

SYNTHESE D'ANALOGUES DEUTERIÉS  
DES (5 $\alpha$ ) ANDROSTANEDIOL - 3  $\xi$ , 17  $\beta$

F. JACOLOT<sup>\*</sup>, F. BERTHOU<sup>\*</sup>, D. PICART<sup>\*</sup>,  
J.Y. LE GALL<sup>+</sup> et H.H. FLOCH<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Service de Biochimie, E.R.A C.N.R.S. n° 784:  
Faculté de Médecine de BREST.

<sup>+</sup> Service de Résonance Magnétique Nucléaire, Faculté  
des Sciences de BREST.

SUMMARY

Six deuterated androstane diols were synthesised. The position of deuterium atoms on the molecule were checked by mass spectrometry and <sup>1</sup>H or <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. The per cent of d<sub>0</sub>, d<sub>1</sub>, ... d<sub>n</sub>-molecules were calculated.

The use of such labelled molecules in the fields of isotopic dilution-mass fragmentography as carriers and/or internal standards is discussed.

## INTRODUCTION

Depuis que la spectrométrie de masse quantitative couplée à la chromatographie en phase gazeuse a été reconnue comme technique de référence (1) dans le contrôle de qualité des dosages des stéroïdes hormonaux, la préparation de stéroïdes enrichis en isotopes stables est devenue une nécessité. De telles molécules jouent le rôle d'entraîneur (2), éventuellement d'étalon interne (3).

Cette étude porte sur la synthèse d'analogues deutériés des (5 $\alpha$ ) androstanediol - 3  $\xi$ , 17  $\beta$ . En effet, le dosage de ces composés dans le torrent circulatoire est envisagé dans le but de compléter les informations fournies par leur dosage urinaire (4). De plus, si de tels stéroïdes ont été évalués dans le plasma par radioimmunologie (5 - 10), il reste à valider de tels résultats par une méthode de référence.

Les molécules marquées aux isotopes stables doivent être d'une grande pureté isotopique. Le marquage au deutérium a été préféré au  $^{13}\text{C}$  en raison de sa mise en oeuvre facile et d'une bonne pureté isotopique des composés synthétisés. Les composés marqués au  $^{14}\text{C}$  n'ont pas été retenus, bien qu'ils soient disponibles commercialement, du fait de leur enrichissement insuffisant.

Le marquage isotopique par le deutérium peut être réalisé de deux manières :

- sur le squelette de la molécule, soit par échange isotopique (11) soit par réaction chimique à l'aide de réactifs marqués au deutérium.
- lors de la dérivation nécessaire pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Dans le premier cas, on obtient un analogue marqué du produit naturel à doser. Dès lors, il peut être ajouté dans le plasma et permettre la correction des pertes lors des étapes de purification de l'extrait biologique et de quantification par fragmentographie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG - FM). Il joue alors le double rôle d'entraîneur et d'étalon interne appelé dans ce cas étalon interne primaire.

Dans le second cas, l'entraîneur ne peut plus jouer son rôle lors des pertes préalables à la quantification (extraction et purification). Utilisé comme entraîneur-étalon interne, il sera dit étalon interne secondaire.

Les concentrations plasmatiques des androstanediols non conjugués oscillant entre la picomole et la nanomole par ml de plasma (5 - 10) la première méthode a été préférée. Des androstanediols porteurs de 2,3 ou 4 atomes de deutérium par molécule ont été synthétisés par réduction chimique :

- de fonction cétone en 3 et 17, à l'aide de borodeutérure de sodium en milieu dioxane/eau lourde.
- d'insaturation en position 5 par le deutérium en présence d'oxyde de platine .
- d'insaturation en position 1 grâce au deutérium en présence de réactif de WILKINSON.

Deux androstanediols marqués en position 19 par 3 atomes de deutérium ont été obtenus par réduction de la 19-d<sub>3</sub> androstène-4 dione-3,17.

Dans un second temps, le marquage de ces molécules a été vérifié par spectrométrie de masse d'une part, et par résonance magnétique nucléaire du proton pour les androstanediols 19- d<sub>3</sub> et du <sup>13</sup>C pour les stéroïdes marqués sur les positions 3,5,6 ou 17, d'autre part.

Enfin la pureté isotopique de ces composés a été calculée dans le but de choisir la molécule marquée répondant le mieux aux critères d'un bon entraîneur (12) pour le dosage des androstanediols plasmatiques.

## SYNTHESE

### I - MATERIEL ET METHODES

#### - Stéroïdes

La (5 $\alpha$ ) androstanedione-3,17 , l'androstène-5 diol-3 $\beta$ ,17 $\beta$  et l'hydroxy-3 $\alpha$  androstèn-5 one-17 sont d'origine commerciale (MERCK, Darmstadt, RFA). L'hydroxy-17 $\beta$  (5 $\alpha$ ) androstèn-1 one - 3 est un don du Dr COLLET (Collège de France).

La 19 - d<sub>3</sub> androstène-4 dione-3,17 a été synthétisée par DYER et HARROW (13) à partir de l'acide dioxo-3,17 androstèn-4 oïque-19 (SEARLE and Co Ltd. ENGLAND).

#### - Solvants

Les solvants utilisés sont de marque MERCK, qualité "pour analyses", excepté l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane (UCB - BELGIQUE). Le méthanol et l'éthanol (PROLABO) sont redistillés au laboratoire.

- Réactifs

Les réactifs utilisés lors des deutériations sont d'origine commerciale :

- deutérium gazeux (AIR LIQUIDE, teneur en deutérium : 99,4 % )
- borodeutérure de sodium (MERCK, pureté : 98 %)
- eau lourde (BIORAD LABORATORIES, teneur en  $D_2O$  : 99,8 %).
- acide acétique ( D - 4 ) (MERCK, 99 % de produit deutérié)

- Chromatographie

- Chromatographie sur colonne

L'alumine utilisée dans la préparation des colonnes est un produit MERCK, degré d'activation II, III selon BROCKMAN.

- Chromatographie sur plaques (CCM)

La chromatographie sur couche mince est réalisée sur des plaques prêtes à l'emploi Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, épaisseur du gel : 0,25 mm (MERCK) excepté lors des chromatographies préparatives (plaques réalisées au laboratoire à l'aide de Kieselgel HF<sub>254</sub> + 366 type 60 (MERCK), l'épaisseur du gel étant de 1 mm).

