

SUR LES LIGANDS STÉROÏDOÏDES DE L'ANDROGEN BINDING PROTEIN. LES ÉNANTIOMÈRES DES *TRANS-TRANS* ET *CIS-TRANS* PERHYDROHEXESTROLS ET *TRANS-TRANS* PERHYDRODICÉTONES

R. SALIBA*, XUÂN-HOA BUI*, R. DEVIS* et P. GENARD†

*Unité de Chimie Hormonologique et de Pharmacognosie.

Université de Louvain. Faculté de Médecine 54.20. avenue Hippocrate 54. 1200 Bruxelles et

†Département de Clinique et de Pathologie Médicales, Hôpital de Bavière. Université de Liège.
4020 Liege. Belgium

(Reçu le 3 decembre)

SUMMARY

In the framework of a study on nonsteroidal androgens, the authors previously observed that in perhydrohexestrol series, the (\pm)-[(*cis*-4 hydroxycyclohexyl)-4 (*trans*-4 hydroxycyclohexyl)-hexane] or *cis-trans* perhydrohexestrol and especially the (\pm)-(3,4 *bis* (*trans*-4-oxocyclohexyl)-hexane) or *trans-trans* perhydrodiketone, there is no affinity for AR (androgen receptor of the prostate) but they bind with high and specific affinity to the testosterone binding site on ABP (epididymal androgen-binding protein). In this work, we describe the preparation, the stereochemistry and biological activities of *trans-trans* and *cis-trans* perhydrohexestrols and of *trans-trans* perhydrodiketone as well as their corresponding enantiomers. Biologically the tests AR and ABP are negative for the *trans-trans* perhydrohexestrol and of *trans-trans* perhydrodiketone and for its enantiomers. However for the enantiomers of *cis-trans* perhydrohexestrol and of *trans-trans* perhydrodiketone, the affinity of the (+) enantiomer for ABP is superior to that of the racemic and that of the (-) enantiomer, whereas the affinity for AR are zero.

Chemically, the stereochemistry of the three racemics has been established especially by X-ray crystallographic analysis or by ^1H n.m.r. The n.m.r. spectra have been analyzed in terms of chemical shifts and coupling constants.

INTRODUCTION

Le mot stéroïdoïde a été suggéré par les termes de l'hypothèse qui permit à Dodds[1-4] d'obtenir les estrogènes synthétiques les plus actifs: "... the molecules of which would be similar to estradiol in shape, weight and in the situation of the hydroxyl groups". C'est dans cette même hypothèse que la série des *perhydrohexestrols* fut l'une des premières à servir de base aux espoirs, encore non réalisés aujourd'hui, de préparer des androgènes synthétiques non stéroïdes très actifs [5-8].

Malgré ces insuccès, nous avons cru utile de reprendre, dans cette série, l'étude des molécules les plus conformes à l'hypothèse, en leur appliquant de nouveaux tests biologiques et de nouvelles analyses structurales. Les tests biologiques que nous avons appliqués sont les mesures d'affinité pour l'AR et pour l'ABP. L'AR (androgen receptor) utilisé est une protéine cytosolique (prostate de rat) douée d'une grande affinité pour la testostérone (T) et pour la 5α -dihydrotestostérone (DHT). L'ABP (androgen binding protein) a aussi une grande affinité pour DHT et T. Sa concentration dans l'épididyme (rat) est en relation avec la spermatogenèse [9] et son blocage par des compétiteurs de DHT ou de T pourrait être une cause de stérilité mâle.

Récemment, les analyses biologiques de dérivés du *perhydrohexestrol* étudiés par notre groupe [10-12]

ont montré que le racémique *perhydrohexestrol trans-trans* (1) [rac-3,4 *bis*(*trans*-4-hydroxycyclohexyl)hexane] n'accuse qu'une très faible affinité pour l'ABP. Par contre, le racémique *perhydrohexestrol cis-trans* (2) et la *perhydrodicétone trans-trans* (5) [rac-3,4 *bis*(*trans*-4-oxocyclohexyl)hexane] sont doués d'une grande affinité pour l'ABP. Ces recherches ont donc déjà permis de découvrir, notamment, deux liants spécifiques très actifs pour ce récepteur.

Etant donné l'intérêt biologique des racémiques (2) et (5) il nous a paru intéressant de préparer leurs énantiomères, d'en établir les structures et de les soumettre aux tests d'affinité pour l'AR et pour l'ABP.

Les deux *perhydrohexestrols* racémiques *trans-trans* (1) et *cis-trans* (2) ont résisté à tous les essais de résolution. Nous avons, dès lors, tenté de préparer leurs énantiomères par voie indirecte. La réduction de la dicétone (5) par NaBH_4 fournit exclusivement l'isomère *trans-trans* (1), dépourvu d'affinité pour l'AR et pour l'ABP, tandis que la *perhydrogénation* catalytique du diéthylstilbestrol ou du (\pm)-hexestrol sur Ni-Raney aboutit aux deux isomères, *trans-trans* (1) et *cis-trans* (2) [8]. On pouvait s'attendre, dès lors, à ce que la *perhydrogénation* séparée des deux énantiomères de l'hexestrol aboutisse à la formation des quatre énantiomères des racémiques (1) et (2).

En ce qui concerne la dicétone racémique (5), Inhoffen et son groupe [6, 7] ont montré l'extrême dif-

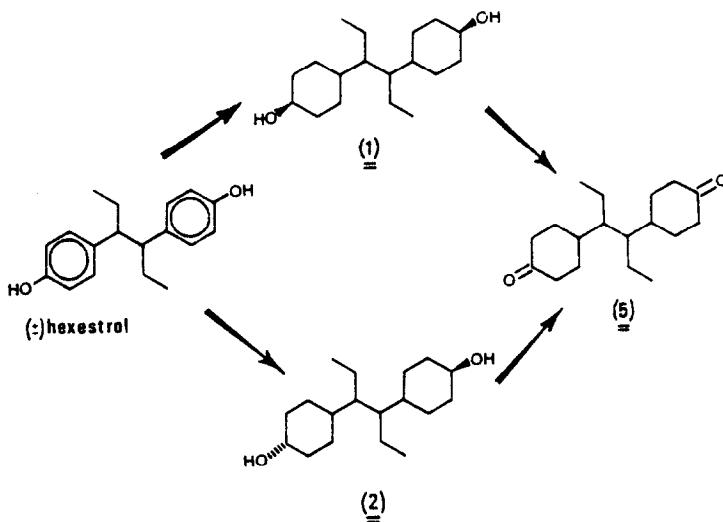


Fig. 1. Obtention des perhydrohexestrols racémiques (1) et (2) et de la perhydrocétone (5).

faculté d'obtenir ses énantiomères et ceux de la cétone-alcool correspondante.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chimie

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil Mettler F.P.I.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés à l'état solide sous forme de pastilles KBr à l'aide d'un spectrographe Beckman, modèle i.r.-4 à double faisceau et calibré par comparaison avec le polystyrène.

Les spectres de RMN protoniques des perhydrohexestrols ont été enregistrés, à 60°C, sur un spectromètre Caméca 250 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre HS-902 (A.E.I.) avec ordinateur DS 50 S à 70 CV à température de source de 130°C.

Les mesures des pouvoirs rotatoires ont été faites avec un polarimètre Perkin-Elmer 241 MC à 20°C.

Les hydrogénations catalytiques à faible pression (jusque 5 atm) ont été faites sur un "Shaker type hydrogenation apparatus" No. 3925 de la Parr Instrument Co, Moline-Illinois. Les hydrogénations à haute pression (jusque 170 atm) ont été exécutées dans des autoclaves A. Hofer, Muhlen, Ruhr. Pour les poids inférieurs à 1 g, une série de perhydrogénations ont été effectuées en microautoclave.

