites were isolated by solid phase extraction on Sep Pak C_{18} cartridges (Waters, Montréal, Canada) as described previously [4]. The steroids were converted to trimethylsilyl- d_0 or - d_9 ethers or trimethylsilyl enol-ethers as described previously, which were analyzed as such by GC/MS.

For scale up experiments, 16 vials containing approximately 8×10^6 cells were placed in 6-well plates (the content of one vial per well) and incubated with proportional amount of drostanolone (**6**) in the same conditions. The metabolites extracted by solid phase extraction from the incubation media were pooled, solvent was dried under nitrogen and the residue dissolved in 25 μL of methanol. Metabolite **6C** was isolated by reverse phase HPLC on Agilent model 1100 equipped with a diode array detector and utilizing Agilent

Zorbax SB-C18 column (5 μ m, 9.4 X 250 mm) (Agilent Technologies, New Castle, USA); the following gradient of acetonitrile and water was used: 50:50 (held 10 min) increased to 65 % acetonitrile in 15 min (held 10 min) to 100 % acetonitrile in 10 min (held 25 min).

Enzymatic reduction with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase

Stock solutions of steroid substrates in methanol (0.01 M) were diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) to final concentration of 10 μ M. NADPH (10 mM) and the enzyme (1 unit/mL) were added to each sample and incubations were performed for 12 h at 37 °C in a water bath. The steroids were extracted with 5 mL of diethyl ether and treated as described previously.

RESULTS

Synthesis of 2 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (methyldrostanolone) (4)

As schematized in Figure 2.1, the four-step synthesis of methyldrostanolone (4) from drostanolone (6) involved a sequential oxidation and methylation in C-17 after protection of the ketone in C-3. The presence of a singlet signal at 1.21 ppm in the ^1H NMR spectra is consistent with the stereochemistry of the 17 α -methyl group, while the presence of the 2 α -methyl group lead to a doublet signal at 1.00 ppm (2 α -CH₃) for both steroids (6) and (4). The mass spectrum of methyldrostanolone was characterised by the presence of the molecular ion at m/z 318 and of ions at m/z 303, 300 and 285 (-CH₃, - H₂O). The major characteristic ions of the TMS-ether, TMS-enol derivative were attributed to the molecular ion at m/z 462, to the presence of the 17-Me, 17-OTMS groups (m/z 143 and 130) and to the fragmentation in the A-ring with ions at m/z 141 (C₂(Me)-C₃(OTMS)), 157, also present in drostanolone (6) [3, 10].

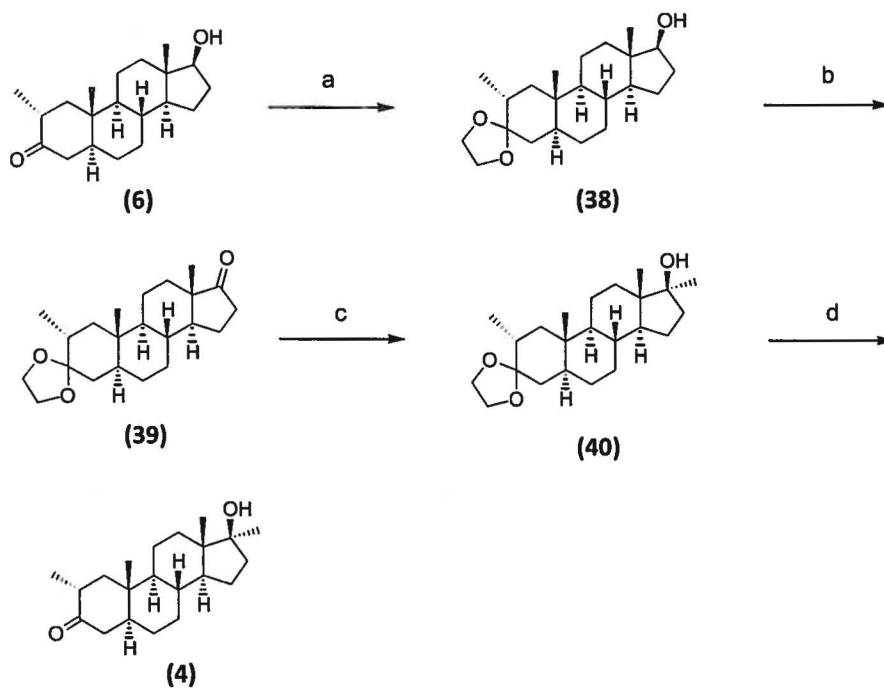


Figure 2.1: Synthesis of methylrostanolone (4) from drostanolone (6). Reagents and conditions: (a) ethylene glycol, triethyl orthoformate, p-TSA, CH_2Cl_2 , rt; (b) Dess-Martin periodinane, CH_2Cl_2 , rt; (c) MeLi, CeCl_3 , THF, -78°C ; (d) HCl 10 % / acetone (4:6, V:V), rt.

Incubations with cryopreserved human hepatocytes

The phase I urinary metabolites of 19-nortestosterone (24) in humans are well known and are formed by the action of 3- and 17-hydroxysteroid dehydrogenases and 5-reductases [31-34]. Having utilized nortestosterone (24) as a control substrate, the supernatant fractions were found to contain after incubations with cryopreserved hepatocytes (4 h), 19-norandrosterone (3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one) (45), 19-noretiocholanolone (3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one) (46) (minor) and 19-norepiandrosterone (3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one) (47) (major), along with several hydroxylated metabolites as reported previously from incubations of fresh hepatocytes [15].

Incubations with drostanolone and methyldrostanolone

Similar metabolites were formed following incubations of human hepatocytes with drostanolone (**6**) and methyldrostanolone (**4**) as substrates. The results are therefore presented simultaneously. A typical chromatogram from the GC/MS analysis of the pertrimethylsilyl mixture of metabolites **4A** – **4H** of methyldrostanolone (**4**) is shown in Figure 2.2.

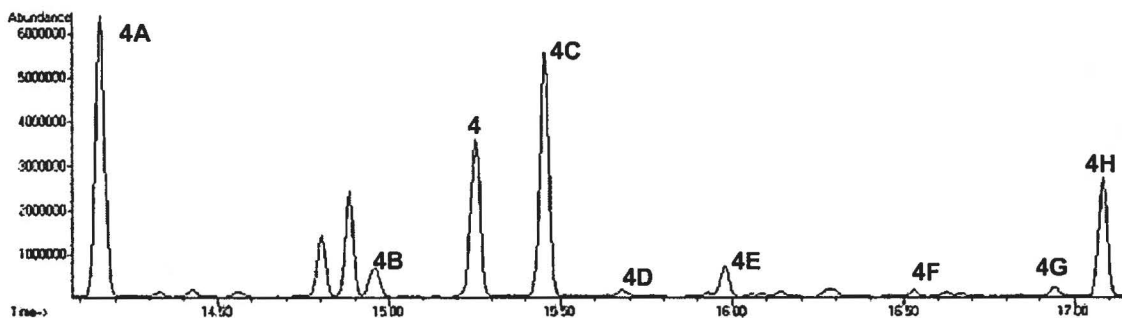


Figure 2.2: Total ion chromatogram of the GC/MS analysis (full scan mode) of metabolites (TMS-derivatives) isolated from incubations of cryopreserved human hepatocytes with methyldrostanolone (**4**).

The first two metabolites **4A** and **4B** of methyldrostanolone (**4**) were identified as respectively the 3α - and 3β -isomers of $2\alpha,17\alpha$ -dimethyl- 17β -hydroxy- 5α -androstan-3-ol (**48**), previously reported as the major metabolites excreted following administration of a capsule of the commercial product to a human volunteer [28, 35]. The molecular ions of the pertrimethylsilyl derivatives are present at m/z 464 along with ions corresponding to the sequential losses of HOTMS and CH_3 producing ions at m/z 374, 359, 284 and 269. The integrity of the D-ring is shown by the presence of the fragment at m/z 143 while the

absence of ions at m/z 141 and 157 further supports the reduction of the ketone in C-3. The corresponding metabolites **6A** and **6B** showing molecular ions at m/z 450 and characteristic ions at m/z 360, 270, 255 and 129 (D-ring fragmentation [36]) were identified in the incubation mixture of drostanolone (**6**). These metabolites are known to be excreted in humans [26]. The structure and stereochemistry of the 3α -isomers were confirmed by the incubation of parent compounds **6** and **4** in the presence of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase [37, 38], which lead to the obtention of single isomers, respectively **6A** and **4A** (results not shown).

The addition of a hydroxyl group in C-16 modifies the fragmentation of 17-methylsteroids, shifting D-ring characteristic ions at m/z 143 and 130 to m/z 231 and 218, the intensity of the latter being increased [39]. Those two intense ions were present in the mass spectrum of two minor metabolites **4E** and **4G** possessing also intense molecular ions at m/z 552 and 550 respectively, as shown in Figure 2.3. Without attempting to further determine the stereochemistry at C-3 and C-16, the peaks were attributed to the 16-hydroxylated metabolites of methyldrostanolone (**4G**) and its reduced 3-ol metabolite (**4E**). Equally typical and easily recognizable fragmentation of pertrimethylsilyl 17-methylsteroids hydroxylated in C-12 was observed in the mass spectrum of another very minor metabolite **4D** showing the characteristic intense ion at m/z 170 (presumptive molecular ion at m/z 550) [40].

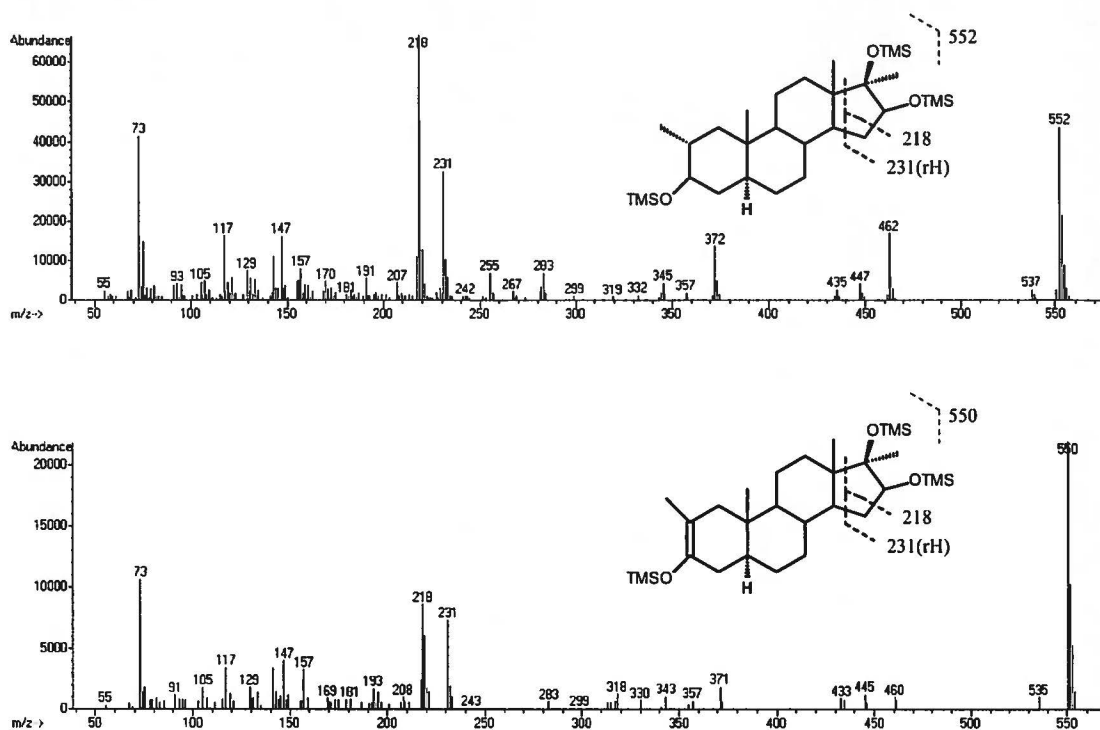


Figure 2.3: Mass spectrum and proposed structures of the pertrimethylsilyl derivative of methylrostanolone 16-hydroxylated metabolites **4E** (upper panel) and **4G** (lower panel) produced from incubations with cryopreserved human hepatocytes.

The mass spectra of the pertrimethylsilyl (TMS- d_0) major metabolite **4C** and of the corresponding drostanolone metabolite **6C** are shown in Figure 2.4. With a mass spectrum almost identical, metabolite **4F** appears to be a minor isomer of **4C**. Molecular ion at m/z 552 (538 for drostanolone metabolite) suggests reduction in C-3 and hydroxylation, while the presence of ions at m/z 143 and 130 excludes hydroxylation in D-ring. Other ions at m/z 462 (TMS- d_9 , 480), 372 (TMS- d_9 , 381) and 282 (TMS- d_9 , 282) are due to the sequential losses of three HOTMS groups. Informative ions suggesting the presence of the third hydroxyl group in A-ring, probably in C-2, are present at m/z 420, 421 (TMS- d_9 , 438, 439), 332 (TMS- d_9 , 341) containing respectively two and one $-OTMS$ groups. These ions are also found in the mass spectra of the

corresponding drostanolone metabolite at m/z 407, 408 (TMS-d₉, 425, 426) and 318 (TMS-d₉, 327), while an ion at m/z 157 (TMS-d₉, 166) is present in both metabolites.

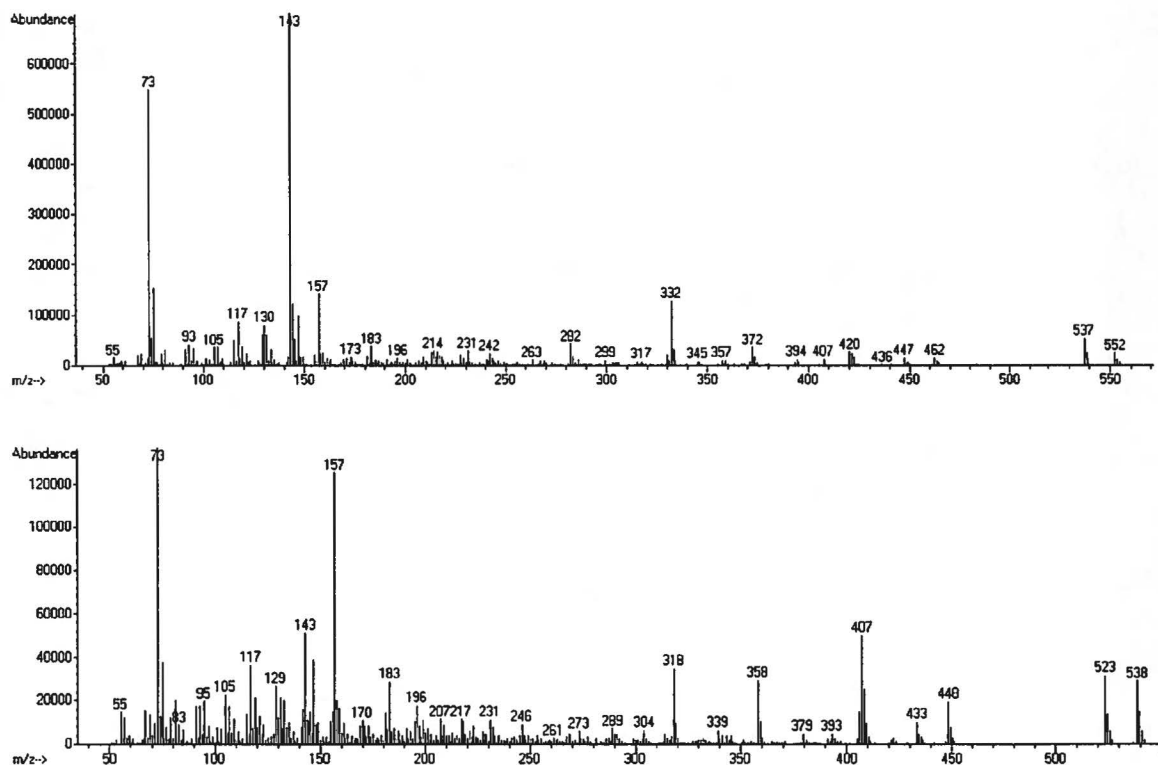


Figure 2.4: Mass spectrum of the pertrimethylsilyl derivative of the major isomer of methylrostanolone metabolite **4C** (upper panel) and drostanolone metabolite **6C** (lower panel) produced from incubations with cryopreserved human hepatocytes.

Having postulated that the metabolite could bear either a 2-hydroxy or a 2-hydroxymethyl group, readily available 17 β -hydroxy-2-(hydroxymethylene)-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one, oxymetholone (**41**), was utilized as the starting material to the synthesis of representative molecules (Figure 2.5). Firstly, 2 α -hydroxymethyl-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**49**) and the corresponding 3 α -OH and 3 β -OH derivatives (**50A** and **50B**) were

obtained by the reduction of oxymetholone (**41**) with sodium borohydride in methanol and purification by flash chromatography [41]. The mass spectra of the pertrimethylsilyl derivative of isomers **50A** and **50B** differ significantly from those of the metabolites **4C** and **4F**, being characterized by the presence of low intensity molecular ions at m/z 552 and ions at m/z 462, 447, 372, 357, 262 and 247 attributed to the sequential losses of HOTMS groups (-90 amu) as shown in Figure 2.6. On that basis, the 2-hydroxymethyl structure was excluded.

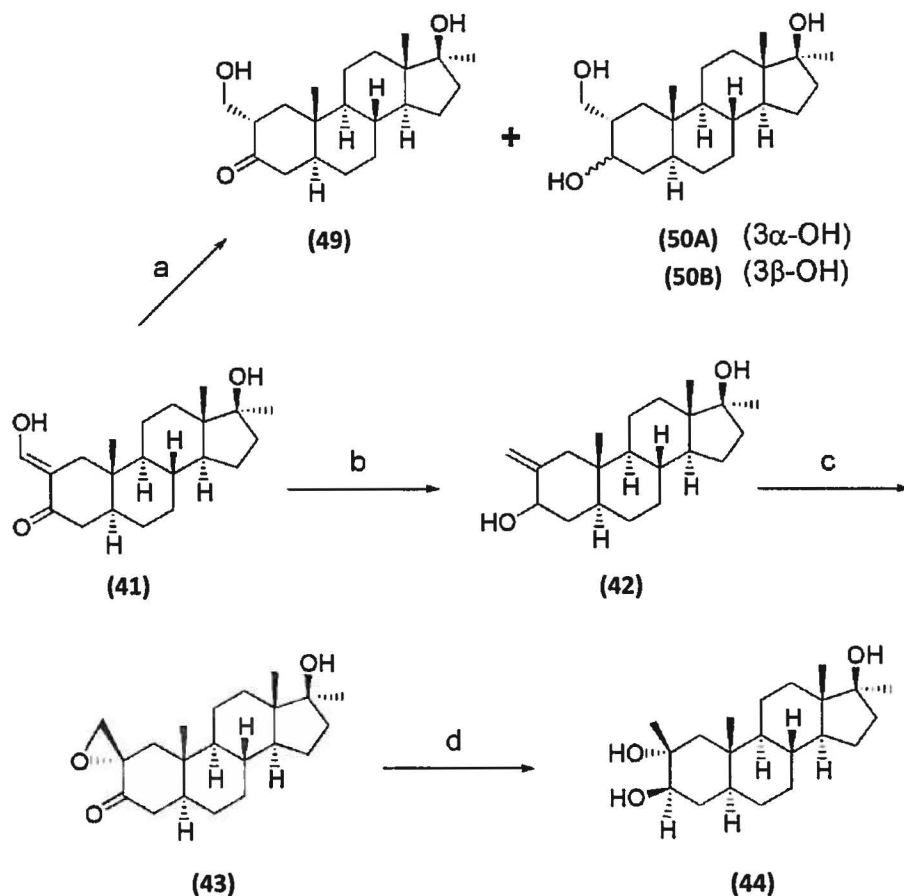


Figure 2.5: Synthesis of 2 α -hydroxymethyl-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (49), the corresponding 3 α -OH and 3 β -OH derivatives (50A and 50B) and 2 β ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-2 α ,3 β ,17 β -triol (44) from oxymetholone (41). Reagents and conditions: (a) NaBH₄, MeOH, rt; (b) LiAlH₄, dioxane/THF (1:1, V:V), reflux; (c) m-CPBA, CHCl₃/benzene (1:1, V:V), rt; (d) LiAlH₄ (1.0 M in THF), diethylether/THF/dioxane (3:2:2, V:V:V), rt.

Four isomers can be produced from the reduction of the ketone in C-3 (3 α -OH and 3 β -OH) and the hydroxylation in C-2 (2 α -OH, 2 β -CH₃ or 2 β -OH, 2 α -CH₃). By a sequence of three steps presented in Figure 2.5, the second model compound (44), the isomer possessing the 3 β -OH, 2 α -OH, 2 β -CH₃ stereochemistry was prepared from oxymetholone (41). The reduction of the

hydroxyenone system of **(41)** with LiAlH_4 , followed by the epoxidation of **(42)** with *m*-chloroperbenzoic acid to provide the oxirane **(43)** as the major isomer and a regioselective opening of **(43)** with LiAlH_4 gave the tertiary alcohol **(44)**. The ^1H NMR spectrum of **(44)** shows clearly four singlet signals at 0.84, 0.88, 1.21 and 1.27 ppm corresponding to methyl groups in C-13 (CH_3 -18), C-10 (CH_3 -19), C-17 α and C-2, respectively, and a doublet of doublet signal at 3.56 ppm for the CH-3. From the analysis of the NOESY spectrum of **(44)**, it was also possible to confirm the CH_3 -2 β stereochemistry (a NOE effect between CH_3 -19 and CH_3 -2 β) and the 3 β -OH stereochemistry (no NOE effect between CH_3 -2 β and CH-3 α). The large coupling constants of the signal at 3.56 ppm (dd) are consistent with a hydroxyl group in the 3 β - instead of the 3 α - configuration.

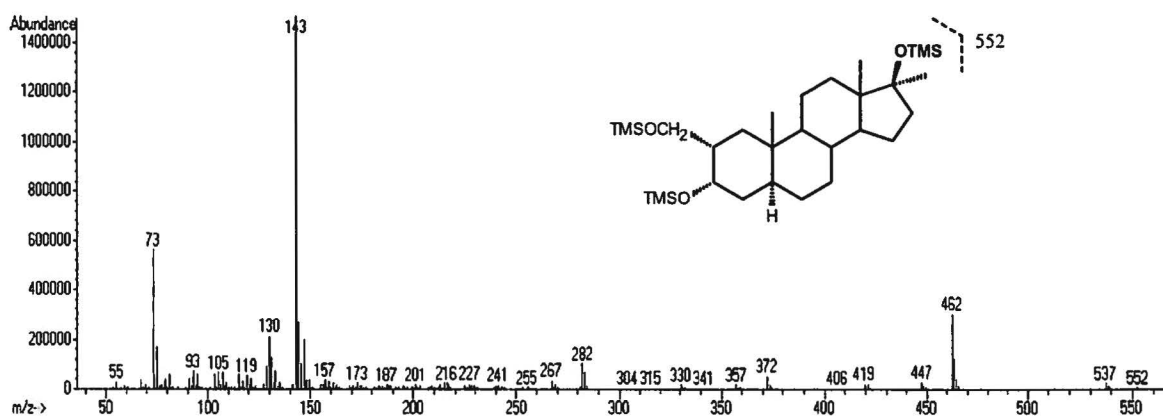


Figure 2.6: Structure and mass spectrum of the pertrimethylsilyl derivative of 2 α -hydroxymethyl-17 α -methyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (**50A**) obtained by chemical synthesis from oxymetholone (**41**).

The mass spectrum of the TMS-derivative of synthesised $2\beta,17\alpha$ -dimethyl- 5α -androstane- $2\alpha,3\beta,17\beta$ -triol (**44**) is reproduced in Figure 2.7. The fragmentation pathways proposed are presented as well. The mass spectrum is almost identical to the one obtained for methylrostanolone metabolite **4C**. The retention times differ therefore suggesting a different stereochemistry at C-2 and C-3. The major reduced metabolites **6A** and **4A** possess 3α -OH groups and that stereochemistry should prevail in all other major metabolites reduced in C-3.

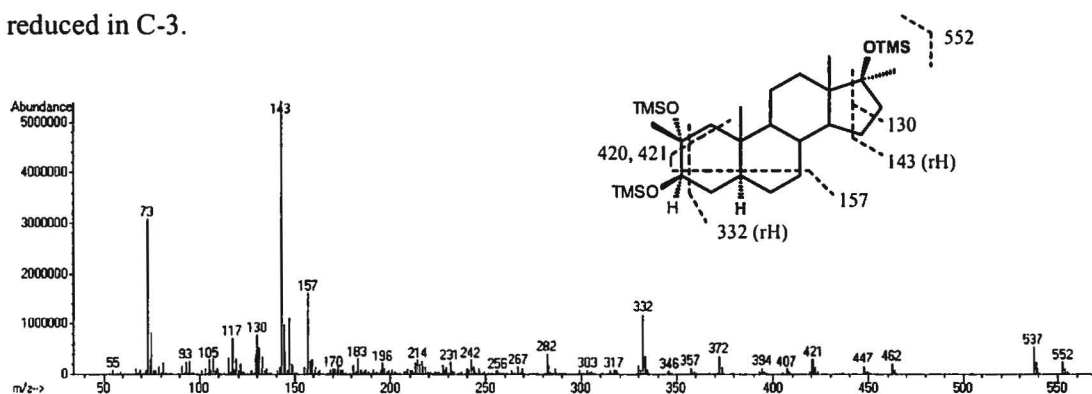


Figure 2.7: Mass spectrum and proposed fragmentation pathways of the pertrimethylsilyl derivative of $2\beta,17\alpha$ -dimethyl- 5α -androstane- $2\alpha,3\beta,17\beta$ -triol (**44**) produced by chemical synthesis from oxymetholone (**41**).

Drostanolone (**6**) being available in larger amounts, large scale incubations with cryopreserved human hepatocytes were carried out and metabolite **6C** could be isolated from the mixture by HPLC in a quantity sufficient to allow the acquisition of its ^1H NMR spectrum. The protons of the three intact methyl groups in C-2, C-10 (CH_3 -19) and C-13 (CH_3 -18) appear as singlets at respectively 1.24, 1.00 and 0.74 ppm, the CH_3 as a sharp multiplet at 3.55 ppm, the CH_2 -17 as a doublet of triplets at 3.63 and the OH produces a weak doublet signal at 3.50 ppm.

The comparison of the key NMR signals of $\text{CH}_3\text{-2}$ and CH-3 of synthesised compound (**44**) with those of isolated compound **6C**, confirms the presence of a tertiary methyl group at C-2 and of a -CHOH at C-3 but suggests different stereochemistry. This is supported by the very similar chemical shifts of $\text{CH}_3\text{-2}$ at 1.27 and 1.24 ppm and CH-3 at 3.56 and 3.55 ppm in compounds (**44**) and **6C** respectively. The shape of the CH-3 signals differs, indicating a probable $3\alpha\text{-OH}$ and $2\beta\text{-OH}$, $2\alpha\text{-CH}_3$ structure for the major isomers of drostanolone and methyldrostanolone metabolites **6C** and **4C** (Figure 2.8). While it is not necessary within the scope of this study to fully confirm the stereochemistry of the metabolites at this point, further work is currently under progress to confirm the formation of 2-hydroxylated metabolites from other steroids as well.

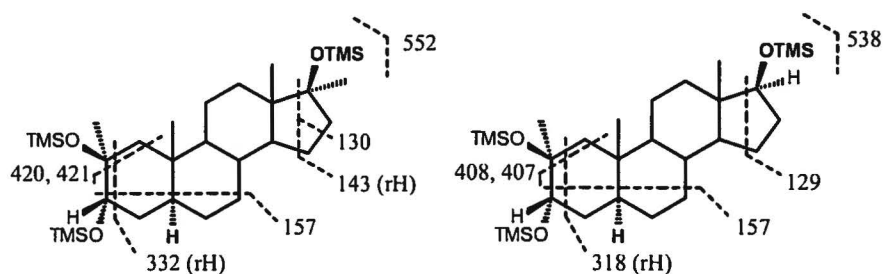


Figure 2.8: Proposed structures and fragmentation pathways for the pertrimethylsilyl derivatives of drostanolone and methyldrostanolone 2-hydroxylated metabolites **6C** and **4C** (major isomers) extracted from incubations with cryopreserved human hepatocytes.

Finally, the same fragmentation plus that of 16-hydroxylated 17-methyl steroids was observed in the mass spectrum of the pertrimethylsilyl derivative of metabolite **4H** therefore suggesting a 2,3,16,17-tetrol structure. The mass spectrum shows the presence of the molecular ion at m/z 640, of ions at m/z 550, 460 and 370 (sequential losses of H₂O/TMS), 231 and 218 (due to C₁₆-

OTMS, C₁₇-OTMS,-Me) and small ions at *m/z* 508, 420 and 157 corresponding to the fragmentation induced by the vicinal 2, 3-OTMS groups in the A-ring as observed with metabolite 4C and synthesized compound (44).

DISCUSSION

Eight metabolites, for which structures were proposed, compounds 4A to 4H, were generated by the incubation of cryopreserved human hepatocytes with methylrostanolone (4) as summarized in Figure 2.9 (corresponding drostanolone (6) metabolites (17 α -H) not shown). Whether the hepatocytes were collected from a single donor or a pool of five, the same metabolites were formed in slightly varying relative abundance.

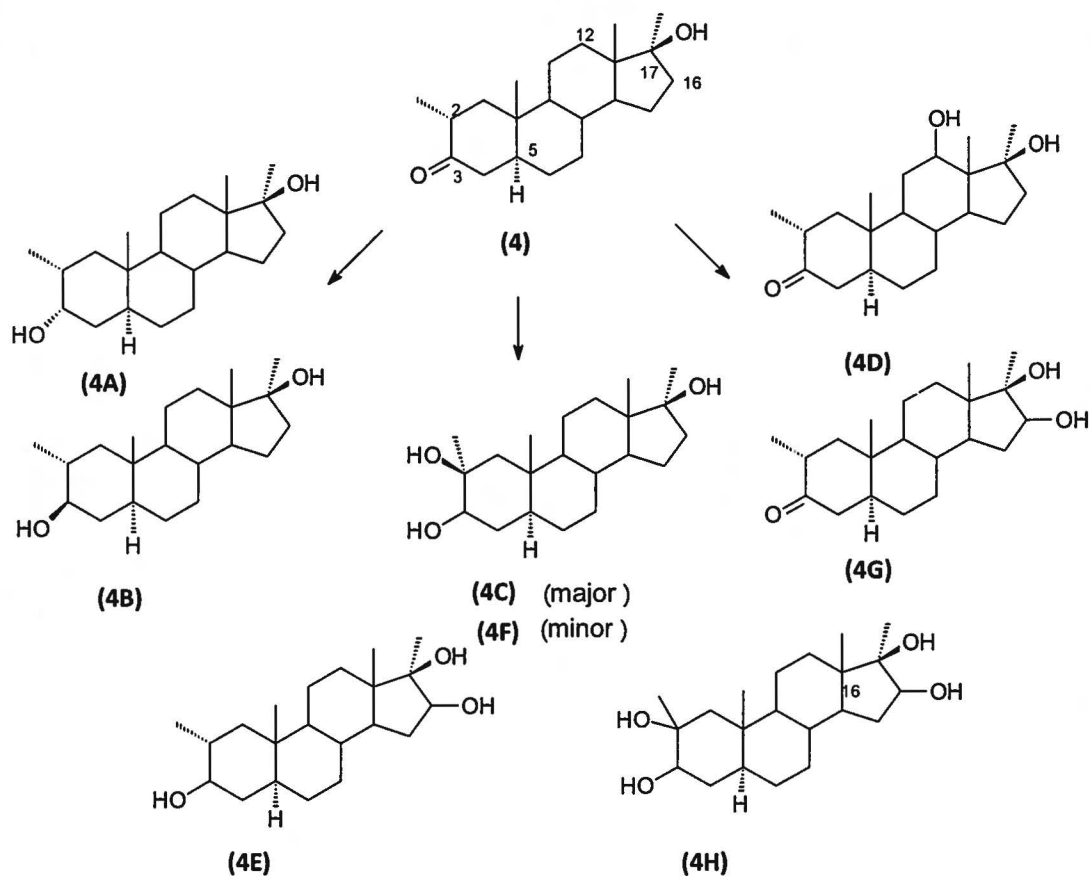


Figure 2.9: Proposed pathways and structures of metabolites **4A** to **4H** for the biotransformation of methyldrostanolone (**4**) in cryopreserved human hepatocytes.