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Deux systèmes ont été utilisés pour vérifier la pureté des composés deutériés, soit en cours de synthèse, soit au stade final :

Système A : chromatographe PYE UNICAM, modèle 104, colonne capillaire OV - 101 (50 m x 0,3 mm) épaisseur de film  $e_f = 0,37 \mu m$  ; rapport de phase  $\beta = 200$  ; température d'analyse : 250 °C ; gaz vecteur : hydrogène.

Système B : chromatographe CARLO ERBA, modèle 2300, colonne capillaire SE - 52 (24 m x 0,3 mm)  $e_f = 0,11 \mu m$  ;  $\beta = 666$  ; température d'analyse : 220 °C ; gaz vecteur : hydrogène.

- Points de fusion

Les points de fusion des androstanediols naturels et marqués ont été déterminés sur un microscope à point de fusion.

- Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse des androstanediols sous forme de dérivés éther bistriméthyl silyloxy (bis TMS) ont été réalisés sur un spectromètre de masse AEI - MS 30 (Manchester - ENGLAND) : énergie d'ionisation : 24 ev ; courant d'ionisation 100  $\mu$ A , résolution 1000, le spectromètre de masse étant couplé à un chromatographe en phase gazeuse PYE UNICAM modèle 104.

- Résonance magnétique nucléaire- RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ 

Les spectres de résonance magnétique nucléaire des androstanediols naturels et marqués ont été réalisés sur un spectromètre JEOL FX 60 (Tokyo JAPON), équipé d'une sonde mixte  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  pour les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$ , et JEOL FX 100 pour les spectres de RMN du proton.

II - DEUTERIATIONS

Les voies de synthèse suivantes ont été envisagées afin d'obtenir des molécules porteuses de 2,3 ou 4 atomes de deutérium.

. 1 $\alpha$ ,3 $\alpha$  -d $_2$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ ,17 $\beta$  (Figure 1)

L'hydroxy-17 $\beta$  (5 $\alpha$ ) androstèn-1 one-3 est soumis à l'action du deutérium gazeux en présence de tris(triphényl phosphine) chloro rhodium (réactif de WILKINSON). En solution homogène, l'addition de deutérium est une cis-addition. L'attaque a lieu du côté  $\alpha$  de la molécule conduisant à un stéroïde 1 $\alpha$  , 2 $\alpha$  -dideutéié ainsi que l'ont montré DJERASSI et GUTZWILLER (14).

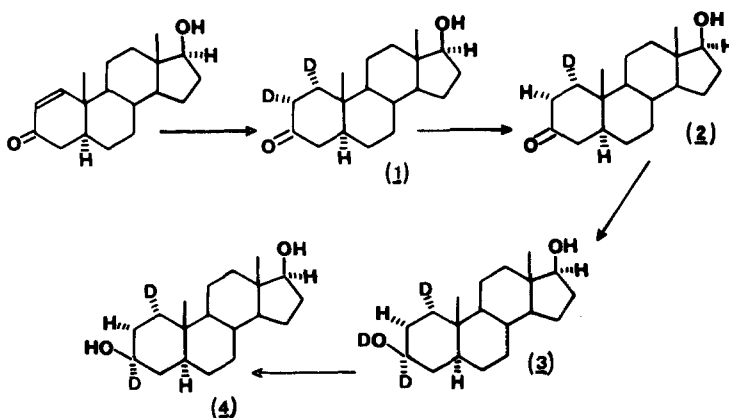


Figure 1 : Synthèse du 1 $\alpha$ ,3 $\alpha$  -d $_2$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ ,17 $\beta$

Le deutérium fixé en position 2 $\alpha$ , en  $\alpha$  d'une fonction cétone, est de ce fait plus labile que l'atome de deutérium fixé en position 1 (**15**). Lors de l'échange isotopique, le deutérium en position 2 est libéré, conduisant au 1 $\alpha$ -d<sub>1</sub> hydroxy-17 $\beta$  (5 $\alpha$ ) androstanone-3. La fixation d'un atome de deutérium en 3 $\alpha$  est réalisée par réduction de la fonction cétone en 3 par le borodeutérure de sodium en milieu dioxanne/D<sub>2</sub>O. La dernière étape de la synthèse consiste en un échange isotopique en présence de potasse méthanolique de tous les atomes de deutérium labiles de la molécule afin de se prévaloir au maximum de tout échange isotopique lors des différentes étapes du dosage.

. 3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (Figure 2)

L'obtention du 3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  est réalisée par réduction au borodeutérure de sodium en milieu dioxanne/D<sub>2</sub>O de la dione-3, 17 correspondante, suivie d'un échange isotopique.

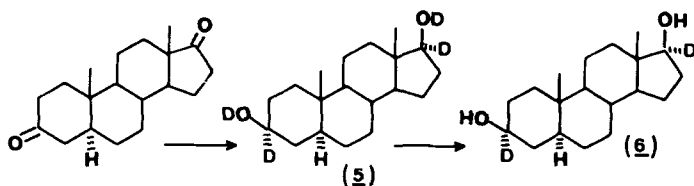
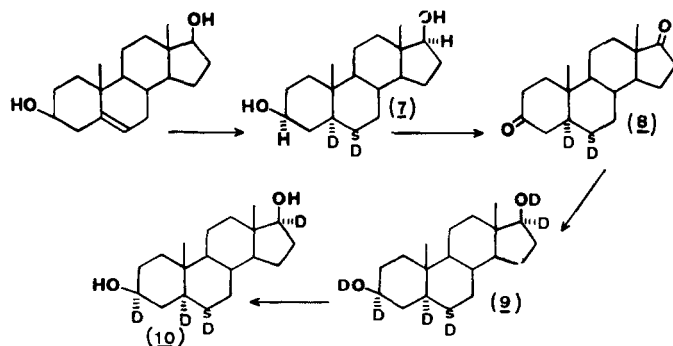


Figure 2 : Synthèse du 3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$

. 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$ -d<sub>4</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (Figure 3)

L'insaturation de l'androstène-5 diol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  est réduite par deutériation catalytique en milieu hétérogène. Dans ce cas, la réduction par le deutérium d'insaturations isolées et non conjuguées à des fonctions cétones conduit souvent à des composés de pureté isotopique assez faible due à des phénomènes d'échanges isotopiques ou de migration de la double liaison (**16**). La pureté isotopique peut néanmoins être améliorée par l'emploi d'oxyde de platine, préféré au palladium en raison de réactions secondaires plus faibles du substrat lorsqu'il est adsorbé sur la surface du catalyseur (**17**). Dans ce cas, le solvant est l'acide acétique perdeutérié.