Les structures cristallines ont été résolues par des méthodes directes d'interprétation (Multan) des spectres relevés par diffractométrie automatique (appareil Synthex P2₁) et ont été affinées par moindres carrés. [13]

1. Séparation des énantiomères du (±)-hexestrol

A. Synthèse du (±)-hexestrol. L'hexestrol racémique a été synthétisé par une variante du procédé de von

Wessely *et al.* [14] à partir de 52,7 g de diéthylstilbestrol. Rendement 45,7 g (85%) ($F = 125-126^{\circ}\text{C}$).

Spectre de masse: Le spectre de masse de l'hexestrol racémique est caractérisé par un pic moléculaire ($m/e = 270$). Le pic principal correspond à la rupture de la molécule en deux parties symétriques ($m/e = 135$).

Spectre de RMN ($\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$): Le spectre de RMN présente: $\delta = 6,67$ un massif pour les protons aromatiques; $\delta = 2,60$ un massif pour le proton tertiaire de la chaîne latérale; $\delta = 1,67$ un massif pour les protons méthylènes et $\delta = 0,70$ un triplet ($J = 7 \text{ Hz}$) pour les protons des groupements méthyles.

B. Séparation des énantiomères du (±)-hexestrol. Nous l'avons réalisée par une variante du procédé de von Wessely [14, 15], repris par Collins [16] et par Inhoffen [6]. Elle comprend les étapes suivantes, dont la dernière, originale, sera décrite en détail: (a) synthèse du chlorure de l'acide bromo-3-(+)-campho-8-sulfonique, (b) estérification, par cet acide, du (±)-hexestrol et séparation des deux diesters diastéréoisomères, (c) hydrolyse de ces deux diesters, (d) purification et identification des deux antipodes du (±)-hexestrol.

10 g de (±)-hexestrol sont estérifiés avec 31,5 g de chlorure de l'acide bromo-3-(+)-campho-8-sulfonique. On obtient, par cristallisation fractionnée dans l'éthanol, 18,4 g du diester du (+)-hexestrol ($F = 173-175^{\circ}\text{C}$) et 5,3 g du diester du (-)-hexestrol (résidu brun huileux).

Ces deux dibromocamphosulfonates sont hydrolysés séparément par un reflux de 5 h avec une solution de KOH à 20% dans le *n*-propanol pour fournir, d'une part, 4,67 g de (+)-hexestrol impur [$(\alpha)_{\text{D}}^{20} = +12^{\circ}$ (éthanol; $c = 0,9\%$)] sous forme semicristalline et, d'autre part, 1,3 g de (-)-hexestrol impur [$(\alpha)_{\text{D}}^{20} = 12,7^{\circ}$ (éthanol; $c = 0,9\%$)] sous forme d'un résidu brun huileux.

Tableau 1. Caractéristiques des deux énantiomères de l'hexestrol racémique purifiés par chromatographie sur colonne d'alumine

Enantiomères	Fraction d'élution	F	TLC (silicagel) *	$(\alpha)_D^{20}$ †	Rendements ‡
(+) -hexestrol	I	—	Spot unique avec courte traînée ($R_f = 0,549$)	+17,7° ($c = 1\%$)	1,96 g (19%)
	II	82°	Spot unique net ($R_f = 0,549$)	+32,8° ($c = 1\%$)	2,35 g (23%)
(–) -hexestrol	I	—	Spot unique avec courte traînée ($R_f = 0,549$)	–22,6° ($c = 0,9\%$)	0,4 g (4%)
	II	81°	Spot unique net ($R_f = 0,549$)	–32,2° ($c = 0,9\%$)	0,85 g (8,5%)

* Solvant d'élution: benzène [acide acétique/méthanol (90/6/16)]. † Mesures faites dans l'éthanol. ‡ Calculés à partir du poids du (±)-hexestrol de départ.

Le (+) et le (–)-hexestrol bruts sont chromatographiés séparément sur colonnes d'alumine Brockman (activité II–III) avec, comme éluant, le benzène pur progressivement enrichi en méthanol jusqu'au méthanol pur. Dans une partie aliquote de chaque éluat de 10 à 25 ml, on dose l'hexestrol par spectrophotométrie à 510 nm, en appliquant la réaction colorée au sulfate de titane- H_2SO_4 [17]. Le diagramme des mesures présente, pour chaque énantiomère brut de départ, deux pics principaux. Les éluats correspondant à chaque pic sont mélangés et les deux mélanges sont évaporés séparément. On obtient ainsi deux fractions dont la première (fraction I) a l'aspect d'une huile brune non cristallisable, et la seconde (fraction II) est formée de cristaux incolores dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 1.

Il est intéressant d'observer que les deux fractions (I et II du Tableau 1), obtenues à partir de chacun des deux énantiomères, ont: la première, un pouvoir rotatoire proche à identique de celui de von Wessely [15] et, la deuxième, un pouvoir rotatoire beaucoup plus élevé et très proche de celui de Collins et d'Inhofen [16, 6]. La grande discordance entre les deux séries de pouvoirs rotatoires est ainsi vérifiée et reproduite dans une même expérience. Nous avons observé qu'il s'agit bien de deux degrés de pureté chimiquement indécélables d'une même substance. Par ailleurs, cette technique de purification sur colonne d'alumine a conduit à une nette amélioration des rendements.

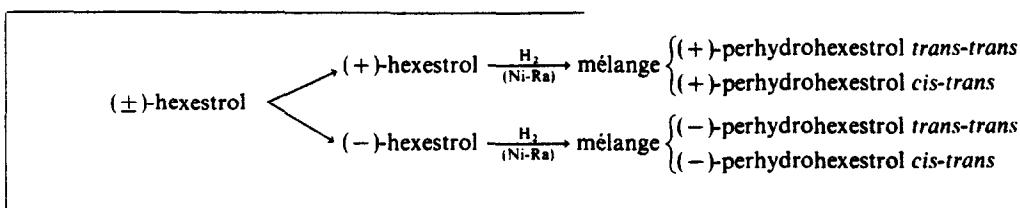
Dans un but d'identification et de récupération supplémentaires, les fractions non cristallisables I ont été estérifiées en dibenzoates ($F = 116-117^\circ C$) dont l'hydrolyse a fourni des produits bruts qui ont été cristallisés dans éther/éther de pétrole pour donner 0,25 g de (+)-hexestrol et 0,050 g de (–)-hexestrol dont les caractéristiques sont identiques à celles obtenues directement pour les fractions II. Les fractions pures rassemblées fournissent au total 2,6 g (26%) d'énantiomère (+) et 0,90 g (9%) d'énantiomère (–) à partir de l'hexestrol racémique de départ.

2. Synthèse des (±)-perhydrohexestrols trans-trans et cis-trans.

Nous l'avons réalisée par hydrogénation catalytique (Nickel-Raney) du trans-diéthylstilbestrol selon le procédé que nous avons décrit pour le (±)-hexestrol [6–8, 10]. Ces deux racémiques, résistant à tous les essais de résolution, ont été préparés pour servir de témoins dans nos analyses de leurs énantiomères, préparés indirectement selon la technique qui suit.

3. Obtention des énantiomères des (±)-perhydrohexestrols trans-trans (1) et cis-trans (2)

Le schéma suivant résume le mode d'obtention indirect des énantiomères des perhydrohexestrols trans-trans (1) et cis-trans (2): elle a été réalisée par perhydrogénation séparée des deux énantiomères de l'hexestrol:



Dans un microautoclave de 200 ml, 660 mg de (+)-hexestrol [$(\alpha)_D^{20} = +32,8^\circ$, $F = 82^\circ\text{C}$] en solution dans 300 ml d'éthanol sont perhydrogénés sur environ 10 g de Ni-Raney à 170°C sous 170 kg/cm^2 pendant 24 h. Le résidu huileux brut est débarrassé des restes aromatiques par un reflux de 8 h dans 30 ml de méthylate de Na à 4% dans le méthanol. On dilue à l'eau, sature en Na_2SO_4 la phase hydro-alcoolique alcaline et extrait au benzène. L'extrait benzénique, séché sur Na_2SO_4 et évaporé à sec, donne un résidu rouge huileux de 487 mg (70%).