Under the conditions employed, cryopreserved hepatocytes when incubated during four or five hours in the presence of drostanolone or methyldrostanolone, produced phase I metabolites that are expected to be found in human urines; the glucuro- and sulfoconjugation phase II processes were however not observed. Only the 3 α - (major) and the 3 β -reduced metabolites have been reported following the administration of methyldrostanolone (**4**) to human volunteers [27,28]. However, once identified from incubation mixtures, a careful re-examination of the urine

samples circulated amongst laboratories as part of an educational test revealed the presence of the same metabolites hydroxylated in C-2, C-12 and C-16, and mixed diols (proposed structures). The formation of metabolites from the incubation of hepatocytes is a static process, the substrate and metabolites formed remaining in the medium for further reaction. *In vivo* dynamic processes of distribution, metabolism, conjugation and excretion result in urine samples containing different metabolites in varying amounts depending amongst other factors, upon the mode and time of administration.

The corresponding metabolites were extracted from cultures of cryopreserved hepatocytes with drostanolone (**6**). In humans, the conjugated urinary metabolites were reported as being mainly 3 α -hydroxy-2 α -methyl-5 α -androstan-17-one, and minor 3 α ,17 β -dihydroxy (**6A**) and 3 β ,17 β -dihydroxysteroids (**6B**), all produced by the 3 α -, β - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes [26]. These metabolites were detected in the incubation mixture along with other hydroxylated metabolites, not yet identified in human urine. Studies reported the presence of unexpected hydroxylated metabolites, but no structure assignment was attempted [26, 27].

There are clear advantages to studying biotransformation pathways in culture of cryopreserved hepatocytes, one of which being the simplified structural analysis of the metabolites. The urine matrix is much more complex and substances are often co-extracted with the metabolite, interfering with the GC/MS analysis. For example, the pertrimethylsilyl derivative of the

2,3,16,17-tetrol **4H** elutes in a region of the chromatogram where several metabolites of corticosteroids are present. The mass spectrum recorded for the peak corresponding to the urinary metabolite **4H** extracted first by solid phase (SPE), and liquid-liquid extraction following enzymatic hydrolysis of the glucuroconjugates, is compared in Figure 2.10 to the one extracted from culture medium. While the latter can readily be analysed, the characteristic ions are lost in the mixed spectrum of the urinary metabolite.

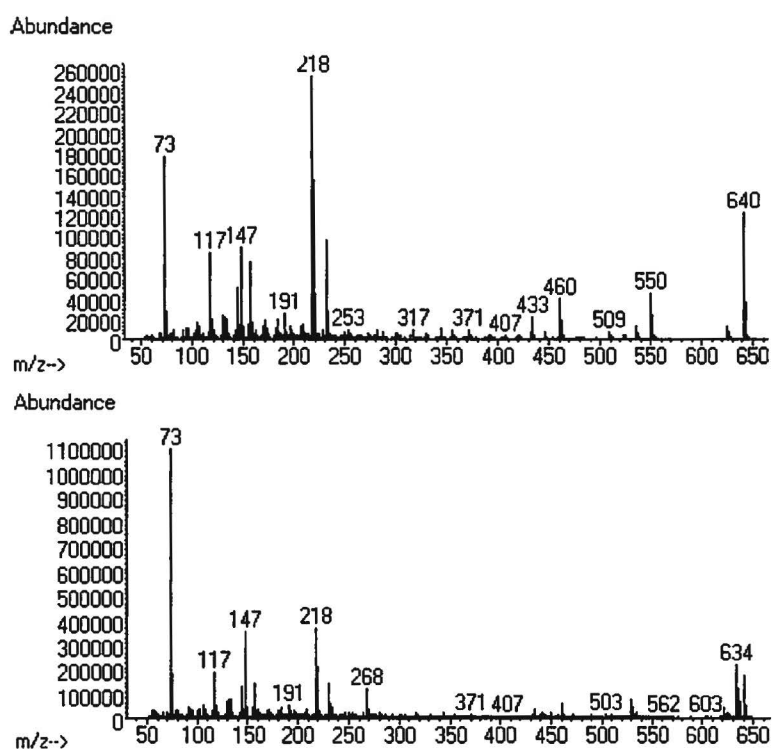


Figure 2.10: Mass spectrum of the pertrimethylsilyl 2,3,16,17-tetrol metabolite **4H** of methyltestosterone (**4**) obtained from the incubation with cryopreserved human hepatocytes (upper panel) and excreted in human urine (lower panel), the latter being interfered by coeluting substances (corticosteroids metabolites).

It is also possible to purify enough material from large scale incubations of cryopreserved hepatocytes to allow the ^1H NMR analysis of drostanolone

metabolite **6C**. This was most useful in proposing a structure. In our view, the relatively high cost of human hepatocytes is counterbalanced by a more efficient structural analysis by-passing ethically difficult administration of impure steroids to human volunteers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been carried out with the support of the World Anti-Doping Agency and of NSERC (Grant to Julie Gauthier). Thanks to Christine Cadot and René Maltais for the chemical synthesis of methylrostanolone, 17 β -hydroxy-2 α -hydroxymethyl-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one and 2 β ,17 α -dimethyl-5 α -androstane-2 α ,3 β ,17 β -triol. The guidance of Mary Gregory for incubations of hepatocytes is gratefully acknowledged.

References

- [1] WADA. 2006 [updated 2006; cited]; Available from: http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Explanatory_Note_2006.pdf.
- [2] Goudreault D, Masse R. Studies on anabolic steroids--4. Identification of new urinary metabolites of methenolone acetate (Primobolan) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1990;37(1):137-54.
- [3] Goudreault D, Masse R. Studies on anabolic steroids--6. Identification of urinary metabolites of stenbolone acetate (17 beta-acetoxy-2-methyl-5 alpha-androst-1-en-3-one) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;38(5):639-55.
- [4] Ayotte C, Goudreault D, Charlebois A. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;687(1):3-25.
- [5] Deventer K, Eenoo PV, Delbeke FT. Screening for anabolic steroids in doping analysis by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(5):429-33.
- [6] Deventer K, Van Eenoo P, Mikulcikova P, Van Thuyne W, Delbeke FT. Quantitative analysis of androst-4-ene-3,6,17-trione and metabolites in human urine after the administration of a food supplement by liquid chromatography/ion trap-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;828(1-2):21-6.
- [7] Catlin DH, Sekera MH, Ahrens BD, Starcevic B, Chang YC, Hatton CK. Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(12):1245-49.
- [8] Sekera MH, Ahrens BD, Chang YC, Starcevic B, Georgakopoulos C, Catlin DH. Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19(6):781-4.
- [9] Catlin DH, Ahrens BD, Kucherova Y. Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2002;16(13):1273-5.
- [10] Ayotte C, Goudreault, D., Cyr, D., Gauthier, J., Ayotte, P., Larochelle, C., Poirier, D., editor. Characterisation of chemical and pharmacological properties of new steroids related to doping of athletes. Manfred Donike Workshop, 24th Cologne Workshop on Dope Analysis; 2006; Cologne, Germany.

- [11] HealthCanada. Health Canada advises consumers not to use unauthorized products containing anabolic steroids. Ottawa: Health Canada; 2006.
- [12] Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004;34(8):513-54.
- [13] Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(6):614-20.
- [14] Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med.* 2002;32(5):285-96.
- [15] Levesque JF, Gaudreault M, Aubin Y, Chauret N. Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of new metabolites of norandrostenedione using in vitro systems. *Steroids.* 2005;70(4):305-17.
- [16] Levesque JF, Gaudreault M, Houle R, Chauret N. Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;780(1):145-53.
- [17] Levesque JF, Templeton E, Trimble L, Berthelette C, Chauret N. Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of metabolites of a doping agent and a direct analogue, tetrahydrogestrinone and gestrinone, using human hepatocytes. *Anal Chem.* 2005;77(10):3164-72.
- [18] Kuuranne T, Leinonen, A., Thevis, M., Schanzer, W., Pystynen, KH., Kostianen, R., editor. Metabolism of "new" anabolic steroids: Development of in vitro methodology in metabolite production and analytical techniques. Manfred Donike Workshop 24th Cologne Workshop on Dope Analysis; 2006; Cologne, Germany.
- [19] Voet DVJ. *Biochemistry.* Paris: De Boeck Université; 1998.
- [20] Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, *et al.* Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev.* 2000;32(1):81-118.
- [21] Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, *et al.* Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact.* 1999;121(1):117-23.
- [22] Skett P, Roberts P, Khan S. Maintenance of steroid metabolism and hormone responsiveness in cryopreserved dog, monkey and human hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 1999;121(1):65-76.

- [23] Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, *et al.* Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem Biol Interact.* 1999;121(1):17-35.
- [24] Jasiurkowski B, Raj J, Wisinger D, Carlson R, Zou L, Nadir A. Cholestatic Jaundice and IgA Nephropathy Induced by OTC Muscle Building Agent Superdrol. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(11):2659-62.
- [25] Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem.* 1996;42(7):1001-20.
- [26] de Boer D, de Jong EG, Maes RA, van Rossum JM. The methyl-5 alpha-dihydrotestosterones mesterolone and drostanolone; gas chromatographic/mass spectrometric characterization of the urinary metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;42(3-4):411-9.
- [27] Van Eenoo P, Delbeke FT. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control-New steroids and new insights. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;101(4-5):161-78.
- [28] Parr MK, Opfermann, G., Schanzer, W., editor. Detection of new 17-alkylated anabolic steroids on WADA 2006 list. Manfred Donike Workshop on Dope Analysis; 2006; Cologne.
- [29] Counsell RE, Klimstra PD. Anabolic Agents. 2-Methylene-5alpha-Androstane Derivatives. *J Med Chem.* 1963 Nov;6:736-8.
- [30] In Vitro T. Products > Cryopreserved Hepatocytes. [cited]; Available from: http://www.invitrotech.com/cryo_hepatocytes.cfm
- [31] Ayotte C. Significance of 19-norandrosterone in athletes' urine samples. *Br J Sports Med.* 2006 Jul;40 Suppl 1:i25-9.
- [32] Schanzer W, Breidbach, A., Geyer, H., Van Kuk, C., Nolteernsting, E., Thevis, M., editor. Metabolism of Nortestosterone, Norandrostenedione and Norandrostenediol; Identification of 3 alpha-hydroxyestr-4-en-17-one glucuronide and 3alpha, 16 alpha-dihydroxy-5alpha-estran-17-one glucuronide and sulphate. Manfred Donike Workshop; 18th Cologne Workshop on Dope Analysis; 2000; Cologne, Germany.
- [33] Masse R, Laliberte C, Tremblay L, Dugal R. Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone urinary metabolites in man. *Biomed Mass Spectrom.* 1985;12(3):115-21.
- [34] Engel LL, Alexander J, Wheeler M. Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone. *J Biol Chem.* 1958;231(1):159-64.

- [35] Rodchenkov G, Sobolevsky T, Sizoi V, editors. *New Designer Anabolic Steroids from Internet. Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of the Manfred Donike Workshop on Dope Analysis*; 2006; Cologne, Germany. Sportverlag MDI.
- [36] Diekman J, Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. *The Journal of organic chemistry*. 1967;32(4):1005-12.
- [37] Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B, Penning TM. Human cytosolic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10784-95.
- [38] Penning TM, Jin Y, Steckelbroeck S, Lanisnik Rizner T, Lewis M. Structure-function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;215(1-2):63-72.
- [39] Schanzer W, Donike M. Metabolism of Anabolic-Steroids in Man - Synthesis and Use of Reference Substances for Identification of Anabolic-Steroid Metabolites. *Anal Chim Acta*. 1993 Apr 1;275(1-2):23-48.
- [40] Schanzer W, Geyer H, Donike M. Metabolism of metandienone in man: identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas chromatographic-mass spectrometric identification of bis-hydroxylated metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;38(4):441-64.
- [41] Oda, T.; Sato, R.; Sato, Y. The hydrogenation of α -hydroxymethylene-ketone derivatives to α -hydroxymethyl-ketone derivatives with a cell-free system of *Streptomyces cinereocrocatus*. *Chem. Pharm. Bull*. 1989; 37: 502-5.

1.4 Complément, discussion et conclusion

La méthyltestostérone (**4**) est un stéroïde illicite (distribué sous le nom de Superdrol ou Méthastérone). L'analogue non méthylé en position C-17, la drostanolone (**6**), est connue depuis un certain temps, mais une étude exhaustive de son métabolisme et la caractérisation de ses métabolites manquaient toujours. Ce stéroïde anabolisant androgène est interdit depuis des décennies aux sportifs et est associé à une élimination rapide de l'organisme (Bahrke & Yesalis, 2004; Van Eenoo & Delbeke, 2003). Les culturistes et les haltérophiles l'ont utilisé en combinaison avec d'autres stéroïdes, des stimulants et des diurétiques (Delbeke *et al.*, 1995).

La drostanolone (**6**) (ou dromostanolone, 17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-3-one) a été synthétisée pour la première fois par Ringold et ses collègues dans les années 1950 (Ringold *et al.*, 1959; Ringold & Rosenkranz, 1956). Cette molécule porte un groupement méthyle en C-2 α et est un dérivé de la dihydrotestostérone (DHT) (**2**). Sans la présence de ce groupement alkyle en position 2, l'aromatisation du cycle A pourrait avoir lieu, causant la conversion de cette molécule en estrogène. L'estrogène cause de la gynécomastie chez les utilisateurs, la drostanolone évite donc cette propriété indésirable. La drostanolone (**6**) est habituellement administrée par voie intra-musculaire, mais est également active oralement sous la forme propanoate. Cette dernière, commercialisée sous le nom Masteril[®] (Syntex Pharmaceuticals), a d'ailleurs fait l'objet d'études cliniques dans le passé en tant que traitement hormonal pour inhiber le développement des tumeurs mammaires chez les femmes atteintes d'un cancer du sein avancé (Bennett *et al.*, 1975; Helman & Bennett, 1972; Teller *et al.*, 1982).

Le métabolisme et les effets endocriniens de la drostanolone (**6**) ont été étudiés par le passé chez le lapin (Templeton & Kim, 1977), le hamster (Ballard & Wood, 2005), le rat (Takahashi *et al.*, 2004) et en partie chez l'humain (de

Boer *et al.*, 1992). Tel qu'attendu, des variations métaboliques interspèces sont observées. Chez le lapin, Templeton *et al.* ont observé la formation de métabolites réduits en position C-3, hydroxylés en C-15, C-16 et sur le groupement méthyle en C-2, ainsi que de l'épimère en C-17 (Templeton & Kim, 1977). Chez l'humain, De Boer *et al.* ont proposé la formation de métabolites oxydés et/ou réduits suivants : 3 α -hydroxylé, 3 α -hydroxy-17-cétonique et 3 β -hydroxy-17-cétonique sans toutefois les avoir caractérisés (de Boer *et al.*, 1992).

Synthèse et caractérisation des métabolites de la drostanolone chez l'humain

Dans cette section, nous décrivons la synthèse des métabolites isolés des incubations d'hépatocytes cryopréservés effectuées en présence de la drostanolone (6). Le chromatogramme de l'analyse CG-SM des dérivés pertriméthysilylés est présenté à la figure 2.11. La formation du métabolite hydroxylé en C-2 et réduit en C-3 rapportée pour la méthyl drostanolone (4) est également observée avec la drostanolone (6) et sa synthèse a donc été effectuée. À la section suivante sont présentés les spectres de masse des métabolites principaux M1 à M6 de la drostanolone, les synthèses de ceux-ci ainsi que leur identification dans les urines de référence utilisées.

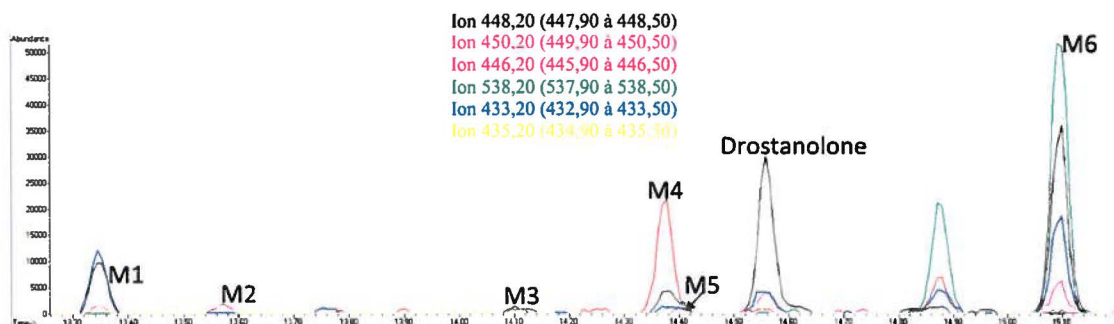


Figure 2.11 : Ions extraits du chromatogramme de l'analyse CG-SM des métabolites pertriméthylsilylés produits de l'incubation de la drostanolone avec les hépatocytes cryopréservés

Matériel et Méthodes

Matériel

Les réactifs suivants proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, Canada): iodotriméthylsilane ((CH₃)₃SiI, ITMS), tétrahydrofurane (C₄H₈O, THF), chlorure de sodium (NaCl), pyridine (C₅H₅N), chlorure de triméthylsilyle ((CH₃)₃SiCl, TMSCl), tamis moléculaire de 4 Å, acide paratoluènesulfonique monohydrate (C₇H₈O₃·H₂O), dihydropyran (C₅H₈O, DHP), borohydrure de sodium (NaBH₄), *tert*-butylchlorodiméthylsilane (C₆H₁₅ClSi, TBDMSCl), hydrure de sodium 60% dans l'huile (NaH), acide 3-chloroperbenzoïque (C₇H₅ClO₃), perruthénate de tétra-*n*-propylammonium (C₁₂H₂₈NO₄Ru), hydrure de lithium et d'aluminium 1M dans le tétrahydrofurane (LiAlH₄), acide paratoluènesulfonique (C₇H₈O₃S), acide 4-nitrobenzoïque (C₇H₅NO₄), triphénylphosphine (C₁₈H₁₅P), diéthylazodicarboxylate (C₆H₁₀N₂O₄), chloroforme deutéré (CDCl₃), méthanol deutéré (CD₃OD), imidazole (C₃H₄N₂), fluorure de tétra-*n*-butylammonium (C₁₆H₃₆FN, TBAF), oxyde de *N*-méthylmorpholine (C₅H₁₁NO₂) et triéthylamine (C₆H₁₅N). De l'eau distillée purifiée a été obtenue d'un système Millipore (Fisher Scientific, Whithy, Canada). L'éthanethiol (C₂H₆S) a été obtenu de Fisher Scientific

(Whithy, Canada). L'acétonitrile (C_2H_3N), l'éther diéthylique ($C_4H_{10}O$), le méthanol (CH_3OH), l'hexane (C_6H_{14}), l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide sulfurique (H_2SO_4) et le dichlorométhane (CH_2Cl_2) proviennent de la compagnie Caledon (Georgetown, Canada). Le phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4), le bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et le carbonate de sodium (Na_2CO_3) ont été obtenus de VWR (Batavia, USA).

Les solvants anhydres suivants proviennent de la compagnie EMD (Gibbstown, USA) : le diméthylformamide (C_3H_7NO), l'acétone (C_3H_6O), le méthanol (CH_3OH), le tétrahydrofurane (C_4H_8O), le dichlorométhane (CH_2Cl_2), le chloroforme ($CHCl_3$) et le benzène (C_6H_6). Les produits suivants proviennent de chez MAT (Québec, Canada) : sulfate de sodium (Na_2SO_4), carbonate de potassium (K_2CO_3) et tartrate de potassium et de sodium ($C_4H_4KNaO_6$). La 2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane-3-one (**51**) provient de chez Upjohn.

Synthèse

Lors de la synthèse, la pureté des produits a été déterminée qualitativement par RMN et par CG-SM ; nous n'avons pas jugé nécessaire de pousser plus avant. En effet, les produits synthétisés ne sont pas utilisés subséquemment pour des incubations, ce qui requièrerait une pureté démontrée, mais plutôt pour caractériser les produits de biotransformations obtenus des modèles *in vitro*. Dans ce contexte, la concordance des spectres de RMN et de masse ainsi que les temps de rétention de divers dérivés chimiques avec les métabolites isolés ne nécessitait pas une pureté supérieure. Par ailleurs, il faut noter que les pourcentages indiqués à la fin de chaque synthèse représentent le rendement obtenu pour chacune des substances et non leur pureté. De plus, les masses exactes ne sont pas annotées aux protocoles de synthèse, mais les ions moléculaires et les patrons de fragmentation des spectres de masse sont présentés pour chaque produit final de synthèse dans la partie résultats et discussion.

Synthèse des 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**54** ; **M2**) et 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**55** ; **M5**)

3-hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (**52** et **53**)

À une solution de 2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane-3-one (**51**) (0,4 g, 1,11 mmol) dans du méthanol anhydre (40 mL) à température ambiante et sous atmosphère d'argon a été ajouté du borohydrure de sodium (0,048 g, 1,27 mmol). La solution a été agitée pendant 30 min à température ambiante. Le mélange a été versé dans l'eau et extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique a été ensuite récupérée et lavée avec de la saumure puis fût séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (10 :90 v :v). Les deux isomères du 3-hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (**52** et **53**) furent ainsi récupérés. Un mélange de ces deux produits a été conservé pour des réactions subséquentes. ¹H RMN produit (**52**) (CDCl₃): 0.78 (s, CH₃-18), 0,79 (s, CH₃-19), 1.13 (t, J₁=7.58 Hz, CH₃-CH₂-CO-), 2.31 (dd, J₁=7.60 Hz, J₂=15.19 Hz, 1H, CH₃-CH₂-CO-), 3.77 (m, J₁=2.4 Hz, CH-3), 4.59 (dd, J₁=7.91 Hz, J₂=9.01 Hz, 1H, CH-17). ¹H RMN produit (**53**) (CDCl₃): 0.78 (s, CH₃-18), 0,83 (s, CH₃-19), 1.13 (t, J₁=7.57 Hz, CH₃-CH₂-CO-), 2.31 (dd, J₁=7.56 Hz, J₂=15.13 Hz, 1H, CH₃-CH₂-CO-), 3.1 (m, CH-3), 4.59 (t, J=8.05 Hz, CH-17)

3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**54** ; **M2**)

À une solution de 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (**52**) (0,02 g, 0,055 mmol) dans le méthanol (1,5 mL) à température ambiante a été ajouté du carbonate de potassium (0,150 g, 1,09 mmol). La solution a été mélangée à température ambiante pendant 16 h. Le mélange réactionnel a ensuite été traité tel que décrit précédemment. Le produit brut résultant a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (30 :70 v :v) pour récupérer le produit 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**54**) (0,0083 g, 49%) ¹H RMN (CDCl₃): 0.73 (s, CH₃-18), 0,80 (s, CH₃-19), 3.63 (t, J₁=8.54 Hz, CH-17), 3.77 (q, J₁=2.5 Hz, CH-3)

3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55 ; M5)

Tel que décrit précédemment pour la synthèse du produit (54), nous avons obtenu à partir d'une solution de 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (53) (0,02 g, 0,055 mmol) et de carbonate de potassium (0,15 g, 1,09 mmol) dans le méthanol (1,5 mL) le produit (55). Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle et d'hexane (10 :90 v :v) augmentant ensuite les proportions à 20 :80 v :v. Ceci a permis d'isoler le produit 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55) (0,0104 g, 68%) ¹H RMN (CDCl₃): 0.73 (s, CH₃-18), 0,83 (s, CH₃-19), 3.1 (td, J₁=10,5 Hz, J₂=4,9 Hz CH-3), 3.62 (t, J₁= 8.49 Hz, CH-17)

Synthèse des 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (59 ; M3) et 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (60 ; M1)

3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (56)

À une solution de 3-hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (52 et 53) (0,338 g, 0,93 mmol) dans du diméthylformamide anhydre (17 mL) à température pièce ont été ajoutés du *tert*-butylchlorodiméthylsilane (TBDMSCl) (0,42 g, 2,79 mmol) et de l'imidazole (0,32 g, 4,7 mmol). La solution a été agitée à 50°C pendant 16 h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans l'eau, extrait avec de l'éther et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un premier éluant d'acétate d'éthyle: hexane (10 :90 v :v) et un second mélange de proportion 20 :80 v :v. Un mélange des isomères du 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (56) a été ainsi obtenu. ¹H RMN (CDCl₃): \approx 0,02 et 0,05 (s, CH₃-Si), 0.77 (s, CH₃-18), 0,82 (s, CH₃-19), 0,89 (s, (CH₃)₃-Si) 1.13 (t, J₁= 7.6 Hz, CH₃-CH₂-CO-), 2.31 (dd, J₁= 7.52 Hz, J₂= 15.08 Hz, CH₃-CH₂-CO-), 3.1 (m, CH-3 α), 3.7 (m, CH-3 β), 4.61 (t, J₁= 8.09 Hz, CH-17)

3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (57)

Tel que décrit précédemment pour la synthèse du produit (54), à une solution de 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (56) (0,419 g, 0,88 mmol) dans le méthanol (28 mL) a été ajouté du carbonate de potassium (2,8 g, 20,28 mmol). Le produit brut résultant a été purifié sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle:hexane (20 :80 v :v) Le produit 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (57) a ainsi pu être récupéré. ^1H RMN (CDCl_3): 0.0018 (s, 2 CH_3 -Si), 0.03 (s, (CH_3) $_3$ -Si) 0.71 (s, CH_3 -18), 0,82 (s, CH_3 -19), 3.1 (m, CH -3 α), 3.61 (m, CH -17), 3.7 (s, CH -3 β).

3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (58)

À une solution de 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (57) (0,195 g, 0,46 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (1 mL) à température ambiante ont été ajoutés de l'oxyde de N-méthylmorpholine (0,82 g, 0,697 mmol), un tamis moléculaire de 4 Å (0,2324 g, 1 mmol) et du perruthénate de tétra-n-propylammonium (0,0163 g, 0,046 mmol). La solution a été mélangée pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant constitué d'acétate d'éthyl: hexane (20 :80 v :v). Ceci a permis de recueillir la 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (58) (0,1446 g, 74%) ^1H RMN (CDCl_3): 0.0012 (s, 2 CH_3 -Si), 0.03 (s, (CH_3) $_3$ -), 0.82 (s, CH_3 -18), 0,83 (s, CH_3 -19), 3.1 (m, CH -3 α), 3.7 (m, CH -3 β).

3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (59; M3)

À une solution de 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (58) (0,145 g, 0,35 mmol) dans le tétrahydrofurane anhydre (10 mL) à température ambiante sous atmosphère d'argon a été ajouté du fluorure de tétra-n-butylammonium 1 M dans le tétrahydrofurane (4,04 mL, 4,04 mmol). La solution a été agitée à température ambiante

pendant 16 h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans l'eau, extrait à l'acétate d'éthyle et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut obtenu a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle:hexane (20 :80 v :v). Ceci a permis l'obtention de la 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (**59**) (0,0373 g, 35%) ¹H RMN (CDCl₃): 0.84 (s, CH₃-18), 0,85 (s, CH₃-19), 3.1 (td, CH-3 α).

3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (**60** ; **M1**)

Dans les mêmes conditions que décrites précédemment pour le produit (**59**), à une solution de 3-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (**58**) (0,0356 g, 0,085 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (7 mL) a été ajouté du fluorure de tétra-*n*-butylammonium 1M dans le tétrahydrofurane (0,75 mL, 0,75 mmol). La solution a été agitée 24 h à reflux. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans l'eau et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut obtenu a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (20 :80 v :v). Ceci a permis l'obtention de la 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (**60**) (0,0113 mg, 44%) ¹H RMN (CDCl₃): 0.81 (s, CH₃-18), 0,85 (s, CH₃-19), 3.78 (m, CH-3 β).

Synthèse de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61** ; **M4**)

2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61** ; **M4**)

Dans les mêmes conditions que pour la synthèse du produit (**58**), à une solution de 17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-3-one (**6**) (0,050 g, 0,164 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (1 mL) ont été ajoutés de l'oxyde de *N*-méthylmorpholine (0,0289 g, 0,256 mmol), du tamis moléculaire de 4 Å (82,25 mg) et du perruthénate de tétra-*n*-propylammonium (0,0029 g, 0,008 mmol). La solution a été mélangée pendant 5 h à température ambiante. Le mélange réactionnel a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle : hexane (20 :80 v :v). La 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61**) a pu

être obtenue (0,046.1 g, 93%). ^1H RMN $:(\text{CDCl}_3)$: 0.88 (s, CH_3 -18), 1.08 (s, CH_3 -19), 1.9 (m, CH -16), 2.3 (t, CH -4), 2.5 (s, CH -2 et CH -16).

Synthèse du 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68)

17 β -tétrahydropyranoyloxy-5 α -androstan-3-one (63)

Le protocole de synthèse a été inspiré de celui de Bernady *et al.* (Bernady *et al.*, 1979). À une solution de 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (62) (0,504 g, 1,74 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (6,83 mL) à température ambiante sous atmosphère d'argon ont été ajoutés du dihydropyrane (0,78 mL, 8,6 mmol) et de l'acide paratoluènesulfonique monohydrate (0,0038 g, 0,019 mmol). La solution a été mélangée à température ambiante pendant 1h30. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans une solution de NaHCO_3 , extrait à l'acétate d'éthyle pour donner la 17 β -tétrahydropyranoyloxy-5 α -androstan-3-one (63) qui a été utilisée tel quel. ^1H RMN (CDCl_3) : 0.78 (s, CH_3 -18), 0,79 (s, CH_3 -19), 3.4 et 3.9 (m, 8H, CH_2 -THP), 3.63 (dd, $J_1= 8.11$ Hz, $J_2= 16.61$ Hz, CH -17), 4.61 (m, CH -THP)

2-hydroxyméthylène-17 β -tétrahydropyranoyloxy-5 α -androstan-3-one (64)

À une solution de 17 β -tétrahydropyranoyloxy-5 α -androstan-3-one (63) (0,649 g 1,735 mmol) dans du benzène anhydre (32,5 mL) à température pièce sous atmosphère d'argon ont été ajoutés de formate d'éthyle (0,21 mL, 0,228 mmol) et de l'hydrure de sodium 60% dans l'huile (0,2334 g, 9,73 mmol). La solution a été agitée pendant 16 h à température pièce. Le mélange réactionnel a été versé dans l'eau et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle : hexane (10 :90 v :v 750 mL, 20 :80 v :v 225 mL, 30 :70 v :v 100 mL), menant à l'obtention de le 2-hydroxyméthylène-17 β -tétrahydropyranoyloxy-5 α -androstan-3-one (64). ^1H RMN (CDCl_3) : 0.80 (s, CH_3 -18), 0,82 (s, CH_3 -19), 3.5 et 3.9 (m, 8H, CH_2 -THP), 3.7 (m, 1H, CH -17 α), 4.6 (m, CH -THP), 8.9 (s, 1H, hydroxyméthylène C-2).

3 β -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (65)

À une solution de 2-hydroxyméthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane-3-one (64) (0,698 g, 1,74 mmol) dans le tétrahydrofurane anhydre (65 mL) à température ambiante sous atmosphère d'argon a été ajouté de l'hydrure de lithium et d'aluminium 1 M dans le tétrahydrofurane (5,21 mL, 5,21 mmol). La solution a été agitée pendant 2 h à reflux. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans une solution de tartrate de sodium et de potassium et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut résultant a été purifié par chromatographie sur gel de silice à l'aide d'un éluant d'acétate d'éthyle : hexane (30 :70 v :v) conduisant à l'obtention du 3 β -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (65) (0,1735 g, 25%). ¹H RMN (MeOD): 0.74 (s, CH₃-18), 0,80 (s, CH₃-19), 3.5 et 3.9 (m, 2H, CH₂-THP), 3.64 (m, CH-17 α), 4.05 (m, CH-3), 4.65 (dd, CH-THP), 4.70 et 5.02 (s, 2H, hydroxyènone C-2).

3 β -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (66a)

À une solution de 3 β -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (65) (0,065 g, 0,1675 mmol) dans un mélange 50 :50 v :v de chloroforme et benzène anhydres (8,6 mL) à 0°C sous atmosphère d'argon a été ajouté goutte-à-goutte une solution d'acide 3-chloroperbenzoïque 77% (0,055 g, 0,322 mmol) dans le chloroforme (1,5 mL). La solution a été agitée pendant 16 h à 0°C. Le mélange réactionnel a été versé dans une solution de NaHCO₃, extrait au dichlorométhane et traité tel que décrit précédemment. Une purification par chromatographie sur gel de silice a été effectuée avec un éluant d'acétate d'éthyle : hexane (40 :60 v :v). Le produit 3 β -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (66a) a ainsi été isolé et seul cet isomère a été utilisé pour poursuivre la synthèse (0,0524 g, 77%) ¹H RMN (MeOD): 0.78 (s, CH₃-18), 0,80 (s, CH₃-19), 2.3 (d, CH₂-2', mineur), 2.55 (d, J₁= 5.31 Hz, CH₂-2', majeur), 2.9 (d, CH₂-2', mineur), 3.11 (d, J₁= 5.12 Hz, CH₂-2', majeur), 3.5 et 3.9 (m, CH₂-THP), 3.64 (m, CH-17 α), 3.8 (dd, J₁= 5.12 Hz, J₂= 10,81 Hz, CH-3 α), 4.64 (m, CH-THP).