Le 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  obtenu est soumis à une oxydation chromique par le réactif de JONES dans l'acétone.

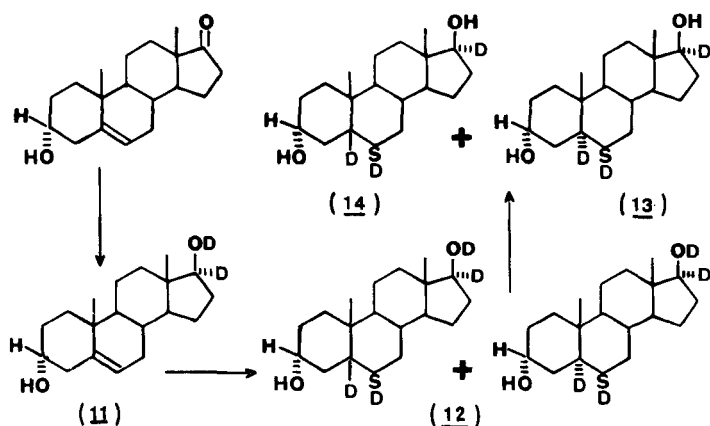


**Figure 3** : Synthèse du 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\xi$ ,17 $\alpha$ -d<sub>4</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ ,17 $\beta$

Les fonctions cétones en 3 et 17 sont ensuite réduites par le borodéutère de sodium pour conduire au 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ , 6 $\xi$ ,17 $\alpha$ -d<sub>4</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ ,17 $\beta$ , la séquence réactive se terminant par un échange isotopique.

. 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$  -d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ ,17 $\beta$  (Figure 4)

L'hydroxy-3 $\alpha$  androstèn-5 one-17 est réduit par le borodéutère de sodium en présence de dioxanne/D<sub>2</sub>O pour conduire au composé 17 $\alpha$  -d<sub>1</sub>. L'insaturation  $\Delta^5$  est réduite par le deutérium gazeux en présence d'oxyde de platine dans l'acide acétique perdeutérié. Lors de l'hydrogénation ou de la deutérioration de composés non substitués en position 3 ou 3 $\beta$ -substitués, il y a formation quasi-exclusive de composés de structure 5 $\alpha$  (18). Avec des composés 3 $\alpha$  - substitués le produit de structure 5 $\beta$  est formé préférentiellement (19).



**Figure 4** : Synthèse du 5 $\alpha$ ,6 $\xi$ ,17 $\alpha$  -d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ ,17 $\beta$

La réduction de l'insaturation de l'androstène-5 diol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  conduira donc à un mélange de composés 5 $\alpha$  et 5 $\beta$  réduits dans un rapport 5 $\alpha$ /5 $\beta$  = 4/6. Un passage sur colonne d'alumine permet la séparation des deux isomères.

. 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  et -3 $\beta$ , 17 $\beta$  (figure 5)

La 19-d<sub>3</sub> androstène-4 dione-3,17 est soumise à une réduction par le lithium dans l'ammoniac liquide selon la méthode décrite par BOWERS et Coll (20) pour conduire à la 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanedione-3,17. A partir de cet intermédiaire, deux voies de synthèse ont été réalisées:

- réduction par le borohydrure de sodium en milieu dioxanne/H<sub>2</sub>O conduisant au 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$ .

- réduction de la fonction cétone en 3 par la méthode de ORR (21) puis de celle en 17 par le borohydrure de sodium en présence du mélange dioxanne/H<sub>2</sub>O afin d'obtenir le 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ .

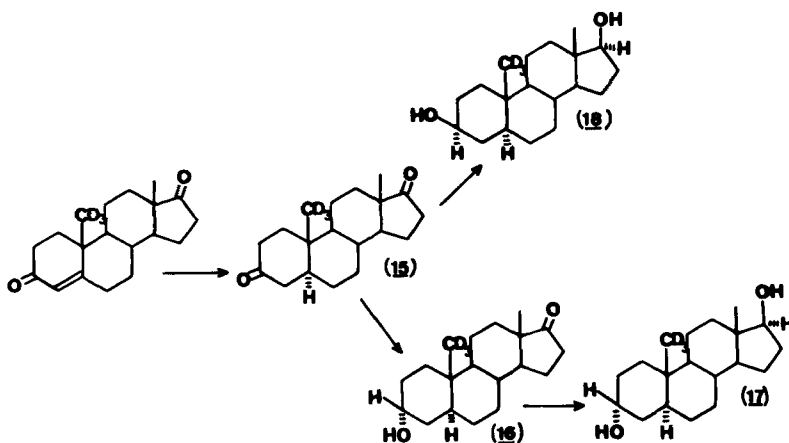


Figure 5 : Synthèse des 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ ,17 $\beta$  et -3 $\beta$ ,17 $\beta$

En effet, alors que la réduction d'une fonction cétone en 3 d'un stéroïde de structure 5 $\alpha$ , par la méthode classique utilisant le borohydrure de sodium ou de potassium conduit à des composés 3 $\beta$ -hydroxylés, la réduction de cette même fonction cétone par la méthode de ORR (21) utilisant le réactif de WILKINSON en présence d'alcool isopropylique et d'eau permet d'obtenir en majorité des composés à hydroxyle axial en 3.