625 mg de (-)-hexestrol, [$(\alpha)_D^{20} = -32,2^\circ$, $F = 81-82^\circ\text{C}$], traités de la même façon, donnent un résidu brun huileux de 410 mg (63%).

La TLC sur silicagel des deux résidus, l'un dextrogyre, l'autre lévogyre, de la perhydrogénation [éluant: benzène/méthanol (95:5)] montre que chacun de ceux-ci contient les deux stéréoisomères *trans-trans* et *cis-trans* (en présence des témoins racémiques).

Diverses tentatives de cristallisation fractionnée n'ont pas abouti à une séparation satisfaisante de ces énantiomères: dès lors, chacun des deux résidus a été chromatographié séparément sur colonnes d'alumine Brockman (activité II-III) dans des conditions identiques à celles appliquées pour la purification des énantiomères de l'hexestrol. Cette méthode a permis de séparer, de façon remarquable et avec de bons rendements, les diols énantiomères *trans-trans* et *cis-trans* de chacun des deux résidus. Les constantes physiques (F , α_D^{20} , R_f en TLC) ainsi que les analyses spectrales, comparées à celles des racémiques correspondants, ont permis de confirmer la structure des énantiomères isolés (Tableaux 2 et 3). D'autre part, l'appariement à poids égaux des énantiomères purs, de signes opposés, a donné dans chaque cas, le racémique correspondant. Les quatre nouveaux stéréoisomères ont été soumis aux analyses biologiques (voir plus loin).

4. Obtention de la perhydrodicétone (5)

Dans un ballon à trois tubulures de 500 ml, on dissout 7,05 g de perhydrohexestrol *trans-trans* (1) dans

200 ml de benzène fraîchement distillé. En maintenant la température à 10°C , on ajoute, goutte-à-goutte sous agitation, 23 ml du réactif de Jones (135 g CrO_3 dissous dans un mélange de 15 ml de H_2SO_4 concentré et de 300 ml d'eau. On porte à 500 ml avec l'eau.) On laisse ensuite réagir le mélange, sous agitation et à la température ambiante, pendant trois heures. On décompose l'agent oxydant en excès par l'addition de 0,5 ml d'isopropanol, on filtre et on lave, sur le filtre, le résidu vert avec 20 ml d'acétone. Les solvants sont évaporés, sous pression réduite, au rotavapor et le résidu vert huileux est dissous dans 100 ml de CH_2Cl_2 et extrait trois fois à l'eau et une fois avec une solution de NaHCO_3 . L'extrait, séché sur MgSO_4 et évaporé à sec, donne un résidu jaune huileux de 6,93 g. Le produit brut, cristallisé deux fois dans l'éther de pétrole, donne 6,25 g (90%) de perhydrodicétone *trans-trans* (5) sous forme de cristaux blancs, $F = 75^\circ\text{C}$.

Le même procédé d'oxydation, appliqué à 2,82 g du perhydrohexestrol *cis-trans* (2) a permis d'obtenir 1,67 g (60%) de la même dicétone (5).

i.r. $(\text{KBr})_{\bar{\nu}_{\text{max}}} 2960$ et 1720 cm^{-1} .

Spectre de masse: Le spectre de masse de la dicétone (5) est caractérisé par un pic moléculaire ($m/e = 278$). Le pic principal correspond à la rupture de la molécule en deux parties symétriques et perte de deux protons ($m/e = 137$).

Spectre de RMN (CDCl_3): Le spectre de RMN présente $\delta = 2,27$ un massif pour les protons vicinaux des carbonyles; $\delta = 1,30$ un quadruplet ($J = 6\text{ Mz}$) pour les protons méthylènes, $\delta = 0,96$ un triplet pour les protons des méthyles.

5. Séparation des énantiomères de la (\pm)-perhydrodicétone

Seul l'isolement de l'énantiomère (-)-perhydrodicétone a été décrit sommairement par W. Kreiser[7]. Nous avons mis au point la méthode de séparation des deux énantiomères [10]. Dans un bicol muni d'un réfrigérant et d'un ampoule à pression constante, on

Tableau 2. Caractéristiques des quatre perhydrohexestrols (*trans-trans* et *cis-trans*) optiquement actifs obtenus

Hexestrols de départ	Perhydrohexestrols	F(+) (*) (C)	TLC (silicagel) R_f (†)	$(\alpha)_D^{20}$ (‡)	Rendements
(+) - Hexestrol	(+) - Perhydrohexestrol <i>trans-trans</i>	168-170	0,203	+12,4° (c = 0,8%)	200 mg (30%)
	(+) - Perhydrohexestrol <i>cis-trans</i>	122-123	0,169	+19,4° (c = 0,95%)	80 mg (12%)
(-) - Hexestrol	(-) - Perhydrohexestrol <i>trans-trans</i>	166-168	0,201	-11,9° (c = 0,73%)	250 mg (40%)
	(-) - Perhydrohexestrol <i>cis-trans</i>	120-121	0,167	-19,0	100 mg

* Pour les perhydrohexestrols *trans-trans* (+) et (-): cristallisation dans l'éther; pour les perhydrohexestrols *cis-trans* (+) et (-): cristallisation dans benzène-éther de pétrole (Eb: $40-60^\circ\text{C}$).

† Solvant d'éluant: benzène-méthanol (95:5).

‡ Mesures faites dans l'éthanol.

Tableau 3. Paramètres RMN des perhydrohexestrols *trans-trans* (1) et *cis-trans* (2) (déplacements chimiques δ par rapport au TMS), constantes de couplage J en Hz, solvant CDCl_3 , $T = 333^\circ\text{K}$. Voir Fig. 5

δ (ppm)		J en Hz												
δ_1 ou δ_6	δ_3	δ_2	δ_4	δ_{9c}	δ_{15c}	δ_{10}	δ_{16}	$J_{1,2}$	$J_{5,6}$	J_{9c-10a} OU $J_{11c-10a}$	$J_{16a-17a}$	$J_{15a-16a}$	$J_{17c-16a}$	$J_{15c-16a}$
(1)	0.88	1.26	1.74	1.99	1.99	3.46	3.50	7	7	10	10	10	4.5	4.5
(2)	0.88	1.26	1.74	1.99	1.99	3.99	3.51	7*	3*	10	10	10	4.5	4.5

* Ces valeurs peuvent être interverties.

introduit, sous agitation. 6 ml d'une solution aqueuse de bisulfite de sodium à 40% et 3 g de (+)- α phényléthylamine. On porte à pH 6 avec de l'acide acétique et on ajoute, goutte-à-goutte à la température ambiante, 3,5 g de la perhydrodicétone (5) dissoute dans 40 ml d'éther anhydre fraîchement distillé. L'addition terminée, on continue à agiter jusqu'à l'obtention d'un précipité blanc que l'on filtre sous pression réduite et lave deux fois à l'éther et une fois avec 5 ml d'eau glacée. On conserve le filtrat pour l'expérience suivante. Le résidu blanc est cristallisé trois fois dans le tétrahydrofurane/ H_2O dans la proportion 2:1 en volume.

Le composé bisulfite aminé (+) obtenu est dissous dans 20 ml de dichlorométhane et hydrolysé par 20 ml d'acide sulfurique à 20% à la température ambiante pendant deux heures. Après décantation, séchage, concentration et trois recristallisations dans l'éther de pétrole, on obtient 1,4 g de la (+)-perhydrodicétone (6) sous forme d'aiguilles blanches avec un rendement de 40%. $F = 62^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = +12^\circ$ ($c = 1$, éthanol absolu).

