

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**L'importance clinique de l'excrétion urinaire des stéroïdes  
sulfoconjugués lors de contrôles antidopage.**

Par  
Jean-François Lévesque  
B. Sc. en chimie

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Dr Donald Poirier  
Faculté de Médecine  
Université Laval

Examineur interne

Dr Michel Charbonneau  
INRS-Institut Armand-Frappier

Directrice de recherche

Dr Christiane Ayotte  
INRS-Institut Armand-Frappier

Co-directeur de recherche

Dr Alain Fournier  
INRS-Institut Armand-Frappier

15 Décembre 1998

## Résumé

Dans le contexte de la détection des anabolisants chez l'humain, la sulfoconjugaison est une réaction de la phase II peu décrite dans la littérature en comparaison à la glucuroconjugaison. Nous avons donc entrepris l'étude du potentiel diagnostique des stéroïdes et des métabolites sulfoconjugués dans diverses problématiques reliées aux contrôles antidopage. Puisque l'analyse des stéroïdes conjugués par CG/SM nécessite une étape d'hydrolyse afin de les libérer de leurs groupements endogènes polaires, nous avons dans un premier temps optimisé les conditions de solvolyses. Nos travaux ont permis d'en maximiser le rendement et la sélectivité et de minimiser la formation de produits secondaires.

La détection de l'utilisation de testostérone est basée sur la détermination d'un rapport urinaire testostérone/épitestostérone anormal. En vue d'éviter les faux-positifs reliés à des rapports entre les glucuronides de testostérone et d'épitestostérone (TG/EG) naturellement élevés, des auteurs ont proposé quatre sondes ponctuelles et complémentaires soit les TG/(EG+ES), EG/ES, TS/ES et TG/androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diolG [Dehennin. 1994b. *J. Endocrinol.*, vol. 142, p. 353-360; Dehennin et Pérès. 1996. *Int. J. Sports Med.*, vol. 17, p. 315-319]. Après avoir évalué le potentiel discriminatoire de ces rapports, nous concluons qu'aucune de ces quatre sondes ne permet de distinguer clairement entre les positifs et les individus ayant un TG/EG physiologiquement élevé. Puisque l'utilisation de ces sondes secondaires est inutile, nous croyons que l'étude du rapport TG/EG dans le temps, sous la forme d'une étude longitudinale, s'avère être la meilleure approche.

Comme la détection des agents anabolisants synthétiques est de plus en plus efficace et l'administration de testostérone est détectée par la sonde TG/EG, certains athlètes se sont alors tournés entre autres vers un de ses précurseurs naturels: la déhydroépiandrostérone (DHEA). Nous avons procédé à l'évaluation des effets de la DHEA sur le profil stéroïdien ainsi qu'à l'identification de ses métabolites sulfoconjugués et glucuroconjugués caractéristiques. Il semble que deux voies métaboliques parallèles participeraient à la biotransformation de ce précurseur de la testostérone. La première voie n'impliquerait que des stéroïdes sous leur forme libre et mènerait à une première hausse des concentrations urinaires en 5 $\alpha$ -androstanes (androstérone et 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) et en 5 $\beta$ -androstanes (étiocholanolone et 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) dans les 5 premières heures suivant la dose orale de DHEA. La seconde voie, impliquant les sulfates de DHEA, d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ainsi que la 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et la 5 $\beta$ -dihydrotestostérone sous la forme libre, entraînerait une hausse des 5 $\beta$ -androstanes uniquement après 13 heures. D'un point de vue diagnostique, la détermination de concentrations anormalement élevées en androstérone, étiocholanolone et DHEA n'est

utile que dans les 2,5 à 13 heures suivant l'administration alors que ces concentrations urinaires risquent de se démarquer des distributions de référence. Par ailleurs, l'étude des profils des stéroïdes tri-oxygénés des fractions sulfate et glucuronide semble nous permettre de détecter l'utilisation de la DHEA sur un laps de temps de plus de vingt heures. Les rapports entre la  $7\beta$ -OH-DHEA et la  $16\alpha$ -OH-androstérone sulfoconjuguées d'une part et entre la  $16\alpha$ -OH-androstérone et la  $16\alpha$ -OH-étiocholanolone glucuroconjuguées d'autre part pourraient constituer des outils diagnostiques pertinents. Nos travaux sont, à notre connaissance, les premiers à traiter de l'excrétion urinaire de métabolites hydroxylés en C-4 et C-7 chez l'humain suite à l'administration de DHEA.

## Remerciements

Je tiens à remercier tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de maîtrise, tout spécialement:

Dr Chistiane Ayotte, ma directrice de recherche, pour son encadrement, sa confiance, son dynamisme et son énergie.

Dr Alain Fournier, mon co-directeur, pour le temps qu'il m'a accordé.

Danielle Goudreault pour ses judicieux conseils et sa grande disponibilité.

Alain Charlebois pour son support technique et informatique.

Toute l'équipe de techniciens pour leur aide quotidienne.

Les Fonds pour la Formation de Chercheurs et d'Aide à la Recherche (FCAR) de m'avoir accordé une bourse pour mes études de deuxième cycle.

L'Institut National de la Recherche Scientifique de m'avoir accordé un supplément de bourse de deuxième cycle.

Claire, Ghislain et Martin pour leur soutien, leurs conseils et leurs encouragements.

Geneviève pour sa présence, sa patience, son écoute, son support et son sourire.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
 Chapitre 1: Introduction.....	 1
1.1. Les contrôles antidopage et les stéroïdes anabolisants androgènes: Une perspective dans le temps.....	1
1.2. Structure et nomenclature des stéroïdes .....	2
1.3. Androgènes.....	3
1.4. Biosynthèse et mécanisme d'action des stéroïdes androgènes.....	5
1.5. Métabolisme des androgènes.....	7
1.5.1. Métabolisme de type phase I.....	7
1.5.2. Métabolisme de type phase II.....	9
1.6. Utilisation de stéroïdes anabolisants synthétiques et endogènes comme agents dopants.....	12
1.7. Utilisation du rapport TG/EG pour détecter l'administration de testostérone.....	14
1.8. La problématique des TG/EG normalement élevés.....	16
1.9. Utilisation d'une sonde complémentaire: $\frac{TG}{(EG + ES)}$ .....	17
1.10. Utilisation des précurseurs de la testostérone comme agents dopants.....	18

1.11. Étude des métabolites sulfoconjugués: Objectifs.....	20
1.12. Protocole analytique.....	20
1.13. Hydrolyse des stéroïdes sulfoconjugués: Les voies enzymatiques et chimiques.....	21
1.14. Solvolysse chimique: Objectifs.....	23
1.15. Sommaire des objectifs.....	24
 Chapitre 2: Matériel et Méthodes.....	 25
2.1. Stéroïdes.....	25
2.2. Produits chimiques et biologiques.....	25
2.3. Méthodes d'analyse du milieu de solvolysse par CLHP-UV.....	26
2.3.1. Isolement des stéroïdes du milieu réactionnel.....	26
2.3.2. Évaluation du rendement de la solvolysse par CLHP.....	27
2.3.3. Chromatographie liquide de haute performance.....	28
2.4. Courbes d'étalonnage.....	28
2.4.1. Quantification de la testostérone et de l'épitestostérone .....	29
2.4.2. Quantification de l'androstérone et de l'étiocolanolone.....	29
2.4.3. Quantification du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol.....	29
2.4.4. Quantification de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, l'androst-5-ène- 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, la DHEA et l'épiandrostérone.....	30
2.4.5. Contrôles de qualité de la quantification et de l'hydrolyse.....	30
2.5. Isolement des stéroïdes libres.....	31
2.6. Isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués.....	31
2.7. Isolement des stéroïdes libres et sulfoconjugués.....	32
2.8. Isolement des stéroïdes sulfoconjugués.....	32
2.9. Dérivations chimiques des extraits stéroïdiens.....	33
2.10. Analyse par CG/SM.....	33

Chapitre 3: Résultats et Discussion.....	35
3.1. Introduction.....	35
3.2. Hydrolyse chimique.....	35
3.2.1. Solvolyse chimique.....	35
3.2.2. Méthanolyse.....	43
3.2.3. Autres conditions de solvolyse et de méthanolyse.....	44
3.2.4. Conclusion.....	47
3.3. Étude de la solvolyse en milieu urinaire.....	48
3.3.1. Sélectivité et durée de la solvolyse.....	48
3.3.2. Solvolyse de stéroïdes sulfoconjugués urinaires dans de l'acétate d'éthyle et du THF.....	49
3.3.3. Conclusion.....	52
3.4. Étude du profil stéroïdien de trois populations et application des sondes secondaires impliquant des stéroïdes sulfoconjugués.....	53
3.4.1. Étude du profil stéroïdien d'une population référence.....	53
3.4.2. Étude du profil stéroïdien d'urines dont les rapports TG/EG sont supérieurs à 3.....	57
3.4.3. Application des sondes secondaires impliquant des stéroïdes sulfoconjugués.....	65
3.4.4. Conclusion.....	72
3.5. Étude des effets de la déhydroépiandrosterone sur le profil stéroïdien et la production de métabolites sulfoconjugués.....	74
3.5.1. Modification du profil stéroïdien par administration de DHEA.....	75
3.5.2. Identification des métabolites urinaires de la DHEA.....	94
3.5.3. Étude des signes d'utilisation de la DHEA chez des urines d'athlètes ayant un TG/EG élevé.....	120
3.5.4. Conclusion.....	122
Chapitre 4: Conclusion.....	123
Liste des références.....	126