III - PARTIE EXPERIMENTALE

. 1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (4)

- 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ -d<sub>2</sub> hydroxy-17 $\beta$ (5 $\alpha$ ) androstanone-3 (1)

46 mg de réactif de WILKINSON sont ajoutés à 10 ml d'acétone . Après 2 heures d'agitation sous pression de deutérium de 1 atm, 40 mg d'hydroxy - 17  $\beta$ (5 $\alpha$ ) androstèn-1 one - 3 sont ajoutés. On réduit par le deutérium (p = 1 atm) pendant 24 heures. Après évaporation du solvant, le milieu est repris par 3 fois 10 ml d'un mélange hexane-dichlorométhane 1/1 afin d'éliminer le réactif de WILKINSON. Le composé (1) est isolé sous forme de cristaux : 34 mg (R = 85 %).

- 1 $\alpha$  - d<sub>1</sub> hydroxy-17 $\beta$  (5 $\alpha$ ) androstanone-3 (2)

34 mg de (1) sont dissous dans 10 ml d'un mélange méthanol-potasse 1 %. L'ensemble est porté 1 heure à reflux. Après refroidissement, le méthanol est éliminé par évaporation sous courant d'azote à froid. On extrait, après addition d'eau distillée, par l'éther diéthylique. La phase étherée est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, évaporée à sec. On obtient 31 mg de composé (2) (R = 91 %).

- 1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol - 3 $\beta$ , 17 $\beta$  (4)

31 mg de (2) sont dissous dans 10 ml de dioxanne séché sur sodium. 20 mg de Na BD<sub>4</sub> et 200  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O sont ajoutés au milieu qui est placé sous agitation durant 24 h. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de D<sub>2</sub>O. Après évaporation du dioxanne, le milieu réactionnel est extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée est lavée à l'eau, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre puis portée à sec. Les cristaux obtenus sont soumis à un échange isotopique dans 10 ml de méthanol-potasse 1 %. Après extraction à l'éther, on obtient 25 mg de 1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (F = 156 - 160 °) cristallisés dans un mélange acétone-hexane. \*

Rendement global : 62, 5 %

. 3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol - 3 $\beta$ , 17 $\beta$  (6)

100 mg de (5 $\alpha$ ) androstanedione- 3 ,17 sont dissous dans 20 ml de dioxanne séché sur sodium. 40 mg de Na BD<sub>4</sub> et 400  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O sont ajoutés

\*F<sub>3 $\beta$</sub> -diol naturel : 160 - 168 °

au milieu réactionnel qui est laissé sous agitation durant 24 h. Après arrêt de la réaction par 2 ml de  $D_2O$ , le dioxanne est évaporé. Le milieu réactionnel est extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée, après lavages à l'eau est séchée sur  $Na_2SO_4$  et portée à sec. Les cristaux obtenus sont soumis à un échange isotopique dans 10 ml de méthanol-potasse 1 %. Après extraction à l'éther, le produit obtenu est cristallisé dans un mélange acétone-hexane pour conduire à 75 mg de  $3\alpha, 17\alpha - d_2$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ ,17 $\beta$  (6)

$F = 157 - 167^\circ$

Rendement global = 75 %.

.  $3\alpha, 5\alpha, 6\epsilon, 17\alpha - d_4$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (10)

-  $5\alpha, 6\epsilon - d_2$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (7)

200 mg d'androstène-5 diol-3 $\beta$ ,17 $\beta$  sont dissous dans le minimum d'acide acétique perdeutérié. 20 mg d'oxyde de platine sont ajoutés au milieu et la solution est placée sous pression de deutérium ( $p = 1$  atm) et sous agitation durant 24 h. Le milieu réactionnel est extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée est lavée par une solution de soude N, puis à l'eau jusqu'à pH neutre, séchée sur  $Na_2SO_4$ , puis portée à sec (7) : 170 mg, R = 85 %

-  $5\alpha, 6\epsilon - d_2$  (5 $\alpha$ ) androstanedione-3, 17 (8)

170 mg de (7) sont dissous dans 10 ml d'acétone. La réaction d'oxydation se fait dans un bain de glace, par addition du réactif de JONES ( $CrO_3$ ) goutte à goutte dans le milieu réactionnel jusqu'à non décoloration de la solution. Après 10 mn d'agitation, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés dans le milieu. Après évaporation de l'acétone à froid sous courant d'azote, on extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée est lavée par une solution de soude N, à l'eau jusqu'à pH = 7. Après séchage sur  $Na_2SO_4$  anhydre elle est portée à sec (8 : 153 mg, R = 90 %).

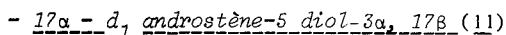
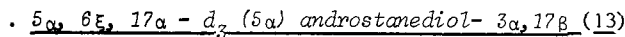
-  $3\alpha, 5\alpha, 6\epsilon, 17\alpha - d_4$  (5 $\alpha$ ) androstanediol - 3 $\beta$ , 17 $\beta$  (10)

153 mg de (8) sont réduits par 60 mg de  $NaBD_4$  et 600  $\mu$ l de  $D_2O$  dans 30 ml de dioxanne séché sur Na. La réaction est arrêtée après 24 h d'agitation par addition de 3 ml de  $D_2O$ . Le milieu réactionnel est extrait par l'éther diéthylique après évaporation du dioxanne. La phase étherée est lavée à l'eau, séchée, portée à sec. Les cristaux obtenus sont soumis à un échange

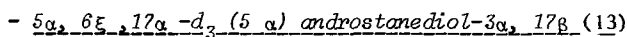
isotopique pour conduire au 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$  -d<sub>4</sub> (5 $\alpha$ ) androstane-diol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (10)

124 mg, cristallisés dans un mélange acétone - hexane (F = 158 - 167 °)

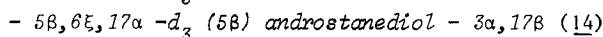
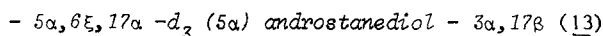
Rendement global : 62 %



200 mg d'hydroxy-3 $\alpha$  androstèn -5 one-17 sont dissous dans 40 ml de dioxanne séché sur Na. On réduit par 80 mg de NaBD<sub>4</sub> et 800  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O. La réaction est stoppée par addition de 4 ml de D<sub>2</sub>O. Le dioxanne évaporé, on extrait par l'éther diéthylique. On obtient 180 mg de composé (11) R = 90 %.