Les eaux mères et le filtrat obtenus précédemment et qui ont été traités par la (-)- α phényléthylamine permettent, en y appliquant le même procédé, d'obtenir le composé pur de (-)-perhydrodicétone (7), avec un rendement de 38%. $F = 64^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ ($c = 1$, éthanol absolu). Les deux énantiomères (6) et (7) sont instables en solution éthanolique à la température ordinaire après quelques heures.

6. Réduction de la dicétone racémique (5)

Un autre essai, séparé, de synthèse du perhydrohexestrol racémique *trans-trans* a été tenté par réduction de la dicétone racémique (5).

300 mg de NaBH_4 dans 30 ml d'éthanol sont additionnés, goutte-à-goutte, de 3,35 g de la dicétone (5) dissous dans 10 ml d'éthanol. On laisse reposer pendant 12 h. On dilue avec 20 ml d'eau et extrait trois fois avec 50 ml de dichlorométhane. L'extrait est séché puis évaporé à sec. Par cristallisation du résidu dans le méthanol, on obtient 2,3 g (80%) de (\pm)-perhydrohexestrol *trans-trans* (1) sous forme de cristaux incolores ($F = 188-189^\circ\text{C}$). Aucune trace du stéréoisomère *cis-trans* (2) n'est décelée dans les eaux-mères.

L'obtention exclusive d'alcool équatorial lors de la réduction, par le borohydrure, de la dicétone (5), non encombrée, peut être due aux interactions de torsion entre les protons axiaux [18] du carbonyle, ce qui favorise l'attaque de l'ion hydrure du côté équatorial.

Etude spectroscopique des composés *trans-trans* (1) et *cis-trans* (2)

Les spectres de masse de ces deux composés sont caractérisés par un ion moléculaire correspondant à une molécule partiellement déshydratée ($m/e = 264$) et par deux ions importants correspondant—l'un à la fragmentation symétrique de la molécule avec perte

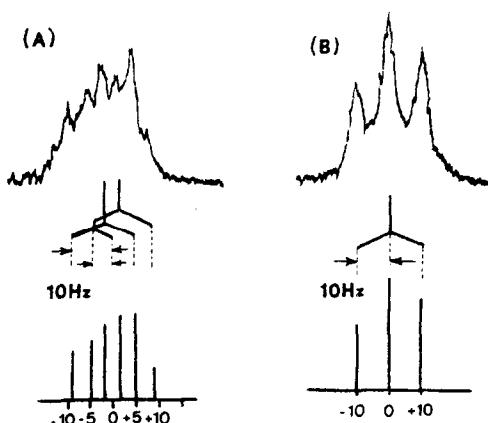


Fig. 2. Spectre ^1H RMN de (A): protons carbinoliques H_{10} et H_{16} et de (B): signaux de ces protons après irradiation des protons vicinaux équatoriaux du perhydrohexestrol *trans-trans* (1).

d'une molécule d'eau ($m/e = 123$) et—l'autre à la déshydratation du cyclohexanol ($m/e = 81$).

Pour les perhydrohexestrols *trans-trans* (1), les spectres i.r. se caractérisent par une fréquence d'élongation $\bar{\nu}_{\text{C-OH}}$ à 1060 cm^{-1} et deux bandes d'absorption asymétriques à 3300 et 3350 cm^{-1} des groupements hydroxyles, ce qui correspond à la situation diéquatoriale des alcools par rapport aux deux cyclohexanes. Ces attributions sont en parfait accord avec les données de la littérature [19–23].

En résonance magnétique protonique (Tableau 3) le spectre du composé (1) montre, au champ le plus faible, un multiplet constitué de deux triplets de triplet dont les raies centrales sont respectivement à 3.50 et 3.46 ppm . A l'intégration, ce multiplet correspond à deux protons et doit être attribué aux protons carbinoliques. Ces protons sont donc représentés par deux

signaux résonant à des fréquences légèrement différentes. Leur multiplicité (deux triplets de triplet), et leurs constantes de couplage (Fig. 2A) avec les protons vicinaux axiaux ($J_{vic} = 10\text{ Hz}$) et avec les protons vicinaux équatoriaux ($J_{vic} = 4.5\text{ Hz}$) indiquent que ces protons carbinoliques sont axiaux [24–28]. En effet, ces résultats concordent avec le fait bien connu que les constantes de couplage sont plus grandes lorsque les protons vicinaux sont diaxiaux *trans*-coplanaires et moins grandes quand ils sont *cis*-coplanaires (protons de type axial-équatorial) [29, 30].

L'irradiation des protons carbinoliques axiaux H_{10} et H_{16} permet l'attribution du massif à 1.99 ppm (4 protons) aux protons vicinaux équatoriaux. En effet, dans les cycles saturés à six pièces, les protons équatoriaux résonnent à champ plus faible que les protons axiaux. D'autre part, l'irradiation de ce massif centré sur 1.99 ppm transforme le multiplet à 3.50 – 3.46 ppm en un triplet qui correspond à un couplage diaxial avec les protons vicinaux axiaux. Ceci est une preuve supplémentaire de la nature vicinale équatoriale *vis-à-vis* des protons carbinoliques du signal à 1.99 ppm .

La Figure 2B de double résonance montre deux constantes de couplage identiques J_{aa}^{vic} qui ne peuvent que caractériser les couplages $J_{9a-10a} = J_{10a-11a} = J_{15a-16a} = J_{16a-17a} = 10\text{ Hz}$. Ces valeurs sont comparables à celles des dérivés *trans*-4-alkyl-cyclohexanols [31–35].

Remarquons l'asymétrie de signal à 1.99 ppm qui traduit des non équivalences magnétiques pour les protons équatoriaux vicinaux $\text{H}_9\text{H}_{11}\text{H}_{15}\text{H}_{17}$.

Le signal centré sur 1.74 ppm comporte six raies. Il n'est pratiquement pas déplacé par $\text{Eu}(\text{FOD})_3$. On peut l'attribuer aux protons liés à C_3 et C_4 magnétiquement équivalents et couplés aux protons équivalents en 7 et 13 d'une part et aux protons méthyléniques équivalents en 2 et 5 d'autre part.

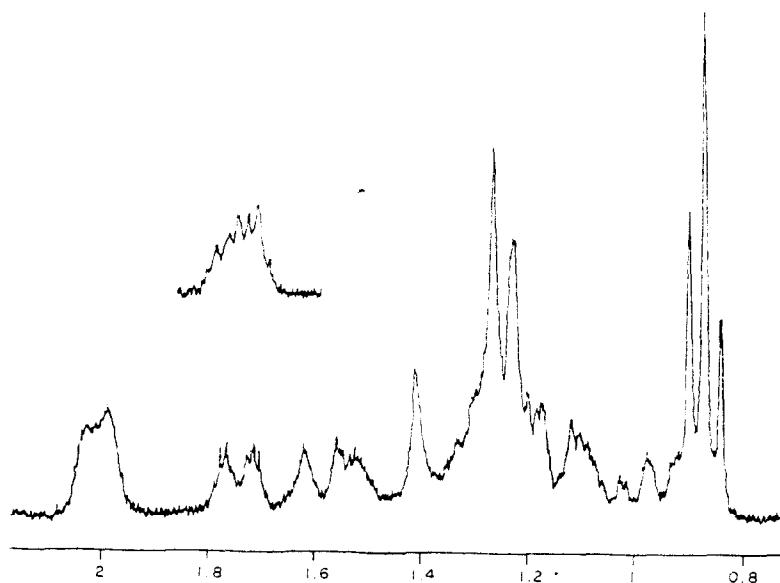


Fig. 3. Spectre ^1H RMN du perhydrohexestrol *trans-trans* (1).