## Liste des figures

Figure 1.1: Androstane.....	3
Figure 1.2: La testostérone et la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone.....	4
Figure 1.3: Biosynthèse des androgènes.....	6
Figure 1.4: Métabolisme de la testostérone et de l'androstènedione.....	8
Figure 1.5: Mécanisme de formation des glucuroconjugués.....	10
Figure 1.6: Mécanisme de formation des sulfoconjugués.....	10
Figure 1.7: Le glucuronide d'androstérone et le sulfate de DHEA.....	11
Figure 1.8: Mécanisme de la solvolyse chimique.....	22
Figure 3.1: Spectre de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éther de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone et de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone déshydratée en C-17 présents dans le milieu réactionnel suite à une solvolyse dans de l'acétonitrile acidifiée.....	41
Figure 3.2: Mécanisme proposé de la solvolyse chimique.....	43
Figure 3.3: Spectres de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éthers de la 19-nortestostérone et de la 19-nortestostérone mono-oxydée présents dans le milieu réactionnel suite à une méthanolyse à l'aide de méthanol contenant du TMCS 1M.....	46
Figure 3.4: Distributions des concentrations urinaires en glucuronide de testostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence, 25 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....	58
Figure 3.5: Distributions des concentrations urinaires en glucuronide d'épitéstostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence, 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....	59

- Figure 3.6: Distributions des concentrations urinaires en sulfate de testostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence, 25 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....61
- Figure 3.7: Distributions des concentrations urinaires en sulfate d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence, 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....62
- Figure 3.8: Distributions des concentrations urinaires en sulfate de déhydroépiandrostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence, 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....63
- Figure 3.9: Distributions du rapport urinaire TG/(EG+ES) chez une population référence, 24 hommes trouvés négatifs et dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....67
- Figure 3.10: Distributions du rapport urinaire EG/ES chez une population référence, 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....69
- Figure 3.11: Distributions du rapport urinaire TS/ES chez une population référence, 25 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....70
- Figure 3.12: Distributions du rapport urinaire TG/androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol glucuronide chez une population référence, 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone.....71
- Figure 3.13: Profil d'excrétion urinaire des rapports TG/EG, AG/EtG et 5 $\alpha$ -diolG/5 $\beta$ -diolG suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....76

Figure 3.14: Profil d'excrétion urinaire des glucuronides d'androstérone et d'étiocholanolone ainsi que de 5 $\alpha$ -androstane- 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....	78
Figure 3.15: Profil d'excrétion urinaire des glucuronides d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol et de déhydroépiandrostérone suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....	80
Figure 3.16: Profil d'excrétion urinaire des rapports AS/EtS et 5 $\alpha$ -diolS/5 $\beta$ -diolS suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....	82
Figure 3.17: Profil d'excrétion urinaire des sulfates d'androstérone et d'étiocholanolone ainsi que de 5 $\alpha$ -androstane- 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....	84
Figure 3.18: Profil d'excrétion urinaire des sulfates d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....	85
Figure 3.19: Profil d'excrétion urinaire des sulfates de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.....	86
Figure 3.20: Métabolisme proposé de la DHEA.....	88
Figure 3.21: Distribution des concentrations urinaires en glucuronide d'androstérone et d'étiocholanolone en fonction de la gravité spécifique des urines: Comparaison entre une population référence et l'étude d'excrétion de la déhydroépiandrostérone chez un volontaire sain.....	91

Figure 3.22: Distribution des concentrations urinaires en glucuronide de déhydroépiandrostérone en fonction de la gravité spécifique des urines: Comparaison entre une population référence et l'étude d'excrétion de la déhydroépiandrostérone chez un volontaire sain.....	92
Figure 3.23: Mécanisme de fragmentation menant à l'ion à m/z 147.....	95
Figure 3.24: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers et TMS-éthers de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one.....	96
Figure 3.25: Mécanisme de fragmentation menant à l'ion [M-15].....	97
Figure 3.26: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers et TMS-éthers du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one.....	98
Figure 3.27: Mécanisme de fragmentation menant à l'ion [M-90].....	99
Figure 3.28: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de l'androst-5-ène-3 $\alpha$ ,4 $\xi$ -diol-17-one et de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol.....	100
Figure 3.29: L'androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\xi$ -diol-17-one (2a).....	101
Figure 3.30: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol-17-one et de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol-17-one.....	102
Figure 3.31: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis au temps zéro et 2,5 heures suite à l'administration d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.....	106
Figure 3.32: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 7,5 et 13,0 heures suite à l'administration d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.....	107

- Figure 3.33: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505, 430, et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 20 heures suite à l'administration d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.....108
- Figure 3.34: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers du  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-one et du  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-one.....110
- Figure 3.35: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers et TMS-éthers de l'androst-5-ène- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one.....112
- Figure 3.36: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers et TMS-éthers du  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one.....113
- Figure 3.37: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de glucuronides de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis au temps zéro et 2,5 heures suite à l'administration d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.....116
- Figure 3.38: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de glucuronides de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 7,5 et 13,0 heures suite à l'administration d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.....117
- Figure 3.39: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de glucuronides de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 20 heures suite à l'administration d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.....118
- Figure 3.40: Chromatogramme des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions (m/z à 522, 507, 520, 505 et 430) extraits du chromatogramme intégral d'un échantillon urinaire d'un athlète mâle déclaré négatif en 1996 présentant des signes d'utilisation de DHEA.....121

## Liste des tableaux

Tableau 1:	Étude semi-quantitative portant sur la solvolysse chimique des conjugués de la testostérone dans l'acétate d'éthyle à 40°C en présence de volumes variables d'acide sulfurique 4M.....	37
Tableau 2:	Étude semi-quantitative portant sur les effets de la température lors d'une solvolysse chimique des conjugués de la testostérone dans l'acétate d'éthyle en présence de 2 µL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M .....	37
Tableau 3:	Étude semi-quantitative portant sur les effets du solvant lors d'une solvolysse chimique des conjugués de la testostérone en présence de 2 µL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M.....	39
Tableau 4:	Étude semi-quantitative portant sur les effets de traces d'eau dans un milieu de solvolysse chimique contenant 1 mL de THF, 2 µL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M et chauffé à 50°C.....	40
Tableau 5:	Étude semi-quantitative de la méthanolyse dans du méthanol anhydre contenant du HCl 3M à 60°C.....	44
Tableau 6:	Étude semi-quantitative de la solvolysse dans le méthanol contenant du HCl 0,5M à 60°C.....	45
Tableau 7:	Étude semi-quantitative portant sur la sélectivité et le temps de solvolysse à l'aide d'urines témoins enrichies.....	48
Tableau 8:	Étude des effets conformationnels des stéroïdes sulfoconjugués urinaires sur le rendement: Solvolysse en triplicata d'une urine d'un homme dans du THF (avec et sans les stéroïdes libres et glucuroconjugués) et dans de l'acétate d'éthyle.....	50
Tableau 9:	Étude des proportions de stéroïdes androgènes urinaires dans les fractions glucuronides et sulfates chez une population référence.....	54
Tableau 10:	Étude des rapports d'androgènes urinaires dans les fractions glucuronides et sulfates chez une population référence.....	56
Tableau 11:	Étude de rapports urinaires chez une population de référence (n=63), un groupe d'athlètes dont les TG/EG sont naturellement élevés (n=25) et un groupe de positifs (n=29).....	66

Tableau 12: Identité de métabolites urinaires tri-oxygénés de la DHEA présents dans la fraction sulfate chez l'homme.....	105
Tableau 13: Identité de métabolites urinaires tri-oxygénés de la DHEA présents dans la fraction glucuronide chez l'homme.....	115

## Liste des abréviations

A: Androstérone

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

C.I.O.: Comité International Olympique

CLHP: Chromatographie en phase liquide de haute performance

Dérivé TMS-énol, TMS-éther: Dérivé énol triméthylsilylé et éther triméthylsilylé.

Dérivé TMS-éther: Dérivé éther triméthylsilylé.

DHEA: Déhydroépiandrostérone

DHT: Dihydrotestostérone

DSI: Détection sélective d'ions

E: Épitestostérone

Et: Étiocholanolone

G: Stéroïde glucuroconjugué

m/z: masse/charge

S: Stéroïde sulfoconjugué

SAA: Stéroïde Anabolisant Androgène

T: Testostérone

THF: Tétrahydrofurane

TMS: Triméthylsilyle

5 $\alpha$ -diol: 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol

5 $\beta$ -diol: 5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol

5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ : Androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol

5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\beta$ : Androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol

# Chapitre 1

## Introduction

### **1.1. Les contrôles antidopage et les stéroïdes anabolisants androgènes: Une perspective dans le temps.**

Il aura fallu un incident tragique pour que les autorités sportives et la population prennent conscience du problème qu'est le dopage dans le sport. Lors des Jeux Olympiques de Rome en 1960, un cycliste Danois du nom de Knut Enemark Jensen est décédé suite à une surdose d'amphétamine et d'acide nicotinique (Park *et al*, 1995). Trois années plus tard, le Colloque Européen sur le dopage a banni l'utilisation de substances destinées à augmenter artificiellement le rendement en vue ou à l'occasion d'une compétition et pouvant porter préjudice à l'éthique sportive et à l'intégrité physique et psychique de l'athlète (Noret, 1981). Dans la même voie, la commission médicale du Comité International Olympique (C.I.O.) fut instaurée en 1967 afin de développer un code médical ainsi qu'un service de contrôle médical lors des Jeux Olympiques de Grenoble et Mexico en 1968. Le code médical du C.I.O. prescrit l'interdiction du dopage, établit les listes de classes de substances et méthodes interdites, impose aux concurrents l'obligation de se soumettre aux contrôles et examens médicaux et prévoit les sanctions applicables en cas de sa violation. Cette liste de substances proscrites contient maintenant près d'une centaine d'agents dopants classés en 5 catégories: les stimulants, les analgésiques narcotiques, les diurétiques, les hormones peptidiques et glycoprotéiniques et les agents anabolisants (C.I.O., 1998). On retrouve deux types d'agents anabolisants, soit les agonistes- $\beta$  et les stéroïdes androgènes anabolisants.