2 α ,3 β -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (67)

À une solution de 3 β -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (66a) (0,0346 g, 0,086 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (3,2 mL) à température ambiante sous atmosphère d'argon a été ajouté de l'hydrure de lithium et d'aluminium 1M dans le tétrahydrofurane (0,43 mL, 0,43 mmol). La solution a été agitée pendant 16 h à reflux. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans une solution de tartrate de potassium et de sodium, extrait à l'acétate d'éthyle et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut obtenu a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle : hexane (30 :70 v :v ; 50 :50 v :v). Ceci a permis l'obtention de 2 α ,3 β -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (67) (0,0155 g, 45%). ¹H RMN (MeOD): 0.78 (s, CH₃-18), 0,80 (s, CH₃-19), 3.5 et 3.9 (m, 7H, CH₂-THP et CH-3 α), 3.6 (m, CH-17 α), 4.64 (m, CH-THP).

2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68)

À une solution de 2 α ,3 β -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (67) (0,0184 g, 0,045 mmol) dans le méthanol (3,75 mL) à 0°C sous atmosphère d'argon a été ajouté de l'acide paratoluènesulfonique (0,0012 g, 0,0063 mmol). La solution a été agitée pendant une heure à 0°C et ensuite à température ambiante pendant 3 h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans une solution de NaHCO₃ et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (150 mL 30 :70 v :v ; 150 mL 50 :50 v :v ; 50 mL 100 :0 v :v). Ceci a permis d'isoler le 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68). ¹H RMN (MeOD): 0.74 (s, CH₃-18), 0,90 (s, CH₃-19), 3.5 (m, CH-3 α), 3.6 (m, CH-17 α)

Synthèse du 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73)

2-méthylène-3 α -paranitrobenzoyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (69)

Le protocole pour la réaction de Mitsunobu fût inspiré de celui de Dodge *et al.* (Dodge *et al.*, 1994). À une solution de 3 β -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane

(65) (0,0795 g, 0,205 mmol) dans le tétrahydrofurane anhydre (5,96 mL) à 0°C sous atmosphère d'argon ont été ajoutés de l'acide 4-nitrobenzoïque (0,1585 g, 0,95 mmol), de la triphénylphosphine (0,2581 g, 0,98 mmol) et une solution de diéthylazodicarboxylate goutte à goutte (0,1486 mL dans 0,75 mL de THF, 0,77 mmol). La solution a été agitée pendant 16 h à température ambiante. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans l'eau et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut fût purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant acétate d'éthyle :hexane (10 :90 v :v). Ceci a permis l'obtention du 2-méthylène-3 α -paranitrobenzoyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (69). ¹H RMN (MeOD): 0.8 (s, CH₃-18), 0,9 (s, CH₃-19), 3.4 et 3.9 (m, CH₂-THP), 3.6 (m, CH-17 α), 3.8 (m, CH-3 β), 4.61 (m, CH-THP), 5.15 et 5.61 (s, 2H, CH-2'), 8.36 et 8.37 (d, 4H, PNB).

3 α -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (70)

Tel que décrit pour la synthèse du produit (54), à une solution de 2-méthylène-3 α -paranitrobenzoyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (69) (0,110 g, 0,205 mmol) dans le méthanol (5 mL) a été ajouté du carbonate de potassium (0,5387 g, 3,89 mmol). La solution fût agitée pendant 16h à température ambiante et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (20 :80 v :v). Ceci a permis l'obtention du 3 α -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (70) (0,0467 g, 59%). ¹H RMN (MeOD): 0.72 (s, CH₃-18), 0.78 (s, CH₃-19), 3.4 et 3.9 (m, CH₂-THP et CH-3 β), 3.62 (m, CH-17 α), 4.61 (m, CH-THP), 4.19 et 4.72 (s, 2H, CH-2').

3 α -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (71a)

De la même façon que pour la synthèse du produit (66), a une solution de 3 α -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (70) (0,05 g, 0,129 mmol) dans un mélange 50 :50 v :v de chloroforme et benzène anhydres (6,6 mL) à 0°C sous atmosphère d'argon a été ajoutée goutte à goutte une solution d'acide 3-chloroperbenzoïque 77% (0,0343 g, 0,199 mmol) dans le chloroforme (1 mL). Une fois la réaction terminée et le mélange traité tel que décrit précédemment, le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (30 :70 v :v). Ceci a permis l'obtention du 3 α -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (71a) et seul cet isomère a été utilisé pour poursuivre la synthèse (0,0308 g, 59%) ¹H RMN (MeOD): 0.78 (s, CH₃-18), 0.89 (s, CH₃-19), 2.68 (dd, CH₂-2'), 3.4 et 3.9 (m, CH₂-THP et CH-3 β), 3.62 (m, CH-17 α), 4.61 (m, CH-THP).

2 α ,3 α -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (72)

Selon le même protocole utilisé pour synthétiser la molécule (67), à une solution de 3 α -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (71a) (0,0308 g, 0,076 mmol) dans le tétrahydrofurane anhydre (3,3 mL) à température pièce sous atmosphère d'argon a été ajouté de l'hydrure de lithium et d'aluminium 1M dans le THF (0,385 mL, 0,385 mmol). Une fois la réaction terminée, le produit a été traité tel que décrit précédemment. Le produit brut a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle :hexane (50v : 50v). Ceci a permis l'obtention du 2 α ,3 α -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (72) (0,0184 g, 59%) ¹H RMN (MeOD): 0.78 (s, CH₃-18), 0.86 (s, CH₃-19), 3.4 et 3.9 (m, CH₂-THP et CH-3 β), 3.62 (m, CH-17 α), 4.61 (m, CH-THP).

2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73)

Tel que décrit dans le protocole de synthèse de la molécule (68), à une solution de 2 α ,3 α -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstane (72) (0,0184 g, 0,045 mmol)

dans le méthanol (3,76 mL) à 0°C sous atmosphère d'argon a été ajouté de l'acide paratoluènesulfonique (0,0011 g, 0,0058 mmol). Une fois la réaction terminée et le mélange traité tel que décrit précédemment, le produit brut obtenu a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle : hexane (70v :30v). Ceci a permis l'obtention du 2β-méthyl-2α,3α,17β-trihydroxy-5α-androstane (**73**) (0,013g, 89%) ¹H RMN (MeOD): 0.74 (s, CH₃-18), 0.89 (s, CH₃-19), 1.26 (s, CH₃-2'), 3.53 (t, J≈ 1 Hz, CH-3β), 3,58 (t, J=8,6 Hz, CH-17α)

Les protocoles d'incubations cellulaires, d'extractions et d'analyse par CG-SM et RMN sont ceux présentés dans l'article de Gauthier *et al.*, 2009 (Gauthier *et al.*, 2009).

Résultats et Discussion

Le spectre de masse du dérivé pertriméthylsilylé de la drostanolone (**6**), présenté à la figure 2.12, est caractérisé par la présence d'un ion moléculaire à m/z 448, ainsi que des ions à m/z 405, 157 et 141 qui selon de Boer *et al.*, proviennent de la fragmentation du cycle A (de Boer *et al.*, 1992). L'ion à m/z 129 provient de la fragmentation du cycle D (Diekman & Djerassi, 1967).

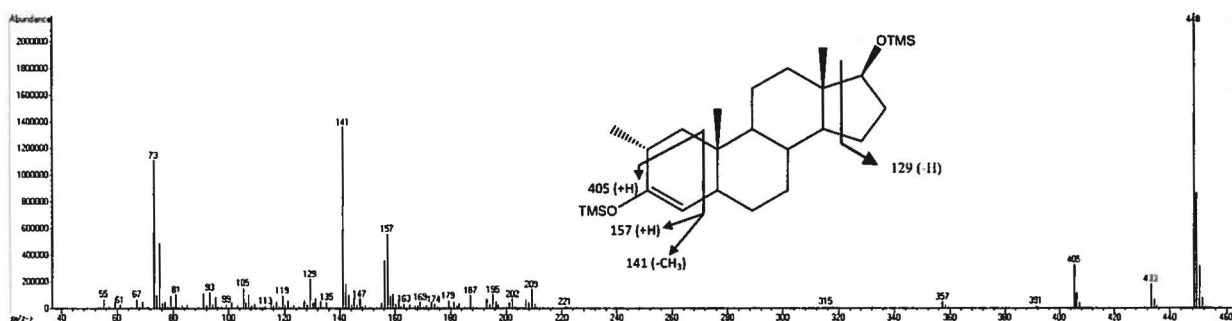


Figure 2.12: Spectre de masse et fragmentation proposée du dérivé pertriméthylsilylé de la drostanolone (**6**) (de Boer *et al.*, 1992)

Caractérisation des métabolites M2 et M5 de la drostanolone produits par des incubations cellulaires et correspondant respectivement à la 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**54**) et à la 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**55**)

Les spectres de masses et temps de rétention des dérivés pertriméthylsilylés des composés (**54**) et (**55**) correspondent à ceux des métabolites M2 et M5 et sont présentés à la figure 2.13. Ces spectres montrent un ion moléculaire à m/z 450 avec des ions correspondant à des pertes séquentielles de groupements HOTMS et -CH₃ d'où l'on obtient les ions à m/z 435, 360, 345, 270, 255. L'ion à m/z 129 provient de la fragmentation du cycle D entre les carbones C-14 et C-15 et C-13 et C-17 (Diekman & Djerassi, 1967 ; Middleditch *et al.*, 1973 ; Gauthier *et al.*, 2009). L'absence des ions à m/z 141 et 157 montre la réduction de la cétone en position C-3. Le spectre du second métabolite réduit M5, présente un patron de fragmentation semblable à celui de l'isomère 3 α -OH, mais les intensités des ions sont légèrement différentes. En effet,

contrairement à l'isomère 3α , l'ion moléculaire à m/z 450 est moins intense que celui à m/z 435 en conformité avec les observations de Houghton *et al.* sur le 3,17-dihydroxyandrostane (Houghton *et al.*, 1989).

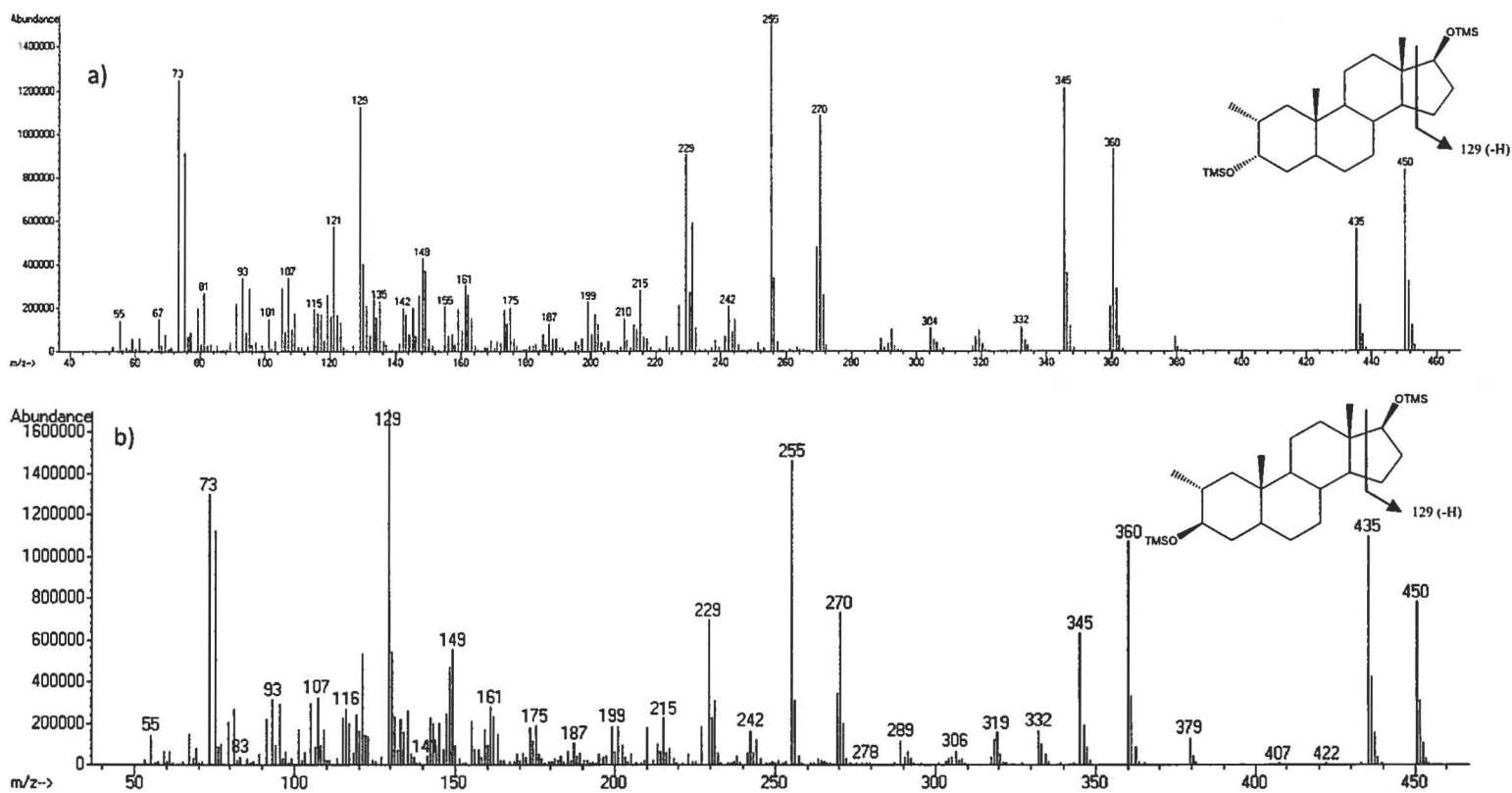


Figure 2.13 : Spectres de masse des dérivés pertriméthylsilylés de : a) 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (54) correspondant au métabolite M2 ; et de b) 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55) correspondant au métabolite M5

La synthèse des deux isomères possibles soit le $3\alpha,17\beta$ -dihydroxy- 2α -méthyl- 5α -androstane (**54**) et le $3\beta,17\beta$ -dihydroxy- 2α -méthyl- 5α -androstane (**55**) a donc été menée et est présentée à la figure 2.14.

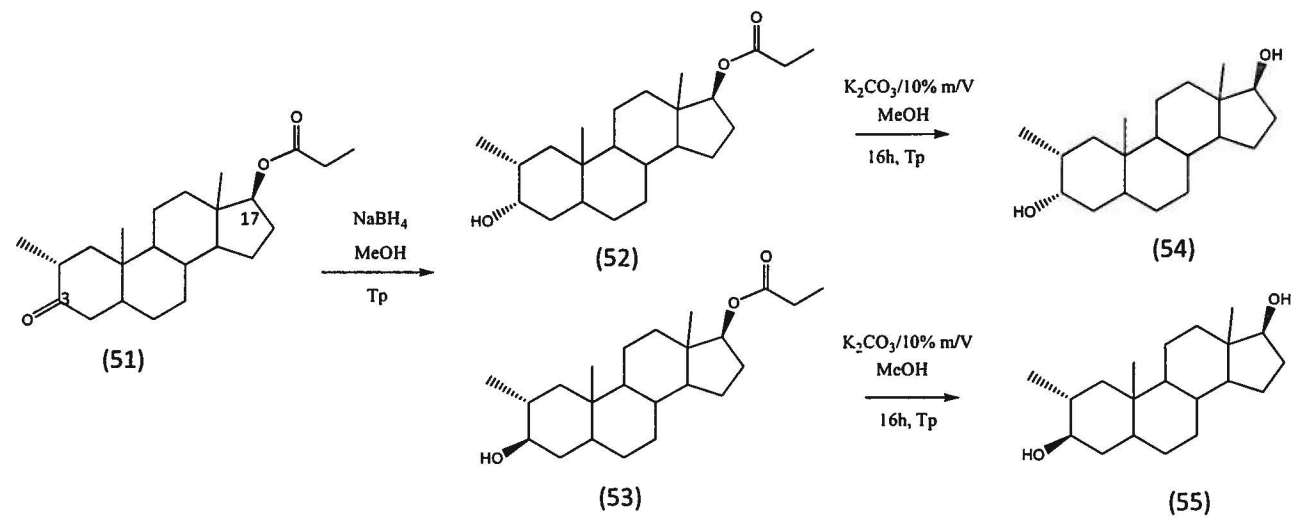


Figure 2.14 : Schéma de synthèse des isomères 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (54 ; M2) et 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55 ; M5)

Tel que montré à la figure 2.14, la réduction de la cétone en C-3 en présence de borohydrure de sodium a fourni un mélange des deux isomères réduits qui ont été séparés par une chromatographie liquide sur gel de silice, suivie de l'hydrolyse du groupement propanoate. Les spectres de ^1H RMN des deux composés montrent un triplet à 3.6 ppm pour le proton en C-17. Pour ce qui est des protons en position C-3, il est possible d'en déduire la stéréochimie selon leurs déplacements chimiques ainsi que leurs multiplicités tel que montré à la figure 2.15. En effet, le signal du proton axial en C-3 α montrera deux constantes de couplage différentes avec les protons en positions C-2 et C-4 : une grande avec les protons axiaux à 180° et une de plus faible valeur avec l'hydrogène équatorial du carbone C-4 (figure 2.15 (55)). Dans le cas de l'isomère 3 α -OH, les constantes de couplage du proton en C-3 β avec les protons voisins en C-2 et C-4 devraient être très similaires et de valeurs inférieures à celles rencontrées si l'angle était de 180° , car un angle dièdre égal de 60° sépare le proton en C-3 des trois protons voisins. Il est par contre possible d'observer tel qu'attendu pour l'isomère 3 β -OH (55) un triplet dédoublé pour le proton en C-3 α présentant clairement deux constantes de couplage de valeurs différentes. Le second produit isolé (54) correspond à l'isomère 3 α -OH pour lequel un signal large pour le proton en C-3 β est observé.

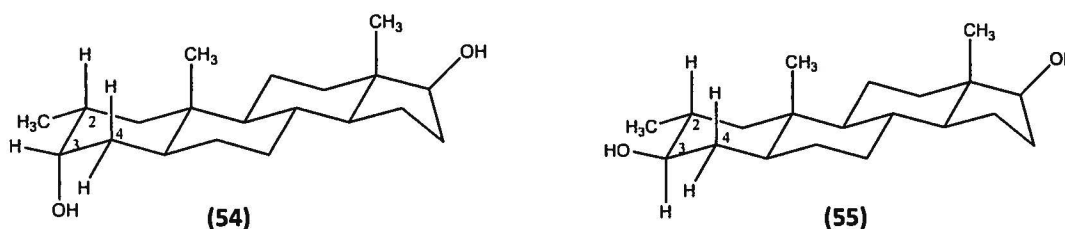


Figure 2.15 : Relation entre les protons C-2, C-3 et C-4 des isomères 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (54 ; M2) et 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (55 ; M5) (m/z 306 u.m.a)

Lors de l'analyse CG-SM des dérivés pertriméthylsilylés, on peut noter l'élution plus rapide de l'isomère 3 α -OH (54 ; M2) par rapport à l'isomère 3 β -OH (55 ; M5). Le groupement

fonctionnel 3 β -OH est d'orientation équatoriale, ce qui amène une conformation planaire de la molécule produisant une augmentation de sa surface de contact avec la phase stationnaire de la colonne, ce qui résulte en un temps de rétention plus long (Clayton, 1962; Zielinski *et al.*, 1976). Des deux métabolites réduits M2 et M5 seul l'isomère 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane (**54** ; **M2**) est présent dans la fraction glucuroconjuguée de l'urine de référence ce qui est en accord avec la littérature (de Boer *et al.*, 1992).

Caractérisation des métabolites M1 et M3 de la drostanolone produits par des incubations cellulaires et correspondant respectivement à la 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (60) et la 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (59)

Les spectres de masse des dérivés pertriméthylsilylés des deux métabolites possèdent un ion moléculaire à m/z 448 et sont présentés à la figure 2.16. Encore ici, les fragments principaux sont ceux liés aux pertes séquentielles de HOTMS alors que la présence un ion à m/z 169 suggère la présence d'une cétone en C-17 (Schänzer & Donike, 1993). Cette hypothèse fût confirmée par la synthèse de la 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (59) et de la 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (60) effectuée selon le schéma présenté à la figure 2.17.

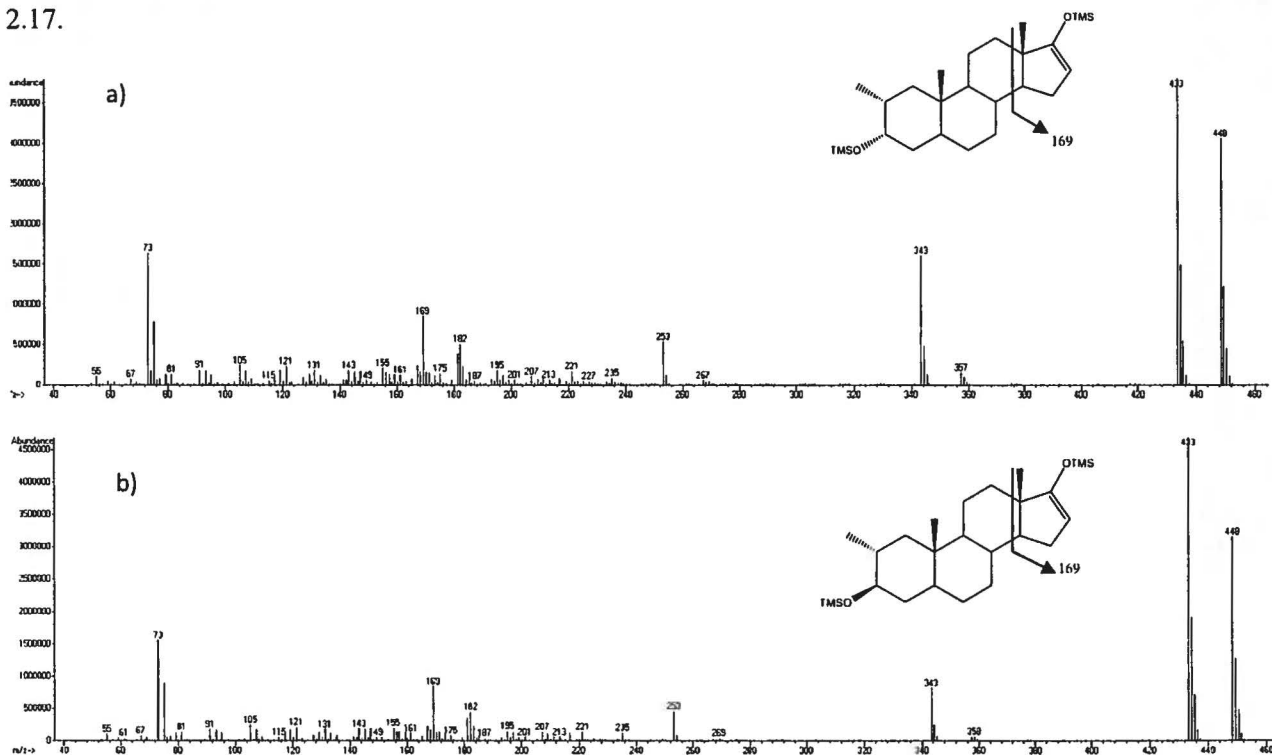


Figure 2.16 : Spectres de masse des dérivés pertriméthylsilylés de la 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (60 ; M1) (a) et de la 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (59 ; M3)(b)

La synthèse de l'isomère 3 α -OH a été rapportée par Schänzer et Donike en 1993 par une voie impliquant l'oxydation de l'alcool de la drostanolone pour ensuite réduire de façon sélective la cétone en C-3 à l'aide de K-Selektre (Schänzer & Donike, 1993). Ceci avait permis d'obtenir 99% de l'isomère 3 α -OH. Nous avons utilisé un protocole différent. Ainsi, en partant du mélange d'isomères des 3-hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane (52 et 53), l'alcool en position C-3 a été protégé par l'ajout d'un groupement *tert*-butyldiméthylsilylé, puis, suivant l'hydrolyse du groupement propanoate, l'alcool en C-17 a été oxydé ce qui est confirmé par la disparition du signal correspondant au proton en C-17 des spectres de RMN obtenus. Finalement, les isomères 3 α -OH et 3 β -OH ont été obtenus par le clivage de l'éther en C-3.

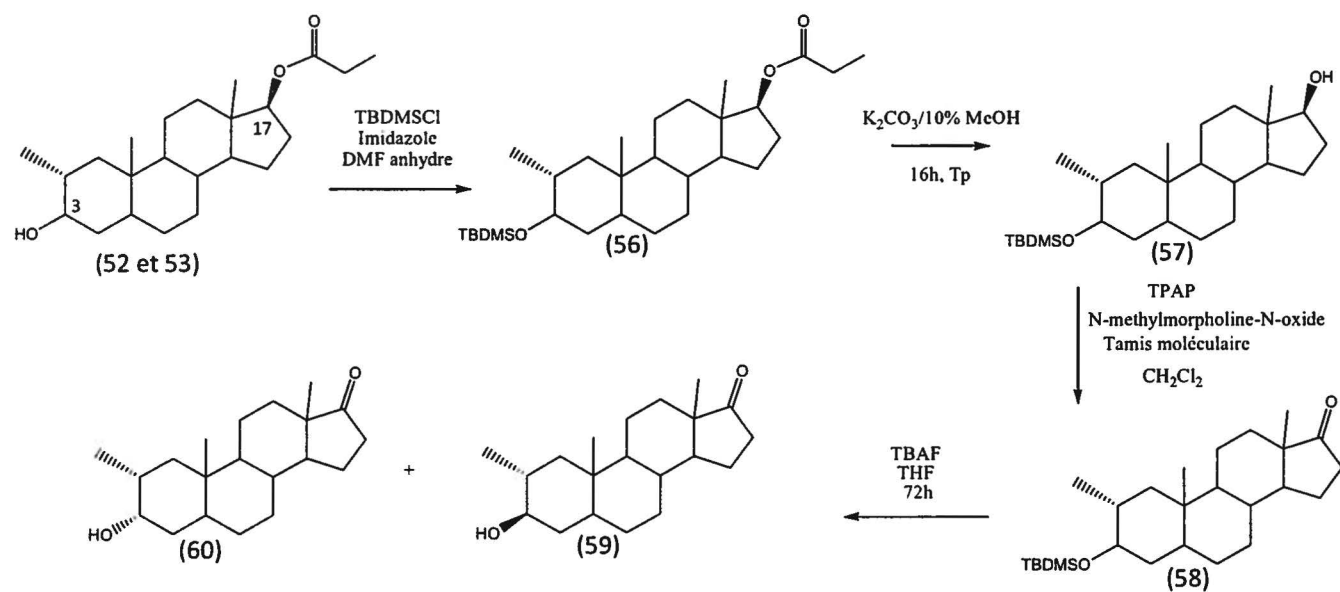


Figure 2.17 : Schéma de synthèse des 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (59 ; M3) et 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one (60 ; M1)

Les isomères (**59** ; **M3**) et (**60** ; **M1**, majeur) sont également présents dans les urines de référence tel qu'attendu, alors que l'isomère 3 β (**59** ; **M3**) est présent en très faible concentration tant dans les incubations cellulaires que dans les urines de référence de la drostanolone. Ces résultats ne sont pas inhabituels, les isomères réduits en 3 α étant majoritaires pour la majorité des SAA. En effet, Schänzer et de Boer ont identifié la 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane-17-one (M1) comme étant le métabolite majeur de la drostanolone chez l'humain (de Boer *et al.*, 1992; Schänzer & Donike, 1993). Ce métabolite pourrait également être produit lors de la prise de sténbolone (**17**) tel que postulé par Goudreault *et al.* qui ont proposé la formation du métabolite (**60**) à partir de ce SAA, sans toutefois avoir déterminé la stéréochimie du méthyle en C-2 (Goudreault & Massé, 1991).

Caractérisation du métabolite M4 de la drostanolone produit par des incubations cellulaires et correspondant à la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61**).

La synthèse de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61**) via l'oxydation de la drostanolone tel que montré à la figure 2.18 a permis de confirmer l'identité du métabolite M4 provenant des incubations *in vitro*. Tel qu'attendu, le spectre de RMN montre la disparition des signaux attribués au proton -CHOH. Le spectre de masse du dérivé pertriméthylsilyle de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61**) synthétisée est montré à la figure 2.19. On note la présence d'un ion moléculaire à m/z 446 alors que la perte séquentielle de groupements HOTMS et de groupements méthyles produit les ions à m/z 431, 356 et 341. Selon Goudreault *et al.*, les ions à m/z 290 et 275, ainsi que 141 et 157 seraient formés par le clivage des liens entre C-1 et C-10 et C-4 et C-5 de l'éther énolique triméthylsilyle en C-3 (Goudreault & Massé, 1991; Massé & Goudreault, 1992).

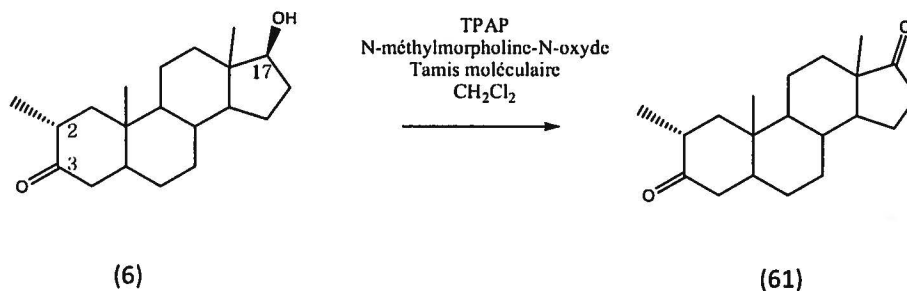


Figure 2.18: Schéma de préparation de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61**) (M4) à partir de la drostanolone (**6**)

Nous n'avons par contre pas retrouvé ce métabolite (**61**) dans les urines de référence analysées. Il est intéressant de noter que la position du groupement méthyle sur le cycle A semble déterminer la présence de ce métabolite *in vivo*. En effet, la mestérolone (**5**) possédant un groupement méthyle en position C-1, produirait plutôt un métabolite dicétonique qui fût identifié dans les urines d'excrétion (Goudreault & Ayotte, 1995).

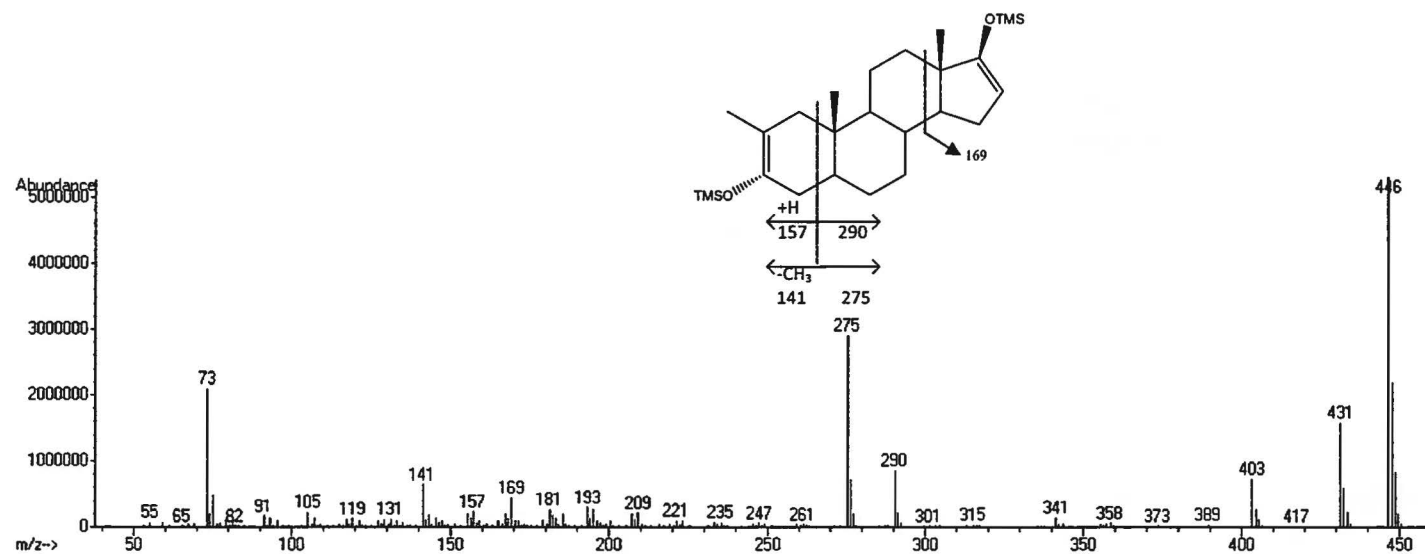


Figure 2.19 : Spectre de masse et fragmentation proposée du dérivé pertriméthylsilyle de la 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione (**61** ; **M4**) (Goudreault & Massé, 1991)

Caractérisation du métabolite M6 de la drostanolone produit des incubations cellulaires et correspondant au 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (74) :

Synthèse des 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68), 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73) et 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (74 ; M6)

Tel que décrit précédemment à partir des résultats de synthèses effectuées, le métabolite majeur isolé des incubations d'hépatocytes humains cryopréservés effectuées avec la méthylldrostanolone et la drostanolone possède une fonction hydroxyle en position C-2 (Gauthier *et al.*, 2009). Il restait à déterminer la stéréochimie des groupements méthyles en C-2 et hydroxyle en C-3. À cette fin, la synthèse des 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68) et 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73) a été effectuée et est résumée aux figures 2.20 et 2.21 respectivement.