180 mg de (11) sont dissous dans le minimum d'acide acétique perdeutérié. Après addition de 20 mg d'oxyde de platine, on établit une pression de deutérium de 1 atm durant 24 h. Le milieu réactionnel est extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée est lavée avec une solution de soude N puis à l'eau jusqu'à pH 7. Après échange isotopique en milieu potasse 1 % - méthanol, on obtient 155 mg d'un mélange de deux composés :



La séparation des composés (13) et (14) est réalisée sur une colonne de 10 gr d'alumine désactivée par 4 % d'eau (P/v). Le mélange 5 $\alpha$ /5 $\beta$  est dissous dans le minimum d'acétone. Cette solution est versée sur 1 g d'alumine désactivée et l'ensemble est séché à froid sous azote, puis sous vide au dessiccateur. La poudre ainsi obtenue est déposée au sommet de la colonne. La séparation est réalisée grâce à un gradient d'éluion benzène - benzène/éthanol 6 % et on isole :

- 60 mg de (13)

- 93 mg de (14)

rapport 5 $\alpha$ / 5 $\beta$  = 4/6

Le 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$  - d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstane-diol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  (13) est cristallisé dans un mélange acétone-hexane (F = 229 - 231 °) \*

Rendement global : 30 %

\*F<sub>3 $\alpha$ -diol naturel</sub> : 229 - 230°

. 19 - d<sub>3</sub> (5α) androstane-3α,17β (17) et -3β,17β (18)

- 19 - d<sub>3</sub> (5α) androstane-3,17 (15)

75 mg de 19-d<sub>3</sub> androstène-4 dione-3,17 en solution dans 3 ml d'un mélange dioxane/éther (1/1) sont additionnés goutte à goutte à 15 ml d'ammoniac liquide en présence de 150 mg de lithium. La solution, de couleur bleue, est maintenue sous agitation durant 3 mn. Du chlorure d'ammonium cristallisé est ajouté au milieu réactionnel jusqu'à décoloration totale. Afin de s'assurer de l'arrêt total de la réaction 5 ml d'éthanol sont additionnés goutte à goutte au milieu. Après évaporation de l'ammoniac et addition d'eau glacée on extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée est rincée avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N puis à l'eau distillée jusqu'à pH neutre. La phase étherée est portée à sec : 73 mg.

Une analyse par CCM d'une part et CPG d'autre part (système B) montre la présence des composés suivants :

- 19-d<sub>3</sub> androstène-4 dione - 3,17
- 19-d<sub>3</sub> hydroxy-17β (5α) androstanone-3
- 19-d<sub>3</sub> (5α) androstane-3β,17β (18)

Le mélange est purifié par chromatographie sur couche mince, sur plaques préparatives et les 3 composés précédemment cités sont isolés dans un rapport de : 3,9 mg ; 22,2 mg et 39,3 mg respectivement.

Au vu des produits isolés, il est clair que la réduction a dépassé le stade de saturation de la double liaison en 4 et que les fonctions cétones en 3 et 17 ont été partiellement réduites. A partir des composés isolés, deux voies de synthèse ont été suivies :

- purifier le 19-d<sub>3</sub> (5α) androstane-3β,17β (18)
- réduire la fonction cétone en 3 de la 19-d<sub>3</sub> hydroxy-17β (5α) androstanone-3 par la méthode de ORR (21)

- 19 - d<sub>3</sub> (5α) androstane-3α,17β (17)

22,2 mg de 19-d<sub>3</sub> hydroxy-17β (5α) androstanone-3 sont mis en présence de 1,80 ml d'alcool isopropylique, 220 µl de triméthyl-phosphite, 18,9 mg de réactif de WILKINSON et 200 µl d'eau distillée, dans une ampoule scellée sous vide et maintenue à 82 ° durant 24 h. Après refroidissement et

addition d'eau glacée, le milieu réactionnel est extrait par l'éther diéthylique. La phase étherée est rincée à l'eau distillée jusqu'à pH 7, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, portée à sec (35,1 mg). Une analyse par CPG indique la présence du produit de départ n'ayant pas réagi (38%) et du composé (17) (62%).

Les deux composés sont séparés sur une colonne de 10 g d'alumine désactivée par 4% d'eau (P/v). La séparation est réalisée grâce à un gradient d'éluion benzène-benzène/éthanol 6% et on isole 14,1 mg de composé (17) après cristallisation dans un mélange chloroforme/hexane. Son analyse par CPG montre un taux de pureté de 99,9% (F: 230-231°).

- 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ ,17 $\beta$  (18)

Le composé (18) isolé montre une pureté de 89,5%, calculée par analyse en CPG (système B). L'unique impureté, soit 10,5% du mélange, n'étant pas l'isomère en 3 du composé (18), ce dernier est purifié par cristallisations successives avec trois mélanges de solvants différents: acétate d'éthyle/hexane, acétone/hexane et chloroforme/hexane pour conduire à 20,1 mg de composé (18) avec un taux de pureté de 98% (F= 162-167°).

• Vérification de la pureté des androstanediols deutériés synthétisés.

Les composés synthétisés ont été analysés par CPG sous forme de dérivés éther bis-triméthyl silyloxy (bis TMS). La pureté des composés (4), (6), (10) et (13) a été vérifiée sur le système A et celle des composés (17) et (18) sur le système B.

RESULTATS

I - VERIFICATION DE LA LOCALISATION DES ATOMES DE DEUTERIUM PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU <sup>1</sup>H ET DU <sup>13</sup>C.