Initialement observé en haltérophilie, l'emploi de stéroïdes anabolisants se propagea ensuite aux disciplines nécessitant soit une hausse globale de la force physique

(ex.: les lancers, boxe, judo, lutte, hockey) ou le renforcement d'un ou plusieurs groupes musculaires (ex.: patinage, aviron, cyclisme) (Noret, 1981). Ces produits sont utilisés non seulement afin d'augmenter la masse musculaire mais également pour hausser l'intensité et la durée des sessions d'entraînement. Les premiers tests effectués lors d'une compétition majeure furent faits aux Jeux Olympiques de Montréal en 1976. De Grenoble en 1968 à Atlanta en 1996, 26 des 56 athlètes déclarés positifs lors des Jeux Olympiques avaient fait usage de stéroïdes anabolisants androgènes (SAA). La situation en 1996 était la suivante : 96000 échantillons urinaires ont été analysés par les 25 laboratoires de contrôle antidopage accrédités par le C.I.O. et 1668 furent donnés positifs. De ceux-ci, 68% était dus à l'utilisation de stéroïdes anabolisants (CIO, 1997). Ces chiffres nous confirment donc que les stéroïdes anabolisants androgènes sont toujours aussi populaires auprès des athlètes d'élites et qu'il importe pour les laboratoires de contrôle antidopage d'y porter une attention toute particulière.

Ce chapitre se subdivise en deux sections. En introduction, nous traiterons de la biosynthèse, du mécanisme d'action et du métabolisme des androgènes, plus spécifiquement de la testostérone. Dans un deuxième temps, nous aborderons la problématique de la détection des stéroïdes endogènes pour ensuite nous concentrer sur l'importance des stéroïdes sulfoconjugués urinaires lors de contrôles antidopages.

## **1.2. Structure et nomenclature des stéroïdes.**

La structure de base de tout stéroïde est celle du phénanthrène entièrement réduite, le perhydrophénanthrène, auquel est fusionné un cycle D possédant cinq atomes de carbone pour donner un ensemble de type cyclopentanoperhydrophénanthrène. Chacun des quatre cycles ainsi que les atomes de carbone qui les constituent sont identifiés à la figure 1.1 où est représentée la structure de base des androstanes.

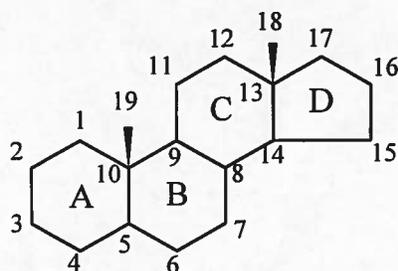


Figure 1.1 Androstane

Il est à noter que l'on retrouve deux groupements méthyles liés aux carbones C-10 et C-13 que l'on numérote C-18 et C-19. Les trois cycles à six carbones adoptent généralement la conformation de type chaise puisqu'elle est plus stable que la conformation de type bateau. Les atomes d'hydrogène ou groupements fonctionnels liés ne sont pas dans le plan. Chaque atome de carbone, possède un lien perpendiculaire au plan (axial) et un autre ayant un angle de  $30^\circ$  avec le plan (équatorial). Par convention, tout groupement situé au-dessus du plan aura la conformation  $\beta$  (ligne pleine) alors que s'il est au-dessous du plan sa conformation sera  $\alpha$  (ligne pointillée) (voir figure 1.1).

La nomenclature des stéroïdes comportant des fonctions alcool, cétone ou alcène comprend l'addition des suffixes ol, one et ène respectivement. La position des groupements fonctionnels est indiquée en relation à l'atome de carbone du squelette auquel ils sont liés. Dans le cas d'un lien double, le carbone impliqué ayant l'indice le plus faible est utilisé.

### 1.3. Androgènes

Les hormones stéroïdiennes sont produites principalement par le cortex surrénal, les testicules, les ovaires ainsi que le placenta (Vander *et al*, 1995). Elles peuvent être divisées en 4 grandes classes: les corticostéroïdes, les oestrogènes, les pregnanes et les androgènes. Nous nous intéresserons principalement aux stéroïdes androgènes, plus spécifiquement à la testostérone.

Les androgènes sont des stéroïdes ayant 19 atomes de carbone principalement sécrétés par les cellules de Leydig présentes dans les tissus interstitiels des testicules, par les glandes surrénales et en de moindres proportions par les ovaires. Les stéroïdes androgènes ont deux caractères physiologiques principaux. Leur propriété androgène est responsable du développement et du maintien du système reproducteur mâle et de la masculinisation lors de la puberté (Gower, 1979). Certains androgènes ont également des effets dits anabolisants décrits comme entraînant la rétention de produits azotés par la hausse de la synthèse protéique et la diminution du catabolisme. La balance positive résulte donc de la baisse du catabolisme et de la hausse de l'anabolisme de protéines utilisées dans l'appareil sexuel mâle et dans les muscles (Wilson, 1995).

L'activité est liée à la structure des 19 atomes de carbone et à la présence d'une fonction hydroxyle en C-17  $\beta$ . La présence d'une fonction cétone en C-17 entraîne une perte d'activité d'environ 80%. Le stéroïde doit également avoir un groupement cétone en C-3 et soit une liaison double en C-4 ou un cycle A saturé. La substitution de la cétone par une fonction alcool en C-3 diminue de 60% l'activité du stéroïde. De plus, lorsque le cycle A est saturé, l'hydrogène en C-5 doit avoir la conformation  $\alpha$ . La testostérone et la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (5 $\alpha$ -DHT) sont considérés comme étant les deux plus puissants androgènes endogènes (Gower, 1979).

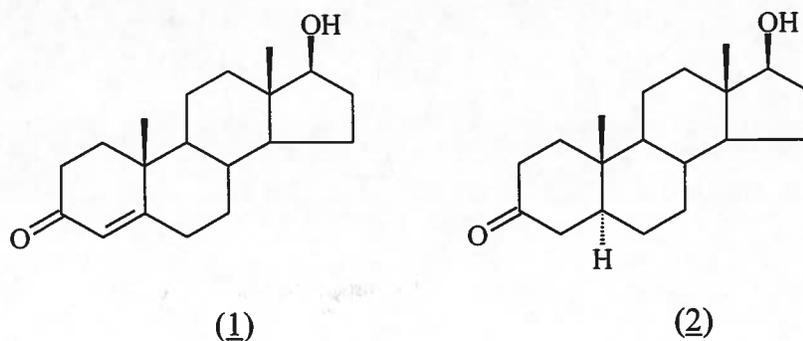


Figure 1.2 La testostérone (1) et la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (2)

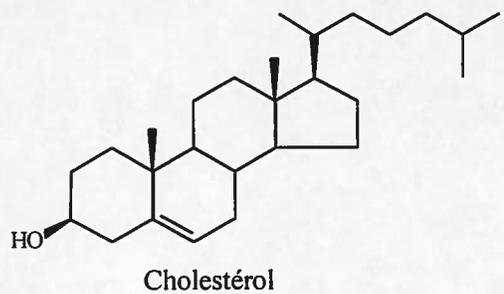
Il existe également une variété d'androgènes de faible activité tels l'androst-4-ène-3,17-dione, la déhydroépiandrostérone (DHEA), le 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et l'androstérone. Leur faible caractère androgène n'est pas uniquement dû à leur faible affinité pour le récepteur androgène mais également au fait qu'ils soient, dans certains cas, des précurseurs de la 5 $\alpha$ -DHT et de la testostérone (Wilson, 1995).

#### 1.4. Biosynthèse et mécanisme d'action des stéroïdes androgènes

Le précurseur de tout stéroïde présent dans le corps humain est le cholestérol. La conversion du cholestérol en pregnénolone est la première étape de cette stéroïdogénèse. De là, deux voies métaboliques peuvent être utilisées (Leunissen, 1979). La première voie implique la pregnénolone, la progestérone, la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, l'androstènedione et la testostérone alors que dans le cas de la seconde, il s'agit de la pregnénolone, la 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, la déhydroépiandrostérone, l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et la testostérone (voir figure 1.3). Le nom donné à chacune des voies provient des similarités structurales entre les stéroïdes impliqués. Dans le premier cas, les stéroïdes possèdent des fonctions 4-ène-3-one alors que dans le deuxième il s'agit surtout de fonctions 5-ène-3 $\beta$ -ol.