Tel que montré à la figure 2.20, le 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane a été obtenu à partir de la 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (62) dont la fonction alcool en position C-17 avait tout d'abord été protégée. Ensuite, un groupement hydroxyméthylène a été ajouté en C-2 suivi de sa réduction ainsi que de celle de la cétone en C-3 menant à l'obtention de l'intermédiaire (65) possédant un groupement hydroxyle en C-3 β . L'isomère majoritaire (66a) résultant de l'époxydation de l'alcène exocyclique en C-2 a ensuite été obtenu. Dû à l'encombrement stérique, la formation du 2 α -spirooxirane (66a) est favorisée à 90%. L'ouverture de cet époxyde suivi du clivage du groupement protecteur de l'hydroxyle en C-17 ont permis d'obtenir le 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68).

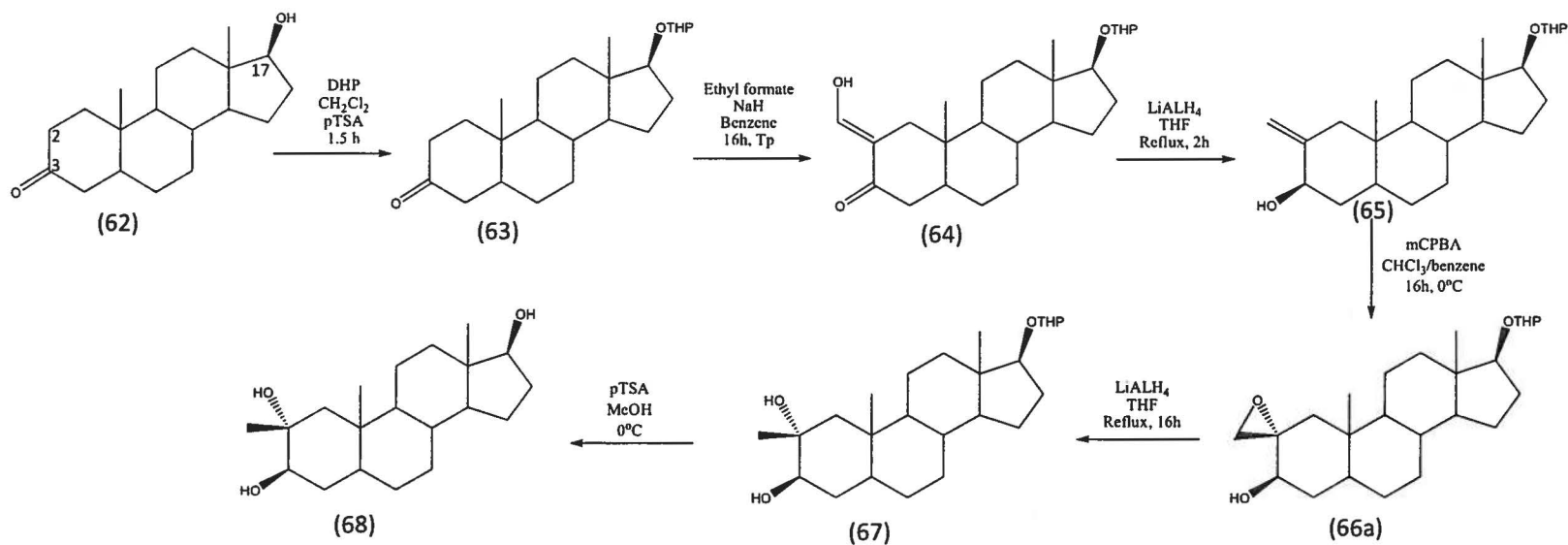


Figure 2.20: Schéma de synthèse du 2β-méthyl-2α,3β,17β-trihydroxy-5α-androstane (**68**) à partir de la 17β-hydroxy-5α-androstan-3-one (**62**).

Le spectre $^1\text{HRMN}$ du produit (68) permet de déterminer la stéréochimie de l'hydrogène en position C-3 en se basant sur les constantes de couplage obtenues. En effet, les angles dièdres entre le $\text{CH-3}\alpha$ et chacun des protons en C-4 sont de 60° et 180° . Ceci donne lieu à deux constantes de couplage différentes soit de 5,2 Hz et 11,1 Hz. Ceci permet donc de confirmer la stéréochimie proposée pour cet hydrogène. L'isomère possédant un proton en 3β a ensuite été synthétisé.

L'isomère possédant la fonction $3\alpha\text{-OH}$ a été obtenu suite à une inversion de Mitsunobu effectuée sur le composé (65) tel que présenté à la figure 2.21. Une fois l'inversion de la configuration complétée, tout comme pour la synthèse du produit (68), une époxydation de la double liaison exocyclique a été effectuée et l'isomère majoritaire (71a) a été retenu pour poursuivre la synthèse. L'ouverture de cet époxyde a été effectuée. Le clivage du groupement protecteur de l'alcool en C-17 a permis l'obtention du $2\beta\text{-méthyl-}2\alpha,3\alpha,17\beta\text{-trihydroxy-}5\alpha\text{-androstane}$ (73).

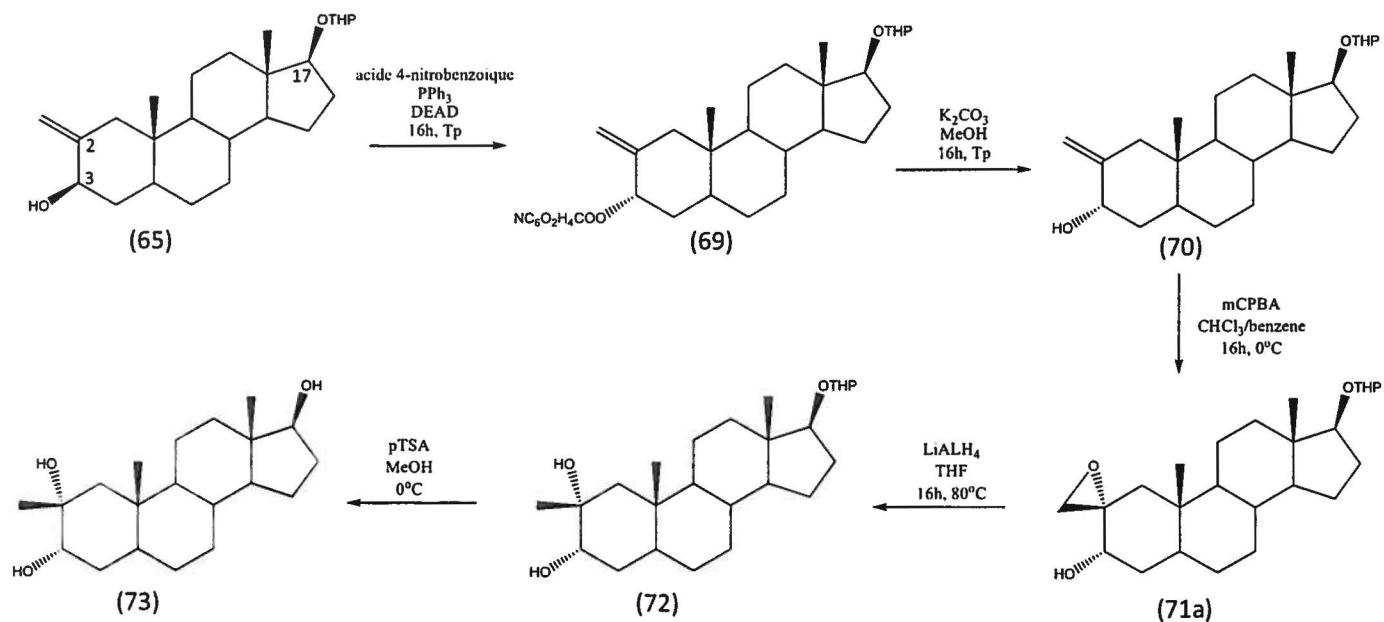


Figure 2.21: Schéma de synthèse du 2β-méthyl-2α,3α,17β-trihydroxy-5α-androstane (**73**) à partir du 3β-hydroxy-2-méthylène-17β-tétrahydropyranyloxy-5α-androstane (**65**)

Encore une fois, les patrons de couplage de l'hydrogène en position C-3 permettent d'en déterminer la stéréochimie. En effet, lorsqu'en position C-3 β , le proton présente des angles dièdres identiques de 60° avec ceux en C-4. Le signal à 3,53 ppm étant un triplet possédant une très faible constante de couplage confirme donc la stéréochimie proposée.

Bien que les spectres de masse des dérivés pertriméthylsilyles des composés (68) et (73) obtenus et montrés aux figures 2.22 et 2.23 soient identiques à ceux du métabolite M6 de la drostanolone isolé des incubations, les temps de rétention diffèrent ainsi que les spectres de RMN, ce qui suggère une stéréochimie différente.

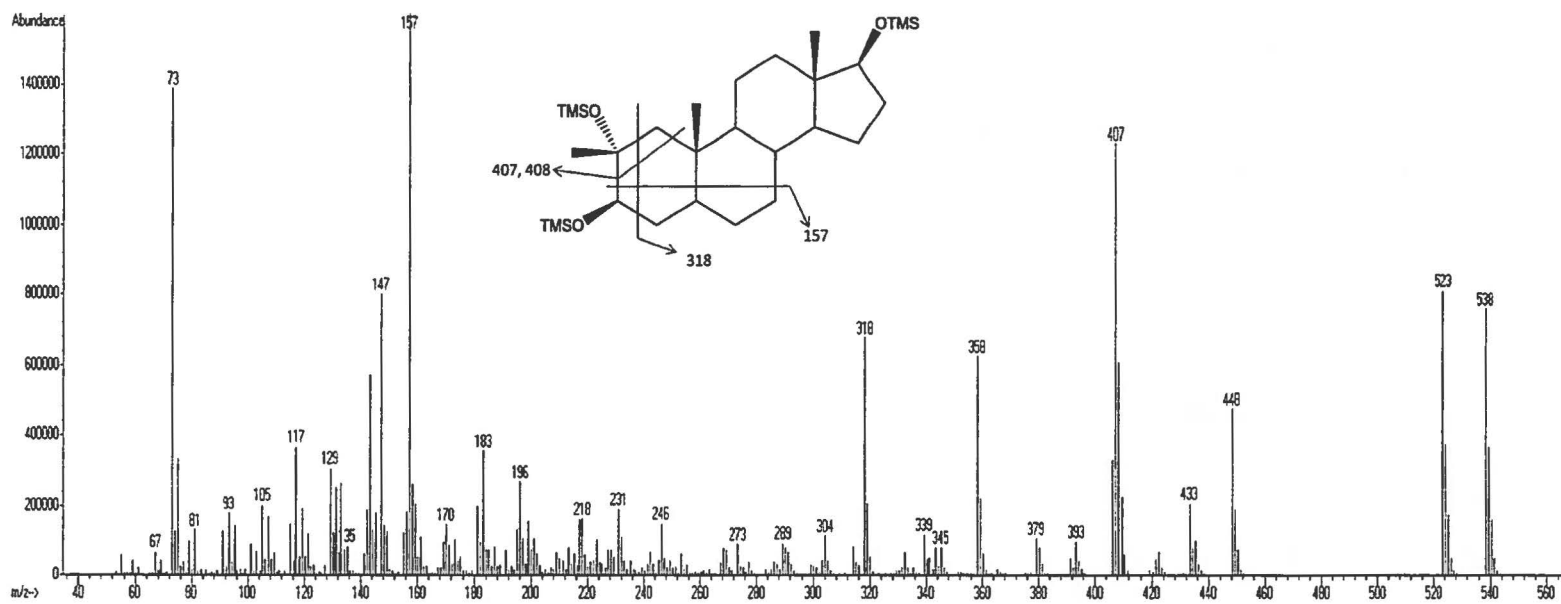


Figure 2.22 : Spectre de masse du dérivé pertriméthysilyle et fragmentation proposée pour le 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (68).

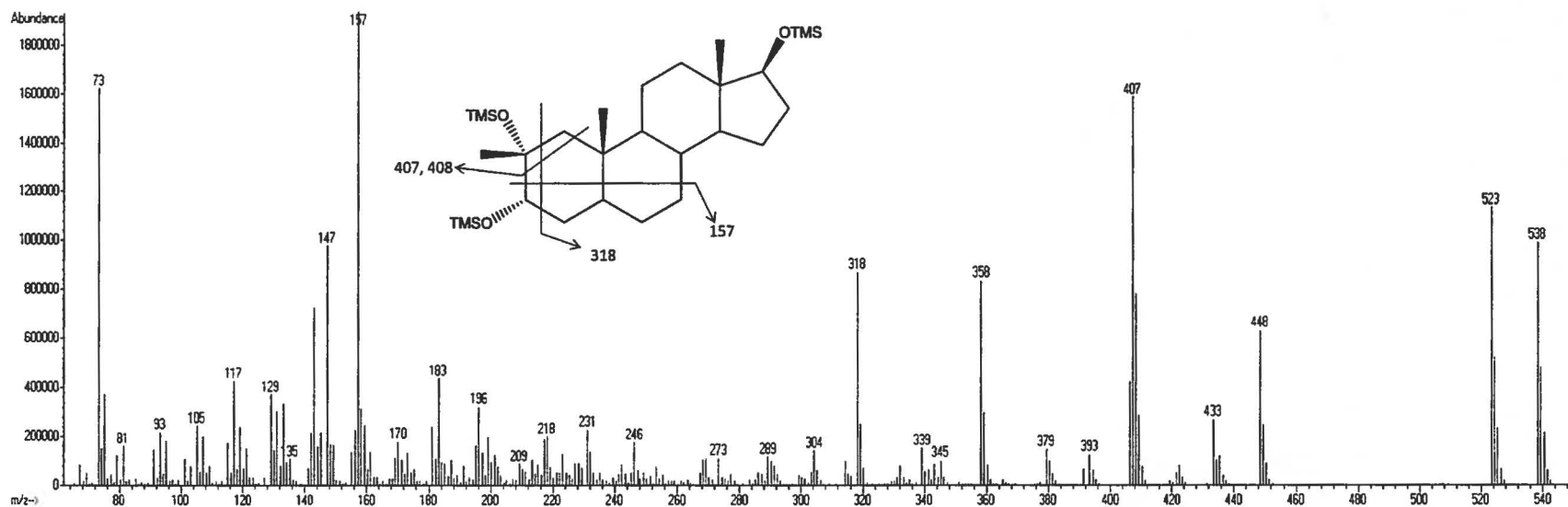


Figure 2.23 : Spectre de masse du dérivé pertriméthysilyle et fragmentation proposée pour le 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (73).

La synthèse du troisième isomère, soit le 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**74**) a été effectuée par nos collaborateurs de la plate-forme de synthèse organique du laboratoire du Professeur Donald Poirier de l'Université Laval à Québec. Le troisième isomère a été obtenu à partir de l'isomère minoritaire du produit (**71b**) correspondant au 2 β -spirooxirane. Malgré un faible rendement de 10% pour ce produit, l'ouverture de l'époxyde et la déprotection des groupements hydroxyles ont pu être complétées pour obtenir le 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**74**).

Nous avons ainsi identifié le métabolite M6 de la drostanolone comme étant le 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**74**) par comparaison des spectre de masse et temps de rétention. Le spectre de RMN de ce troisième isomère concordait également avec le spectre du métabolite recherché. Les spectres de RMN (^1H et NOESY) sont montrés à la figure 2.24 et 2.25.

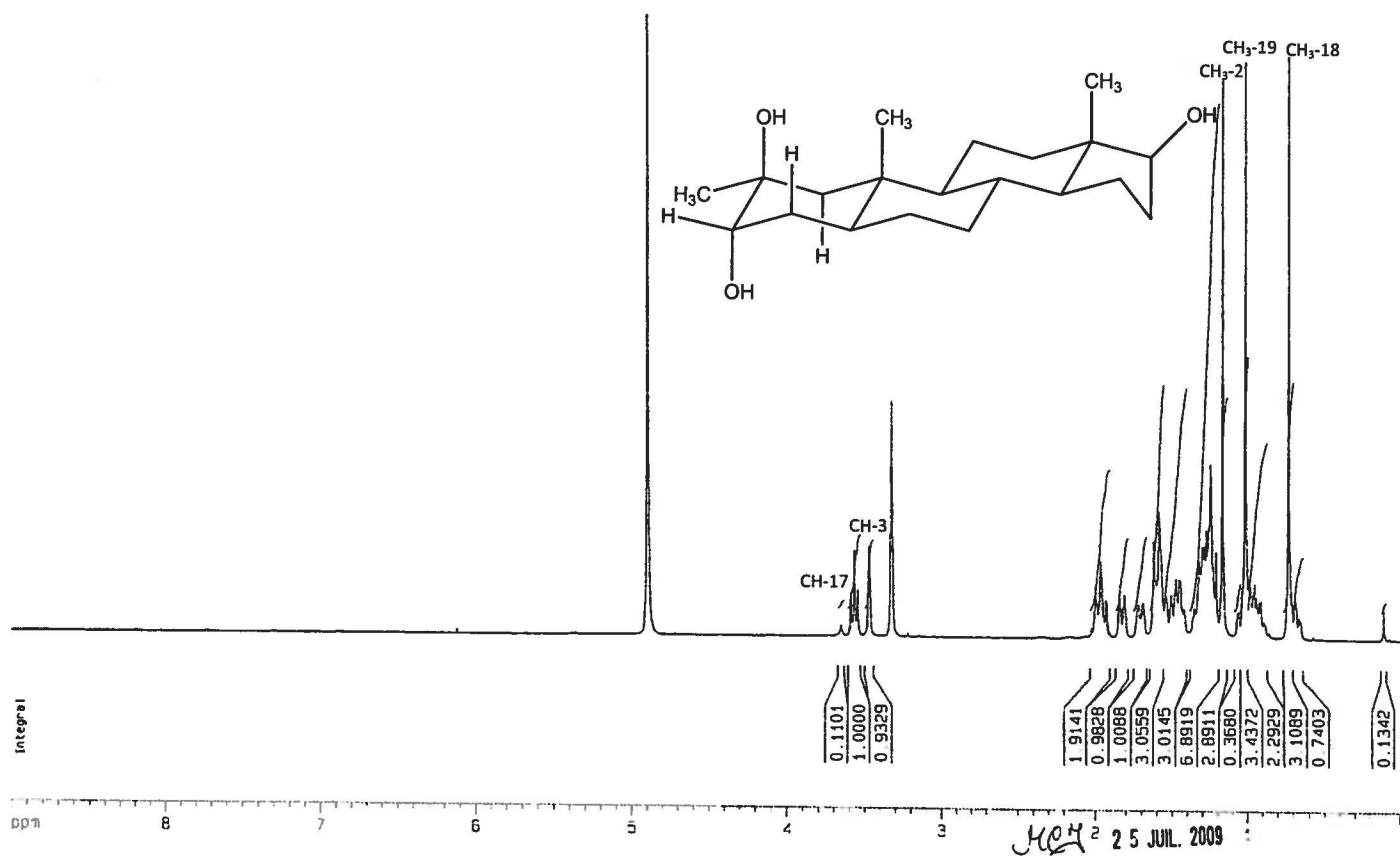


Figure 2.24: Spectre ¹H RMN du 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (74 ; M6)

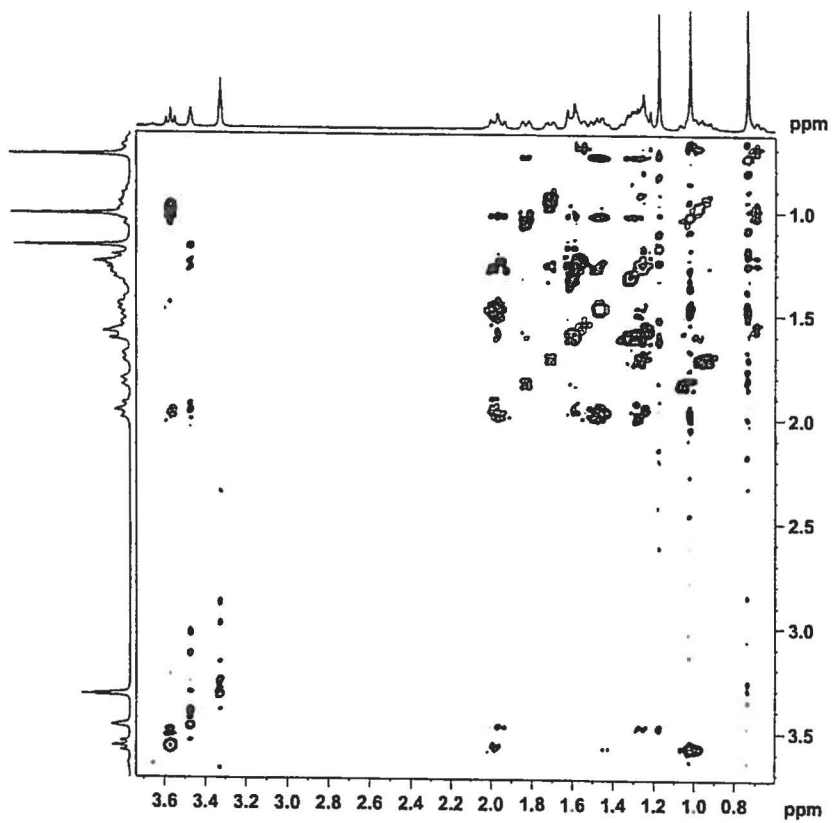


Figure 2.25: Spectre NOESY du 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (74 ; M6)

Le spectre de RMN du métabolite isolé M6 en solution dans le chloroforme deutéré, montre un quadruplet pour le proton en C-17 couplé avec trois protons dont celui de l'alcool. Le proton en position C-3 possédant trois voisins, son signal devrait être un multiplet. On observe pour le spectre du composé (74) solubilisé dans le méthanol deutéré, solvant protique, une légère variation de la multiplicité des signaux causée par la disparition du signal du proton de l'hydroxyle. Ainsi, les protons présents sur les groupements méthyles en C-18, C-19 et C-2 auront des déplacements chimiques respectifs de 0,74 ppm, 1,02 ppm et 1,18 ppm, alors que celui présent en C-3 aura un déplacement chimique de 3,47 ppm. Finalement, le signal du proton en C-17 est un triplet à 3,57 ppm avec des constantes de couplage de 8,62 Hz.

Dans le but de déterminer la stéréochimie des groupements hydroxyles en position C-2 et C-3, une analyse RMN NOESY a été effectuée. Une orientation α et donc équatoriale du groupement méthyle en position C-2 est suggérée par l'absence de couplage avec le groupement méthyle en C-19. D'autre part, l'alcool en position C-3 semble posséder une orientation α et axiale, en conformité avec des constantes de couplage de même intensité du proton en C-3 β avec les deux protons en C-4, ce qui ne serait pas le cas pour un proton de configuration axiale en C-3. Ce qui confirme la structure de ce métabolite comme étant le 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (74). Il est à noter que les spectres RMN protons des produits (73) et (74) présentent des triplets identiques pour l'hydrogène en C-3 β . Ces données de même que la très grande homologie de structure des molécules permettent donc de confirmer la stéréochimie du groupement hydroxyle en position C-3 du produit (73).

Par ces travaux qui ont permis la détermination de la stéréochimie des groupements fonctionnels en C-2 et C-3, nous avons complété la caractérisation des métabolites isolés des incubations et déterminé la stéréochimie du métabolite trihydroxylé de la drostanolone et de la méthyl drostanolone.

Cependant, ce métabolite n'a pas été retrouvé dans la fraction glucuroconjuguée ou sulfoconjuguée des urines de référence de la drostanolone bien qu'il ait été obtenu dans le cas de la méthylhydrostanolone (Gauthier *et al.*, 2009). En effet, le métabolisme de la drostanolone semblerait principalement régir par les voies d'oxydo-réduction usuelles produisant des métabolites réduits en C-3 et oxydés en C-17 qui sont rapidement conjugués et excrétés. La présence d'un groupement méthyle en C-17 empêche cette conversion rapide et favorise des processus d'hydroxylation secondaires. En culture cellulaire, ces processus prennent de l'importance, le milieu n'étant pas dynamique.

La formation de métabolites hydroxylés en position C-2 n'est pas inhabituelle. En effet, des réactions associées à l'activité enzymatique de CYP450, soient le CYP3A4, le CYP2C9 et le CYP2C19 ont été rapportées dans la littérature pour l'éthinylestradiol (**18**), la testostérone (**1**), la progestérone (**19**) et l'androstènedione (**12**) (Choi *et al.*, 2005; B. Wang *et al.*, 2004; Yamazaki & Shimada, 1997). Cette voie métabolique est aussi importante dans le cas de l'estrone (**14**) (Lee *et al.*, 2002). Un métabolite glucuroconjugué hydroxylé en C-2 a aussi été proposé pour la méthénolone (**16**) (Goudreault & Massé, 1990).

Conclusion

Les incubations d'hépatocytes cryopréservés en présence de drostanolone (**6**) et de méthylhydrostanolone (**4**) ont produit des métabolites qui ont été analysés par spectrométrie de masse et de RMN et caractérisés par synthèse chimique. Dans le cas de la méthylhydrostanolone (**4**), des métabolites réduits en C-3 α et β ont été obtenus, ainsi que des métabolites hydroxylés en C-2, C-16 et C-12. La réduction de la cétone conduit très majoritairement à l'obtention du métabolite de configuration 3 α -OH. Ces métabolites sont présents dans les incubations cellulaires et les urines de référence. La 2 α -méthyl-5 α -androstane-

3,17-dione (**61** ; **M4**), fût isolée des incubations cellulaires de la drostanolone (**6**) et ne semble pas excrétée chez l'humain en quantité appréciable. Finalement, la synthèse d'isomères hydroxylés en position C-2 a permis de confirmer la structure du métabolite M6 comme étant le 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**74**). Ces travaux ont en partie été publiés en 2009 dans la revue *Steroids* (Gauthier *et al.*, 2009). Les principaux métabolites urinaires ont été intégrés à la méthode de détection et d'identification utilisée au laboratoire pour l'analyse de routine d'échantillons recueillis dans le cadre de programmes de dépistage du dopage sportif.

Section 2 : Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes.

Julie Gauthier, Donald Poirier, Christiane Ayotte

Steroids, 77 (6), 2012, 635-643

2.1 Résumé de l'article en français

La désoxyméthyltestostérone (DMT, 17β -hydroxy- 17α -méthyl- 5α -androst-(2,3)-ène, (7)) est un stéroïde de synthèse présent dans certains suppléments hormonaux distribués illégalement à des fins d'auto-administration tel quel ou en combinaison avec d'autres stéroïdes. Il fait partie de la Liste des interdictions du Code mondial antidopage (Agence Mondiale Antidopage, 2009) et sa détection dans les échantillons d'urine d'athlètes est basée sur sa détection ou celle de ses métabolites urinaires majeurs, qui n'ont pas été totalement caractérisés à ce jour. Suite à l'isolement des métabolites d'incubations d'hépatocytes humains frais et de fractions subcellulaires S9 d'homogénats de foie, nous avons été en mesure d'identifier le métabolite majeur de la DMT comme étant le 17α -méthyl- $2\beta,3\alpha,17\beta$ -trihydroxy- 5α -androstane (76). D'autres métabolites mineurs ont également été caractérisés. La production, l'isolement, les analyses de spectrométrie de masse et de RMN, ainsi que les synthèses chimiques sont ici présentées.

2.2 Description de l'article et contribution de l'étudiante

Tel que mentionné au chapitre 1, la DMT (7) est un nouveau stéroïde de synthèse figurant à la liste des interdictions de l'Agence mondiale antidopage (AMA) dont on sait très peu. Il a été montré que ce produit était vendu illégalement, sa présence ayant été détectée dans des produits tels le P-Plex (Okano *et al.*, 2009). L'étiquetage de ces produits n'est de toute évidence pas

fiable, la prise d'un tel supplément diététique peut avoir de graves conséquences. En plus de l'activité anabolique de ce stéroïde ayant été prouvée (Ayotte *et al.*, 2006), la provenance de distributeurs clandestins de ces préparations fait en sorte que le contrôle de cette substance est important. La première étude a été publiée par le groupe de Sekera en 2005 et portait sur la détection d'un métabolite dihydroxylé dans les urines recueillis suite à l'administration de DMT (7) à un babouin (Sekera *et al.*, 2005).

Ayant identifié la désoxyméthyltestostérone d'une préparation saisie aux douanes canadiennes en 2004 et l'avoir baptisée DMT, nous avons entrepris divers projets visant à caractériser les propriétés hormonales et les métabolites de stéroïdes de synthèse (Ayotte *et al.*, 2006). Afin de faciliter l'obtention de métabolites et leur caractérisation, nous avons eu recours à des modèles *in vitro* hépatiques. Les premiers essais ont été faits avec des cellules cryopréservées, mais n'ont pas donné les résultats escomptés, alors que plusieurs métabolites dont celui d'intérêt ont été générés d'incubations d'hépatocytes frais. Dans le but d'élucider la structure du métabolite dihydroxylé majeur, des incubations avec des fractions subcellulaires S9 ont été effectuées, permettant ainsi d'obtenir une quantité suffisante de produit pour permettre une analyse RMN après son isolement par HPLC. Nous avons pu caractériser le métabolite principal en effectuant la synthèse du stéroïde de référence.

L'étudiante a effectué les incubations cellulaires, les extractions et analyses par CG-SM ainsi que l'interprétation des spectres de masse et la proposition de structure. De plus, elle a effectué les incubations à grande échelle et l'isolement de produits par HPLC. Elle a analysé les spectres de RMN et a effectué la synthèse chimique des métabolites.

2.3 Article

Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes.

Gauthier J *et al.* Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes. *Steroids*, 77(6), may 2012, 635-643

Julie Gauthier, INRS – Institut Armand-Frappier, Laval, Canada

Donald Poirier, CHUQ-CHUL Research Center and Université Laval, Québec, Canada

Christiane Ayotte, INRS – Institut Armand-Frappier, Laval, Canada

Corresponding Author:

Christiane Ayotte,

INRS-Institut Armand-Frappier

531, boul. des Prairies

Laval, Québec H7V 1B7

Tel.: (450) 686 5442

Fax: (450) 686 5614

E-mail address: christiane.ayotte@iaf.inrs.ca

Abstract

Desoxymethyltestosterone (DMT; 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene) (7) is a designer steroid present in hormonal supplements distributed illegally as such or in combination with other steroids, for self-administration. It figures on the list of substances prohibited in sports and its detection in athlete's urine samples is based upon the presence of the parent compound or the main urinary metabolite, which has not been characterized yet. Following its isolation from cultures of human fresh hepatocytes and S9 fractions of liver homogenates, we were able to identify this metabolite as being 17 α -methyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (76). Other minor metabolites were also characterized. The production, isolation, NMR, mass spectral analyses and chemical synthesis are presented.

Keywords: Desoxymethyltestosterone, metabolites, synthesis, hepatocytes, GC-MS

Introduction

Desoxymethyltestosterone (DMT, **(7)**), a mixture composed principally but not uniquely of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene and to a lesser extent of the 3-ene isomer, was identified in a bottle bearing the inscription “New Stuff Δ ”, seized at the Canadian customs in 2003[1, 2]. This clandestine product has, since then, been introduced in so-called designer hormonal supplements as such (Ergomax LMG, Phera-plex) or in combination with other molecules (Halodrol). Even though the distribution of products containing DMT is illegal in many countries such as Canada and the USA, its proliferation has not fully stopped. Not only are these products prepared and commercialized without the required quality controls, but also they have not gone through any clinical trials; effects and health problems are discovered a posteriori [3-6]. In earlier work, we have studied the hormonal properties of DMT using mammalian-based reporter gene bioassays. More specifically, the androgenic activity was determined using CAMA-1 breast cancer cells transiently transfected with a reporter plasmid, which comprises the androgen-responsive mouse mammary tumor virus promoter in front of the luciferase gene (MMTV-luc). DMT was found in these assays to be androgenic, although less potent than tetrahydrogestrinone (13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -pregna-4,9,11-trien-3-one) (**(21)**) and 17 α -methyldrostanolone (2 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androst-3-one) (**(4)**), two other designer steroids [1]. In 2007, Diel *et al.* reported powerful anabolic properties with potential risk of toxic side effects to be expected from the administration of products containing this steroid [7].