Les spectres de masse des androstanediols deutériés, analysés sous forme de dérivés bis TMS, ont été comparés à ceux de leurs analogues naturels, les fragmentations de ces derniers ayant tout particulièrement été étudiées au laboratoire (22). De même, une étude comparative entre les spectres de résonance magnétique nucléaire du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C des androstanediols naturels et marqués a été réalisée (tab.1.). Les travaux de EGGERT (23) et GROVER (24) ont permis l'attribution des pics aux carbones correspondants.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
(5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -naturel (A)	37,5	31,5	71,3	38,2	45,4	29,1	32,1	36,0	55,0	36,0	21,3	37,2	43,4	51,5	23,8	30,3	82,0	11,5	12,7
1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -d <sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$ (A)	37,4	31,4	----	38,1	45,4	29,1	32,1	36,0	55,0	36,0	21,3	37,2	43,4	51,5	23,8	30,3	82,0	11,5	12,7
3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -d <sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$ (A)	37,8	31,5	----	38,3	45,7	29,3	32,4	36,3	55,4	36,3	21,5	37,5	43,7	51,8	23,9	30,2	----	11,4	12,7
3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 17 $\alpha$ -d <sub>4</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$ (A)	38,3	32,0	----	38,7	----	29,4	32,8	36,9	56,0	36,9	22,0	38,0	44,0	52,4	24,3	30,5	----	11,6	12,7
(B)	37,8	31,5	----	38,2	----	28,9	32,2	36,3	55,4	36,1	21,4	37,6	43,5	51,8	23,8	30,0	----	11,4	12,5
(5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ naturel (A)	32,6	30,1	66,5	37,2	39,5	28,9	32,6	36,0	54,9	36,5	20,7	37,2	43,3	51,5	23,6	32,0	81,9	11,3	11,5
5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 17 $\alpha$ -d <sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ (A)	32,7	30,0	66,6	37,2	----	29,0	32,7	36,0	55,1	36,4	20,8	37,2	43,3	51,7	23,7	32,0	----	11,4	11,4

TMS en ppm dans CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD (A) ou CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>OD (B)

Tableau 1 : RMN <sup>13</sup>C des androstanediols naturels et deutériés.

. 1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -d<sub>2</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (4)

L'étude du pic moléculaire du composé (4) sous forme de dérivé bis TMS montre un amas isotopique dont la répartition suit : 436 (3%), 437 (21%), 438 (47%), 439 (20%), 440 (5%), 441 (3%), le pic moléculaire de l'analogue naturel apparaissant à m/z 436. Ceci confirme la présence de 2 atomes de deutérium sur la molécule. Le spectre de masse du produit naturel montre un ion à m/z 217. Cet ion est issu de la perte du groupement TMS du cycle D suivie de la rupture du cycle A avec perte d'un fragment porteur des carbones 1, 2 et 3 de formule brute C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. L'apparition d'un ion à m/z 217 pour le produit marqué implique la perte d'un fragment C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>D<sub>2</sub>O Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Ceci permet d'affirmer que les 2 atomes de deutérium de la molécule sont répartis entre les positions 1, 2 et 3. L'étude du spectre de RMN du <sup>13</sup>C du composé (4), comparé à celui de son analogue naturel, permet d'observer que le signal correspondant au C<sub>3</sub> n'est plus détectable. D'autre part, on note une diminution de l'intensité des pics correspondants aux C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>, diminution plus importante dans le cas du C<sub>1</sub>. Sachant que dans le cas de carbones quaternaires le temps de relaxation est long, l'intensité des pics correspondants sera faible (cas des C<sub>10</sub> et C<sub>13</sub> par exemple). A la limite, le signal bien que toujours existant ne sera plus détectable. Cette "disparition" du signal correspondant au C<sub>3</sub> confirme la présence d'un atome de deutérium sur ce carbone. Quant à la diminution de l'intensité du pic du C<sub>1</sub>, bien que non quaternaire elle pourrait suggérer la présence d'un atome de deutérium sur ce carbone, en accord avec les résultats de synthèse publiés par DJERASSI et GUTZWILLER (14). Il convient néanmoins de rester prudent quant au marquage spécifique sur la position 1 en raison de la diminution plus faible mais non négligeable de l'intensité du signal du C<sub>2</sub>.

. 3 $\alpha$ , 17 $\alpha$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (6)

L'amas isotopique au niveau du pic moléculaire du composé (6) présente un maximum à m/z 438 confirmant le marquage de la molécule par deux atomes de deutérium ( $M^{+}$  : 436 (1 %), 437 (5 %), 438 (63 %), 439 (20 %), 440 (9 %), 441 (2 %)). L'apparition d'un ion à m/z 218 (217 pour le produit naturel) indique la présence d'un atome de deutérium sur le carbone 1, 2 ou 3. Le spectre du (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  montre un pic de base à m/z 129 correspondant à l'ion  $C_3H_4O^+Si(CH_3)_3$  issu de la fragmentation du cycle D et porteur des carbones 15, 16 et 17. Dans le cas du composé (6), le pic de base apparaît à m/z 130, en accord avec le marquage de la molécule en 17. L'étude du spectre de RMN du  $^{13}C$  du composé (6) montre la "disparition" des signaux des carbones 3 et 17, confirmant la fixation de deutérium sur ces positions.

. 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$ -d $_4$  (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (10)

L'étude de la distribution isotopique au niveau du pic moléculaire du composé (10) montre une intensité importante pour les ions m/z 440 et 441, respectivement 4 et 5 atomes de deutérium fixés sur la molécule. ( $M^{+}$  : 436 (0,3 %), 437 (0,7 %), 438 (3 %), 439 (12 %), 440 (33 %), 441 (32 %), 442 (14 %), 443 (5 %)). L'intensité élevée de l'ion m/z 441 peut s'expliquer par le fait que, lors de la deutérioration catalytique de la double liaison en position 5, des hydrogènes labiles de la molécule auraient été échangés par des atomes de deutérium. La complexité des amas isotopiques au niveau des différents fragments rend la vérification des positions du marquage très délicate. Néanmoins, on peut noter que lors de la perte de deux groupements TMS (-2 x 90), on observe un doublet à m/z 260 (261) et un 3ème ion d'intensité voisine à m/z 259 faisant songer à la perte d'un groupement TMS (-90) et de  $(CH_3)_3SiOD$  (-91), en accord avec la fixation d'un atome de deutérium en position 5. L'apparition d'un doublet à m/z 220 (221), m/z 217 pour le produit naturel, indique la fixation d'un atome de deutérium sur le carbone 1, 2 ou 3. D'autre part, la présence d'un doublet à m/z 150 (151), m/z 147 pour l'analogue naturel, issu de la rupture du cycle C conduisant à la perte des cycles C et D et des groupements TMS indique que les 3 (4) atomes de deutérium restants sont répartis entre les cycles A et B. L'apparition du pic de base à m/z 130 confirme la présence d'un atome de deutérium sur le cycle D. L'étude du spectre de RMN du  $^{13}C$  du composé (10) montre la "disparition" des signaux des carbones 3, 5 et 17, carbones devenus quaternaires par le marquage au deutérium. L'intensité du pic du  $C_6$  est voisine de celle du bruit de fond. Ceci peut laisser supposer que

1 (2) atome(s) de deutérium est (sont) fixé(s) sur cette position. Par ailleurs, on peut noter une diminution de l'intensité du pic du  $C_7$ . En conclusion, il semblerait que 4 atomes de deutérium soient répartis entre les positions 3, 5, 6 et 17, le cinquième pouvant être fixé sur le  $C_6$  ou le  $C_7$ .