La biosynthèse de la testostérone est contrôlée par un processus de régulation hormonal. Chez un adulte normal, les cellules neuroendocriniennes de l'hypothalamus libèrent les facteurs de relâche de l'hormone lutéinisante (LH-RH) et de la folliculostimuline (FSH-RH) toutes les deux heures environ. Ceux-ci atteignent le lobe antérieur de l'hypophyse et déclenchent la relâche de la LH et de la FSH. La FSH agit sur les cellules de Sertoli et entraîne la production d'agents paracrines stimulant la spermatogénèse et d'autres fonctions de ces cellules. La LH quant à elle agit sur les cellules de Leydig en stimulant la production de testostérone (Vander *et al*, 1995).

Comme tout stéroïde, les androgènes traversent facilement les membranes plasmiques pour atteindre un récepteur à la surface du noyau cellulaire. Toute action de



- Enzymes impliquées:  
1. 20 $\alpha$ ,22-C-27 desmolase  
2. 17 $\alpha$ -hydroxylase  
3. 3 $\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase

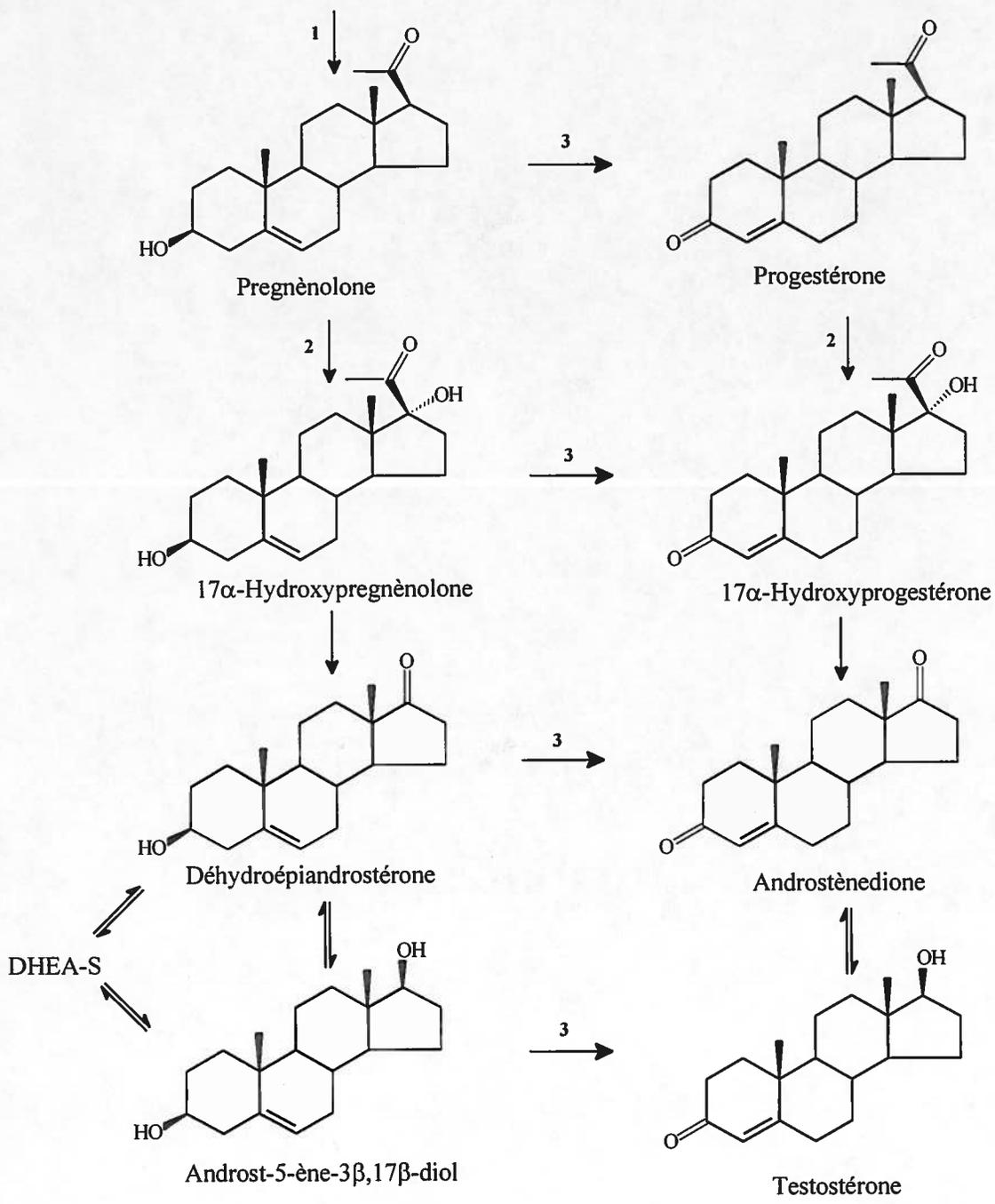


Figure 1.3. Biosynthèse des androgènes (Leunissen, 1979)

stéroïdes de la classe des androgènes dans un organe cible nécessite l'implication d'un seul et même type de récepteurs, le récepteur des androgènes. La testostérone et la  $5\alpha$ -DHT sont les androgènes ayant le plus d'affinité pour cette protéine. Le complexe hormone-récepteur formé mène à la transcription du gène, la synthèse de l'ARN messager et finalement la synthèse de diverses enzymes (Yesalis *et al*, 1993).

### 1.5. Métabolisme des androgènes

Le métabolisme des androgènes est subdivisé en 2 classes de réactions: celles de phases I et II. Les réactions enzymatiques impliquées lors de la phase I (oxydation, réduction, hydroxylation, désalkylation et hydrolyse) visent à transformer le stéroïde initial en une forme inactive dont l'élimination est facilitée. Les réactions de type phase II consistent en une ou plusieurs réactions biosynthétiques durant lesquelles une molécule polaire endogène est conjuguée à un produit de la phase I ou à la molécule mère afin d'en favoriser l'élimination (Dutton, 1978). Dans les deux sections qui suivent, nous présenterons plus spécifiquement le métabolisme de la testostérone.

#### 1.5.1. Métabolisme de type phase I

Lors du métabolisme de stéroïdes possédant les fonctions 4-ène-3-one, telle la testostérone, la première étape consiste à réduire le lien double. Cette réaction est effectuée par les  $5\alpha$ -réductase et  $5\beta$ -réductase amenant la formation d'un centre asymétrique en C-5 ( $5\alpha$  et  $5\beta$ ). La  $5\alpha$ -réductase est située dans le réticulum endoplasmique alors que la  $5\beta$ -réductase est dans le cytoplasme. Selon Schanzer (1996; 1997), le métabolisme de la testostérone vers ses formes réduites ( $5\alpha$  et  $5\beta$ ) se fait dans un ratio de 1:6 alors que pour les molécules mères comme l'androstènedione ayant une cétone en C-17, le ratio est de 1:1. Il est à noter que cette réaction est considérée comme étant l'étape limitante du métabolisme des fonctions 4-ène-3-one et qu'elle est irréversible (Schänzer, 1996; 1997).

Par la suite, il y a réduction de la cétone en C-3 à l'aide des  $3\alpha$  et  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases (Träger, 1977). L'orientation de l'alcool formé en C-3 dépend de l'isomère impliqué. Dans le cas du  $5\alpha$ , la formation du groupement  $3\alpha$ -ol est favorisée alors que le  $3\beta$ -ol est produit en de faibles quantités (Zimmermann, 1986). Pour ce qui est de l'isomère  $5\beta$ , la réduction mène uniquement au  $3\alpha$ -ol et aucune trace de  $3\beta$ -ol n'a été trouvée jusqu'à ce jour (Schänzer, 1996).