Desoxymethyltestosterone (**(7)**) figures on the list of prohibited substances published by the World Anti-Doping Agency [8]. Its detection in athlete's samples depends upon the identification of characteristic, long-lasting metabolites. To this end, DMT must first be synthesized or purified from the low quality preparations available, which combined to the absence of clinical data limits the feasibility of the administration to volunteers. The formation of

metabolites from DMT was therefore only partially studied. Sekera *et al.*, reported in the baboon the excretion of a dihydroxylated metabolite formed from incubations of pooled human liver microsomes [9], while Rodchenkov *et al.* described extensive metabolism from an administration to a human volunteer, leading to the formation of several mono- and dihydroxylated urinary metabolites; none were identified [10].

Different hepatic models were used to mimic phase I and II metabolism of similar molecules [11-14]. The production of metabolites by fresh human hepatocytes was evaluated for androstenedione (androst-4-ene-3,17-dione) (12), norandrostenedione (estr-4-ene-3,17-dione) (33), gestrinone (13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -pregna-4,9,11-trien-20-yn-3-one) (37) and tetrahydrogestrinone (21) [15-17], correlating to a certain degree with the results of excretion studies. Microsomal and S9 fractions of human liver homogenates were utilized for the formation of phase I and II metabolites of 17-alkylated steroids such as methyltestosterone (17 β -hydroxy-17 α -methyl-androst-4-en-3-one) (13) and methandienone (17 β -hydroxy-17 α -methyl-androsta-1,4-dien-3-one) (25) [12]. We also reported the characterization of the metabolites of drostanolone (17 β -hydroxy-2 α -methyl-5 α -androstan-3-one) (6) and its 17-methylated analog (4) isolated from cryopreserved human hepatocytes [18]. However in our hands, desoxymethyltestosterone (DMT (7)) remained almost intact following incubations with cryopreserved hepatocytes with only traces of metabolites being formed, which precluded any further investigations at the time.

In this paper, we wish to report the characterization of the main urinary metabolite of DMT reported previously, produced in cultures of human fresh hepatocytes and isolated from liver S9 fractions.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Distilled water was purified on a Milli-Q Gradient system from Millipore (Fisher Scientific, Whithy, Canada). The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada): trypan blue, trimethylsilyliodide (TMIS), tetrahydrofuran (THF), N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide grade purissimo (MSTFA, Fluka), β -glucuronidase from *E. coli*, Percoll solution, sodium chloride (NaCl), pyridine, trimethylsilylchloride (TMCS), triethylamine, NAPD, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, dimethylsulfoxide, chromium (VI) oxide, 2-propanol, dioxane, deuterated chloroform, deuterated methanol, lithium bromide, lithium carbonate, lithium chloride, hydrazine monohydrate, 2-propanol, sodium borohydrate, Pd/C 10% , methyl magnesium bromide, pyridinium tribromide, zinc dust, N-bromosuccinimide, perchloric acid and chromium trioxide. Ethanethiol was obtained from Fisher Scientific (Whithy, Canada) and acetonitrile, diethyl ether, methanol, hexane, chlorhydric acid, sulfuric acid and dichloromethane from Caledon (Georgetown, Canada), all the others from EMD (Gibbstown, USA). Deuterated N,O-bis(trimethyl-d₉-silyl)acetamide and chlorotrimethyl-d₉-silane were from C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Canada).

Sodium phosphate (monobasic), sodium bicarbonate (ACS grade) and sodium carbonate were obtained from VWR (Batavia, USA). The Krebs-Henseleit buffer, the HT medium, pooled human male liver S9 fractions and fresh hepatocytes were from Celsis In Vitro Technologies (Baltimore, USA). The following products were obtained from MAT (Québec, Canada): hydrogen peroxide 33%, sodium hydroxide, celite, K₂CO₃, Na₂SO₄ and NH₄Cl.

Anhydrous reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure using commercially available anhydrous solvents (Gibbstown, USA), except THF which was distilled from sodium/benzophenone ketyl under argon. Chemical reagents for synthesis were purchased from Aldrich Chemical Co (Milwaukee, USA). Flash chromatography was performed on Silicycle 60 230-400-mesh silica gel (Québec, Canada).

The synthesis of DMT was described previously [1]. 17 β -acetyloxy-5 α -androst-2-en-4-one (**77**) and 4 ξ ,17 β -diacetyloxy-5 α -androst-2-ene (**79**) were a kind gift from Pr. John F. Templeton, Professor Emeritus, Faculty of Pharmacy, University of Manitoba, and 17 β -hydroxy-17 α -methyl-2,3 α -spirooxirane-5 α -androstane (**75**) was synthesized earlier by Pr. Donald Poirier [19]. 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (**47**) was purchased from Aldrich, and androst-4-ene-3,17-dione (**12**) was from Steraloids. Two capsules of Halodrol and one aliquot of "New Stuff Δ " were provided by the Laboratory and Scientific Services Directorate of the Canada Border Services Agency.

Reverse Phase HPLC

The steroids extracted from the incubation media were purified by reverse phase HPLC on a HP1100 chromatograph equipped with a photodiode array detector, a quaternary pump and with a Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm X 9.4 mm X 5 μ m) (Agilent Technologies, New Castle, USA). Fractions were collected during the run made with the following mobile phase: acetonitrile: water (60:40) (held for 12 minutes) followed by a linear gradient (for 1 minute) reaching 95% acetonitrile (held for 5 minutes). The metabolite of interest was recovered in the fraction collected between 8.0 and 8.4 min.

GC-MS

Analyses in the full scan mode (50 to 750 amu) with EI ionization at 70 eV were performed on an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to a 5973 mass selective detector equipped with an 5973 auto-sampler with instrument control and data analysis by the Enhance ChemStation software. The chromatograph was equipped with a DB-5MS column (SGE) (30 m X 0.22 mm id X 0.25 μ m film thickness) (Agilent, New Castle, USA) and the analyses were carried out with the following temperature program of the GC oven: 100 °C (held for 0.5 min) to 240 °C using a gradient of 20 °C/min, followed by a 6 °C/min gradient to reach 278 °C and a final gradient of 10 °C/min reaching 320 °C (held 4 min) with He as the carrier gas (BOC, Montréal, Canada). The temperature of the injector and the transfer line was respectively 270 °C and 310 °C.

NMR

^1H NMR spectra were recorded at 400 MHz on a Bruker AVANCE 400 spectrometer (Billerica, MA, USA). The chemical shifts (δ) are expressed in ppm and referenced to chloroform (7.26 ppm).

Incubations with fresh human hepatocytes

According to the protocol suggested by the supplier [20, 21], the cells were first washed on Percoll gradient following which they were suspended in 2.5 mL of Krebs-Henseleit buffer (KHB). The vial contained at least 5×10^6 cells and their viability was assessed with trypan blue. As described previously [18], DMT (7) was dissolved in ethanol (0.01 M); further dilution in KHB to a concentration of 100 μ M was freshly made just prior to the experiment. 250 μ L of the cell suspension and the DMT (7) solution were sampled in 24-well plates and the incubation was carried out at 37°C for 4 h under an atmosphere of 95% O_2 to CO_2 . The enzymatic reactions were stopped by the addition of 500 μ L of acetonitrile and the content was transferred to Eppendorf tubes

which were vortexed and centrifuged at 14 000 rpm for 10 min. The metabolites were purified as described previously by solid phase extraction on Sep Pak C₁₈ cartridges (Waters, Montréal, Canada), and selective hydrolysis of the glucuroconjugates and sulphates was carried out by enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase from *E. coli* and chemical solvolysis respectively. The steroids were converted to TMS-ether, TMS-enol derivatives and the mixture was analysed as such by GC/MS [22].

Incubations with S9 human liver fractions

The incubations were performed according to the recommendations of the supplier [23]. The frozen vials containing the S9 fractions (30 mg per vial) were placed in a water bath at 37°C; when thawed, 550 μ L of this suspension and 3.52 mL of Tris buffer at 50 mM were added to test tubes cooled in an ice water bath, followed by the addition of 55 μ L of a solution of DMT (7) in ethanol at 5 mM. In parallel, 170 mg of NADP (2.3 mmol) and 600 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase (6 U/mL) were added to 100 mL of an aqueous solution of NaHCO₃ at 2% (W:V). Both preparations were placed in a water bath at 37°C for 5 min following which 1.375 mL of the second solution were added to the first one and incubations were carried out at 37°C during one hour. After the addition of 5 mL of acetonitrile to each tube, the solvent was transferred and evaporated to dryness. After the extraction of the metabolite as described previously (solid phase and liquid-liquid extraction), the residue was dissolved in 30 μ L of methanol and 45 μ L of acetonitrile and injected on the HPLC. Fractions containing DMT metabolites were pooled and analysed by ¹H NMR and GC/MS as their TMS-ether or TMS-enol, TMS-ether derivatives.

Reference human urine samples

An aliquot of a urine sample obtained following the ingestion of DMT was kindly provided by the Anti-doping Centre in Moscow. One athlete's sample collected during an international event and received for testing was found to

contain the main urinary metabolite of desoxymethyltestosterone (**7**), along with those of 17-methylrostanolone (**4**) and dehydrochlormethyltestosterone (**15**); the athlete admitted to the use of "Halodrol". The main urinary metabolites detected in these specimens were those researched in the cultures of hepatocytes and liver S9 fractions.

Synthesis of proposed DMT metabolites

A structure was proposed for the most intense DMT metabolite (2-en isomer) purified by HPLC on the basis of the ^1H NMR and mass spectra. The synthesis of 17 α -methyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76**) and that of other minor metabolites (hydroxyl or ketone in C-1 or C-4) was carried out as described in the following sections.

Synthesis of 17 α -methyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76**)

A solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-2,3 α -spirooxirane-5 α -androstane (**75**) (0.0125 g, 0.041 mmol) in THF (0.77 mL) was treated with 0.5 M H_2SO_4 (0.51 mL, 0.1027 mmol) and stirred at room temperature for 4 h. After neutralization with a saturated NaHCO_3 solution, the reaction mixture was extracted three times with ethyl acetate. The organic layer was dried over MgSO_4 and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate: hexane (70:30 V:V) as eluent to give 17 α -methyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76**) (0.0099g, 75%). ^1H NMR (CDCl_3): 0.85 (s, 3H, CH_3 -18), 1.01 (s, 3H, CH_3 -19), 1.21 (s, 3H, CH_3 -20), 3.87 (q, 1H, CH-3), 3.91 (q, 1H, CH-2). ^{13}C NMR (CDCl_3): 14.03 (C-18), 14.58 (C-19), 20.48, 23.19, 25.81 (C-20), 28.09, 29.69, 39.9, 35.77 (C-8), 38.96, 39.02 (C-5), 40.56 (C-1), 50.63 (C-9), 55.14 (C-14), 70.56 (C-3), 71.77 (C-2).

Synthesis of 17 β -hydroxy-5 α -androst-2-ene-4-one (**78**)

To a solution of 17 β -acetyloxy-5 α -androst-2-en-4-one (**77**) (0.15 g, 0.45 mmol) in methanol (10 mL) was added K₂CO₃ (1 g, 7.24 mmol) and the reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The resulting product was purified by flash chromatography on silica gel, using the following combination of ethyl acetate:hexane : 200 mL 30:70 V:V, 200 mL 40:60 V:V and 100 mL 50:50 V:V) as eluent to give 17 β -hydroxy-5 α -androst-2-en-4-one (**78**) (92 mg, 71%). ¹H NMR (CDCl₃): 0.74 (s, 3H, CH₃-18), 0.86 (s, 3H, CH₃-19), 3.64 (dd, 1H, CH-17), 6.00 (dd, J₁= 2.92 Hz, J₂=10 Hz, 1H, CH-3), 6.8 (m, 1H, CH-2).

Synthesis of 4 ξ ,17 β -dihydroxy-5 α -androst-2-ene (**80**)

To a solution of 4 ξ ,17 β -diacetyloxy-5 α -androst-2-ene (**79**) (0.0147 g, 0.039 mmol) in methanol (1 mL) was added K₂CO₃ (0.1 g, 0.72 mmol) and the reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was then poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate : hexane (20:80 V:V) as eluent to give 4 ξ ,17 β -dihydroxy-5 α -androst-2-ene (**80**) (4 mg, 39%). ¹H NMR (CDCl₃): 0.75 (s, 3H, CH₃-18), 0.97 (s, 3H, CH₃-19), 3.63 (dd, CH-17), 3.97 (d, J= 3.92 Hz, 1H, CH-4), 5.82, (m, 2H, CH-2 and CH-3)

Synthesis of 1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86**) and 1 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**88**)

3 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane (**81**)

According to the method described by Ferraboschi *et al.* [24], to a solution of 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (**47**) (3.0153 g, 10.3 mmol) in anhydrous toluene (84 mL) was added a solution of CH₃MgBr in toluene : THF (75:25 V:V) (1.4 M, 117.6 mmol) at room temperature under argon. The reaction was stirred for 4 h at reflux and left overnight at room temperature. An aqueous solution of ammonium chloride (2.6 M) was added dropwise at 0°C to the reaction mixture; the aqueous phase was extracted eight times with chloroform. The organic phase was washed with water and treated as described previously. The resulting crude product was used for the next step without any further purification (2.31 g, 73%). ¹H NMR (CDCl₃): 0.82 (s, 3H, CH₃-18), 0.84 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, CH₃-20), 3.59 (m, 1H, CH-3).

17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**82**)

According to the method described by Ferraboschi *et al.* [24], to a solution of 3 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**81**) (2.2917 g, 9.84 mmol) in acetone (60 mL) was added dropwise Jones reagent (5.46 mL, 14.75 mmol) at room temperature under argon, until the orange color persisted. The reaction was stirred at room temperature for 30 min and 2-propanol was added dropwise until the green color persisted. The reaction mixture was filtered under vacuum on a celite pad and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting crude product was used as such (2.1 g, 92%). ¹H NMR (CDCl₃): 0.88 (s, 3H, CH₃-18), 1.03 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, CH₃-20).

2 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**83**)

According to the method described by Ferraboschi *et al.* [24], to a solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**82**) (2.09 g, 6.89 mmol) in anhydrous ethanol (41.8 mL) and anhydrous methylene chloride (20.9 mL) was added pyridium tribromide (2.2 g, 6.9 mmol) at 40°C under argon. The reaction was stirred at 40°C for 2 h and pyridium tribromide was added (0.94 g, 2.9 mmol) to complete the reaction, which was stirred for another hour at 40°C. The reaction mixture was poured in an aqueous solution of NaHCO₃

(87 g/L) and extracted three times with dichloromethane. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using toluene :hexane (70:30 V:V) as eluent to give 2 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**83**) (1.31 g, 50%). ¹H NMR (CDCl₃): 0.87 (s, 3H, CH₃-18), 1.11 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, CH₃-20), 1.81 (m, 1H, CH-1 α), 2.41 (m, 2H, CH₂-4), 2.64 (dd, J₁= 6.34 Hz, J₂= 12.87 Hz, 1H, CH-1 β), 4.45 (dd, J₁= 6.31 Hz, J₂= 13.34 Hz, 1H, CH-2).

17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-en-3-one (**84**)

According to the method described by Ferraboschi *et al.* [24], to a solution of 2 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one (**83**) (1.38 g, 3.61 mmol) in anhydrous DMF (27.4 mL) were added lithium bromide (2.06 g, 23.7 mmol) and lithium carbonate (1.79 g, 26.03 mmol) at room temperature under argon. The reaction was stirred at reflux during 1 h, and then the mixture was poured in water and extracted five times with diethyl ether. The organic phase was washed with water and brine, and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (30:70 V:V) as eluent to give 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-en-3-one (**84**), (0.5274 g, 48 %), which was utilized as such. ¹H NMR (CDCl₃): 0.87 (s, 3H, CH₃-18), 1.01 (s, 3H, CH₃-19), 1.20 (s, 3H, CH₃-20), 2.20 (dd, J₁= 4.04 Hz, J₂= 17.68 Hz, 1H, CH-4), 2.35 (dd, J₁= 14.16 Hz, J₂= 17.66 Hz, 1H, CH-4), 5.83 (d, J₁= 10.18 Hz, 1H, CH-2), 7.13 (d, J₁= 10.21 Hz, 1H, CH-1).

17 β -hydroxy-17 α -methyl-1 α ,2 α -spirooxirane-5 α -androst-3-one (**85**)

As described by Counsell *et al.* [25], to a solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-en-3-one (**84**) (0.5074 g, 1.68 mmol) in anhydrous methanol (8.5 mL) were added simultaneously hydrogen peroxide 30% (0.547 mL, 5.3 mmol) and sodium hydroxide (10% in MeOH) (0.142 mL, 0.51 mmol) at 0°C under argon. The reaction was stirred at 0°C under argon during

2 h and at room temperature for 3 h; it was then poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (30:70 V:V) as eluent to give 17 β -hydroxy-17 α -methyl-1 α ,2 α -spirooxirane-5 α -androst-3-one (**85**) (0.4868 g, 91 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.88 (s, 3H, CH₃-18), 0.91 (s, 3H, CH₃-19), 1.24 (s, 3H, CH₃-20), 2.26 (dd, J₁= 13.81 Hz, J₂= 18.61 Hz, 1H, CH-4), 3.24 (d, J₁= 4.15 Hz, 2H, CH-1), 3.53 (d, J₁= 4.14 Hz, 1H, CH-2).

1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86**)

As adapted from the method described by Klimstra [26], a solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-1 α ,2 α -spirooxirane-5 α -androst-3-one (**85**) (0.2983 g, 0.938 mmol) in hydrazine monohydrate (4.71 mL, 91.2 mmol) was stirred at room temperature for 30 min, at 90°C for 15 min and at 100°C for 10 min. The reaction mixture was then poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (40:60 V:V) as eluent to give 1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86**) (0.1512 g, 53 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.73 (s, 3H, CH₃-19), 0.86 (s, 3H, CH₃-18), 1.21 (s, 3H, CH₃-20), 3.71 (d, J₁= 4.36 Hz, 1H, CH-1), 5.82 (m, 2H, CH-2 and CH-3).

17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-1-one (**87**)

To a solution of 1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86**) (0.092 g, 0.302 mmol) in acetone (3 mL) was added dropwise Jones reagent (0.23 mL, 0.58 mmol) at room temperature under argon until an orange color persisted. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and 2-propanol was added dropwise until a green color persisted. The reaction mixture was filtrated under vacuum on a celite pad and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting crude product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (40:60 V:V) as eluent to give 17 β -

hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-1-one (**87**) (0.0713 g, 78 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.88 (s, 3H, CH₃-18), 1.08 (s, 3H, CH₃-19), 1.23 (s, 3H, CH₃-20), 5.80 (d, J₁= 9.60 Hz, 1H, CH-2), 6.65 (d, J₁= 9.65 Hz, 1H, CH-3).

1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86**) and 1 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**88**)

To a solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-1-one (**87**) (0.0495 g, 0.1639 mmol) in anhydrous methanol (5 mL) was added sodium borohydride (0.0186 g, 0.479 mmol) at room temperature under argon followed by stirring for one hour. The reaction mixture was poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, and treated as described previously. The resulting crude product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (30:70 V:V) as eluent to give a mixture of the two isomers of 1,17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86 and 88**). ¹H NMR (CDCl₃): 0.74 (1 α , s, 3H, CH₃-19), 0.81 (1 β , s, 3H, CH₃-19), 0.86 (s, 3H, CH₃-18), 1.21 (s, 3H, CH₃-20), 3.71 (1 α , d, J₁= 4.24 Hz, 1H, CH-1), 3.96 (m, 1H, CH-1), 5.39 (d, J₁= 9.23 Hz, 1H, CH), 6.84 (m, 2H, CH-2 and CH-3).

Synthesis of 4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**94**)

Androst-3-en-17-one (**89**)

As adapted from Tavares da Silva *et al.* [27], to a solution of androst-4-ene-3,17-dione (**12**) (5.005 g, 17.48 mmol) in acetic acid (300 mL) was added zinc dust (30 g, 461 mmol) at reflux under argon over a period of 10 min, followed by refluxing with stirring for 1.5 h. The suspension was filtered, the residue was washed with acetic acid and the filtrate was evaporated to dryness. The residue was dissolved in water and extracted three times with diethyl ether. The organic phase was washed three times with a solution of NaHCO₃, three times with water, and treated as described previously to give a mixture of the 5 α and 5 β -olefin; the former (**89**) (2.3 g, 49%) was precipitated after standing

in heptane at -15°C for 48 h. ^1H NMR (CDCl_3): 0.80 (s, 3H, CH_3 -18), 0.88 (s, 3H, CH_3 -19), 5.29 (ddd, $J_1=1.89$ Hz, $J_2=9.86$ Hz, 1H, CH-4), 5.57 (ddd, $J_1=3.25$ Hz, $J_2=6.55$ Hz, $J_3=9.89$ Hz, 1H, CH-3).

17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane-3-ene (90)

As adapted from Klimstra [28], to a solution of androst-3-en-17-one (89) (2.2785 g, 8.38 mmol) in anhydrous toluene (30.71 mL) was added dropwise a solution of CH_3MgBr in diethyl ether (3 M, 30.71 mL, 92.13 mmol) at room temperature under argon. The mixture was left stirring at room temperature for 16 h and refluxed for 4 h. A saturated solution of NH_4Cl in water (37.2 g in 100 mL) was added dropwise at 0°C , the aqueous phase was extracted eight times with chloroform. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The product obtained was used without any further purification (2.28 g, 89%). ^1H NMR (CDCl_3): 0.79 (s, 3H, CH_3 -18), 0.87 (s, 3H, CH_3 -19), 1.22 (s, 3H, CH_3 -20), 5.28 (ddd, $J_1=1.9$ Hz, $J_2=7.9$ Hz, $J_3=11.8$ Hz, 1H, CH-4), 5.56 (ddd, $J_1=3.2$ Hz, $J_2=6.6$ Hz, $J_3=9.8$ Hz, 1H, CH-3).

3 α -bromo-4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane (91)

To a solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane-3-ene (90) (0.9086 g, 2.89 mmol) in water and THF (20% V:V, 4 mL) was added at room temperature N-bromosuccinimide freshly recrystallized from water (0.5906 g, 3.32 mmol), followed by stirring overnight. The reaction mixture was poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (10:90 V:V) as eluent to give 3 α -bromo-4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane (91) (0.2251 g, 19%). ^1H NMR (CDCl_3): 0.85 (s, 3H, CH_3 -18), 1.04 (s, 3H, CH_3 -19), 1.21 (s, 3H, CH_3 -20), 2.36 (m, 1H, CH-5), 3.87 (td, 1H, CH-3), 4.36 (dd, 1H, CH-4).

3 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane-4-one (**92**)

As adapted from Klimstra [28], to a solution of 3 α -bromo-4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane (**91**) (0.1842 g, 0.447 mmol) in acetic acid (14 mL) was added dropwise a solution of chromium trioxide (0.1174 g, 1.17 mmol) in acetic acid (2.5 mL) at 0°C, followed by stirring overnight at room temperature. The reaction mixture was poured in aqueous NaHCO₃ (87 g/L) and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate: hexane (30:70 v: v) as eluent to give 3 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane-4-one (**92**) (0.1055 g, 58 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.75 (s, 3H, CH₃-18), 0.85 (s, 3H, CH₃-19), 1.22 (s, 3H, CH₃-20), 3.09 (dd, J₁= 3.1 Hz, J₂=12.2 Hz, 1H, CH-5), 4.3 (dd, 1H, CH-3)

17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane-2-en-4-one (**93**)

As adapted from Klimstra [28], to a solution of 3 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane-4-one (**92**) (0.0927 g, 0.226 mmol) in anhydrous DMF (6 mL) were added lithium chloride (0.0482 g, 1.14 mmol) and lithium carbonate (0.0324 g, 0.47 mmol) at room temperature under argon, followed by stirring at reflux for 3 h. The reaction mixture was poured in water and extracted five times with ethyl ether. The organic phase was washed with water and brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate:hexane (20:80 V:V) as eluent to give 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-4-one (**93**) (0.0424 g, 62 %). ¹H NMR (CDCl₃): 0.86 (s, 3H, CH₃-18), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 1.22 (s, 3H, CH₃-20), 5.99 (dd, J₁= 2.8 Hz, J₂=10.0 Hz, 1H, CH-3), 6.79 (m, 1H, CH-2).

4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-2-ene (94)

To a solution of 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-4-one (93) (0.0267 g, 0.088 mmol) in anhydrous methanol (2.5 mL) was added sodium borohydride (0.018g, 0.48 mmol) at room temperature under argon, followed by stirring for 3 h. The reaction mixture was poured in water and extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine and treated as described previously. The resulting product was purified by flash chromatography using ethyl acetate :hexane (25:75 V:V) as eluent to give a mixture of the two isomers in C-4 of 4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-2-ene (94) (0.0219 g, 81 %). Both were isolated by semi-preparative reverse phase HPLC: the residue was dissolved in acetonitrile and water (50% V:V, 50 μ L) and injected. The elution was carried out with varying proportions of acetonitrile and water each containing formic acid (0.1% V:V) starting at 41% (1 mL/min) for 3 min, to 42.3% in 0.1 min (0.5 mL/min), raised to 43.2 % in 8.9 min and finally to 80% in 0.1 min, held for 0.4 min. One isomer was isolated with sufficient purity in the fraction eluting between 9.5 and 10.3 min; the configuration of the hydroxyl group in C-4 was not determined. ¹H NMR (CDCl₃): 0.86 (s, 3H, CH₃-18), 0.97 (s, 3H, CH₃-19), 1.21 (s, 3H, CH₃-20), 3.97 (m, 1H, CH-4), 5.82 (m, 2H, CH-2 and CH-3).

RESULTS

Content of the DMT ("New Stuff Δ ") preparation and of a capsule of "Halodrol".

The oily preparation labeled "New Stuff Δ " was diluted and analyzed by GC/MS as such and as its trimethylsilyl derivatives. The most abundant products were characterized as being the 2- and 3-en isomers of DMT (approximately 3:1 mixture) [1]. The lack of sufficient purification was attested by the presence of other steroids. Of these, the probable chemical precursor utilized 5 α -androst-2-en-17-one (95) and the 3-en isomer (signal 20% in height of the most intense peak) and 17 β -epimers of DMT that could have resulted from a poorly controlled methylation. From the complex

mixture of hydroxyl and ketonic compounds present were identified inter alii 17 α -methyltestosterone (**13**), 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-en-3-one (**84**) also known as delta-1-methyltestosterone and its 17-epimer, 3 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane (**96**) (metabolite of 17 α -methyltestosterone), 3 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-ene (**97**) (metabolite of delta-1-methyltestosterone), androst-4-ene-3,17-dione (**12**) as well as isomeric 3-hydroxy-5-androst-4-ene-17-one (**98**). Traces of 1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86**) and 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-4-one (**93**), synthesized within the scope of this project were also found in the mixture.

Halodrol is another supplement product claimed to “induce maximal muscle hypertrophy” labeled as containing “Polydehydrogenated, polyhydroxylated halomethetioallocholane” but known to contain steroids such as DMT (**7**). A capsule of Halodrol was crushed and dissolved in methanol. The solvent was evaporated, the residue dissolved in KOH and extracted with hexane. After evaporation, the content was analysed as described previously by GC/MS. At least twelve steroids were detected of which nine appeared to be derived from dehydrochlormethyltestosterone (DHCMT, 17 β -hydroxy-17 α -methyl-4-chloroandrost-1,4-diene-3-one) (**15**), itself present in the mixture. The mass spectra of these chlorinated compounds show molecular ions increased by 2, 4 and 6 amu, hence consistent with the result of a non selective hydrogenation of DHCMT. The two isomers of DMT (**7**) and 17 α -methylrostanolone (**4**) were also in high abundance in that product.

Comparison of metabolites found in incubations and reference human urine samples

Under the conditions employed, four metabolites, mostly in the free form, were formed from the incubation with fresh human hepatocytes in low but sufficient amount to permit the acquisition of their mass spectra as their pertrimethylsilylated derivatives. Metabolite M1 (molecular ion at m/z 448)

appeared to be hydroxylated in C-16 showing the characteristic ions at m/z 231 and 218 from D-ring fragmentation [29]. This metabolite expected from 17-alkylated steroids was barely detectable in the reference urines and therefore, whether it belonged to the 2-en or 3-en isomer was not determined.

The mass spectrum of the TMS-derivative of the second metabolite (M2) suggested the presence of a keto group in the A-ring with an intact D-ring (m/z 179, 193, 195, 143), while closely eluting M3 could be the corresponding hydroxylated metabolite (molecular ions at m/z 446 and 448 respectively). The chemical synthesis of the isomeric compounds with the keto or hydroxyl group in C-1 and C-4 was undertaken for the main isomer of DMT with the double bond in C-2. The corresponding products from the non methylated analogue, 17 β -hydroxy-5 α -androst-2-en-4-one (**78**) and 4 ξ ,17 β -dihydroxy-5 α -androst-2-ene (**80**) were also prepared from their acetates as described earlier, to compare their mass spectra.

17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-1-one (**87**) and 1,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**86 and 88**) were obtained as described above and summarized in figure 2.26 from 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (**47**).

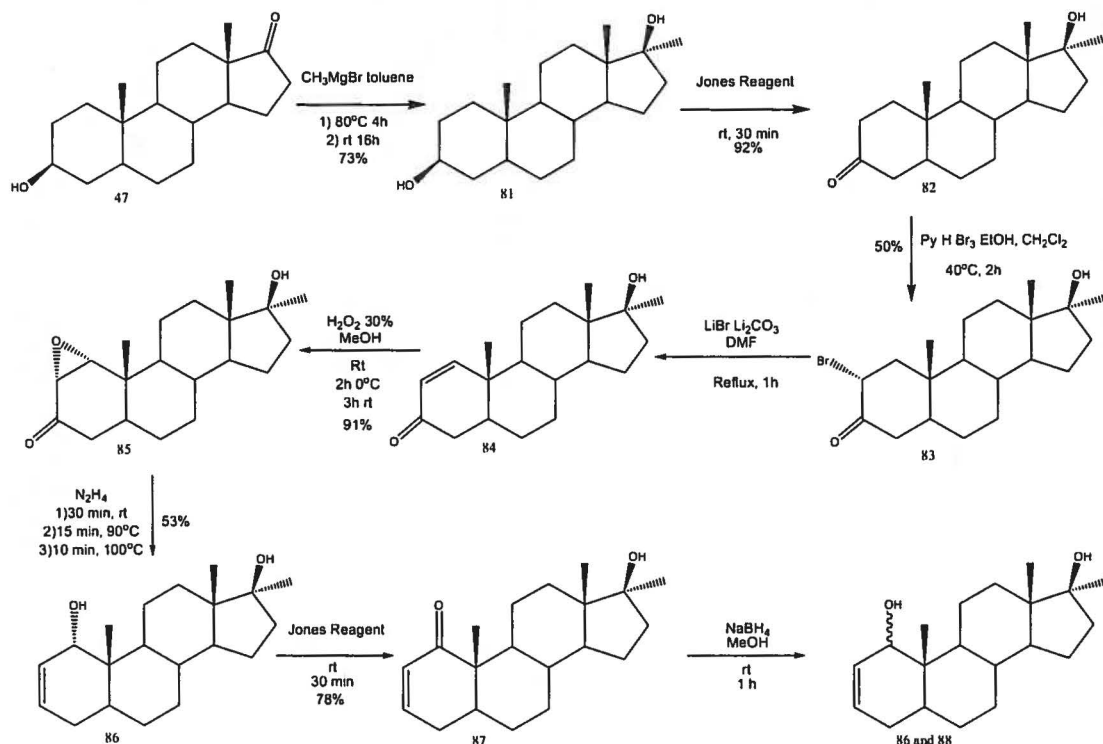


Figure 2.26: Synthesis of $1\alpha,17\beta$ -dihydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-ene (**86**) and $1\beta,17\beta$ -dihydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-ene (**88**).

The methyl group at C-17 was added by a Grignard reaction, which was followed by the oxidation of the hydroxyl group in C-3 and the addition of a bromine atom in C-2 to give (**83**). Following elimination in the presence of lithium bromide and carbonate, the $1\alpha,2\alpha$ -spirooxirane (**85**) was formed by Weitz-Scheffer reaction, which begins with the addition of the peroxide ion on the double bond in C-1. This addition occurring preferentially on the less hindered side of the molecule, the $1\alpha,2\alpha$ -spirooxirane was obtained. The latter, by a Wharton reaction, produced the C- 1α -hydroxyle (**86**), with the retained configuration. This alcohol was oxidized to the conjugated ketone (**87**), in turn reduced with sodium borohydride to afford a mixture of both isomers of the C-1-hydroxylated metabolite (**86, 88**). The mass spectra of the TMS-derivatives of 17β -hydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-en-1-one (**87**) and $1\alpha,17\beta$ -dihydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-ene (**86**) (proposed structure) are

shown in figure 2.27 along with the proposed fragmentation pathways leading to the most intense ions. These two compounds do not appear to be direct metabolites of DMT however the $1\alpha,17\beta$ -diol (**86**) was identified in the crude oily preparation “New Stuff Δ ”.