. 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$ -d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  (13)

Le spectre de masse du composé (13) présente un pic moléculaire majoritaire à  $m/z$  439 ( $M^{+}$  : 437 (1 %), 438 (8 %), 439 (40 %), 440 (34 %), 441 (12 %), 442 (5 %)). La présence d'un ion intense à  $m/z$  440 peut s'expliquer de la même manière que dans le cas du composé (10). La perte de deux groupements TMS se traduit par l'apparition d'un doublet à  $m/z$  259 (260), accompagné d'un ion très intense à  $m/z$  258, qui semble confirmer la présence d'un atome de deutérium en position 5. La perte des cycles C et D et des 2 groupements TMS conduit au doublet  $m/z$  149 (150) indiquant que 2 (3) atomes de deutérium sont répartis entre les cycle A et B. L'apparition du pic de base à  $m/z$  130 confirme la présence d'un atome de deutérium sur le cycle D. Le spectre de RMN du  $^{13}C$  du composé (13) montre la "disparition" des signaux des carbones 5 et 17, en accord avec le marquage de ces positions par le deutérium. La position du 3ème atome de deutérium de la molécule n'a pas pu être confirmée par l'étude du spectre.

. 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  (17)

Le spectre de masse du composé (17) présente un pic moléculaire majoritaire à  $m/z$  439 ( $M^{+}$  : 437 (2 %), 438 (8 %), 439 (56 %), 440 (24 %), 441 (8 %), 442 (2 %)) confirmant le marquage de la molécule par 3 atomes de deutérium. Son spectre de RMN du  $^1H$  indique la "disparition" du signal correspondant au méthyl en 19, en accord avec le marquage de cette position par 3 atomes de deutérium. (RMN : 0,73 ppm, s, 3H (Me 18), pas de signal à 0,79 ppm (Me 19).)

. 19-d<sub>3</sub> (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\beta$ , 17 $\beta$  (18)

Le spectre de masse du composé (18) présente un pic moléculaire  $M^{+}$  : 438 (9 %), 439 (61 %), 440 (19 %), 441 (9 %), 442 (2 %), l'ion  $m/z$  439 (+ 3D) étant majoritaire. La "disparition" du signal du méthyl en 19 sur le spectre de RMN du  $^1H$  du composé (18) confirme le marquage par 3 atomes de deutérium du  $C_{19}$ . (RMN : 0,73 ppm, s, 3H (Me 18), pas de signal à 0,82 ppm (Me 19).)



II - RENDEMENT DE MARQUAGE DES ANDROSTANEDIOLS DEUTÉRIÉS.

Les androstanediols deutériés synthétisés étant destinés à servir d'entraîneur et/ou d'étalon interne en fragmentographie de masse, il est nécessaire de connaître leur rendement de marquage. En effet, il est indispensable d'éliminer toute interférence entre molécule naturelle à doser et molécule marquée "entraîneur". L'ion moléculaire des androstanediols bis-TMS ayant été choisi pour le dosage, seuls les composés marqués donnant un ion à m/z 436 d'intensité très faible (< 1 % de l'amas isotopique du pic moléculaire) ou nulle, seront utilisables comme entraîneur. L'amas isotopique du pic moléculaire des (5 $\alpha$ ) androstanediol-3 $\xi$ , 17 $\beta$  se présente de la façon suivante : m/z 436 (67 %), m/z 437 (23 %) et m/z 438 (10 %), ces valeurs étant expérimentales. Les rapports expérimentaux  $\frac{M+1}{M}$  et  $\frac{M+2}{M}$  sont respectivement de 0,34 et 0,15. Les spectres des androstanediols marqués présentent un amas isotopique de m/z 436 à 443. L'intensité relative d'un pic de l'amas isotopique ne représente pas seulement le pourcentage de molécule marquée par n atomes de deutérium, mais aussi les contributions dues aux isotopes naturels des éléments constituant la molécule. Ces contributions ont pu être calculées en appliquant les rapports expérimentaux  $\frac{M+1}{M} = 0,34$  et  $\frac{M+2}{M} = 0,15$  au cas des androstanediols deutériés. Par différence entre l'intensité des pics mesurée sur le spectre et ces contributions des isotopes naturels du C, H, O, Si calculées, on peut connaître le rendement de marquage des composés synthétisés (tab . 2).

*	1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -d <sub>2</sub>	3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -d <sub>2</sub>	3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$ -d <sub>4</sub>	5 $\alpha$ , 6 $\xi$ , 17 $\alpha$ -d <sub>3</sub>	19-d <sub>3</sub>	19-d <sub>3</sub>
	3 $\beta$ -diol (4)	3 $\beta$ -diol (6)	3 $\beta$ -diol (10)	3 $\alpha$ -diol (13)	3 $\beta$ -diol (16)	3 $\alpha$ -diol (17)
436 (d <sub>0</sub> )	4,5	1,5	0,4	0	0	0
437 (d <sub>1</sub> )	30	6,9	0,5	1,5	3,6	1,8
438 (d <sub>2</sub> )	60	91,6	4,0	11,6	10,7	11,2
439 (d <sub>3</sub> )	5,5		16,2	56,4	78,5	82,6
440 (d <sub>4</sub> )			42,6	30,5	7,2	4,3
441 (d <sub>5</sub> )			30,4			
442 (d <sub>6</sub> )			4,0			
443 (d <sub>7</sub> )			1,5			

\* sous forme de dérivés bis TMS.