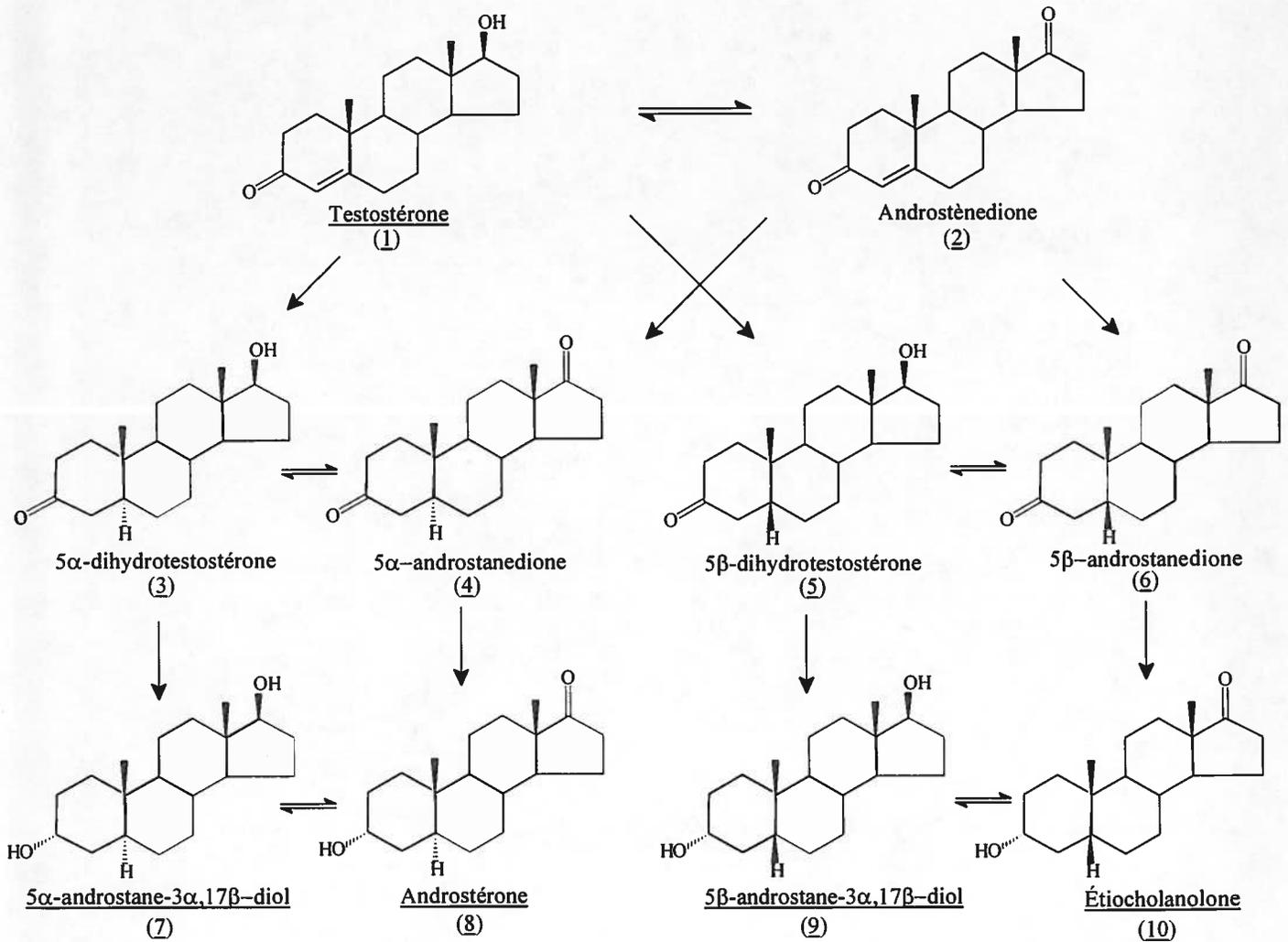


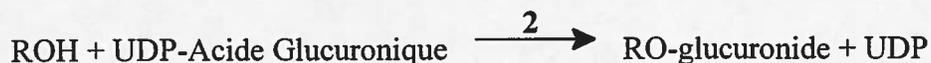
Figure 1.4 Métabolisme de la testostérone (1) et de l'androstènedione (2) (Schänzer, 1997)

En présence d'un groupement hydroxyle en C-17 $\beta$ , la voie métabolique la plus commune mène à la formation d'une cétone à l'aide de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase (Williams, 1979). Les métabolites ayant une fonction cétone en C-17 sont les principaux métabolites urinaires de la testostérone. Soit l'androstérone (8), l'étiocolanolone (10) et l'épiandrostérone (Schänzer, 1996). La figure 1.4 illustre les 3 types de réactions de la phase I impliquées lors du métabolisme de la testostérone et de l'androstènedione. Bien que non représentée à la figure 1.4, l'épiandrostérone serait produite à partir de la 5 $\alpha$ -androstanedione à l'aide de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (Schänzer, 1996). Il est à noter que les noms des principaux métabolites urinaires sont soulignés dans la figure 1.4.

### 1.5.2. Métabolisme de type phase II

La phase II consiste en une ou plusieurs réactions biosynthétiques où une molécule endogène polaire se conjugue aux métabolites de la phase I ou à la molécule mère. La molécule doit avoir un groupement chimique susceptible d'accueillir cette molécule endogène. Plusieurs groupes et molécules polaires peuvent être impliqués: soit l'acide glucuronique, le sulfate, un acide aminé, le glutathion, etc... Toute conjugaison nécessite de l'énergie sous forme d'ATP afin de synthétiser et/ou activer les groupements endogènes. Dans tous les cas, les molécules à conjuguer seront en compétition pour l'agent de conjugaison et dans certains cas pour l'enzyme (Dutton, 1978). Les deux réactions les mieux décrites de phase II impliquées dans le métabolisme de la testostérone mènent à la formation de dérivés glucuroconjugés et de sulfoconjugés.

La formation de dérivés glucuronides de stéroïdes est la plus importante des réactions de la phase II et la plus étudiée. Les principaux groupements de la molécule mère pouvant se conjuguer à l'acide glucuronique via le mécanisme décrit à la figure 1.5 sont les fonctions hydroxyle, carboxyle, amine, imine et sulfhydryle.



où: UDP: l'uridine diphosphate de l'acide glucuronique

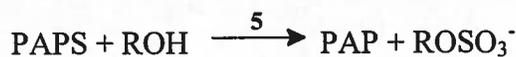
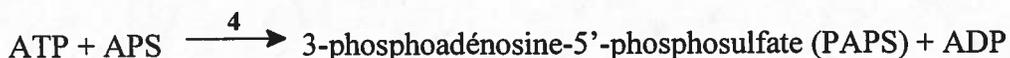
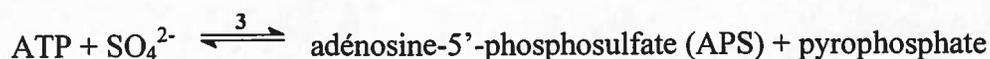
1: UDP-glucose déshydrogénase

2: UDP-glucuronyltransférase

Figure 1.5 Mécanisme de formation des glucuroconjugués

Lors de la première étape, il y a oxydation du groupement  $-\text{CH}_2\text{OH}$  du glucose en l'acide carboxylique correspondant. Par la suite, il y a transfert de l'acide glucuronique vers le stéroïde désigné. Ces deux réactions sont catalysées à l'aide de la UDP-glucose déshydrogénase et la UDP-glucuronyltransférase (Dutton, 1978).

En milieu urinaire, les androgènes sulfoconjugués ont été beaucoup moins étudiés malgré le fait qu'ils occupent une place importante des réactions de la phase II. La formation de dérivés sulfoconjugués nécessite la présence de groupements hydroxyle ou amine primaire. Avant son transfert vers la molécule hôte, deux réactions sont nécessaires à l'activation du groupement sulfate. Les réactions impliquées sont décrites à la figure 1.6.



où: 3: l'ATP-sulfate adényle transférase (ATP-sulfurylase)

4: l'ATP-adénylesulfate-3-phosphotransférase (APS-kinase)

5: sulfotransférase

Figure 1.6 Mécanisme de formation des dérivés sulfoconjugués

Les interconversions métaboliques, le transport et l'excrétion de stéroïdes sulfoconjugués nécessitent beaucoup d'énergie comparativement à la glucuroconjugaison (Dutton, 1978). On retrouve les sulfokinases au niveau du cytosol des glandes surrénales, des gonades, du foie et dans certains tissus du fœtus. La clairance rénale des stéroïdes sulfoconjugués serait 10 fois inférieure à celle des glucuroconjugués (Gower, 1979).

Puisque, règle générale, les androgènes comportent au moins un groupement hydroxyle, c'est à cette fonction que va se lier soit l'acide glucuronique ou le sulfate. La formation de conjugués d'androgènes dépend beaucoup de la structure des stéroïdes impliqués. Les stéroïdes ayant une fonction  $3\alpha$ -ol seront conjugués à l'acide glucuronique quelle que soit l'orientation de l'hydrogène en C-5. Une faible quantité de dérivé sulfoconjugué peut tout de même être produite. Les stéroïdes possédant des fonctions  $3\beta$ -ol quant à eux seront exclusivement conjugués à des groupements sulfates (Träger, 1977). Près de 80% de l'androstérone ( $3\alpha$ -ol) et la presque totalité de l'étiocolanalone ( $3\alpha$ -ol) sont excrétés sous la forme glucuroconjuguée alors que la DHEA (5-ène- $3\beta$ -ol) et l'épiandrostérone ( $3\beta$ -ol) sont entièrement sulfoconjugués (Leunissen, 1979; Jayle et Pasqualini, 1974).

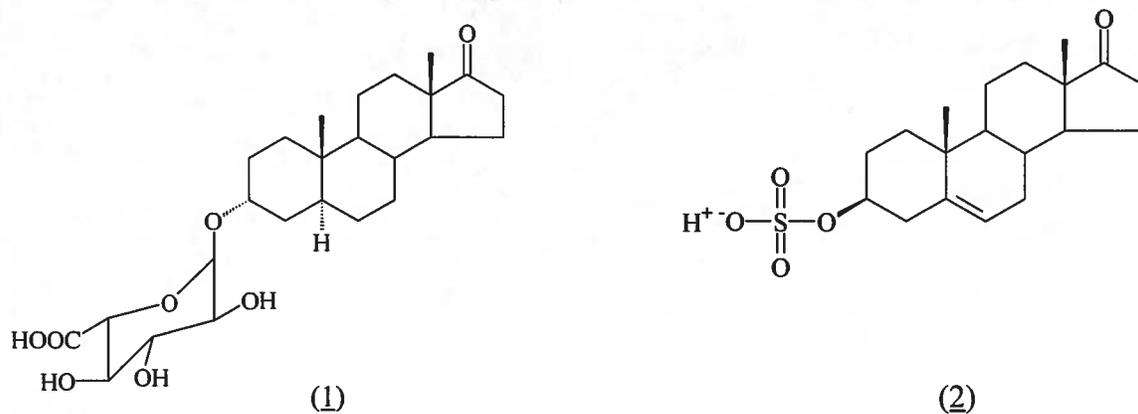


Figure 1.7 Le glucuronide d'androstérone (1) et le sulfate de DHEA (2).