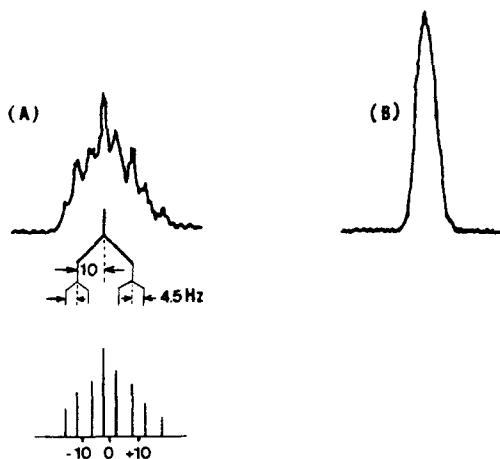


Fig. 4. Spectre ^1H RMN de (A): proton carbinolique axial H_{10} et de (B): proton carbinolique équatorial H_{16} du perhydrohexestrol *cis-trans* (2).

Nous trouvons à 1,41 ppm un signal déplacé par les variations de température. Il s'agit d'un hydroxyle dont on n'observe pas le couplage avec le proton carbinolique. La surface de ce pic est équivalente à celle d'un proton. Un second proton hydroxylique résonne vraisemblablement dans la région située entre 1,52–1,55 ppm laquelle subit des modifications après changement de température (Fig. 3).

L'addition de sel d'Europium dissocie le massif situé à 1,26 ppm en trois triplets: le premier est peu déplacé vers les champs faibles par rapport au signal de départ et il correspond à 4 protons, nous l'attribuons donc aux CH_2 en C_2 et C_5 ; le deuxième et le troisième sont déplacés plus nettement et correspondent chacun à deux protons, il s'agit très probablement des protons vicinaux axiaux H_9 , H_{11} et H_{15} , H_{17} non équivalents deux par deux.

Les méthyles en C_1 et C_6 apparaissent sous la forme d'un triplet centré sur 0,88 ppm objectivant le couplage avec les CH_2 en C_2 et C_5 . Le fait que les raies extérieures de ce triplet ne sont pas d'amplitude égale et que la raie centrale est large suggère qu'il existe pour les méthyles deux signaux à des fréquences légèrement différentes et que le couplage des méthyles avec les méthylènes voisins n'est pas du premier ordre.

Pour les perhydrohexestrols *cis-trans* (2), les spectres i.r. présentent deux bandes d'absorption différentes: l'une à 1060 cm^{-1} et l'autre à 960 cm^{-1} , ce

qui correspond donc à la situation axiale équatoriale des hydroxyles [19–23].

En résonance magnétique nucléaire, le spectre protonique du composé (3) présente à champ faible trois multiplets distincts. La comparaison des composés (1) et (2) permet d'attribuer le signal à 3,51 ppm, représentant un proton, au proton carbinolique axial. Le signal à 3,99 ppm, également d'intensité équivalente à un proton, est attribuable au proton carbinolique équatorial (Fig. 4). En effet, sur les cycles à 6 pièces, les protons équatoriaux résonnent à environ 0,5 ppm à champ plus faible que les protons axiaux. En outre, si les constantes de couplage du signal à 3,99 ppm ne peuvent être mesurées avec précision, la largeur assez faible de la raie permet d'exclure le cas J diaxiales. Ces valeurs sont en parfait accord avec les résultats expérimentaux de Price[36] et d'Anet[37, 38].

En ce qui concerne les constantes de couplage vicinales, le proton carbinolique H_{16a} se présente comme dans le cas du *trans-trans* diol (1) sous la forme d'un triplet de triplet (3,51 ppm) avec deux constantes de couplage diaxiales identiques $J_{9a-10a} = J_{10a-11a} = 10\text{ Hz}$ et des constantes plus petites axiales-équatoriales $J_{9c-10a} = J_{10a-11c} = 4,5\text{ Hz}$.

Le massif à 1,99 ppm (2 protons) peut être attribué aux protons équatoriaux en C_9 , C_{11} par analogie avec le spectre de (1) et aussi grâce au fait qu'il est modifié après l'irradiation du signal à 3,51 ppm (proton carbinolique axial en C_{10}).

Egalement par comparaison avec le spectre (1), les groupements méthylènes en C_2 et C_5 peuvent être localisés à 1,26 ppm (Fig. 6).

On observe deux triplets pour les protons des méthyles en C_1 et C_6 dont les raies centrales sont fort voisines (0,88 ppm) mais dont les J_{vic} avec les méthylènes en C_2 et C_5 sont différents (7 Hz et 3 Hz) (Tableau 3).

Analyse radiocristallographique des composés (1) et (5)

Au point de vue chimique le perhydrohexestrol *trans-trans* (1) et la perhydrodicétone (5) ne diffèrent que par leurs deux groupements fonctionnels. Au point de vue biologique, le racémique (1) n'a aucune affinité pour le récepteur ABP, tandis que le composé (5) a, pour l'ABP, une grande affinité. Il nous a, dès lors, paru important de comparer la structure de ces deux molécules établie par l'analyse radiocristallographique que nous avons publiée ailleurs [39].

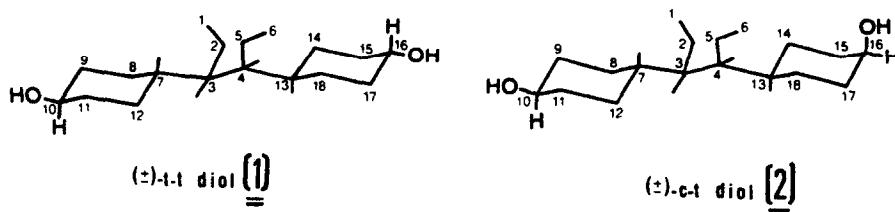


Fig. 5. (à mettre en tête du Tableau 3).

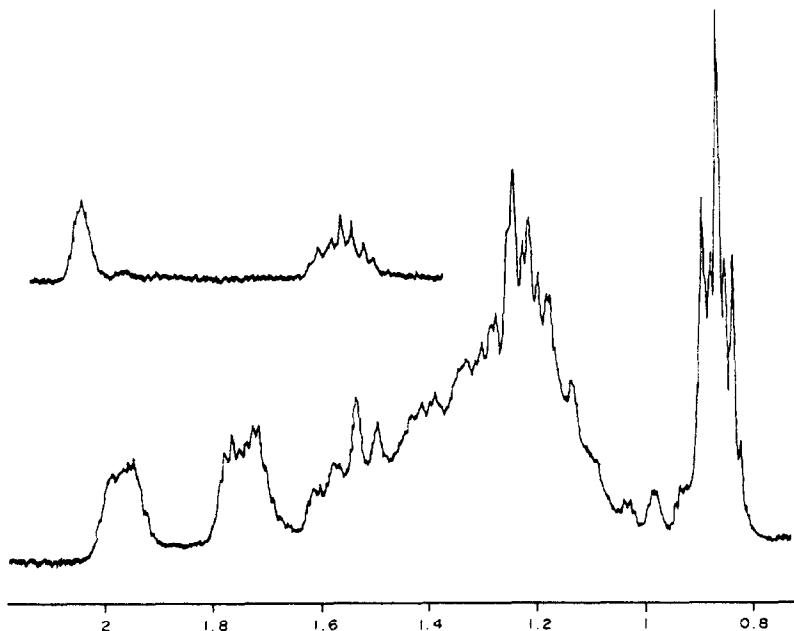


Fig. 6. Spectre ^1H RMN du perhydrohexestrol *cis-trans* (2).

Les molécules (1) et (5) montrent, à l'état solide, des conformations très semblables: les deux groupements éthyloxy se placent respectivement à 32° et 31° l'un de l'autre, en conformation semi-éclipsée; les fragments cyclohexaniques adoptent la configuration chaise. La Fig. 7 donne une perspective nouvelle de la structure radiocristallographique du composé (5).