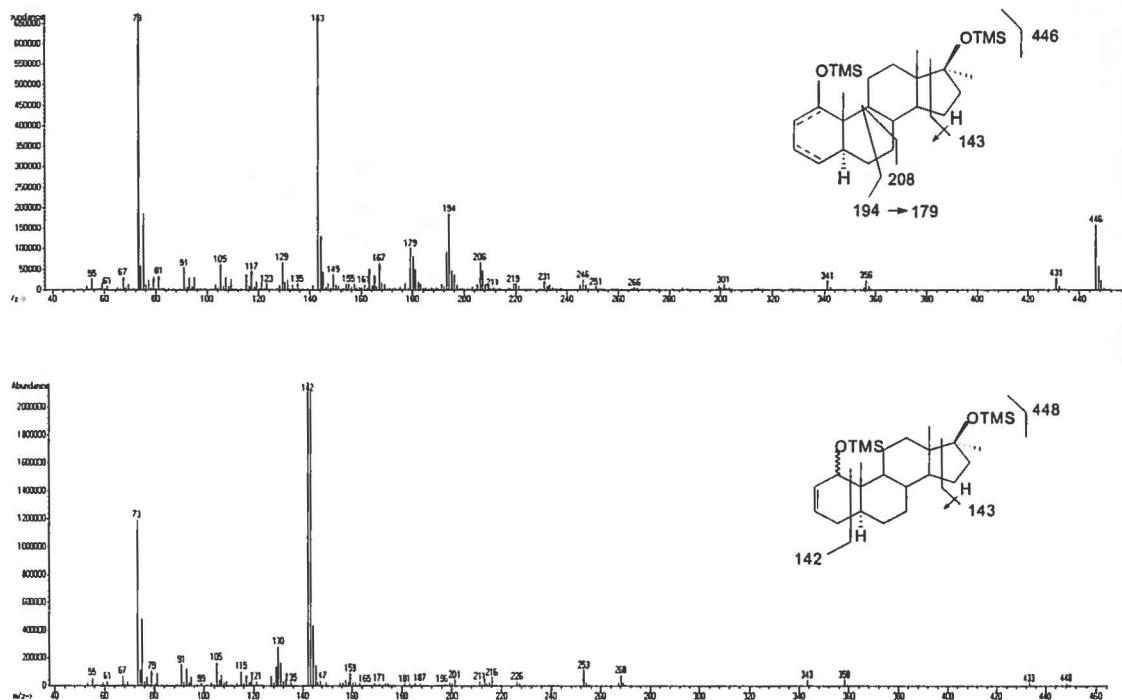


Figure 2.27: Mass spectra and proposed fragmentation pathways of the TMS-derivatives of synthesized 17β -hydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-en-1-one (**87**) (upper panel) and $1\alpha,17\beta$ -dihydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-ene (**86**), proposed structure) (lower panel).

17β -hydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-en-4-one (**93**) (**M2**) and $4\xi,17\beta$ -dihydroxy- 17α -methyl- 5α -androst-2-ene (**94**) (**M3**) were obtained from androst-4-ene-3,17-dione (**12**) as described earlier and summarized in figure 2.28.

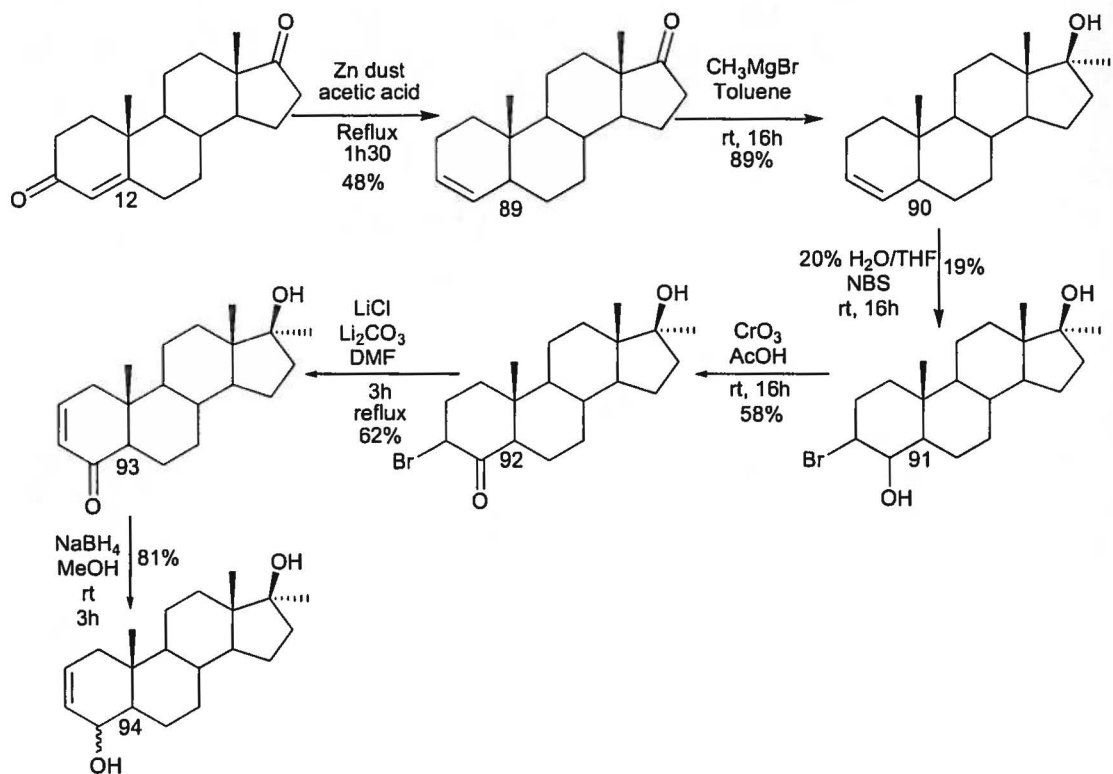


Figure 2.28: Synthesis of 4ξ,17β-dihydroxy-17α-methyl-5α-androstan-2-ene (94 ; M3)

The methylation of (89) was followed by the formation of bromohydrine the alkene in C-3 which resulted in the formation of several by-products, the desired compound being obtained in low yield. Oxidation followed by elimination produced the conjugated ketone (93) which was finally reduced with sodium borohydride in methanol to afford several products including fully reduced alcohols; the diol (94) was purified from this mixture by semi-preparative reverse phase HPLC. The stereochemistry of the hydroxyl group in C-4 was not determined. The ^1H NMR spectrum obtained showed a signal at 3.97 ppm for the proton attached to the carbon bearing the hydroxyl group in C-4, while the two vinylic protons in C-2 and C-3 were found at 5.82 ppm. The mass spectra of the TMS-derivatives of the two ketones (78) and (93) are similar, exhibiting intense ions corresponding to the loss of a methyl group and the fragmentation of the B-ring (ions at m/z 195, 194, 193 and 179)

(Figure 2.29). The mass spectrum of the TMS-derivative of the diol (**94**), also shown, is characterized by the presence of a weak molecular ion at m/z 448 and the fragment ions at m/z 433 ($-\text{CH}_3$), 358, 343, 268, 253 (sequential losses of HOTMS and CH_3), with the base peak at m/z 143 (D-ring). These two compounds correspond to metabolites M2 and M3, but the ketone (**93**) was also identified in the crude preparation of DMT.

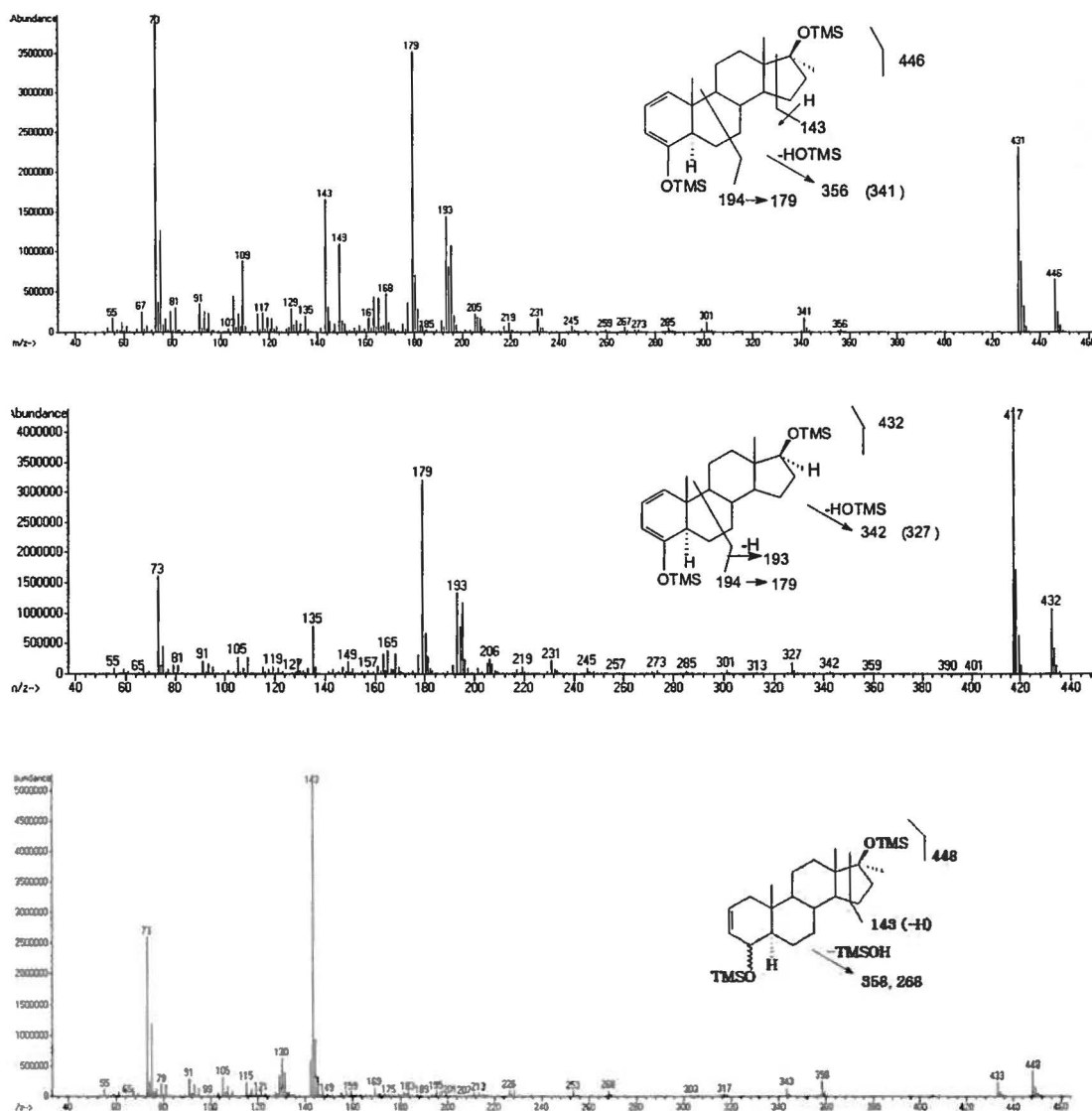


Figure 2.29: Mass spectra of the TMS-derivatives of synthesized 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-4-one (**93** ; M2) (upper panel), 17 β -hydroxy-5 α -androst-2-en-4-one (**78**) (middle panel) and 4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene (**94** ; M3) (lower panel).

The major metabolite M4 isolated from the incubations with fresh hepatocytes and S9 fractions was also the principal one in the reference urine samples. A minor isomer with the same molecular ion is also present in both. The mass spectrum of its pertrimethylsilyl derivative is not that informative apart from indicating the presence 3 hydroxyl groups, with a weak molecular ion at m/z 538 and ions at m/z 448, 358 and 269, while the base peak at m/z 143 excludes hydroxylation sites on the D-ring. Scaling up with repeated incubations of human liver S9 fractions permitted the NMR analysis required for establishing the configuration of the hydroxyl groups prior to its synthesis.

The presence of a signal at 3.9 ppm (2H) suggested a $2\beta,3\alpha$ -dihydroxy steroid, based upon this chemical shift [30-32]. This hypothesis is also supported by the absence of an ion at m/z 191 and the relatively weak ion at m/z 147 in the mass spectrum of M4 expected to be formed with vicinal diols in the *cis* configuration (TMSO-CH=OTMS⁺).

17α -methyl- $2\beta,3\alpha,17\beta$ -trihydroxy- 5α -androstane (76) was obtained from the opening in acidic conditions of the spirooxirane (75); the retention time and mass spectrum of its TMS-derivative matched the metabolite present in the reference urines and the incubation mixtures with fresh hepatocytes and S9 fractions as shown in figure 2.30.

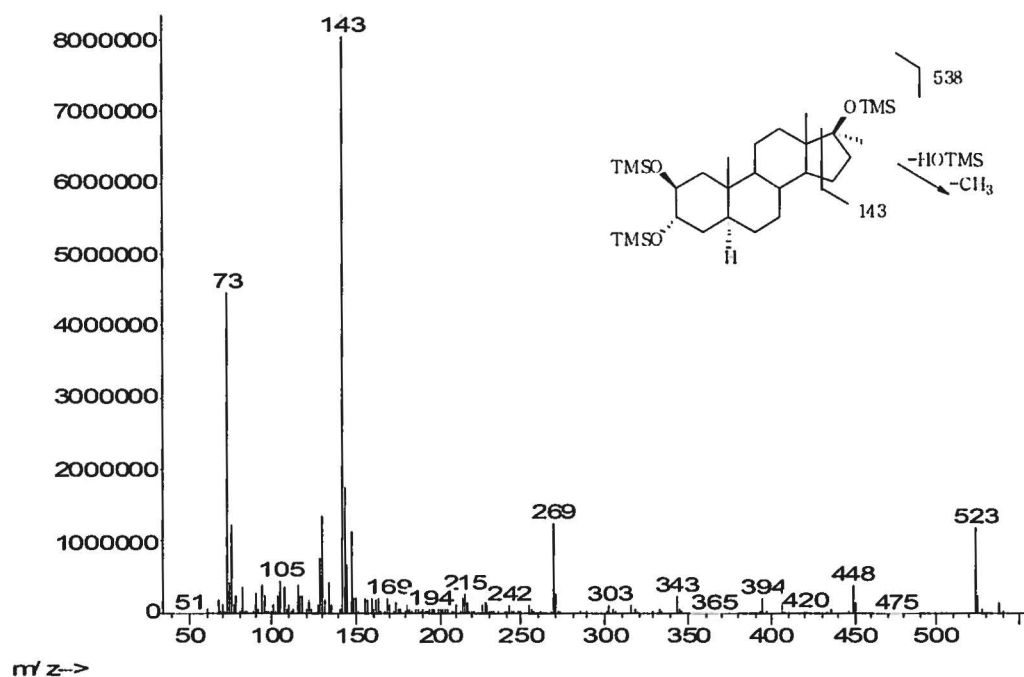


Figure 2.30: Mass spectrum of the TMS-derivative of 17 α -methyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76** ; **M4**).

The NMR, mass spectra and retention times were identical to metabolite M4, which confirms its structure. The HSQC NMR spectrum showed two signals at 71.77 and 70.56 ppm for the two carbon atoms C-2 and C-3, while their two protons formed quadruplets with respective chemical shifts of 3.87 (CH-3) and 3.91 (CH-2) in the NOESY NMR spectrum. These two protons in C-2 and C-3 being in an equatorial orientation, their coupling with their respective vicinal protons in C-1 and C-4 was shown to be of equal intensity, which would not have been the case, had it been in the axial configuration. Accordingly, in the ^1H NMR spectrum, the two quadruplets having a coupling constant inferior to 4 Hz suggests two equatorial protons in C-2 and C-3 [33].

DISCUSSION

The “hormonal” products containing DMT are in fact, mixtures of several steroids, some of closely related structure and of the same molecular weight.

The 2-en isomer of DMT is predominant but always accompanied by the 3-en isomer in varying proportions (5 to 8: 1), which reflects the composition of the precursor steroid employed for its synthesis and the stereoselectivity and purification of the 17-methylation reaction [1, 9]. Therefore, locating and identifying the specific metabolites in the urine matrix, which is itself complex, was rightly described as difficult [10]. Incubations with fresh hepatocytes and liver S9 fractions were most helpful in that regards, having been done with DMT of known purity from synthesis [1].

In humans, according to Rochenkov *et al.*, the urinary metabolites of DMT appeared to be mostly mono-hydroxylated with the double bond intact or fully reduced or dihydroxylated [10]. In fact, our results show that from the several compounds with mass spectra showing the expected molecular ions at m/z 450 and 448 (TMS derivatives), many were either metabolites of other steroids or already present in the starting material. Having compared the reference urine samples with incubation mixtures and considered the steroids present in the starting material analyzed, we concluded that the main glucuroconjugated metabolite attributed strictly to the DMT major 2-en isomer, was 17 α -methyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76** ; **M4**). The structure of the other isomer eluting earlier in the GC/MS chromatogram has not been characterized but is postulated to be the 3,4-diol arising from 3-en DMT. Another metabolite was exclusively sulfoconjugated and its characterization will be reported elsewhere.

The characterization of the main urinary glucuroconjugated metabolite of DMT (**7**) will enable its detection in athlete's samples. However, although the designer steroid itself could have been invisible to anti-doping controls, some of the other steroids present in the product such as methyltestosterone (**13**) and DHCMT (**15**) were most certainly picked up by the highly sensitive contemporary assays (LC or GC MSⁿ).

ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been carried out in part with the support of the World Anti-Doping Agency and of NSERC (Grant to Julie Gauthier). We are grateful to Pr John Templeton for the gift of precious reference steroids, to Cathy Copeland, Paul Loo and Philippe St-Amour of the Laboratory and Scientific Services Directorate of the Canada Border Services Agency for their contribution in uncovering DMT and providing preparations and to Celsis In Vitro Technologies for the gift of fresh human hepatocytes. The assistance of Philippe Räss and Patrick Allard for scaling up and purifying DMT main metabolite, of René Maltais and Marie-Claude Trottier with the chemical syntheses and NMR analyses is gratefully acknowledged.

References

1. Ayotte, C., Goudreault, D., Cyr, D., Gauthier, J., Ayotte, P., Larochelle, C., Poirier, D. Characterisation of chemical and pharmacological properties of new steroids related to doping of athletes. in Manfred Donike Workshop, 24th Cologne Workshop on Dope Analysis. 2006. Cologne.
2. WADA. WADA announces discovery of new designer steroid. 2005; Available from: <http://www.wada-ama.org/en/newsarticle.ch2?articleID=3115089>.
3. HealthCanada, Health Canada advises consumers not to use unauthorized products containing anabolic steroids. 2006, Health Canada: Ottawa.
4. Hartgens, F. and H. Kuipers, Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med*, 2004. **34**(8): p. 513-54.
5. Bahrke, M.S. and C.E. Yesalis, Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*, 2004. **4**(6): p. 614-20.
6. Kutscher, E.C., B.C. Lund, and P.J. Perry, Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med*, 2002. **32**(5): p. 285-96.
7. Diel, P., Friedel, A., Geyer, H., Kamber, M., Laudenschlager, U., Schanzer, W., Thevis, M., Vollmer, G., Zierau, O., Characterisation of the pharmacological profile of desoxymethyltestosterone (Madol), a steroid misused for doping. *Toxicol Lett*, 2007. **169**(1): p. 64-71.
8. WADA. 2006; Available from: http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Explanatory_Note_2006.pdf.
9. Sekera, M.H., Ahrens, B.D., Chang, Y.C. Starcevic, B., Georgakopoulos, C., Catlin, D.H. , Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005. **19**(6): p. 781-4.
10. Rodchenkov, G., T. Sobolevsky, and V. Sizoi. New Designer Anabolic Steroids from Internet. in Manfred Donike Workshop, 24th Cologne Workshop on Dope Analysis 2006. Cologne.
11. Kuuranne, T., Kurkela, M., Thevis, M., Schanzer, W., Finel, M., Kostiaainen, R., Glucuronidation of anabolic androgenic steroids by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 2003. **31**(9): p. 1117-24.

12. Kuuranne, T., Leinonen, A., Thevis, M., Schanzer, W., Pystynen, K.H., Kostiaainen, R. Metabolism of "new" anabolic steroids: Development of in vitro methodology in metabolite production and analytical techniques. in Manfred Donike Workshop 24th Cologne Workshop on Dope Analysis. 2006. Cologne.
13. Hintikka, L., Kuuranne, T., Aitio, O., Thevis, M., Schanzer, W., Kostiaainen, R., Enzyme-assisted synthesis and structure characterization of glucuronide conjugates of eleven anabolic steroid metabolites. *Steroids*, 2008. **73**(3): p. 257-65.
14. Rendic, S., E. Nolteernsting, and W. Schanzer, Metabolism of anabolic steroids by recombinant human cytochrome P450 enzymes. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999. **735**(1): p. 73-83.
15. Levesque, J.F., Gaudreault, M., Aubin, Y., Chauret, N., Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of new metabolites of norandrostenedione using in vitro systems. *Steroids*, 2005. **70**(4): p. 305-17.
16. Levesque, J.F., Gaudreault, M., Houle, R., Chauret, N., Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002. **780**(1): p. 145-53.
17. Levesque, J.F., Templeton, E., Trimble, L., Berthelette, C., Chauret, N., Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of metabolites of a doping agent and a direct analogue, tetrahydrogestrinone and gestrinone, using human hepatocytes. *Anal Chem*, 2005. **77**(10): p. 3164-72.
18. Gauthier, J., Goudreault, D., Poirier, D., Ayotte, C., Identification of drostanolone and 17-methyl drostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes. *Steroids*, 2009. **74**(3): p. 306-14.
19. Poirier, D., Maltais, R., Roy, J. 2-(N-substituted piperazinyl) steroid derivatives, WO 2010/060215 A1 (2010)
20. Celsis, I.V.T. Fresh Hepatocyte Suspension. 2007; Available from: <http://www.celsis.com/media/pdf/filelib/ps-fresh-human-animal-hepatocyte-suspensions.pdf>.
21. Celsis-In Vitro, T. Products > Cryopreserved Hepatocytes. Available from: http://www.invitrotech.com/cryo_hepatocytes.cfm

22. Ayotte, C., D. Goudreault, and A. Charlebois, Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996. **687**(1): p. 3-25.
23. Celsis, I.V.T. Human and Animal Liver S9. 2007; Available from: <http://www.celsis.com/media/pdf/filelib/ps-human-animal-s9.pdf>.
24. Ferraboschi, P., D. Colombo, and P. Prestileo, A convenient synthesis of oxandrolone through a regioselective *Candida antarctica* lipase-catalyzed transformation. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003. **14**(18): p. 2781-2785.
25. Counsell, R.E. and P.D. Klimstra, Anabolic Agents: Derivatives of 2-Halo 5alpha-Androst-1-Ene. *J Med Pharm Chem*, 1962. **91**: p. 477-83.
26. Klimstra, P.D., Optionnally 17-alkylated-3alpha-methyl- and derivatives thereof, U.S.P. Office, Editor. 1968: USA.
27. Tavares da Silva, E.J., Roleira, F.M.F., Sa e Melo, M.L., Campos Neves, A.S., Paixao, J.A., de Almeida, M.J., Silva, M.R., Andrade, L.C.R. , X-ray and deuterium labeling studies on the abnormal ring cleavages of a 5[beta]-epoxide precursor of formestane. *Steroids*, 2002. **67**(3-4): p. 311-319.
28. Klimstra, P.D., Optionnally 17-alkylated 17-oxygenated 5alpha-2-en-4-ones and intermediates thereto, U.S.P. Office, Editor. 1965: USA.
29. Masse, R., Bi, H.G., Ayotte, C., Dugal, R., Studies on Anabolic-Steroids .2. Gas-Chromatographic Mass-Spectrometric Characterization of Oxandrolone Urinary Metabolites in Man. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 1989. **18**(6): p. 429-438.
30. Cruz Silva, M.M., S. Riva, and M.L. Sá e Melo, Regioselective enzymatic acylation of vicinal diols of steroids. *Tetrahedron*, 2005. **61**(12): p. 3065-3073.
31. Horvath, A., Skoda-Foldes, R., Maho, S., Berente, Z., Kollar, L., Facile ring opening of 2,3-epoxy-steroids with aromatic amines in ionic liquids. *Steroids*, 2006. **71**(8): p. 706-11.
32. Santos, G.A., Murray, G.A., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Maier, M.S., Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2beta,3alpha-dihydroxy-5alpha-cholestane. *Steroids*, 2003. **68**(2): p. 125-32.

33. Karplus, M., Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 1963. **85**(18): p. 2870-2871.

2.4 Conclusion

Après des incubations infructueuses avec les hépatocytes humains cryopréservés, nous nous sommes tournés vers des hépatocytes humains frais pour étudier le métabolisme de la DMT. Ceci a permis d'obtenir des métabolites de cette substance, incluant celui décrit par Sekera *et al.* (Sekera *et al.*, 2005). Chez l'humain, Rochenkov *et al.* (Rodchenkov *et al.*, 2006) avaient proposé plusieurs métabolites urinaires de la DMT monohydroxylés dont la liaison double était ou non réduite et dihydroxylés. Aucune structure n'a été confirmée et des travaux que nous avons effectués sur les préparations commerciales suggèrent que plusieurs de ces métabolites provenaient d'autres stéroïdes présents dans le mélange initial consommés par les athlètes.

Suite aux incubations avec des cellules fraîches et aux analyses par spectrométrie de masse, des incubations à grande échelle avec des fractions subcellulaires S9 ont été menées et nous ont permis d'isoler le métabolite majeur en quantité suffisante pour en permettre l'analyse RMN. Nous avons ainsi pu proposer une structure pour ce métabolite dihydroxylé en position C-2 et C-3 provenant probablement de l'isomère 2-ène majoritaire de la DMT. Nous avons par la suite effectué la synthèse de ce métabolite ainsi que de métabolites mineurs en vue d'en confirmer la structure.

Ainsi, nous avons pu identifier le métabolite majeur de la DMT comme étant le 17 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76** ; **M4**) (voir figure 2.31). Ce métabolite est présent dans les urines de références sous forme glucuroconjuguée. Des métabolites monohydroxylés en position C-4 ont aussi été caractérisés. Ces travaux seront poursuivis pour permettre d'élucider la structure d'un second métabolite dihydroxylé pouvant être hydroxylé en C-3 et C-4 provenant de l'isomère 3-ène mineur présent dans les préparations illicites de DMT.

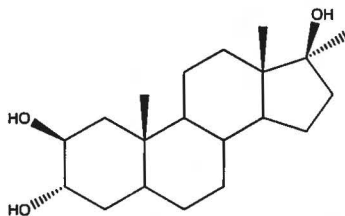


Figure 2.31 : Structure du métabolite proposé de la DMT : 17 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (76 ; M4)

La portée de ces travaux est concrète pour le dépistage de produits anabolisants dans les urines. En effet, lors de contrôles antidopage, un premier dépistage est fait dans les urines en recherchant par CG-SM des ions ou transitions précis propres aux substances recherchées. Dans le cas de la DMT, le produit de départ est excrété en très faible concentration durant les premières heures seulement ; sa recherche rendait donc la détection potentielle de l'utilisation à toute fin pratique inefficace. La caractérisation du métabolite majeur de la DMT permet maintenant d'en détecter l'administration.

**Chapitre 3 CONCLUSION ET CONTRIBUTIONS À L'AVANCEMENT
DES CONNAISSANCES**

Dans le cadre de ce projet, la structure de plusieurs métabolites de la drostanolone (6), la méthyl drostanolone (4) et la DMT (7) a été établie. Pour se faire, différents modèles *in vitro* tels que des hépatocytes humains cryopréservés et frais en suspension ont été utilisés. Suite à l'extraction des métabolites, des analyses par CG-SM de dérivés pertriméthylsilylés ont permis de proposer des structures pour ces produits. Lorsque nécessaire, des incubations à grande échelle ont ensuite été menées pour obtenir une quantité suffisante de métabolite d'intérêt et suite à l'isolation par chromatographie liquide, des analyses par résonance magnétique nucléaire ont été effectuées pour confirmer les structures proposées et permettre la synthèse chimique de ces structures.

Tout d'abord, dans le cas de la méthyl drostanolone (4), des incubations à l'aide d'hépatocytes humains cryopréservés ont permis de proposer des structures de métabolites monohydroxylés en position C-12 et C-16 par l'obtention de patrons de fragmentation caractéristiques. Les isomères du métabolite réduit en position C-3 ont été identifiés par réduction enzymatique à l'aide de la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase. Un métabolite hydroxylé sur le cycle A a aussi été observé, le spectre de masse obtenu suggérant une hydroxylation en position C-2. Suite à une incubation cellulaire à grande échelle avec la drostanolone (6) et une analyse RMN, l'hydroxylation en position C-2 a été confirmée, mais des travaux de synthèse ont été nécessaires pour établir la stéréochimie de ce métabolite comme étant la 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (74). D'autres synthèses ont été complétées pour une caractérisation des métabolites obtenus pour la drostanolone (6). Dans le cas de la méthyl drostanolone (4), les métabolites se trouvaient autant dans les incubations cellulaires d'hépatocytes cryopréservés que dans les urines positives.

Contrairement à la méthyl drostanolone (4) et à la drostanolone (6), aucun métabolisme significatif n'a été obtenu avec les cellules cryopréservées pour la DMT (7), menant à l'utilisation d'hépatocytes frais pour ce stéroïde.

Quelques métabolites dont un majeur dihydroxylé et quelques mineurs monohydroxylés ont été observés. Par les patrons de fragmentation caractéristiques, il a été possible de proposer un métabolite hydroxylé en position C-16 pour la DMT. Pour le second métabolite monohydroxylé, une fragmentation particulière du cycle B laissait croire à une hydroxylation du cycle A du stéroïde en position C-1 ou C-4. Une comparaison du spectre de masse de ce métabolite cétonique à celui de la 17 β -hydroxy-5 α -androst-(2,3)-èn-4-one (**78**) a montré une grande similitude et la synthèse de ce métabolite méthylé en C-17 a permis de confirmer la structure de ce métabolite et de son analogue réduit. La stéréochimie du groupement alcool en C-4 du métabolite réduit n'a par contre pas été établie.

Dans le cas du métabolite majeur de la DMT ayant un ion moléculaire à m/z 538, des incubations supplémentaires ont été nécessaires. Un modèle *in vitro* de fractions subcellulaires de foie humain a été utilisé pour produire une grande quantité de ce métabolite qui a par la suite été isolé par HPLC et analysé par RMN. Dû au déplacement chimique particulier des hydrogènes en position C-2 et C-3 du produit, il a été possible de proposer le 17 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane (**76**) comme métabolite. Celui-ci a été synthétisé, ce qui a permis d'en confirmer non seulement la structure, mais aussi la stéréochimie. La structure de ce métabolite majeur rapporté chez le babouin (Sekera *et al.*, 2005) et chez l'humain (Rodchenkov *et al.*, 2006) n'avait jamais été élucidée auparavant. La synthèse chimique de ce produit permet donc d'obtenir un standard et de confirmer sa présence dans des urines positives à la DMT.

Que ce soit avec les cellules hépatiques cryopréservées, fraîches ou les fractions subcellulaires S9, les modèles utilisés ont réellement permis d'obtenir une matrice d'analyse plus propre et de diminuer les interférences lors des analyses. L'urine contient beaucoup de métabolites endogènes, ce qui complique l'élucidation des structures de métabolites en moins grande concentration. Lors de l'analyse d'un spectre de masse, la présence de pics

provenant de fragments interférents rend difficile l'identification de fragments propres au métabolite d'intérêt. Non seulement l'utilisation des modèles *in vitro* facilite la détection de métabolite mineur grâce à une ligne de base plus stable, l'élucidation des spectres de masse est grandement facilitée.

De nombreuses contributions découlent de ce projet. La caractérisation et l'obtention de standards des métabolites de la méthyltestostérone (4), de la drostanolone (6) et de la DMT (7) permettent maintenant une détection de ces métabolites lors de dépistages de contrôles de dopage. Cette élucidation complète de la structure et de la stéréochimie des métabolites permet de mieux connaître les voies métaboliques de ces stéroïdes. De plus, ce projet a permis de développer l'utilisation de modèles *in vitro* hépatiques dans le but de réduire au minimum les études d'excrétion chez les volontaires humains ce qui est préférable dans le cas des nouveaux stéroïdes vu le manque d'information sur leur innocuité et leur toxicité. Dans le but de permettre l'élucidation des structures inconnues des métabolites, un très grand volume d'urine est généralement nécessaire, ce qui s'avère long et fastidieux. Ceci est évité en conduisant des incubations à grande échelle et en isolant par chromatographie en phase liquide le produit permettant de procéder à des analyses RMN.