Pour ce qui est de la conjugaison sur le cycle D, un groupement  $\beta$ -hydroxyle lié à un carbone secondaire en C-17 est généralement glucuroconjugué. Dans le cas d'une fonction hydroxyle liée à un carbone tertiaire, aucun glucuronide de stéroïde n'a pu être observé. La formation de sulfoconjugués en C-17 $\beta$  en présence d'un carbone secondaire est observée mais en de faibles proportions (Schänzer, 1996).

### **1.6. Utilisation de stéroïdes anabolisants synthétiques et endogènes comme agents dopants**

Les premières tentatives effectuées afin d'isoler et de caractériser un androgène remontent à 1931 alors que Butenandt isola 15 mg d'androstérone à partir de 25 000 litres d'urine d'homme (Butenandt, 1931). L'androstérone n'était toutefois pas cet androgène actif tant recherché présent dans les extraits de tissus testiculaire. Il s'agissait plutôt de la testostérone qui fut pour la première fois isolée et identifiée par David *et al* (1935), puis synthétisée par Ruzicka et Wettstein (1935) et Butenandt et Hannisch (1935). Ces derniers reçurent le prix Nobel en 1939. L'intérêt porté à la testostérone était principalement basé sur son action anabolisante. Dès le début des années 1950, les succès de l'équipe d'haltérophilie de l'ancienne U.R.S.S étaient réputés être liés à l'usage de testostérone (Wade, 1972).

Bien que la testostérone ait un potentiel anabolisant, ce stéroïde n'est pas idéal puisque l'organisme l'inactive très rapidement, diminuant ainsi sa durée d'action. Suite à l'administration de la testostérone par voie orale, le stéroïde est absorbé puis directement dirigé au foie par la veine porte où il sera métabolisé. Il s'agit de l'effet de premier passage. L'utilisation de la voie parentale mène également à une inactivation rapide. Il est par contre possible de modifier la structure chimique de la testostérone afin d'éviter la dégradation rapide au niveau du foie et de hausser le potentiel anabolisant (Wilson, 1995). Ces changements structuraux mènent à la formation de stéroïdes anabolisants de type synthétique. Contrairement à la testostérone qui est un stéroïde anabolisant androgène endogène, ces stéroïdes ne sont pas naturellement produits par l'organisme. Les enzymes hépatiques agissant normalement sur la testostérone sont tout de même

actives face aux stéroïdes anabolisants synthétiques, ce qui entraîne la formation de nombreux métabolites caractéristiques (Schänzer, 1996).

Pour les cas d'utilisation de stéroïdes anabolisants synthétiques, la détection est basée sur l'identification de la molécule mère et/ou de ses métabolites. Pour ce faire, un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de type filtre quadrupolaire est généralement utilisé. L'identification consiste à comparer le temps de rétention chromatographique et le spectre de masse de l'analyte à ceux d'un standard de référence. Les récents développements quant à l'utilisation de spectromètres de masse de haute résolution lors de contrôles antidopage ont permis d'abaisser sensiblement les seuils de détection (Horning et Schänzer, 1997).

Les longs temps de demi-vie de certains stéroïdes anabolisants et leur nature synthétique facilitent leur identification et la confirmation de leur usage en tant qu'agents dopants. Les utilisateurs se sont donc tournés vers les stéroïdes endogènes ayant un potentiel anabolisant et vers leurs précurseurs naturels. La testostérone étant le stéroïde endogène dont le potentiel anabolisant est le plus élevé et dont il existe un nombre élevé de préparations, il s'agit donc du stéroïde naturel le plus utilisé comme agent dopant. Les esters de testostérone sont généralement utilisés afin d'obtenir une durée d'action maximale. Suite à l'administration, ces esters quittent lentement le site d'injection vers le milieu sanguin où ils seront hydrolysés vers la forme libre. La testostérone est ensuite métabolisée normalement par l'organisme (Wilson, 1995).

Lors de contrôles, il est impossible d'utiliser une approche qualitative comme dans le cas précédent puisque ces stéroïdes sont naturellement présents dans le milieu urinaire. De plus, le spectromètre de masse de type filtre quadrupolaire ne permet pas de distinguer entre les stéroïdes endogènes et exogènes, car les spectres de masse générés sont identiques. Nous devons adopter une approche quantitative tout en considérant que la seule présence de concentrations urinaires élevées en testostérone ne constitue pas une preuve de l'administration. Le facteur discriminant doit permettre d'identifier les cas de

dopage à la testostérone tout en minimisant les risques de faux-positifs et de faux-négatifs.

### **1.7. Utilisation du rapport TG/EG pour détecter l'administration de testostérone.**

L'épitestostérone (androst-4-ène-17 $\alpha$ -ol-3-one) est un épimère de la testostérone. Elle est sécrétée principalement par les testicules et en faibles quantités par les glandes surrénales (Kicman, 1990). Il n'y a que très peu d'informations sur les précurseurs et les fonctions biologiques de l'épitestostérone. Certains avancent que l'androstènedione serait le précurseur de l'épitestostérone (Brooks et Giuliani, 1964) alors que d'autres considèrent qu'il s'agirait de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol (Dehennin, 1993). La production d'épitestostérone chez l'humain ne représente que 3% de celle de la testostérone mais son faible métabolisme et son excrétion élevée rendent comparables leurs concentrations urinaires (Wilson et Lipsett, 1966). L'épitestostérone, longtemps considérée comme étant inactive, agirait comme un anti-androgène via l'inhibition de la 5 $\alpha$ -réductase. Elle contrôlerait ainsi les effets androgènes sur l'organisme mâle lors de la maturation sexuelle (Starka *et al*, 1997). L'épitestostérone entrerait en compétition avec la testostérone au niveau des tissus cibles (Starka *et al*, 1989).

La production de testostérone et son excrétion sous la forme glucuroconjuguée varient beaucoup d'un individu à l'autre rendant impossible l'imposition d'une concentration limite. Une approche plus raisonnable serait d'utiliser un rapport de concentrations urinaires indépendant du débit urinaire ou de la concentration du spécimen. En 1982, Donike *et al* proposèrent le rapport entre les glucuronides de testostérone (TG) et d'épitestostérone (EG) comme sonde. Suite à l'administration de testostérone, une hausse de la concentration urinaire en testostérone glucuroconjuguée est observée alors que le niveau de glucuronide d'épitestostérone reste stable ou diminue (Donike *et al*, 1982).

Deux approches complémentaires sont utilisées afin de déterminer si un rapport TG/EG est normal ou s'il est anormalement élevé:

- A. Comparer le ratio avec la normale d'une population de référence.
- B. Établir la norme de l'athlète et comparer au ratio suspect.

#### A. Comparer à une population

Afin de fixer un TG/EG limite, plus de 3 000 valeurs de T/E d'athlètes ont été évalués. Donike *et al* (1982) ont pu observer que 99,9% des rapports se situent entre 0,05 et 5,27. C'est à l'aide de cette distribution que le C.I.O. a fixé la valeur limite du TG/EG à 6/1. Ainsi, tout rapport étant plus élevé que 6 est considéré comme une évidence qu'il y a eu administration de testostérone (Donike *et al*, 1982). Une étude effectuée plus récemment par notre équipe sur 3667 athlètes mâles appuie ces affirmations (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Suite à l'administration de fortes doses de testostérone, il y aurait un phénomène de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire qui tendrait à diminuer l'excrétion en conjugué d'épitéstostérone. Il s'agit de la rétroaction négative. Ainsi, l'augmentation du ratio suite à l'absorption de testostérone serait due à une hausse en testostérone glucuroconjugée et à une baisse en épitéstostérone glucuroconjugée excrétées (Dehennin et Matsumoto, 1993).

#### B. L'utilisation de l'étude longitudinale

Une approche complémentaire consiste à comparer le ratio TG/EG actuel aux valeurs obtenues de tests précédents ou subséquents. Il s'agit d'une étude longitudinale. Il a été prouvé que pour un individu, les rapports TG/EG sont stables dans le temps et en diverses situations (hors compétition et en compétition). Ceci est dû à l'homéostasie de la biosynthèse et du métabolisme des stéroïdes endogènes (Shackelton, 1986). Lors d'études longitudinales, il a été démontré que le rapport peut fluctuer autour d'une valeur moyenne avec un coefficient de variation n'excédant pas 30% chez les athlètes mâles. La méthode consiste donc à discriminer une valeur isolée ou écartée d'une série de TG/EG

mesurés chez un même individu. Une telle valeur pourrait être identifiée comme étant à l'extérieur d'une zone définie par la moyenne plus ou moins l'écart-type (calculés sans la valeur suspecte) (Donike, 1994). Il est à noter que les études longitudinales sont généralement utilisées afin d'appuyer des résultats trouvés positifs ou suspects à l'aide de la méthode définie en A.