Toutefois, il existe des différences aux deux centres d'asymétrie: les projections de Newman autour de la liaison $\text{C}_3^*-\text{C}_4^*$, indiquent que les angles $\text{C}_7-\text{C}_3-\text{H}$ (100°) et $\text{C}_7-\text{C}_3-\text{C}_2$ (99°) de la perhydrodicétone (5) (Fig. 8B) sont plus écartés que les angles correspondants (92° et 96°) du perhydrohexestrol *trans-trans* (1) (Fig. 8A). Parallèlement, on observe que la molécule (1) possède un axe binaire perpendiculaire à la liaison centrale C_3-C_4 tandis que dans la molécule (5) cet axe n'est qu'approximatif.

Les données des déterminations de structure sont publiées ailleurs [39].

Biologie

1. L'ABP a été obtenue par la méthode de G. Rousseau [11, 12] à partir d'épididymes de rats Wistar. L'AR cytosolique épидидymaire a été inactivé par le procédé de Kirchoff [40] c'est-à-dire par congélation à -20°C suivie de décongélation à 30° pendant 30 min. en absence de 1,4-dithiothreitol. L'ABP est insensible à ce traitement [40].

Pour déterminer la liaison spécifique avec l'ABP, des aliquots de cytosol épидидymaire sont incubés 3 h à 0° avec une quantité constante de $[\text{}^3\text{H}]\text{-DHT}$ (1,5 nM) et en présence de concentrations croissantes de la substance à tester (Fig. 9). A la fin de l'incubation, la fraction de substance non liée à l'ABP est éliminée au Norit-Dextrane (50 mg de Norit

Merck + 5 mg de Dextrane par ml d'eau distillée [40]). On détermine par comptage la somme de la liaison spécifique et de la liaison non spécifique. La liaison non spécifique est calculée par soustraction à partir d'une incubation parallèle avec un grand excès (ordre de 500 à 1000 fois) de DHT non radioactif de façon à éliminer toute la radioactivité liée au complexe de liaison spécifique. De cette manière, la liaison non spécifique à l'ABP représente 10% de la liaison totale.

On a déterminé la caractère *compétitif* de l'inhibition de la liaison DHT-ABP en incubant 3 h à 0° des aliquots de cytosol épидидymaire avec des concentrations croissantes de $[\text{}^3\text{H}]\text{-DHT}$ (ligand radioactif spécifique) et en l'absence ou en la présence (en quantité constante de $1\ \mu\text{M}$) de la substance inhibitrice testée (Fig. 10).

L'affinité pour l'ABP est exprimée en constante d'association à l'équilibre K_A ou en constante de dis-

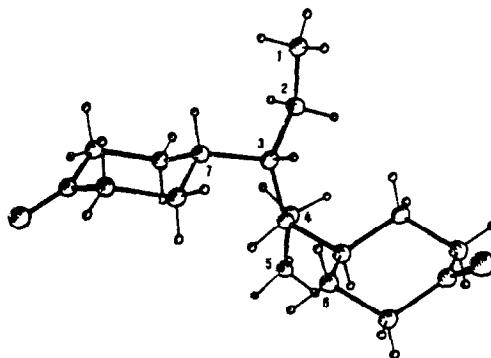


Fig. 7. Radiocristallographie de la perhydrodicétone *trans-trans* (5).

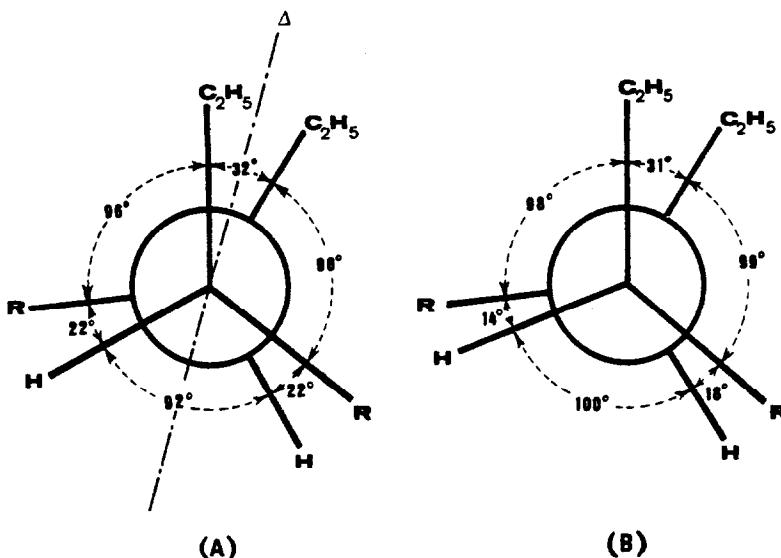


Fig. 8. Projection de Newman (A): du perhydrohexestrol *trans-trans* (1) et (B): de la perhydrodicétone *trans-trans* (5). R = cycle.

sociation $K_D = 1/K_A$. K_A a été calculé par extrapolation (régression linéaire) à partir du graphique de Lineweaver-Burk établi d'après les résultats expérimentaux (Fig. 10). On a joint à chaque expérience une série faite avec $1 \mu M$ de DHT non tritiée servant d'étalon interne. Les valeurs de K_A ont été corrigées par cet étalon.

Résultats pour l'ABP

Le tableau 4 montre que le perhydrohexestrol racémique *trans-trans* (1) et ses deux énantiomères n'ont qu'une très faible affinité pour l'ABP; par contre, le perhydrohexestrol racémique *cis-trans* (2), ses deux énantiomères et surtout la perhydrodicétone racémique (5) accusent une nette affinité pour l'ABP dont elles inhibent complètement la liaison à la DHT. L'affinité

de l'énantiomère (+) de (2) est supérieure à celle de l'énantiomère (-), celle-ci étant à peu près identique à celle du racémique. L'affinité des deux énantiomères de la (\pm) dicétone n'a pas pu être mesurée correctement à cause de leur grande instabilité (voir partie expérimentale). Les essais suggèrent toutefois que la forme (+) a une affinité pour l'ABP plus grande que la forme (-) [12].

Les résultats (Fig. 10) confirment que la DHT réagit avec une classe unique de sites récepteurs [40, 11] et que les inhibiteurs paraissent interférer avec la DHT par compétition.

2. L'AR (androgen receptor de la prostate) a été obtenu par un procédé analogue [11, 40], mais en présence de 1,4-dithiothreitol en concentration d'ordre nM. Pour déterminer la liaison spécifique à

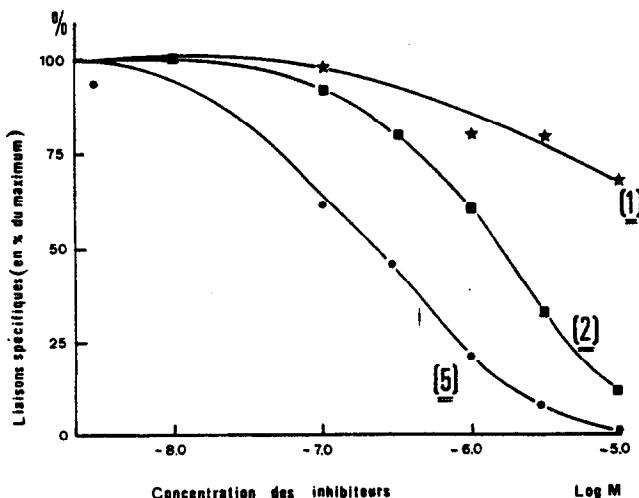


Fig. 9. Liaisons spécifiques des inhibiteurs à l'ABP en % du maximum de liaison de [3H]-DHT observée en l'absence des inhibiteurs.