Ces divers modèles se révèlent efficaces pour permettre une élucidation rapide de structures de métabolites, ceci étant un avantage majeur face aux nombreux produits de contrefaçon se retrouvant sur le marché et dont le but est d'être indétectables. Ces composés passent en effet inaperçus au dépistage jusqu'à ce qu'ils soient caractérisés et que leurs métabolites soient identifiés. Ces outils *in vitro* permettront donc ultimement de cibler plus rapidement les marqueurs métaboliques devant être utilisés pour la détection de l'utilisation illicite de SAA par les sportifs et d'ajouter ces substances au dépistage de produits dopants chez les athlètes.

Chapitre 4 RÉFÉRENCES

- Anderson, S., Luffer-Atlas, D., & Knadler, M. P. (2009). Predicting circulating human metabolites: how good are we? *Chem Res Toxicol*, 22(2), 243-256.
- Ansedé, J. H., & Thakker, D. R. (2004). High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism. *J Pharm Sci*, 93(2), 239-255.
- Agence Mondiale Antidopage (2009). Code mondial antidopage. from http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_FR.pdf
- Ayotte, C., Goudreault, D., & Charlebois, A. (1996). Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 687(1), 3-25.
- Ayotte, C., Goudreault, D., Cyr, D., Gauthier, J., Ayotte, P., Larochelle, C., & Poirier, D. (2006). *Characterisation of chemical and pharmacological properties of new steroids related to doping of athletes*. Paper presented at the Manfred Donike Workshop, 24th Cologne Workshop on Dope Analysis, Cologne.
- Bahrke, M. S., & Yesalis, C. E. (2004). Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*, 4(6), 614-620.
- Bain, J. (2007). The many faces of testosterone. *Clin Interv Aging*, 2(4), 567-576.
- Ballard, C. L., & Wood, R. I. (2005). Intracerebroventricular self-administration of commonly abused anabolic-androgenic steroids in male hamsters (*Mesocricetus auratus*): nandrolone, drostanolone, oxymetholone, and stanozolol. *Behav Neurosci*, 119(3), 752-758.
- Bauman, D. R., Steckelbroeck, S., & Penning, T. M. (2004). The roles of aldoketo reductases in steroid hormone action. *Drug News Perspect*, 17(9), 563-578.
- Benghuzzi, H., & Mohamed, A. (2007). The effects of androstenedione on renal tubule epithelial cells. *Biomed Sci Instrum*, 43, 63-68.
- Bennett, M. B., Helman, P., & Palmer, P. (1975). Hormonal therapy of breast cancer with special reference to Masteril therapy. *S Afr Med J*, 49(49), 2036-2040.
- Bernady, K. F., Floyd, M. B., Poletto, J. F., & Weiss, M. J. (1979). Prostaglandins and congeners. 20. Synthesis of prostaglandins via conjugate addition of lithium trans-1-alkenyltrialkylalanate reagents. A novel reagent for conjugate 1,4-additions. *The Journal of Organic Chemistry*, 44(9), 1438-1447.
- Bhasin, S., Woodhouse, L., & Storer, T. W. (2001). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol*, 170(1), 27-38.
- Botre, F., & Pavan, A. (2008). Enhancement drugs and the athlete. *Neurol Clin*, 26(1), 149-167; ix.
- Bowers, L. D., Clark, R. V., & Shackleton, C. H. (2009). A half-century of anabolic steroids in sport. *Steroids*, 74(3), 285-287.
- Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug

- biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 189(3), 233-246.
- Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L. S., & Guengerich, F. P. (1990). Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 29(51), 11280-11292.
- Brooks, C. J. W., Thawley, A. R., Rocher, P., Middleditch, B. S., Anthony, G. M., & Stillwell, W. G. (1971). Characterization of steroidal drug metabolites by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 9, 35-43.
- Brooks, R. V., Jeremiah, G., Webb, W. A., & Wheeler, M. (1979). Detection of anabolic steroid administration to athletes. *Journal of Steroid Biochemistry*, 11(1, Part 3), 913-917.
- Brower, K. J., Blow, F. C., Young, J. P., & Hill, E. M. (1991). Symptoms and correlates of anabolic-androgenic steroid dependence. *Br J Addict*, 86(6), 759-768.
- Buisson, C., Hebestreit, M., Weigert, A. P., Heinrich, K., Fry, H., Flenker, U., Banneke, S., Prevost, S., Andre, F., Schaezner, W., et al. (2005). Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17beta-estradiol administration to cattle. *J Chromatogr A*, 1093(1-2), 69-80.
- Butenandt, A., Hanisch G. (1935). *A Method for Preparing Testosterone from Cholesterol Ber. deutsch. Chem. Ga.*, 68, 1859.
- Casarett, L., Doull's, J. (2008). *Toxicology: the Basic Science of Poisons*: McGraw-Hill Compagny.
- Catlin, D. H., Ahrens, B. D., & Kucherova, Y. (2002). Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16(13), 1273-1275.
- Catlin, D. H., Sekera, M. H., Ahrens, B. D., Starcevic, B., Chang, Y. C., & Hatton, C. K. (2004). Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18(12), 1245-1049.
- Chang, C., Saltzman, A., Yeh, S., Young, W., Keller, E., Lee, H. J., Wang, C., & Mizokami, A. (1995). Androgen receptor: an overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 5(2), 97-125.
- Choi, M. H., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (2005). Characterization of testosterone 11 beta-hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos*, 33(6), 714-718.
- Clayton, R. B. (1962). Gas-Liquid Chromatography of Sterol Methyl Ethers and Some Correlations Between Molecular Structure and Retention Data. *Biochemistry*, 1(2), 357-366.
- Clouet-Dumas, A., Le Bizec, B., Le Pape, M., Maume, D., Monteau, F., & Andre, F. (2000). Biosynthesis of 6beta-hydroxymethyltestosterone using bovine hepatocyte cultures. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74(1-2), 57-62.
- Clouet, A. S., Le Bizec, B., Boerlen, F., Monteau, F., & Andre, F. (1998). Calf primary hepatocyte culture as a tool for anabolic steroid metabolism studies. *Analyst*, 123(12), 2489-2492.
- Coldham, N. G., Moore, A. S., Dave, M., Graham, P. J., Sivapathasundaram, S., Lake, B. G., & Sauer, M. J. (1995). Imidocarb residues in edible

- bovine tissues and in vitro assessment of imidocarb metabolism and cytotoxicity. *Drug Metab Dispos*, 23(4), 501-505.
- Coughtrie, M. W., & Johnston, L. E. (2001). Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metab Dispos*, 29(4 Pt 2), 522-528.
- Cross, A. D., Edwards, J. A., Orr, J. C., Berkoez, B., Cervantes, L., Calzada, M. C., & Bowers, A. (1963). Steroids. CCVI. Ring a Modified Hormone Analogs. II. 2-methylene androstanes and 2-methyl-delta-1,delta-2 and delta-3-androstenes. *J Med Chem*, 35, 162-166.
- Cross, D. M., & Bayliss, M. K. (2000). A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metab Rev*, 32(2), 219-240.
- Dalvie, D., Obach, R. S., Kang, P., Prakash, C., Loi, C. M., Hurst, S., Nedderman, A., Goulet, L., Smith, E., Bu, H. Z., *et al.* (2009). Assessment of three human in vitro systems in the generation of major human excretory and circulating metabolites. *Chem Res Toxicol*, 22(2), 357-368.
- David, K. (1935). *Acta Brev. Neerland.*, 5, 85 and 108.
- de Boer, D., de Jong, E. G., Maes, R. A., & van Rossum, J. M. (1992). The methyl-5 alpha-dihydrotestosterones mesterolone and drostanolone; gas chromatographic/mass spectrometric characterization of the urinary metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 42(3-4), 411-419.
- De Brabander, H. F., Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J. P., Verheyden, K., Mortier, V., Courtheyn, D., & Noppe, H. (2007). Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals. *J Mass Spectrom*, 42(8), 983-998.
- Delbeke, F. T., Desmet, N., & Debackere, M. (1995). The abuse of doping agents in competing body builders in Flanders (1988-1993). *Int J Sports Med*, 16(1), 66-70.
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*, 26(1), 51-78.
- Deventer, K., Eenoo, P. V., & Delbeke, F. T. (2006). Screening for anabolic steroids in doping analysis by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 20(5), 429-433.
- Deventer, K., Van Eenoo, P., Mikulcikova, P., Van Thuyne, W., & Delbeke, F. T. (2005). Quantitative analysis of androst-4-ene-3,6,17-trione and metabolites in human urine after the administration of a food supplement by liquid chromatography/ion trap-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 828(1-2), 21-26.
- Diekman, J., & Djerassi, C. (1967). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. *The Journal of Organic Chemistry*, 32(4), 1005-1012.
- Diekman, J., Thomson, J. B., & Djerassi, C. (1968). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CLV. Electron impact induced fragmentations and rearrangements of some trimethylsilyl ethers of aliphatic glycols, and related compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, 33(6), 2271-2284.

- Dodge, J. A., Trujillo, J. I., & Presnell, M. (1994). Effect of the acidic component on the Mitsunobu inversion of a sterically hindered alcohol. *The Journal of Organic Chemistry*, 59(1), 234-236.
- Donike, M. (1969). N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. *J Chromatogr*, 42, 103-104.
- Donike M, Z. J., BÄRWALD K-R, Schänzer W, Christ V, Klostermann K, Opfermann G. (1984). Routine-Bestimmung von Anabolika im Harn. *D. Z. Sportmed*, 1, 14-24.
- Dürbeck, H. W., & Büker, I. (1980). Studies on anabolic steroids. The mass spectra of 17alpha-methyl-17beta-hydroxy-1,4-androstadien-3-one (dianabol) and its metabolites. *Biological Mass Spectrometry*, 7(10), 437-445.
- Dürbeck, H. W., Büker, I., Scheulen, B., & Telin, B. (1983). GC and capillary column GC/MS determination of synthetic anabolic steroids. II. 4-chloro-methandienone (oral turinabol) and its metabolites. *Journal of Chromatographic Science*, 21(9), 405-410.
- Edlund, P. O., & Baranczewski, P. (2004). Identification of BVT.2938 metabolites by LC/MS and LC/MS/MS after in vitro incubations with liver microsomes and hepatocytes. *J Pharm Biomed Anal*, 34(5), 1079-1090.
- Edwards, J. A., Calzada, M. C., & Bowers, A. (1963). Steroids. CCIX. Ring A Modified Hormone Analogs. V. 2-methylene-3-oxygenated androstanes. *J Med Chem*, 35, 178-182.
- Eneroth, P., Hellstroem, K., & Ryhage, R. (1964). Identification and Quantification of Neutral Fecal Steroids by Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry: Studies of Human Excretion during Two Dietary Regimens. *J Lipid Res*, 5, 245-262.
- Engel, L. L., Alexander, J., & Wheeler, M. (1958). Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone. *J Biol Chem*, 231(1), 159-164.
- Erve, J. C., Vashishtha, S. C., Demaio, W., & Talaat, R. E. (2007). Metabolism of Prazosin in Rat, Dog and Human Liver Microsomes and Cryopreserved Rat and Human Hepatocytes and Characterization of Metabolites by Lc/Ms/Ms. *Drug Metab Dispos.*, 35(6), 908-916.
- Falany, C. N. (1991). Molecular enzymology of human liver cytosolic sulfotransferases. *Trends Pharmacol Sci*, 12(7), 255-259.
- Falany, C. N. (1997). Sulfation and sulfotransferases. Introduction: changing view of sulfation and the cytosolic sulfotransferases. *Faseb J*, 11(1), 1-2.
- Falany, C. N., Vazquez, M. E., & Kalb, J. M. (1989). Purification and characterization of human liver dehydroepiandrosterone sulphotransferase. *Biochem J*, 260(3), 641-646.
- Fang, H., Tong, W., Branham, W. S., Moland, C. L., Dial, S. L., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R., Owens, W., & Sheehan, D. M. (2003). Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem Res Toxicol*, 16(10), 1338-1358.
- Floby, E., Johansson, J., Hoogstraate, J., Hewitt, N. J., Hill, J., & Sohlenius-Sternbeck, A. K. (2009). Comparison of intrinsic metabolic clearance in fresh and cryopreserved human hepatocytes. *Xenobiotica*, 39(9), 656-662.

- Fotherby, K., James, F. (1972). Metabolism of Synthetic Steroids. In M. H. Briggs (Ed.), *Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology* (Vol. 3). New York.
- Fragkaki, Angelis, Y., Koupparis, M., Tsantili-Kakoulidou, A., Kokotos, G., & Georgakopoulos, C. (2009). Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids*, 74(2), 172-197.
- Fragkaki, Angelis, Y., Tsantili-Kakoulidou, A., Koupparis, M., & Georgakopoulos, C. (2009). Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer steroids in human urine. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 115(1-2), 44-61.
- Franke, W. W., & Berendonk, B. (1997). Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. *Clin Chem*, 43(7), 1262-1279.
- Gauthier, J., Goudreault, D., Poirier, D., & Ayotte, C. (2009). Identification of drostanolone and 17-methyldrostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes. *Steroids*, 74(3), 306-314.
- Giannitrapani, L., Soresi, M., La Spada, E., Cervello, M., D'Alessandro, N., & Montalto, G. (2006). Sex hormones and risk of liver tumor. *Ann N Y Acad Sci*, 1089, 228-236.
- Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V., & Donato, M. T. (2007). Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact*, 168(1), 30-50.
- Goudreault, D., Ayotte, C. (1995). *Investigation of Mesterolone Urinary Metabolites by GC/MS*. Paper presented at the 13th Cologne Workshop on Dope Analysis 12th to 17th March 1995, Cologne.
- Goudreault, D., & Massé, R. (1990). Studies on anabolic steroids--4. Identification of new urinary metabolites of methenolone acetate (Primobolan) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37(1), 137-154.
- Goudreault, D., & Massé, R. (1991). Studies on anabolic steroids--6. Identification of urinary metabolites of stenbolone acetate (17 beta-acetoxy-2-methyl-5 alpha-androst-1-en-3-one) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 38(5), 639-655.
- Graham, M. R., Davies, B., Grace, F. M., Kicman, A., & Baker, J. S. (2008). Anabolic steroid use: patterns of use and detection of doping. *Sports Med*, 38(6), 505-525.
- Griffiths, W. J. (2003). Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. *Mass Spectrom Rev*, 22(2), 81-152.
- Guay, C., Goudreault, D., Schanzer, W., Flenker, U., & Ayotte, C. (2009). Excretion of norsteroids' phase II metabolites of different origin in human. *Steroids*, 74(3), 350-358.
- Guillouzo, A., Rialland, L., Fautrel, A., & Guyomard, C. (1999). Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact*, 121(1), 7-16.
- Gustafsson, J., & Lisboa, B. (1970). Studies on the metabolism of C19 steroids in rat liver. 6-Alpha hydroxylation of 3-oxo-delta 4-steroids in rat liver microsomes. *Eur J Biochem*, 12(2), 369-374.

- Gustafsson, J. A., & Lisboa, B. P. (1970). Studies on the metabolism of C19 steroids in rat liver. 6. Hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione in rat liver microsomes. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 65(1), 84-94.
- Gustafsson, J. A., Lisboa, B. P., & Sjoval, J. (1968). Studies on the metabolism of C19-steroids in rat liver. 3. Isolation and biosynthesis of 5 α -androstanetriols in rat liver microsomes. *Eur J Biochem*, 6(2), 317-324.
- Gustafsson, J. A., & Pousette, A. (1975). Demonstration of partial characterization of cytosol receptors for testosterone. *Biochemistry*, 14(14), 3094-3101.
- Hageloch, W., Appell, H. J., & Weicker, H. (1988). [Rhabdomyolysis in a bodybuilder using anabolic steroids]. *Sportverletz Sportschaden*, 2(3), 122-125.
- Hallifax, D., Rawden, H. C., Hakooz, N., & Houston, J. B. (2005). Prediction of metabolic clearance using cryopreserved human hepatocytes: kinetic characteristics for five benzodiazepines. *Drug Metab Dispos*, 33(12), 1852-1858.
- HAMPL, R., & Stárka, L. (1979). Practical aspects of screening of anabolic steroids in doping control with particular accent to nortestosterone radioimmunoassay using mixed antisera. *Journal of Steroid Biochemistry*, 11(1, Part 3), 933-936.
- Hartgens, F., & Kuipers, H. (2004). Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med*, 34(8), 513-554.
- HealthCanada. (2006). Health Canada advises consumers not to use unauthorized products containing anabolic steroids. Ottawa: Health Canada.
- Helman, P., & Bennett, M. B. (1972). Hormone therapy of breast cancer with special reference to masteril therapy. *S Afr Med J*, 46(34), 1195-1199.
- Hengstler, J. G., Ringel, M., Biefang, K., Hammel, S., Milbert, U., Gerl, M., Klebach, M., Diener, B., Platt, K. L., Bottger, T., *et al.* (2000). Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. *Chem Biol Interact*, 125(1), 51-73.
- Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K. L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., *et al.* (2000). Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev*, 32(1), 81-118.
- Hintikka, L., Kuuranne, T., Aitio, O., Thevis, M., Schanzer, W., & Kostianen, R. (2008). Enzyme-assisted synthesis and structure characterization of glucuronide conjugates of eleven anabolic steroid metabolites. *Steroids*, 73(3), 257-265.
- Hiroi, T., Kishimoto, W., Chow, T., Imaoka, S., Igarashi, T., & Funae, Y. (2001). Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. *Endocrinology*, 142(9), 3901-3908.
- Hooijerink, D., Schilt, R., Hoogenboom, R., & Huveneers-Oorsprong, M. (1998). Identification of metabolites of the anabolic steroid methandienone formed by bovine hepatocytes in vitro. *Analyst*, 123(12), 2637-2641.
- Houghton, E., Ginn, A., Teale, P., Dumasia, M. C., & Copsey, J. (1989). Comparison of the use of mass spectrometry and methylene unit values

- in the determination of the stereochemistry of estranediol, the major urinary metabolite of 19-nortestosterone in the horse. *Journal Chromatogr A*, 479, 73-83.
- Huffman MN, L. F. I. (1961). 17 alpha lower alkyl-2-androsten-17 beta-ol In U. Patent (Ed.) (Vol. 2996524).
- Impens, S., Van Loco, J., Degroot, J. M., & De Brabander, H. (2007). A downscaled multi-residue strategy for detection of anabolic steroids in bovine urine using gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS3). *Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), 43-48.
- Jasiurkowski, B., Raj, J., Wisinger, D., Carlson, R., Zou, L., & Nadir, A. (2006). Cholestatic Jaundice and IgA Nephropathy Induced by OTC Muscle Building Agent Superdrol. *Am J Gastroenterol*, 101(11), 2659-2662.
- Jin, Y., & Penning, T. M. (2001). Steroid 5alpha-reductases and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 15(1), 79-94.
- Jockenhövel, F., Bullmann, C., Schubert, M., Vogel, E., Reinhardt, W., Reinwein, D., Müller-Wieland, D., & Krone, W. (1999). Influence of various modes of androgen substitution on serum lipids and lipoproteins in hypogonadal men. *Metabolism*, 48(5), 590-596.
- Kam, P. C., & Yarrow, M. (2005). Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia*, 60(7), 685-692.
- Kennedy, M. C., & Lawrence, C. (1993). Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust*, 158(5), 346-348.
- Kicman, A. T. (2008). Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*, 154(3), 502-521.
- Kicman, A. T., & Gower, D. B. (2003). Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann Clin Biochem*, 40(Pt 4), 321-356.
- Kincl, F., & Dorfman, R. (1963). *Acta Endocrinol, Supplement*, 73, 3.
- King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., & Tephly, T. R. (2000). UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab*, 1(2), 143-161.
- Knights, B. A., & Thomas, G. H. (1962). Effect of Substituents of Relative Retention Times in Gas Chromatography of Steroids. *Analytical Chemistry*, 34(9), 1046-1048.
- Komura, H., & Iwaki, M. (2008). Species differences in in vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A substrates. *J Pharm Sci*, 97(5), 1775-1800.
- Kremers, P., Beaune, P., Cresteil, T., de Graeve, J., Columelli, S., Leroux, J. P., & Gielen, J. E. (1981). Cytochrome P-450 monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Eur J Biochem*, 118(3), 599-606.
- Krieg, M., & Voigt, K. D. (1976). In vitro binding and metabolism of androgens in various organs: a comparative study. *Journal of Steroid Biochemistry*, 7(11-12), 1005-1012.
- Kuhn, C. M. (2002). Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res*, 57, 411-434.
- Kushnir, M. M., Rockwood, A. L., & Bergquist, J. (2010). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrometry Rev*, 29(3), 480-502.

- Kutscher, E. C., Lund, B. C., & Perry, P. J. (2002). Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med*, 32(5), 285-296.
- Kuuranne, T., Kurkela, M., Thevis, M., Schanzer, W., Finel, M., & Kostianen, R. (2003). Glucuronidation of anabolic androgenic steroids by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 31(9), 1117-1124.
- Kuuranne, T., Leinonen, A., Thevis, M., Schanzer, W., Pystynen, K., & Kostianen, R. (2006). *Metabolism of "new" anabolic steroids: Development of in vitro methodology in metabolite production and analytical techniques*. Paper presented at the Manfred Donike Workshop 24th Cologne Workshop on Dope Analysis, Cologne.
- Laqueur, L., David K., Dingemans E. and Freud J. (1935). *Acta Brev. Neerland.*, 5, 84.
- Lee, A. J., Mills, L. H., Kosh, J. W., Conney, A. H., & Zhu, B. T. (2002). NADPH-dependent metabolism of estrone by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 838-849.
- Lévesque, J.-F., Ayotte, C. (1999). *The Oral Administration of DHEA: the Efficiency of Steroid Profiling*. Paper presented at the 17th Cologne Workshop on Dope Analysis 14th to 19th March 1999, Cologne.
- Lévesque, J. F., Gaudreault, M., Aubin, Y., & Chauret, N. (2005). Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of new metabolites of norandrostenedione using in vitro systems. *Steroids*, 70(4), 305-317.
- Lévesque, J. F., Gaudreault, M., Houle, R., & Chauret, N. (2002). Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 780(1), 145-153.
- Lévesque, J. F., Templeton, E., Trimble, L., Berthelette, C., & Chauret, N. (2005). Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of metabolites of a doping agent and a direct analogue, tetrahydrogestrinone and gestrinone, using human hepatocytes. *Analytical Chemistry*, 77(10), 3164-3172.
- Levsen, K., Schiebel, H. M., Behnke, B., Dotzer, R., Dreher, W., Elend, M., & Thiele, H. (2005). Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *J Chromatogr A*, 1067(1-2), 55-72.
- Lewis, D. F., Ioannides, C., & Parke, D. V. (1998). Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ Health Perspect*, 106(10), 633-641.
- Li, A. P. (2001). Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today*, 6(7), 357-366.
- Li, A. P. (2007). Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact*, 168(1), 16-29.
- Li, A. P. (2008). Human hepatocytes as an effective alternative experimental system for the evaluation of human drug properties: general concepts and assay procedures. *ALTEX*, 25(1), 33-42.
- Li, A. P., & Albert, P. L. (1997). Primary Hepatocyte Cultures as an in Vitro Experimental Model for the Evaluation of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions. In *Advances in Pharmacology* (Vol. Volume 43, pp. 103-130): Academic Press.

- Li, A. P., Gorycki, P. D., Hengstler, J. G., Kedderis, G. L., Koebe, H. G., Rahmani, R., de Sousas, G., Silva, J. M., & Skett, P. (1999). Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact*, *121*(1), 117-123.
- Li, A. P., Lu, C., Brent, J. A., Pham, C., Fackett, A., Ruegg, C. E., & Silber, P. M. (1999). Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem Biol Interact*, *121*(1), 17-35.
- Lisboa, B. P., & Gustafsson, J. A. (1970). Studies on the metabolism of steroids in the foetus. Biosynthesis of 3-hydroxy-delta 4-C19 steroids in the human foetal liver. *Eur J Biochem*, *14*(3), 556-559.
- Lisboa, B. P., Gustafsson, J. A., & Sjovall, J. (1968). Studies on the metabolism of C19-steroids in rat liver. I. Hydroxylation of testosterone in rat liver microsomes. *Eur J Biochem*, *4*(4), 496-505.
- Lootens, L., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., & Van Eenoo, P. (2011). Metabolic studies with promagnon, methylclostebol and methasterone in the uPA+/-SCID chimeric mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *127*(3-5), 374-381.
- Lootens, L., Meuleman, P., Pozo, O. J., Van Eenoo, P., Leroux-Roels, G., & Delbeke, F. T. (2009). uPA+/-SCID Mouse with Humanized Liver as a Model for In Vivo Metabolism of Exogenous Steroids: Methandienone as a Case Study. *Clin Chem*, *55*(10), 1783-1793.
- Lootens, L., Van Eenoo, P., Meuleman, P., Pozo, O. J., Van Renterghem, P., Leroux-Roels, G., & Delbeke, F. T. (2009). Steroid metabolism in chimeric mice with humanized liver. *Drug Testing and Analysis*, *1*(11-12), 531-537.
- Lukacik, P., Kavanagh, K. L., & Oppermann, U. (2006). Structure and function of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, *248*(1-2), 61-71.
- Mackenzie, P. I., Rodbourne, L., & Stranks, S. (1992). Steroid UDP glucuronosyltransferases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *43*(8), 1099-1105.
- Madea, B., & Grellner, W. (1998). Long-term cardiovascular effects of anabolic steroids. *Lancet*, *352*(9121), 33.
- Maravelias, C., Dona, A., Stefanidou, M., & Spiliopoulou, C. (2005). Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett*, *158*(3), 167-175.
- Massé, R., & Goudreault, D. (1992). Studies on anabolic steroids--11. 18-hydroxylated metabolites of mesterolone, methenolone and stenbolone: new steroids isolated from human urine. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *42*(3-4), 399-410.
- Maurer, H. H. (2004). Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin Chem Lab Med*, *42*(11), 1310-1324.
- Maurer, H. H., Kraemer, T., Springer, D., & Staack, R. F. (2004). Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: a synopsis. *Ther Drug Monit*, *26*(2), 127-131.

- McCloskey, J. A., Stillwell, R. N., & Lawson, A. M. (1968). Use of deuterium-labeled trimethylsilyl derivatives in mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 40(1), 233-236.
- Merlanti, R., Gallina, G., Capolongo, F., Contiero, L., Biancotto, G., Dacasto, M., & Montesissa, C. (2007). An in vitro study on metabolism of 17[beta]-boldenone and boldione using cattle liver and kidney subcellular fractions. *Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), 177-183.
- Middleditch, B. S., Vouros, P., & Brooks, C. J. (1973). Mass spectrometry in the analysis of steroid drugs and their metabolites: electron-impact-induced fragmentation of ring D. *J Pharm Pharmacol*, 25(2), 143-149.
- Moss, G. P. (1989). Nomenclature of steroids (Recommendations 1989). *Pure and Applied Chemistry*, 61(10), 1783-1822.
- Mottram, D. R., & George, A. J. (2000). Anabolic steroids. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 14(1), 55-69.
- Muntane, J. (2009). Regulation of drug metabolism and transporters. *Curr Drug Metab*, 10(8), 932-945.
- Nasr, J., & Ahmad, J. (2009). Severe cholestasis and renal failure associated with the use of the designer steroid Superdrol (methasteron): a case report and literature review. *Dig Dis Sci*, 54(5), 1144-1146.
- Nieminen, M. S., Ramo, M. P., Viitasalo, M., Heikkila, P., Karjalainen, J., Mantysaari, M., & Heikkila, J. (1996). Serious cardiovascular side effects of large doses of anabolic steroids in weight lifters. *Eur Heart J*, 17(10), 1576-1583.
- Niwa, T., Yabusaki, Y., Honma, K., Matsuo, N., Tatsuta, K., Ishibashi, F., & Katagiri, M. (1998). Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica*, 28, 539-547.
- Okano, M., Sato, M., Ikekita, A., & Kageyama, S. (2009). Analysis of non-ketotic steroids 17alpha-methylepithiostanol and desoxymethyltestosterone in dietary supplements. *Drug Testing and Analysis*, 1(11-12), 518-525.
- Ostrowska, A., Bode, D. C., Pruss, J., Bilir, B., Smith, G. D., & Zeisloft, S. (2000). Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. *Cell Tissue Bank*, 1(1), 55-68.
- Parr, M. K., Flenker, U., & Schänzer, W. (2010). Sports-Related Issues and Biochemistry of Natural and Synthetic Anabolic Substances. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 39(1), 45-57.
- Parr, M. K., Fuscholler, G., Schlorer, N., Opfermann, G., Piper, T., Rodchenkov, G., & Schanzer, W. (2009). Metabolism of androsta-1,4,6-triene-3,17-dione and detection by gas chromatography/mass spectrometry in doping control. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23(2), 207-218.
- Parr, M. K., Gutschow, M., Daniels, J., Opfermann, G., Thevis, M., & Schanzer, W. (2009). Identification of steroid isoxazole isomers marketed as designer supplement. *Steroids*, 74(3), 322-328.
- Pereira de Jesus-Tran, K., Cote, P. L., Cantin, L., Blanchet, J., Labrie, F., & Breton, R. (2006). Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists

- reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci*, 15(5), 987-999.
- Pozo, O. J., Lootens, L., Van Eenoo, P., Deventer, K., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., Parr, M. K., Schänzer, W., & Delbeke, F. T. (2009). Combination of liquid-chromatography tandem mass spectrometry in different scan modes with human and chimeric mouse urine for the study of steroid metabolism. *Drug Testing and Analysis*, 1(11-12), 554-567.
- Quaglio, G., Fornasiero, A., Mezzelani, P., Moreschini, S., Lugoboni, F., & Lechi, A. (2009). Anabolic steroids: dependence and complications of chronic use. *Intern Emerg Med.*, 4(4), 289-296.
- Radomska, A., Comer, K. A., Zimniak, P., Falany, J., Iscan, M., & Falany, C. N. (1990). Human liver steroid sulphotransferase sulphates bile acids. *Biochem J*, 272(3), 597-604.
- Rentic, S., Nolteernsting, E., & Schanzer, W. (1999). Metabolism of anabolic steroids by recombinant human cytochrome P450 enzymes. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 735(1), 73-83.
- Ringold, H. J., Batres, E., Halpern, O., & Necochea, E. (1959). Steroids. CV.1 2-Methyl and 2-Hydroxymethylene-androstane Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 81(2), 427-432.
- Ringold, H. J., & Rosenkranz, G. (1956). Communications - Steroids. LXXIII. Synthesis of 2-Methyl and 2,2-Dimethyl Hormone Analogs. *The Journal of Organic Chemistry*, 21(11), 1333-1335.
- Rodchenkov, G., Sobolevsky, T., & Sizoi, V. (2006). *New Designer Anabolic Steroids from Internet*. Paper presented at the Manfred Donike Workshop, 24th Cologne Workshop on Dope Analysis Cologne.
- Rongone, E. L., & Segaloff, A. (1962). Isolation of urinary metabolites of 17alpha-methyltestosterone. *J Biol Chem*, 237, 1066-1067.
- Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 63, 25-61.
- Ruzicka, L., Wettstein, . (1935). *Sexualhormone VII. Uber die kunstliche Herstellung des Testikelhormons*. Testosteron (Androsten-3-one-17-ol.). *Helv. Chim. Acta.*, 18, 1264.
- Saunders, W. B. (1982). Fundamentals of Clinical Chemistry. In N. Witiets (Ed.), (pp. 1263). Philadelphia.
- Scarth, J. P., Clarke, A. D., Teale, P., & Pearce, C. M. (2010). Comparative in vitro metabolism of the 'designer' steroid estra-4,9-diene-3,17-dione between the equine, canine and human: Identification of target metabolites for use in sports doping control. *Steroids*, 75(10), 643-652.
- Scarth, J. P., Spencer, H. A., Hudson, S. C., Teale, P., Gray, B. P., & Hillyer, L. L. (2010). The application of in vitro technologies to study the metabolism of the androgenic/anabolic steroid stanozolol in the equine. *Steroids*, 75(1), 57-69.
- Schänzer, W. (1996). Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem*, 42(7), 1001-1020.
- Schänzer, W., & Donike, M. (1993). Metabolism of Anabolic-Steroids in Man - Synthesis and Use of Reference Substances for Identification of

- Anabolic-Steroid Metabolites. *Analytica Chimica Acta*, 275(1-2), 23-48.
- Schänzer, W., Geyer, H., & Donike, M. (1991). Metabolism of metandienone in man: identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas chromatographic-mass spectrometric identification of bis-hydroxylated metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 38(4), 441-464.
- Schänzer, W., Opfermann, G., & Donike, M. (1990). Metabolism of stanozolol: identification and synthesis of urinary metabolites. *Journal Steroid Biochemistry*, 36(1-2), 153-174.
- Schänzer, W., Opfermann, G., & Donike, M. (1992). 17-Epimerization of 17 alpha-methyl anabolic steroids in humans: metabolism and synthesis of 17 alpha-hydroxy-17 beta-methyl steroids. *Steroids*, 57(11), 537-550.
- Schubert, K., & Schumann, G. (1970). [Metabolism of steroid drugs. 3. Excretion of tritium-labelled 4-chloro-17 alpha-methyl-17 beta-hydroxy-1,4-androstadiene-3-one and its metabolites in humans]. *Endokrinologie*, 56(1), 1-10.
- Segura, J., Ventura, R., & Jurado, C. (1998). Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 713(1), 61-90.
- Sekera, M. H., Ahrens, B. D., Chang, Y. C., Starcevic, B., Georgakopoulos, C., & Catlin, D. H. (2005). Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19(6), 781-784.
- Shahidi, N. T. (2001). A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther*, 23(9), 1355-1390.
- Sinz, M. W. (1999). In Vitro Metabolism: Hepatocytes. In T. Woolf (Ed.), *Handbook of Drug Metabolism*. NY: Marcel DEKKER Inc.
- Sjoqvist, F., Garle, M., & Rane, A. (2008). Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet*, 371(9627), 1872-1882.
- Sjovall, J., & Vihko, R. (1966). Identification of 3-beta, 17-beta-dihydroxyandrost-5-ene, 3-beta, 20-alpha-dihydroxypregn-5-ene and epiandrosterone in human peripheral blood. *Steroids*, 7(5), 447-458.
- Skett, P., Roberts, P., & Khan, S. (1999). Maintenance of steroid metabolism and hormone responsiveness in cryopreserved dog, monkey and human hepatocytes. *Chem Biol Interact*, 121(1), 65-76.
- Skett, P., Tyson, C., Guillouzo, A., & Maier, P. (1995). Report on the international workshop on the use of human in vitro liver preparations to study drug metabolism in drug development. Held at Utrecht, The Netherlands, 6-8 September 1994. *Biochem Pharmacol*, 50(2), 280-285.
- Sloan, S., Harvey, D. J., & Vouros, P. (1971). Interaction and rearrangement of trimethylsilyloxy functional groups. The structural significance of the m/e 147 ion in the mass spectra of trimethylsil steroidal ethers. *Organic Mass Spectrometry*, 5(7), 789-799.
- Soars, M. G., McGinnity, D. F., Grime, K., & Riley, R. J. (2007). The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Chem Biol Interact*, 168(1), 2-15.