### **1.8. La problématique des TG/EG normalement élevés**

Des auteurs ont rapporté chez quelques individus n'ayant pas consommé de testostérone un TG/EG de plus de 6. Ils considèrent qu'il existe statistiquement un risque non négligeable de rapport TG/EG faussement positifs, spécialement chez les adolescents (Dehennin et Scholler, 1990; Raynaud *et al*, 1992; Oftebro, 1992; Dehennin, 1994a), un auteur évaluant le risque d'un rapport TG/EG faussement positif à 15 sur 10 000 chez une population d'adolescents (Dehennin et Scholler, 1990). Il est important de noter que cet auteur a utilisé une population de onze adolescents pour effectuer ces calculs et qu'aucune des valeurs mesurées ne dépassait 3. Pour expliquer ce phénomène, certains avancent que l'excrétion urinaire de la testostérone et de l'épitéstostérone ne serait pas parallèle lors de la puberté (Raynaud *et al*, 1993). Dehennin, quant à lui, affirme que les cas de TG/EG physiologiquement élevés seraient dus à une excrétion soutenue en glucuronide de testostérone et en sulfate d'épitéstostérone (ES) jumelée à une faible excrétion en glucuronide d'épitéstostérone. Ceci aurait pour effet de diminuer le dénominateur du rapport et ainsi hausser le TG/EG. Ces sujets auraient une mauvaise régulation entre la sécrétion testiculaire en épitéstostérone sulfoconjuguée et en épitéstostérone libre, probablement due à une suractivité de la sulfotransférase au niveau des testicules (Dehennin, 1994b). Il est à noter que seules l'épitéstostérone libre et sulfoconjuguée semblent être produites par les testicules et que le glucuronide d'épitéstostérone serait formé à partir des stéroïdes sous la forme libre dans divers tissus (Dehennin, 1993).

Lors de cas de TG/EG élevés, une étude longitudinale est utilisée afin d'observer si le ratio est constant dans le temps ou s'il s'agit d'une valeur isolée. Bien qu'elles soient utiles, ces études nécessitent l'accumulation de plusieurs données sur un long laps

de temps et elles obligent que des études quantitatives de différents laboratoires soient considérées entraînant par le fait même une hausse du coefficient de variation limite. C'est pourquoi l'utilisation d'une sonde complémentaire ponctuelle pourrait s'avérer intéressante.

### 1.9. Utilisation d'une sonde complémentaire: $\frac{TG}{(EG + ES)}$

Plusieurs sondes secondaires ont été proposées afin de détecter l'administration de testostérone. Des chercheurs ont proposé entre autres les rapports TG/LH (Brooks *et al*, 1979) et T/17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone plasmatique (Carlström *et al*, 1992). Certains proposèrent même l'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse de la testostérone, le kétoconazole, pour observer si les concentrations urinaires étaient d'origine endogène ou exogène (Kicman *et al*, 1993). En 1993, Dehennin et Matsumoto avancèrent que le rapport  $\frac{TG}{(EG + ES)}$  permettrait d'éliminer les risques de faux-positifs reliés à une faible excrétion en glucuronide d'épitestostérone. Les auteurs considèrent cette sonde comme étant appropriée puisque tous les sujets étudiés ayant un TG/EG naturellement élevé auraient des ratios  $\frac{TG}{(EG + ES)}$  sous la valeur limite de 3 (Dehennin, 1994b). Le rapport EG/ES, pourrait être un autre outil diagnostique pour les individus dont le TG/EG est supérieur à 4. Leurs rapports seraient de 4 fois inférieurs à celui de la population dite normale ce qui indiquerait que la forme sulfate serait favorisée (Dehennin, 1994b).

Il faut noter que les études sur les rapports TG/EG naturellement élevés portent sur un nombre très restreint de cas. De 27 sujets (Garle *et al*, 1996) à un seul (Oftebro, 1992; Raynaud *et al*, 1993b) en passant par 2 (Raynaud *et al*, 1993a), 3 (Raynaud *et al*, 1992) et 12 (Dehennin, 1994b), un total de 46 individus ayant un ratio élevé ont été étudiés au fil des années. Par ailleurs, la méthode de solvolysé chimique utilisée par Dehennin n'est pas sélective et pourrait entraîner l'hydrolyse non seulement des sulfoconjugués mais également des glucuroconjugués n'ayant pas été extraits du milieu. Il est également possible, tenant compte des conditions réactionnelles utilisées, que les

stéroïdes aient été affectés lors de la solvolysse chimique. Dans un premier temps, nous nous proposons donc de vérifier la pertinence de la sonde  $\frac{TG}{(EG + ES)}$ .

### 1.10. Utilisation des précurseurs de la testostérone comme agents dopants.

Lorsqu'il devint clair que le contrôle pour la testostérone serait introduit par le C.I.O. en 1982, le gouvernement de l'ex-Allemagne de l'est forma un groupe de travail afin de trouver des alternatives. L'une d'elles était de remplacer la testostérone par ses précurseurs, l'androstènedione et la déhydroépiandrostérone (DHEA) (Franke et Berendonk, 1997). Il est impossible de discerner entre la testostérone naturelle et celle provenant de ces précurseurs exogènes. Certains auteurs affirment que 40% de l'androstènedione sécrétée serait convertie en testostérone dans le corps humain alors que seulement 4% de la DHEA mènerait à la formation de testostérone. Ainsi, la conversion de la DHEA vers la testostérone représenterait 10% de celle entre l'androstènedione et la testostérone (Horton et Tait, 1996).

La DHEA, le sulfate de DHEA et l'androstènedione sont principalement produits par les cellules corticales des glandes surrénales. Les androgènes synthétisés par les surrénales semblent jouer un rôle androgène mineur (Blanchard et Robaire, 1997). Chez l'humain, le sulfate de DHEA est le stéroïde le plus abondant dans le sang alors que les niveaux de DHEA sous la forme libre sont de 200 fois inférieurs (Sulcova *et al*, 1997). Plutôt que d'être un métabolite inactif, le sulfate de DHEA pourrait être un important réservoir de précurseurs pouvant mener à la formation de testostérone (Longscope, 1996). Les rôles physiologiques de la DHEA libre et sulfoconjuguée sont plus ou moins bien connus. Le cortisol, qui est le principal glucocorticoïde chez l'humain, est connu comme ayant des activités anti-inflammatoire et immunosuppressive et comme étant impliqué dans le processus d'adaptation au stress et de contrôle du métabolisme organique. Bien que les niveaux de DHEA diminuent avec l'âge, les taux de cortisol restent relativement stables. Certains auteurs postulent donc qu'un des rôles premiers de la DHEA chez l'humain serait de contrôler les effets du cortisol en agissant comme son antagoniste surtout lors de périodes prolongées d'hyperactivité des glucocorticoïdes (Hechter,

Grossman et Chatterton, 1997). D'autres avancent qu'il pourrait s'agir d'une fontaine de jouvence puisque les individus ayant des concentrations sanguines élevées en DHEA vivraient plus longtemps (Orentreich *et al*, 1984).

La DHEA libre et sulfoconjuguée forment principalement un complexe avec l'albumine dans le milieu sanguin alors qu'une faible quantité se lie à la SHBG (Sex Hormone Binding Globuline). La clairance rénale du sulfate de DHEA serait plus faible que celle de la DHEA libre à cause de sa grande affinité pour l'albumine. La DHEA est presque exclusivement excrétée sous la forme sulfoconjuguée alors que seules des traces d'androstènedione libre sont présentes dans le milieu urinaire. L'androstènedione et la DHEA ont été ajoutées à la liste des substances bannies par le C.I.O.. Il faut mentionner que ces précurseurs de la testostérone sont en vente libre aux États-Unis et qu'il est donc relativement facile pour un athlète de s'en procurer.

Jusqu'à ce jour, seul le groupe de Dehennin s'est penché sur l'utilisation de la DHEA comme agent dopant (Dehennin *et al*, 1998). Ils ont constaté que les rapports d'excrétion les plus élevés sont notés dans les deux heures suivant une dose de 50 mg de DHEA et que celle-ci est préférentiellement métabolisée en métabolites sulfoconjugués. Les auteurs estiment qu'une concentration urinaire limite de 300 ng/mL en glucuronide de DHEA (ajustée à une gravité spécifique de 1,020 g/mL) serait le critère le plus adéquat afin de détecter rapidement les utilisateurs de ce précurseur de la testostérone.

Nous avons dans un premier temps identifié les métabolites urinaires de la DHEA suivant son administration par voie orale. Cette étude nous a permis de proposer diverses sondes utilisées pour en détecter l'administration.

### 1.11. Étude des métabolites sulfoconjugués: objectifs.

La sulfoconjugaison est une réaction de type phase II très peu discutée dans la littérature en comparaison à la glucuroconjugaison en ce qui a trait à la détection des stéroïdes androgènes anabolisants chez l'humain. Dans un premier temps, nous avons étudié le potentiel discriminatoire de quatre sondes proposées par Dehennin, dont le rapport  $\frac{TG}{(EG + ES)}$ . Pour ce faire, nous avons évalué trois types de spécimens urinaires: ceux caractérisés par un TG/EG « normal », ceux négatifs dont le rapport TG/EG est normalement supérieur à 3 et ceux provenant de cas avérés de dopage à la testostérone. Les profils urinaires de ces trois populations ont été également évalués. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de la DHEA, un précurseur de la testostérone, sur le profil stéroïdien ainsi que sur la production de métabolites sulfoconjugués caractéristiques.