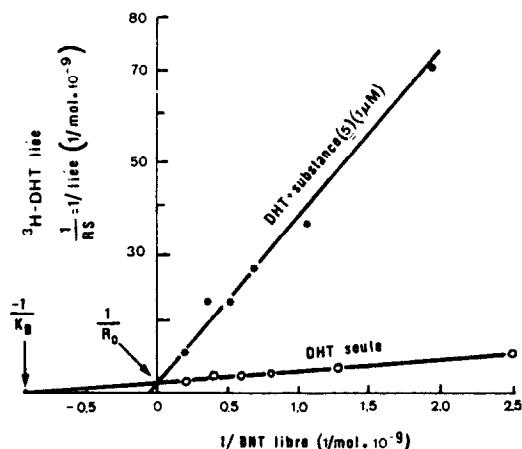


Fig. 10. Graphique de Lineweaver-Burk des mesures de compétition de la $[^3\text{H}]$ -DHT avec la perhydrodicétone (5): liaison de $[^3\text{H}]$ -DHT à l'ABP du cytosol épидидymaire de rat en absence et en présence du corps (5) [11]. R_0 et S_0 représentent la concentration totale respectivement du Récepteur et de la Substance à tester.

l'AR prostatique, le cytosol est incubé 16 h à 0°C , avec de la $[^3\text{H}]$ -méthyltriénolone 2,5 nM, parallèlement en absence et en présence des substances à doser et, d'autre part, en absence et en présence de testostérone ou de DHT témoins. La liaison non spécifique, calculée comme pour l'ABP, a été de 27% de la liaison totale de l'AR à la méthyltriénolone. La liaison spécifique est exprimée en pourcentage de la liaison maximale trouvée en absence d'inhibiteurs (7 340 d.p.m.) et dans les conditions où la testostérone et la DHT inhibent à 100% la liaison avec la méthyltriénolone (17 β -hydroxy-17 α -méthyl-estra-4,9,11-triène-3-one). Ce stéroïde a, pour l'AR, une affinité spécifique plus forte que la DHT, mais n'a qu'une affinité très faible pour l'ABP [40, 11].

Résultats pour l'AR

Les pourcentages de liaison spécifique pour l'AR prostatique ne sont significatifs pour aucune des sept molécules mentionnées dans le Tableau 4.

DISCUSSION

Si, sur le plan chimique, l'obtention des énantiomères des racémiques *cis-trans* perhydrohexestrol

(2) et *trans-trans* perhydrodicétone (5) est une nouveauté d'une approche difficile, elle a aussi un intérêt certain sur le plan biologique. Contrairement à la T et surtout à la DHT, ces deux composés et leurs énantiomères, surtout les énantiomères (+), ont une affinité spécifique marquée pour l'ABP sans avoir, comme DHT et comme T, une affinité supplémentaire pour l'AR prostatique.

En ce qui concerne le mécanisme des affinités de nos molécules pour leurs récepteurs protéiques, la détermination des structures (1) et (5) par diffraction des rayons X apporte une meilleure connaissance de leur conformation, sans paraître expliquer, pour autant, ces affinités. Plusieurs auteurs [10, 41, 42] ont proposé l'hypothèse d'une analogie de structure stérique entre les hormones stéroïdes naturelles et les "hormones" non stéroïdes artificielles pour expliquer, ou pour obtenir par synthèse, l'équivalence de leurs propriétés biologiques. Dans le cas présent, l'analogie géométrique de (1) et de (5) ne concorde pas avec une analogie d'affinité pour le récepteur ABP. Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer ces apparentes contradictions: les configurations spatiales pourraient varier d'après que la substance est à l'état pur (solide cristallisé) ou à l'état solvaté (liquide): l'analyse conformationnelle par la radiocristallographie laisse d'ailleurs prévoir, pour nos deux composés—surtout pour la perhydrodicétone (5)—la possibilité d'existence d'autres conformations susceptibles de s'accommoder, par analogie stérique, à un récepteur approprié de stéroïdes. Cependant, l'hypothèse structurale dépend elle-même d'autres facteurs, tels que la nature et les positions respectives des fonctions chimiques de la molécule, le degré de solubilité dans les fluides biologiques, etc.

L'étude stéréochimique des composés *trans-trans* (1) et *cis-trans* (2) par la méthode spectroscopique ^1H RMN fournit des résultats assez remarquables: le composé *trans-trans* perhydrohexestrol (1) présente deux signaux pour les protons hydroxyliques, les protons carbinoliques et les protons vicinaux et axiaux C_9 , C_{11} , C_{15} et C_{17} . La molécule étant symétrique, chacun de ces protons ou groupe de protons devrait être représenté par un seul signal. On peut suggérer une explication à ce phénomène: en solution les cycles à six carbones retrouvent une certaine mobilité. Le dédoublement des signaux des protons de l'hydroxyle

Tableau 4. Constantes d'affinité des composés étudiés pour l'Androgen binding protein (ABP)

Substances	Constantes d'affinité K_d (l/mol)
(\pm)-Perhydrohexestrol <i>trans-trans</i> (1)	$0,6 \times 10^9$
(+)-Perhydrohexestrol <i>trans-trans</i>	$0,6 \times 10^9$
(-)-Perhydrohexestrol <i>trans-trans</i>	$0,7 \times 10^9$
(\pm)-Perhydrohexestrol <i>cis-trans</i> (2)	$3,6 \times 10^9$
(+)-Perhydrohexestrol <i>cis-trans</i>	$4,9 \times 10^9$
(-)-Perhydrohexestrol <i>cis-trans</i>	$3,3 \times 10^9$
(\pm)-Perhydrodicétone <i>trans-trans</i> (5)	$12,0 \times 10^9$

et des cycles pourrait correspondre à l'existence de deux conformères énergétiquement favorisés.

Le composé *cis-trans* perhydrohexestrol (2) montre un seul massif pour le proton carbinolique axial qui se présente sous la forme d'un triplet de triplet ayant deux constantes de couplage vicinales identiques à ceux du composé (1).

D'autre part, on observe également que les protons des méthyles en C₁ et C₆ du composé (2) ont des déplacements chimiques voisins, mais les constantes de couplage avec les méthylènes en C₂ et C₅ sont nettement différentes.

Remerciements—Mme le Docteur Sc. Xuân-Hoa Bui-Bruyère adresse ses vifs remerciements au Consortium Pétrochimique du Mahgreb pour son mécénat. Mr R. Saliba, Ing. Chimiste, remercie le Conseil National de la Recherche Scientifique du Liban pour son crédit lui permettant de poursuivre ses recherches. Nos remerciements vont aussi à l'Union Chimique Belge (U.C.B.), en particulier aux Docteurs Sc. Geerts et Naveau pour leur aide importante et amicale relative aux hydrogénations catalytiques et à la prise des spectres de masse. Les Docteurs H. Bassompierre et R. Roger ont exécuté les tests biologiques sur les perhydrohexestrols racémiques et énantiomères à l'E.N.S. (Paris): nous leur exprimons notre vive reconnaissance. Enfin, nous tenons à remercier Mme Lomba et Mr Ph. Tilkin pour leur collaboration technique particulièrement efficace.