- Soars, M. G., Riley, R. J., Findlay, K. A., Coffey, M. J., & Burchell, B. (2001). Evidence for significant differences in microsomal drug glucuronidation by canine and human liver and kidney. *Drug Metab Dispos*, 29(2), 121-126.
- Staack, R. F., & Hopfgartner, G. (2007). New analytical strategies in studying drug metabolism. *Anal Bioanal Chem*, 388(7), 1365-1380.
- Steckelbroeck, S., Jin, Y., Gopishetty, S., Oyesanmi, B., & Penning, T. M. (2004). Human cytosolic 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J Biol Chem*, 279(11), 10784-10795.
- Strahm, E., Saudan, C., Sottas, P. E., Mangin, P., & Saugy, M. (2007). Direct detection and quantification of 19-norandrosterone sulfate in human urine by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 852(1-2), 491-496.
- Sullivan, M. L., Martinez, C. M., Gennis, P., & Gallagher, E. J. (1998). The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis*, 41(1), 1-15.
- Sundaram, K., Kumar, N., Monder, C., & Bardin, C. W. (1995). Different patterns of metabolism determine the relative anabolic activity of 19-norandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53(1-6), 253-257.
- Takahashi, M., Tatsugi, Y., & Kohno, T. (2004). Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocr J*, 51(4), 425-434.
- Taskinen, J., Ethell, B. T., Pihlavisto, P., Hood, A. M., Burchell, B., & Coughtrie, M. W. (2003). Conjugation of catechols by recombinant human sulfotransferases, UDP-glucuronosyltransferases, and soluble catechol O-methyltransferase: structure-conjugation relationships and predictive models. *Drug Metab Dispos*, 31(9), 1187-1197.
- Teller, M. N., Stock, C. C., Bowie, M., Chou, T. C., & Budinger, J. M. (1982). Therapy of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinomas with combinations of 5-fluorouracil and 2 alpha-methyl-dihydrotestosterone propionate. *Cancer Res*, 42(11), 4408-4412.
- Templeton, J. F., & Kim, R. S. (1977). Metabolism of 17beta-hydroxy-2alpha-methyl-5alpha-androstan-3-one in the rabbit. *Steroids*, 29(3), 371-381.
- Tephly, T. R., & Burchell, B. (1990). UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol Sci*, 11(7), 276-279.
- Thevis, M., Thomas, A., Kohler, M., Beuck, S., & Schanzer, W. (2009). Emerging drugs: mechanism of action, mass spectrometry and doping control analysis. *J Mass Spectrom*, 44(4), 442-460.
- Thiblin, I., Mobini-Far, H., & Frisk, M. (2009). Sudden unexpected death in a female fitness athlete, with a possible connection to the use of anabolic androgenic steroids (AAS) and ephedrine. *Forensic Sci Int*, 184(1-3), e7-11.
- Thummel, K. E., Kunze, K. L., & Shen, D. D. (1997). Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 27(2-3), 99-127.
- Toth, M., & Zakar, T. (1982). Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 alpha-reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins: a suggested role of 5 alpha-reductive steroid metabolism in the dissociation of "myotropic"

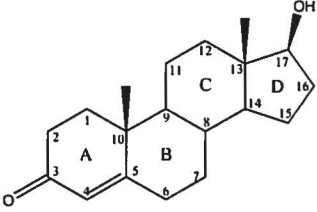
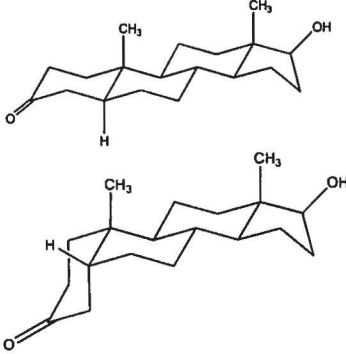
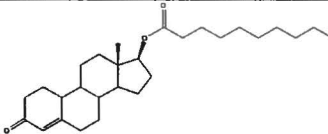
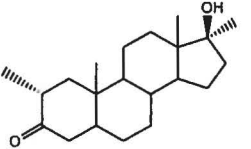
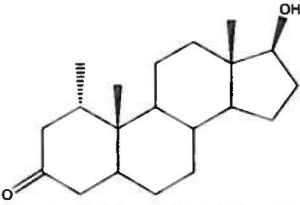
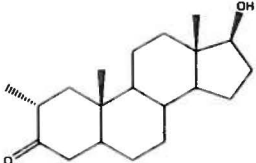
- and "androgenic" activities of 19-nortestosterone. *Journal Steroid Biochemistry*, 17(6), 653-660.
- Tseng, Y. L., Sun, C. Y., & Kuo, F. H. (2006). Detection and quantification of glucuro- and sulfoconjugated metabolites in human urine following oral administration of xenobiotic 19-norsteroids. *Steroids*, 71(9), 817-827.
- Turgeon, D., Carrier, J.-S., Levesque, E., Hum, D. W., & Belanger, A. (2001). Relative Enzymatic Activity, Protein Stability, and Tissue Distribution of Human Steroid-Metabolizing UGT2B Subfamily Members. *Endocrinology*, 142(2), 778-787.
- Van Eenoo, P., & Delbeke, F. T. (2003). The Prevalence of Doping in Flanders in Comparison to the Prevalence of Doping in International Sports. *Int J Sports Med*, 24(08), 565-570.
- van Herwaarden, A. E., van Waterschoot, R. A. B., & Schinkel, A. H. (2009). How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? *Trends in Pharmacol Sci*, 30(5), 223-227.
- Van Poucke, C., Van De Velde, M., & Van Peteghem, C. (2005). Combination of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry for the detection of 21 anabolic steroid residues in bovine urine. *J Mass Spectrom*, 40(6), 731-738.
- Van Puymbroeck, M., Kuilman, M. E., Maas, R. F., Witkamp, R. F., Leysens, L., Vanderzande, D., Gelan, J., & Raus, J. (1998). In vitro liver models are important tools to monitor the abuse of anabolic steroids in cattle. *Analyst*, 123(12), 2453-2456.
- Verslycke, T., De Wasch, K., De Brabander, H. F., & Janssen, C. R. (2002). Testosterone metabolism in the estuarine mysid neomysis integer (Crustacea; Mysidacea): identification of testosterone metabolites and endogenous vertebrate-type steroids. *Gen Comp Endocrinol*, 126(2), 190-199.
- Voet, D. V. J. (1998). *Biochemistry*: De Boeck Université. Paris.
- Wang, B., Sanchez, R. I., Franklin, R. B., Evans, D. C., & Huskey, S. E. (2004). The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 alpha-ethinylestradiol. *Drug Metab Dispos*, 32(11), 1209-1212.
- Wang, C., & Swedloff, R. S. (2003). Androgen Pharmacology and Delivery Systems. In C. J. Bagatell, Bremner, W.J. (Ed.), *Androgens in Health and Disease* (pp. 141-153). New Jersey: Humana Press.
- Wang, G., Hsieh, Y., Cui, X., Cheng, K. C., & Korfmacher, W. A. (2006). Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of testosterone and its metabolites in in vitro samples. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20(14), 2215-2221.
- Weinshilboum, R. M., Otterness, D. M., Aksoy, I. A., Wood, T. C., Her, C., & Raftogianis, R. B. (1997). Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *Faseb J*, 11(1), 3-14.
- Wilson, J. D. (2001). The role of 5 alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reprod Fertil Dev*, 13(7-8), 673-678.
- Wolf, S. E., Thomas, S. J., Dasu, M. R., Ferrando, A. A., Chinkes, D. L., Wolfe, R. R., & Herndon, D. N. (2003). Improved net protein balance, lean mass, and gene expression changes with oxandrolone treatment in the severely burned. *Ann Surg*, 237(6), 801-810; discussion 810-801.

- Woodard, T. L., Burghen, G. A., Kitabchi, A. E., & Wilimas, J. A. (1981). Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Aplastic Anemia Treated with Oxymetholone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 53(5), 905-908.
- Wu, F. C. (1997). Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem*, 43(7), 1289-1292.
- Yamazaki, H., & Shimada, T. (1997). Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 346(1), 161-169.
- Yoon, C. N., Lee, T. H., & Park, J. (1990). Mass spectrometry of methyl and methyl-d3 derivatives of diuretic agents. *J Anal Toxicol*, 14(2), 96-101.
- Zielinski, W. L., Johnston, K., & Muschik, G. M. (1976). Nematic liquid crystal for gas-liquid chromatographic separation of steroid epimers. *Analytical Chemistry*, 48(6), 907-911.
- Zuber, R., Anzenbacherova, E., & Anzenbacher, P. (2002). Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med*, 6(2), 189-198.

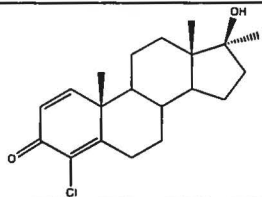
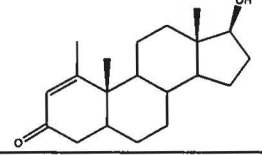
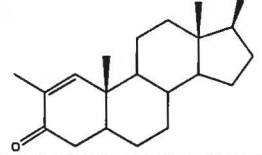
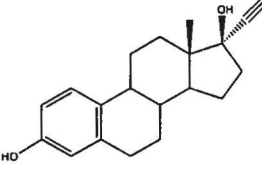
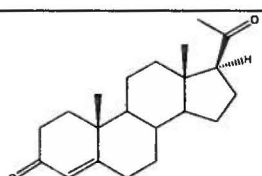
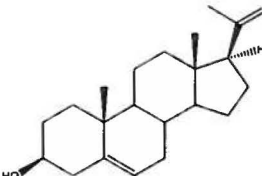
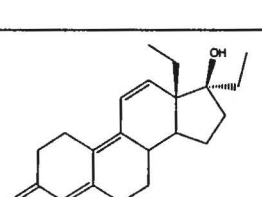
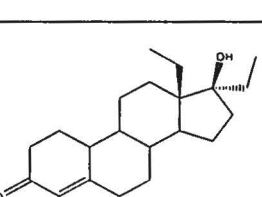
Annexes

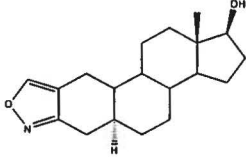
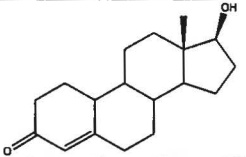
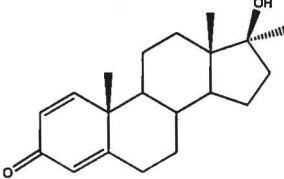
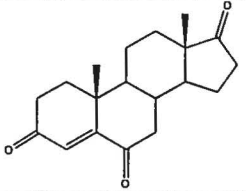
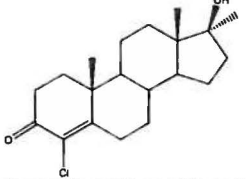
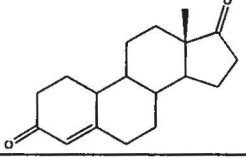
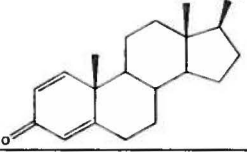
Annexe A

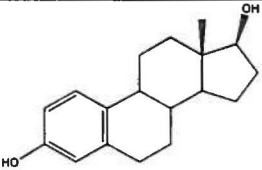
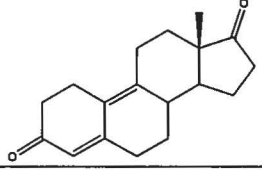
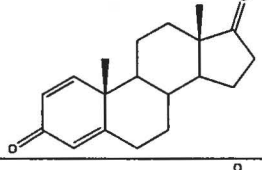
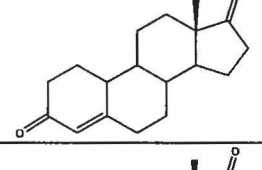
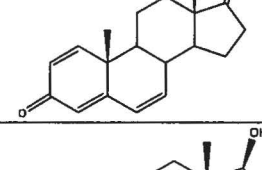
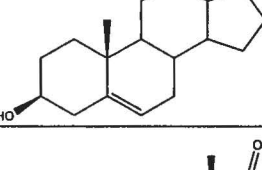
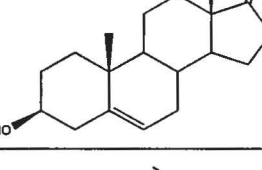
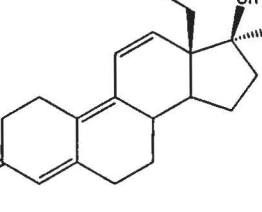
Structures des stéroïdes présentés dans la thèse

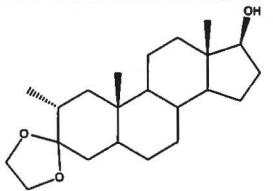
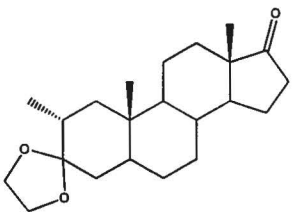
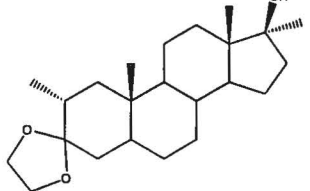
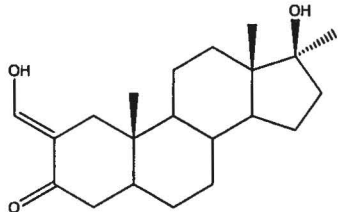
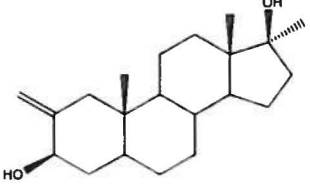
| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------------------|---|---|
| 1 | Testostérone | 17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one |  |
| 2 | Dihydrotestostérone | 17 β -hydroxy-5-androstan-3-one |  |
| 3 | décanoate de nandrolone | 17 β -hydroxydécanoate-estr-4-èn-3-one |  |
| 4 | Méthyldrostanolone | 17 β -hydroxy-2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-3-one |  |
| 5 | Mestérolone | 17 β -hydroxy-1 α -méthyl-5 α -androstan-3-one |  |
| 6 | Drostanolone | 17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-3-one |  |

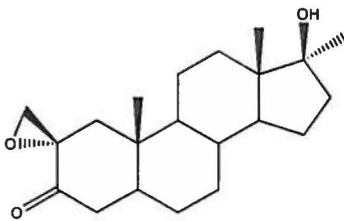
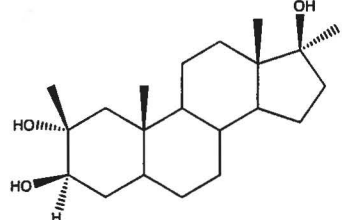
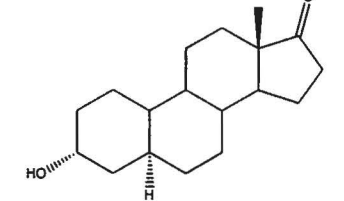
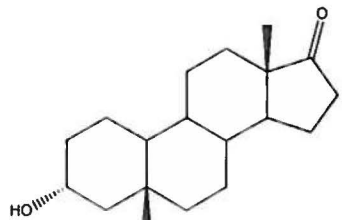
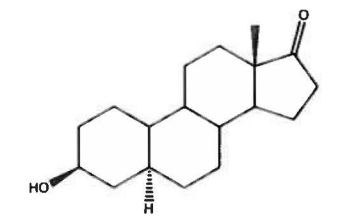
| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|--|--|------------|
| 7 | Désoxyméthyltestostérone DMT, madol | 17 β -hydroxy-17 α -méthyl-5 α -androst-2-ène | |
| 8 | Clostébol | 4-chloro-17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one | |
| 9 | Mibolérone | 7 α ,17 α -diméthyl-17 β -hydroxy-estr-4-èn-3-one | |
| 10 | Stanozolol | 17 β -hydroxy-17 α -méthyl-5 α -androst-2-eno[3,2-c]pyrazole | |
| 11 | Prostanozolol | | |
| 12 | androstènedione | androst-4-èn-3,17-dione | |
| 13 | 17 α -méthyltestostérone | 17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one | |
| 14 | Estrone | | |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|--------------------------------|--|---|
| 15 | | 4-chloro-1,2-dehydro-17 α -méthyltestostérone |  |
| 16 | Méthénolone | 17 β -hydroxy-1-méthyl-5 α -androst-1-èn-3-one |  |
| 17 | Stenbolone | 17 β -hydroxy-2-méthyl-5 α -androst-1-en-3-one |  |
| 18 | éthinyloestradiol | 3,17 β -dihydroxy-17 α -éthynyl-estr-1,3,5(10)-triène |  |
| 19 | Progestérone | pregn-4-èn-3,20-dione |  |
| 20 | Prégnénolone | 3 β -hydrox-pregn-5-èn-20-one |  |
| 21 | Tétrahydrogestri- none, THG | 17 β -hydroxy-18 α -homo-pregna-4,9,11-trièn-3-one |  |
| 22 | Norboléthone | 18,19-dinor-13-éthyl-17-hydroxy-17 α -pregn-4-èn-3-one |  |

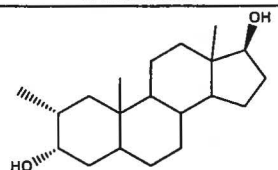
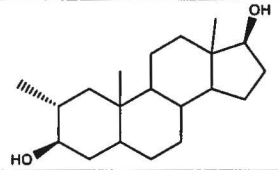
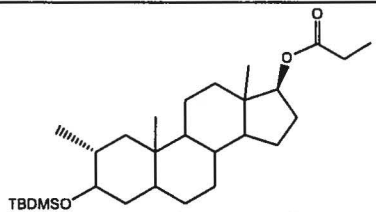
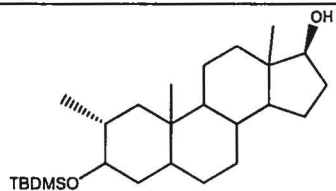
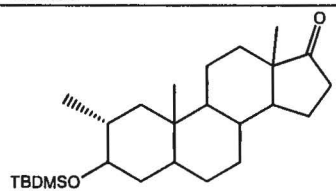
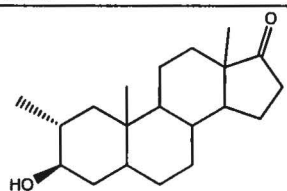
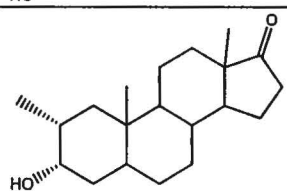
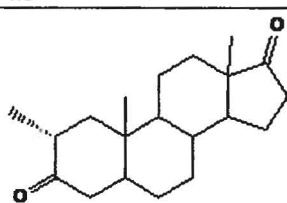
| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|--------------------|---|---|
| 23 | | 17 β -hydroxyandrostanol(3,2-c)isoxazole |  |
| 24 | 19-nortestostérone | 17 β -hydroxyestra-4-en-3-one |  |
| 25 | Méthandiène | 17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-1,4-diène-3-one |  |
| 26 | | androst-4-ène-3,6,17-trione |  |
| 27 | Méthylclostebol | 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-ène-3-one |  |
| 28 | | 19-norandrost-4-ène-3,17-dione |  |
| 29 | Boldénone | 17 β -hydroxyandrost-1,4-diène-3-one |  |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|------------------------|---|--|
| 30 | Estradiol | 3,17 β -dihydroxy-estr-1,3,5-triène |  |
| 31 | | estra-4,9-diène-3,17-dione |  |
| 32 | Boldione | androst-1,4-dièn-3,17-dione |  |
| 33 | Norandrostènedi-one | estr-4-ène-3,17-dione |  |
| 34 | | androsta-1,4,6-triène-3,17-dione |  |
| 35 | Androstènediol | 3 β ,17 β -dihydroxy-androst-5-ène |  |
| 36 | Déhydroépiandrosterone | 3 β -hydroxy-5-androstèn-17-one |  |
| 37 | Gestrinone | 13-éthyl-17 β -hydroxy-18,19-dinorpregna-4,9,11-trien-20-yn-3-one |  |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|--------------|--|--|
| 38 | | 3,3-Ethylenedioxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17 β -ol |  |
| 39 | | 3,3-Ethylenedioxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one |  |
| 40 | | 3,3-Ethylenedioxy-2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-17 β -ol |  |
| 41 | oxymetholone | 17 β -hydroxy-2-hydroxyméthylène-17 α -méthyl-5 α -androstan-3-one |  |
| 42 | | 2-Méthylène-17 α -methyl-5 α -androstan-3 β ,17 β -diol |  |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-----------------------|---|---|
| 43 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-2-oxirane-5 α -androstan-3-one |  The structure shows a steroid nucleus with a ketone group at C-3, a methyl group at C-10, and an epoxide ring at C-2. A methyl group is attached to C-17, and a hydroxyl group is attached to C-17 with a dashed bond. |
| 44 | | 2 β ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-2 α ,3 β ,17 β -triol |  The structure shows a steroid nucleus with methyl groups at C-10 and C-17. Hydroxyl groups are attached at C-2, C-3, and C-17. The hydroxyl groups at C-2 and C-3 are on dashed bonds, while the hydroxyl group at C-17 is on a wedged bond. |
| 45 | 19-norandrosterone | 3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one |  The structure shows a steroid nucleus with a ketone group at C-17 and a hydroxyl group at C-3. A methyl group is at C-10, and a hydrogen atom is at C-5 with a dashed bond. |
| 46 | 19-noretiocholanolone | 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one |  The structure shows a steroid nucleus with a ketone group at C-17 and a hydroxyl group at C-3. A methyl group is at C-10, and a hydrogen atom is at C-5 with a wedged bond. |
| 47 | 19-norepiandrosterone | 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one |  The structure shows a steroid nucleus with a ketone group at C-17 and a hydroxyl group at C-3. A methyl group is at C-10, and a hydrogen atom is at C-5 with a dashed bond. |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|---|------------|
| 48 | | 2 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-ol | |
| 49 | | 2 α -hydroxymethyl-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one | |
| 50 | | 2 α -hydroxymethyl-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-ol | |
| 51 | | 2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstan-3-one | |
| 52 | | 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane | |
| 53 | | 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane | |

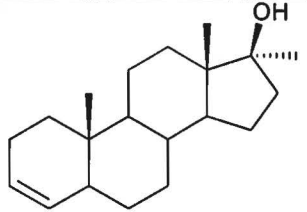
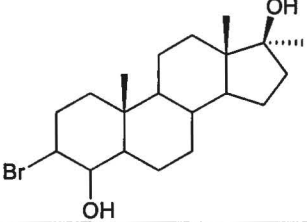
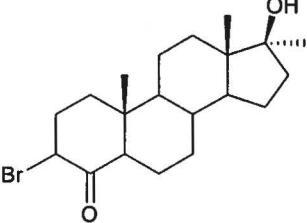
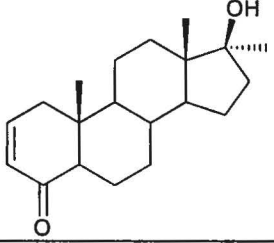
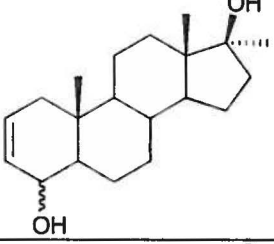
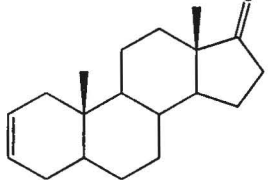
| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|--|---|
| 54 | | 3 α ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane |  |
| 55 | | 3 β ,17 β -dihydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane |  |
| 56 | | 3- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-17 β -oxypropanoyl-5 α -androstane |  |
| 57 | | 3- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy-17 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstane |  |
| 58 | | 3- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one |  |
| 59 | | 3 β -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one |  |
| 60 | | 3 α -hydroxy-2 α -méthyl-5 α -androstan-17-one |  |
| 61 | | 2 α -méthyl-5 α -androstane-3,17-dione |  |

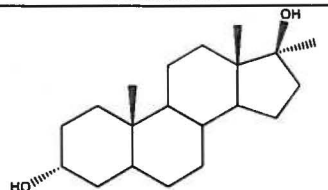
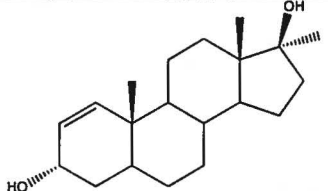
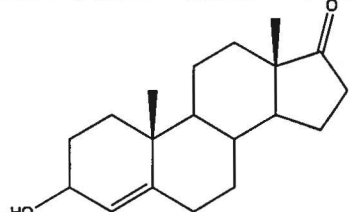
| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|---|------------|
| 62 | | 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one | |
| 63 | | 17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstan-3-one | |
| 64 | | 2-hydroxyméthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstan-3-one | |
| 65 | | 3 β -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstan-3-one | |
| 66 | | 66a) 3 β -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstan-3-one | |
| 67 | | 2 α ,3 β -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyranyloxy-5 α -androstan-3-one | |
| 68 | | 2 β -méthyl-2 α ,3 β ,17 β -trihydroxy-5 α -androstan-3-one | |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|---|------------|
| 69 | | 2-méthylène-3 α -paranitrobenzoyl-17 β -tétrahydropyraniloxy-5 α -androstane | |
| 70 | | 3 α -hydroxy-2-méthylène-17 β -tétrahydropyraniloxy-5 α -androstane | |
| 71 | | 71a) 3 α -hydroxy-2 α -spirooxirane-17 β -tétrahydropyraniloxy-5 α -androstane | |
| 72 | | 2 α ,3 α -dihydroxy-2 β -méthyl-17 β -tétrahydropyraniloxy-5 α -androstane | |
| 73 | | 2 β -méthyl-2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane | |
| 74 | | 2 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane | |
| 75 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-2,3 α -spirooxirane-5 α -androstane | |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|--|------------|
| 76 | | 17 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane | |
| 77 | | 17 β -acetyloxy-5 α -androst-2-en-4-one | |
| 78 | | 17 β -hydroxy-5 α -androst-2-en-4-one | |
| 79 | | 4 ξ ,17 β -diacetyloxy-5 α -androst-2-ene | |
| 80 | | 4 ξ ,17 β -dihydroxy-5 α -androst-2-ene | |
| 81 | | 3 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane | |
| 82 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one | |

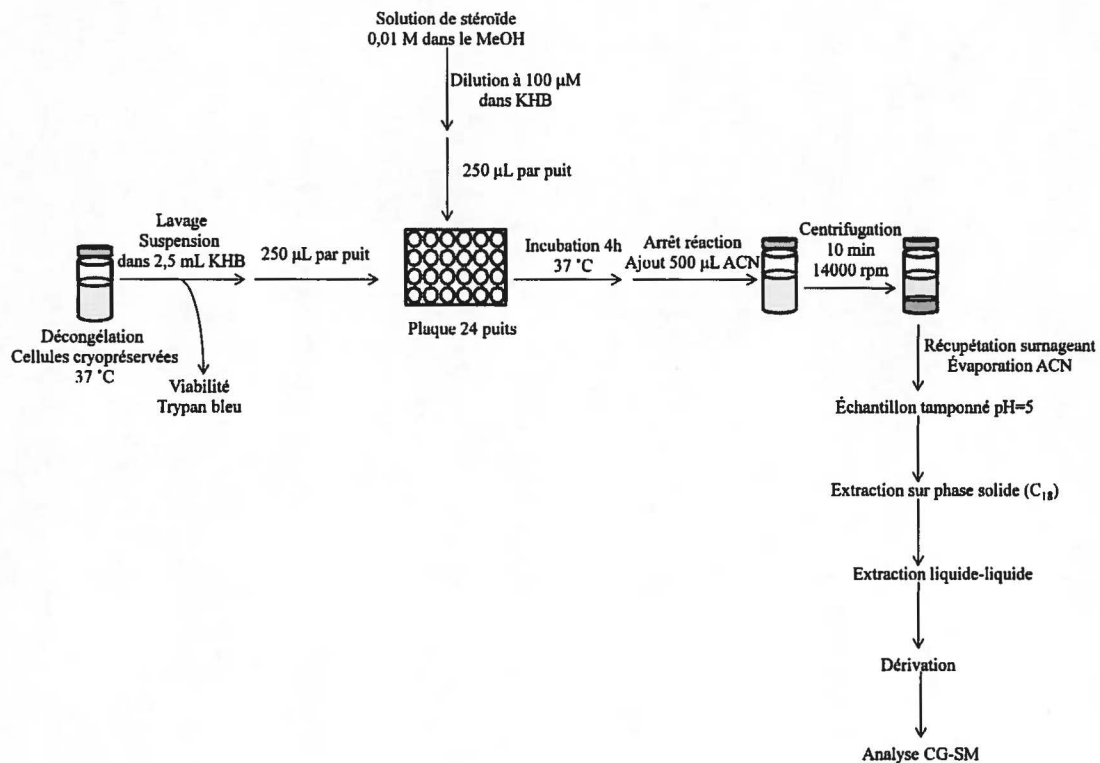
| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|--|------------|
| 83 | | 2 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-one | |
| 84 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-en-3-one | |
| 85 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-1 α ,2 α -spirooxirane-5 α -androst-3-one | |
| 86 | | 1 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene | |
| 87 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-en-1-one | |
| 88 | | 1 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-2-ene | |
| 89 | | Androst-3-en-17-one | |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|---|---|
| 90 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-3-ene |  |
| 91 | | 3 α -bromo-4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstanane |  |
| 92 | | 3 α -bromo-17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-4-one |  |
| 93 | | 17 β -hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-2-en-4-one |  |
| 94 | | 4 ξ ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan-2-ene |  |
| 95 | | 5 α -androst-2-en-17-one |  |

| Numéros | Noms usuels | Noms UIPAC | Structures |
|---------|-------------|---|---|
| 96 | | 3 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstane |  |
| 97 | | 3 α ,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androst-1-ene |  |
| 98 | | 3-hydroxy-5-androst-4-ene-17-one |  |

Annexe B :

Schéma des manipulations pour la production de métabolites à l'aide d'hépatocytes cryopréservés



Annexe C :

Spectre RMN du métabolite 17 α -méthyl-2 β ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstane
(76)