Tableau 2 : Rendement de marquage des androstanediols deutériés synthétisés

Le composé (4) deutérié en 1 $\alpha$ , 3 $\alpha$  comporte 60 % de molécules effectivement marquées par 2 atomes de deutérium. 30 % des molécules n'ont fixé qu'un atome de deutérium, vraisemblablement en 3 $\alpha$ . 4,5 % des molécules ne sont pas marquées ( $d_0$ ) : ce composé ne sera pas utilisable en CPG-FM. Le composé (6) présente un fort pourcentage (91,6 %) de molécules deutériées en 3 $\alpha$  et 17 $\alpha$ . La méthode utilisée pour la réduction des fonctions cétones en 3 et 17 (Na B D<sub>4</sub> dans le dicxanne/D<sub>2</sub>O) est spécifique quant au nombre d'atomes fixés sur la molécule et à leur position sur la molécule. Néanmoins, le composé (6) ne sera pas utilisé en FM, l'ion à m/z 436 n'étant pas négligeable (1,5 %). Le composé (10) tétradeutérié se compose d'un ensemble de molécules portant 3, 4, 5 atomes de deutérium. Ceci est dû à un manque relatif de spécificité de la deutérioration catalytique de la double liaison en 5. 42,6 % des molécules sont marquées par 4 atomes de deutérium, 30,4 % par 5 atomes et 16,2 % par seulement 3 atomes de deutérium. Le composé (10) sera utilisé en FM, l'ion à m/z 436 étant très faible (0,4 %). Le composé (13) résulte aussi d'un mélange de molécules portant 2 (11,6 %), 3 (56,4 %) ou 4 (30,5 %) atomes de deutérium pour les mêmes raisons qu'énoncées précédemment. On n'observe pas d'ion à m/z 436. Les composés (17) et (18) marqués au deutérium en position 19 ne donnent pas d'ion à m/z 436 ; 82,6 % et 78,5 % respectivement des molécules sont marquées par 3 atomes de deutérium. Ces composés seront utilisables en tant qu'entraîneurs en FM.

#### CONCLUSION

Parmi les six androstane-diols deutériés synthétisés, quatre sont utilisables comme entraîneur et/ou étalon interne en FM. Les stéroïdes marqués par deux atomes de deutérium présentent un ion non négligeable à m/z 436. Il est donc nécessaire de marquer la molécule par plus de deux atomes de deutérium. De plus, dans ces conditions, les interférences avec l'ion M + 2 (m/z 438 dans notre cas) du produit naturel sont nulles (12). Pour 3 ou 4 atomes de deutérium fixés par molécule, on n'observe plus ou peu (< 1 %) de composés  $d_0$ . On note que dans le cas de réactions non univoques comme la deutérioration catalytique de doubles liaisons, les composés obtenus sont constitués par un mélange de molécules portant n-1, n et n+1 atomes de deutérium. Lorsque la réaction est univoque, le pourcentage de molécules portant n atomes de deutérium est beaucoup plus élevé. Lors du marquage de stéroïdes par le deutérium, ces 2 critères seront à respecter : absence de produit non marqué par fixation d'un nombre supérieur à 2 atomes de deutérium sur la molécule, utilisation de réactions univoques afin d'obtenir une meilleure spécificité du marquage.

REFERENCES.

1. Siekmann L. - In "Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences, II", De Leenheer A.P., Roncucci R. R. Van Peteghem C., Elsevier Publ., Amsterdam, 1978, 3 - 16.
2. Samuelsson B., Hamberg M. et Sweeley C.C. - Anal. Biochem. 38 : 301 (1970).
3. Lec H.G. et Millard B.J. - Biomed. Mass Spectrom. 2 : 78 (1975).
4. Berthou F. - Thèse de Doctorat es-Sciences, Brest, 1977.
5. Habrioux G., Desfosses B., Condom R., Faure B. et Jayle M.F. - Steroids 32 : 61 (1978).
6. Hopkinson C.N.R., Park B.K., Johnson M.W., Sturn G., Steinback K. et Hirschhauer C. - J. Steroid biochem. 8 : 1253 (1977).
7. Barberia J., Pages L. et Horton R. - Fertility and Sterility 27 : 1101 (1976)
8. Klemm W., Liebich H.M. et Gupta D. - J. Clin. Endocr. Metab. 42 : 514 (1976)
9. Kinouchi T. et Horton R. - J. Clin. Endocr. Metab. 38 : 262 (1974).
10. Laband P., Tresgerres J.A.F., Lisboa B.P., Wolkwein U. et Tamm J. - Acta Endocr. 88 : 778 (1978).
11. Dehennin L., Reiffsteck A. et Scholler R. - Biomed. Mass Spectrom. 7 : 493 (1980).
12. Jacolot F., Berthou F. et Picart D. - Spectra 2000 41 : 37 (1978).
13. Dyer R.L. et Harrow T.A. - Steroids 33 : 617 (1979).
14. Djerassi C. et Gutzwiller J. - J. Amer. Chem. Soc. 88 : 4537 (1966).
15. Tobes L. et Throop L.J. - In "Organic Reactions in Steroid Chemistry", Fried J. et Edwards J.A., Van Nostrand Reinhold Co, New-York, 147-151, 1972.
16. Burwell R.L. - Accounts Chem. Res. 2 : 289 (1969).

17. Smith G.V. et Burwell R.L. - J. Amer. Chem. Soc. 84 : 925 (1962).
18. Shoppee C.W., Agashe B.D. et Summers G.H.R. - J. Chem. Soc. : 3107 (1957)
19. Lewis J.R. et Shoppee C.W. - J. Chem. Soc. : 1365 (1955).
20. Bowers A., Ringold H.J. et Denot E. - J. Amer. Chem. Soc. 80 : 6115 (1958)
21. Orr J.C., Mersereau M. et Sanford A. - Chem. Comm. : 162 (1970).
22. Picart D. - Thèse de Doctorat es-Sciences, Brest, 1980.
23. Eggert H., Van Antwerp C.L., Bhacca N.S. et Djerassi C. - J. Org. Chem. 41 : 71 (1976).
24. Grover S.H. et Stothers J.B. - Can. J. Chem. 52 : 870 (1974).