REFERENCES

- Dodds E. C. and Lawson W.: Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc. r. Soc. Lond. B.* **126** (1938) 222–231.
- Dodds E. C., Goldberg L., Lawson W. and Robinson R.: Synthetic oestrogenic compounds related to stilbene and diphenylethane. Part I. *Proc. r. Soc. Lond. B.* **127** (1939) 140–167.
- Dodds E. C., Goldberg L., Grünfeld E. I., Lawson W., Saffer C. M. Jun. and Robinson R. Synthetic oestrogenic compounds related to stilbene and diphenylethane. II. *Proc. r. Soc. Lond. B.* **131** (1943) 83–100.
- Campbell N. R., Dodds E. C. and Lawson W.: The nature of the oestrogenic substances produced during the demethylation of anethol. *Proc. r. Soc. Lond. B.* **128** (1940) 253–262.
- Schoeller W., Inhoffen H. H., Steinruck K. und Höss O.: *D.R.P.* Nr. 743 005 (1939).
- Inhoffen H. H., Kopp D., Maric S., Bekurds J. and Selimoglu R.: Untersuchungen an hochsubstituierten Äthylenen und Glykolen. X. Zur Stereochemie der Hexoestrole. *Tetrahedron Lett.* **30** (1970) 999–1002.
- Kreiser W. and Neff G.: Untersuchungen an hochsubstituierten Äthylenen und Glykolen. XIII. Racematspaltung und absolute Konfiguration des 3,4-bis-(4-oxocyclohexyl)-hexans. *Tetrahedron Lett.* **31** (1971) 2985–2988.
- Ugnade H. E. and Ludutsky A.: Hydrodiethylstilbestrol compounds. I. The perhydrocompounds. *J. org. Chem.* **10**, (1945) 307.
- Hansson V., Ritzén E. M., French F. S. and Nayfeh S. N.: Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. In *Handbook of Physiology* (Edited by D. W. Hamilton and R. O. Greep). Endocrinology chap. 7. Vol. V. (1975) pp. 173–201.
- Devis R. et Bui Xuân-Hoa: Contribution à l'étude des androgènes synthétiques non stéroïdes. I. Perhydrohexestrols et dicétones correspondantes. *Bull. Soc. Chim. France* (1979) 657–664.
- Rousseau G. G., Quivy J. I., Kirchoff J., Bui X. H. and Devis R.: Non steroidal compounds which bind epididymal androgen-binding protein but not the androgen receptor. *Nature.* **284** (1980) 458–459.
- Quivy J. I., Devis R., Bui X. H., Schmit J. P. and Rousseau G. G.: Specific inhibitors on androgen binding to the androgen-binding protein ABP. In *Reproductive Processes and Contraception* (Edited by K. W. McKerns). Plenum Press, New York, (1981) pp. 181–193.
- Main P., Hull S. E., Lessinger L., Germain G., Declercq J. P. and Wolfson M. M.: Multan 78: A system of Computer Programmes for the Automatic solution of crystal structures from X-Ray Diffraction Data. Universities of York and Louvain (1978).
- von Wessely G. und Welleba H.: Zur Konfiguration der synthetischen Oestrogenen. *Naturwiss.* **28** (1940) 780.
- von Wessely F. und Welleba H.: Ueber synthetische Oestrogene, II. Zur Konfiguration der synthetischen Oestrogene. *Ber. d. Chem. Ges.* **74** (1941) 777–788.
- Collins D. H. and Hobbs J. J.: Antioestrogenic and antifertility compounds. III. Enantiomers of (±)-hexoestrol and its homologues. *Aust. J. Chem.* **24** (1971) 1605–1624.
- Devis R.: Recherches sur les réactions colorées du diéthylstilbestrol (oestrogène de synthèse). *C. r. séanc. Soc. Biol., Belg.* **140** (1946) 1071–1083. *Chem. Abst.* **42** (1948) 629D.
- Cherest M. and Felkin H.: Torsional strain involving partial bonds. The steric course of the reaction between alkyl magnesium bromide and 4-t-butylcyclohexanone. *Tetrahedron Lett.* **18** (1968) 2205–2208.
- Braude E. A. and Waight E. S.: The relationships between the stereochemistry and spectroscopic properties of organic compounds. In *Progress in Stereochemistry* (Edited by W. Klyne). Butterworths, London, Vol. I (1954) pp. 126–176.
- Oki M. and Iwamura H.: Intramolecular interaction between hydroxyl group and π -electrons. IV. Rotational isomers of alcohols and shift of OH absorption in phenyl substituted alcohols. *Bull. Chem. Soc. Japan* **32** (1959) 950–955.
- Mounet J., Huel J. et Dreux J.: Etude de la condensation du formaldéhyde sur la cyclohexanone. IV. Réduction du dioxo-2,2 dicyclohexyl-méthane méso. *Bull. Soc. Chim. France* **8** (1971) 3006–3009.
- Chiurdoglu G. et Masschelein W.: Etudes spectroscopiques de molécules hydroxylées. I. Localisation des bandes (C—O) d'une série d'alcylcyclohexanols secondaires par l'étude des effets de solvant sur les spectres infra-rouges. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **70** (1961) 307–320.
- Aaron H. S. and Radar C. P.: Direct conformational assignment of the hydroxyl group. *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 3046–3047.
- Musher J. I.: Long-range nuclear magnetic shielding in molecules and the anisotropy in the magnetic susceptibility of a carbon-carbon single bond. *J. Chem. Phys.* **35** (1961) 1159–1168.
- Musher J. I.: The nuclear magnetic resonance spectra of the 10-methyldecalols-2. *J. Am. Chem. Soc.* **83** (1961) 1146–1151.
- Williams D. H. and Bhacca N. S.: Dependency of vicinal coupling constants on the configuration of electronegative substituents. *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 2742–2743.
- Bhacca N. S. and Williams D. H.: *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry; Illustrations from the Steroid Field* (Holden Day Series in physical

- technics in Chemistry). Holden Day, San Francisco (1964) p. 131.
28. Reisse J., Celotti J. C., Zimmerman D. et Chiurdoglu G.: Analyse conformationnelle par resonance nucléaire magnétique. I. Différence d'enthalpie et enthalpie libre entre conformères du cyclohexanol. *Tetrahedron Lett.* **31** (1964) 2145–2150.
 29. Ensley J. W., Feeney J. and Sutcliffe L. H.: *High Resolution NMR Spectroscopy*. Pergamon Press, Oxford, Vol. I (1967) pp. 160–199.
 30. Karplus M.: Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2870–2871.
 31. Eliel E. L.: *Stereochemistry of Carbon Compounds*. McGraw Hill, New York (1962) Chap. 8.
 32. Eliel E. L., Gianni M. H., Williams Th. H. and Stothers J. B.: Chemical shifts in the nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of substituted cyclohexanols. *Tetrahedron Lett.* **17** (1962) 741–747.
 33. Eliel E. L., Bailey W. F., Kopp L. D., Willer R. L., Bertrand R., Christensen K. A., Dalling D. K., Duch M. W., Wenkert E., Schell F. M. and Cochran D. W.: Carbon-13 magnetic resonance. Upfield shifts caused by nitrogen, oxygen and fluorine atoms located at the position and anti-periplanar to the nucleus observed. *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 322–330.
 34. Lewin A. H. and Winstein S.: NMR Spectra and conformational analysis of 4-alkyl-cyclohexanols. *J. Am. Chem. Soc.* **84** (1962) 2464–2465.
 35. Uebel J. J. and Goodwin H. W.: Hydroxyl coupling constants in conformational analysis. *J. Org. Chem.* **31**, (1966) 2040–2042.
 36. Price Ch.C. and Beard Ch.D.: Free-radical chlorination of methyl cyclohexane carboxylate. II. Stereochemistry of the hydrogen-abstraction tep. *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 5921–5926.
 37. Anet F. A. L., Lee H. H. and Sudmeier J. L.: Coupling constants in the nuclear magnetic resonance spectra of endo- and exo- norbornene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 4431–4435.
 38. Anet F. A. L.: The use of remote deuteration for the determination of coupling constants and conformational equilibria in cyclohexane derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **84** (1962) 1053–1054.
 39. Van Meerssche M., Germain G., Declercq J. P., Touillaux R., Devis R. et Bui X. H.: Bis (trans-4-hydroxycyclohexyl)-3,4-hexane racemate. *Cryst. Struct. Comm.* **8** (1979) 893–897; and Bis (4-oxocyclohexyl)3,4-hexane racemate. *ibid.* **8** (1979) 971–976.
 40. Kirchoff J., Soffié M. et Rousseau G. G.: Differences in the steroid-binding site specificities of rat prostate androgen receptor and epididymal androgen-binding protein (ABP). *J. steroid Biochem.* **10** (1979) 487.
 41. Busseta B., Courseille C., Hospital M.: Etude cristallographique de différentes formes solvatées du diéthylstilboestrol. *Acta Crystallogr. B.* **29** (1973) 245–246.
 42. Weeks C. M., Cooper A. and Norton D. A., *Acta Crystallogr.* **B 26** (1970) 429–438.