### 1.12. Protocole analytique

L'analyse directe d'une urine par CG/SM est impossible pour différentes raisons. Tout d'abord, les stéroïdes conjugués sont très peu volatiles ce qui rend difficile leur passage en phase gazeuse. La présence de plusieurs fonctions labiles amène une dégradation thermique de certains stéroïdes dans le port d'injection. De plus, la présence de fortes quantités de produits autres que les analytes d'intérêt interfère également lors de l'analyse. Le protocole suivi se divise en quatre étapes. Nous devons tout d'abord isoler les stéroïdes conjugués de l'urine pour ensuite libérer le stéroïde de son groupement polaire de nature endogène tels l'acide glucuronique ou le sulfate. Le stéroïde libre est extrait du milieu d'hydrolyse pour ensuite être dérivé afin de maximiser la résolution chromatographique, de hausser la volatilité de l'analyte et d'éviter la dégradation thermique.

### 1.13. Hydrolyse des stéroïdes sulfoconjugués: Les voies enzymatiques et chimiques

Les diverses méthodes utilisées pour l'hydrolyse des stéroïdes conjugués peuvent être subdivisées en deux classes: les réactions enzymatiques et les réactions chimiques. L'hydrolyse enzymatique est généralement la méthode préférée à cause de sa grande sélectivité et de l'absence de réactions secondaires. Pour l'hydrolyse des glucuronides de stéroïdes, la  $\beta$ -glucuronidase est utilisée. Cette enzyme est tirée des glandes digestives de *Helix pomatia* ou de source bactérienne tel le *E. coli* (Leunissen, 1979). Cette dernière source est la plus utilisée puisque contrairement aux sucs bruts de *Helix pomatia*, elle ne possède pas d'activité secondaire (Houghton *et al*, 1992; Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Certains sulfoconjugués de stéroïdes peuvent être hydrolysés par une aryle sulfatase également présente dans les préparations de *Helix pomatia*. En plus de contenir la  $\beta$ -glucuronidase et l'aryle sulfatase, on y retrouve malheureusement aussi entre autres la  $3\beta$ -hydroxystéroïde oxydase et la 5-4-ène-isomérase (Vanluchene *et al*, 1982; Massé, Ayotte et Dugal, 1989; Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996), ces deux enzymes entraînant des changements structuraux importants chez certains stéroïdes. Il a été observé que l'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol en présence des deux enzymes mentionnées ci-haut mènent à la formation de testostérone (Massé, Ayotte et Dugal, 1989). Par ailleurs, les stéroïdes sulfoconjugués en C-17 tels la testostérone et l'épitéstostérone, sont résistants à l'hydrolyse par les sucs de *Helix pomatia* (Houghton *et al*, 1992). L'activité de la sulfatase serait très faible voire nulle face aux stéroïdes ayant une configuration  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ -ol (Leunissen, 1979). Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas utilisé cette méthode enzymatique.

L'hydrolyse chimique en milieu aqueux de stéroïdes sulfoconjugués nécessite l'utilisation de conditions drastiques menant souvent à des réactions secondaires (Batts, 1966). Par ailleurs, la solvolysse, une autre méthode d'hydrolyse bien connue, est en théorie sélective aux stéroïdes sulfoconjugués et n'affecte pas les glucuroconjugués. Cette réaction se déroule en milieu organique en présence de faibles concentrations (de  $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  M) d'acide fort tel l'acide sulfurique (Burstein et Lieberman, 1958a). La nature du solvant utilisé lors de la solvolysse est déterminante du rendement de la réaction.



sulfate d'étiocholanolone alors que la présence d'un lien double en C-5 comme chez la DHEA n'affecte pas la constante de vitesse de la réaction.

Une autre méthode d'hydrolyse chimique est la méthanolyse. Cette méthode qui consiste à soumettre les conjugués à de fortes concentrations en HCl à 60°C dans le méthanol anhydre (Tang et Crone, 1989; Houghton *et al*, 1990) manque cependant de sélectivité puisque à la fois les sulfoconjugués et les glucuroconjugués sont hydrolysés. Afin de distinguer entre les deux types de stéroïdes libérés, nous devons les séparer avant la méthanolyse. L'utilisation d'une méthode d'hydrolyse rapide, efficace et sélective des stéroïdes sulfoconjugués est primordiale.

D'autres conditions réactionnelles d'hydrolyse des sulfoconjugués sont rapportées dans la littérature. L'utilisation de 1 mL d'acétate d'éthyle et des traces d'acide sulfurique à 50 °C pendant environ une heure est la plus courante (Setchell *et al*, 1976; Deslypere *et al*, 1981; Axelson, Sahlberg et Sjövall, 1981; Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996).

#### **1.14. Solvolyse chimique: objectifs**

Nous devons tout d'abord mettre au point une procédure analytique permettant d'analyser le milieu de solvolyse afin de suivre le cours de la réaction. À l'aide de cette méthode, nous allons optimiser la solvolyse chimique en variant les conditions réactionnelles, soit: le solvant, la concentration en acide, la température du milieu réactionnel et le temps de réaction. Les conditions optimales devront nous permettre de faire une solvolyse complète des stéroïdes sulfoconjugués et ce, dans un laps de temps le plus court possible, sans qu'il y ait hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués et sans qu'aucun stéroïde ne soit dégradé.

### 1.15. Sommaire des objectifs

La recherche effectuée dans le cadre de ce mémoire vise à étudier le potentiel diagnostique des métabolites sulfoconjugués dans diverses problématiques liées au contrôle antidopage. En premier, nous avons optimisé les conditions de solvolysé afin d'en maximiser le rendement et la sélectivité. Nous avons par la suite étudié deux problématiques impliquant des sulfates d'androgènes. Tout d'abord, nous avons voulu vérifier l'importance diagnostique de 4 rapports, dont le  $\frac{TG}{(EG + ES)}$  à l'aide de trois populations ayant des T/E différents. Enfin, nous avons étudié l'excrétion des métabolites sulfoconjugués de la DHEA et les effets de ce précurseur de la testostérone sur le profil stéroïdien.

## Chapitre 2

### Matériel et Méthodes

#### 2.1. Stéroïdes

La testostérone, l'épitestostérone, le  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, le  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, l'épiandrostérone, la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol, l'androst-5-ène- $3\beta,16\alpha$ -diol-17-one ( $16\alpha$ -hydroxy-DHEA) et l'épiétiocholanolone (standard interne) ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO, USA). Nous nous sommes procuré l'androstérone, l'étiocolanolone, l'androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol, le sel de sodium du glucuronide de testostérone, le sel de sodium du glucuronide d'épitestostérone, le sel de sodium du sulfate de testostérone, l'androst-5-ène- $3\beta,4\alpha,17\beta$ -triol, le  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one, le  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one, le  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\alpha$ -diol, le  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\alpha$ -diol et le  $5\beta$ -androstane- $3\beta,17\alpha$ -diol chez Steraloids (Wilton, NH, USA) et le  $17\alpha$ -méthyl- $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol (standard interne) chez Amersham/Searle (Oakville, Canada). La  $17\alpha$ -méthyltestostérone provient de Aldrich (Milwaukee, WI, USA) et la 19-nortestostérone a été achetée chez Organon (Oss, Hollande). L'androst-5-ène- $3\beta,7\alpha$ -diol-17-one ( $7\alpha$ -hydroxy-DHEA) et l'androst-5-ène- $3\beta,7\beta$ -diol-17-one ( $7\beta$ -hydroxy-DHEA) ont été gracieusement données par le professeur Robert Morfin (Paris, France) alors que l'épitestostérone sulfoconjuguée a été synthétisée et fournie par M. Donald Poirier du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) à Québec.

#### 2.2. Produits chimiques et biologiques

L'acide acétique glacial, l'acétate de sodium, le phosphate de sodium monobasique, le phosphate de sodium dibasique, le bicarbonate de sodium et l'acide

sulfurique ont été achetés soit chez J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), Fisher Scientific (Montréal, Canada), BDH (Ville St-Laurent, Canada) ou Malinckrodt (Paris, KY, USA). L'acétate d'éthyle, l'acétonitrile, le tétrahydrofurane (THF), le méthanol, l'éther diéthylique, le dichlorométhane, l'acétone et l'hexane proviennent de Caledon (Montréal, Canada) et le chloroforme de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). L'éther est de qualité « distillée sur verre » alors que les autres solvants sont de qualité CLHP. La solution de méthanol anhydre contenant du HCl 3 N provient de chez Supelco (Bellefonte, PA, USA). Le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA), le triméthyliodosilane (TMIS) et l'éthanethiol proviennent de chez Aldrich (Milwaukee, WI, USA). La pyridine a été achetée chez Caledon (Montréal, Canada) alors que le triméthylchlorosilane (TMCS) a été acheté chez Pierce (Rockford, IL, USA). L'eau a été purifiée par osmose inverse et filtrée par un système Milli-Q avant d'être utilisée (Millipore, Mississauga, Canada). L'azote de qualité zéro provient de chez Air Liquide Canada (Montréal, Canada). La  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*, type IX-A, sous forme de poudre lyophilisée, contenant de 1 500 000 à 2 000 000 U/g d'activité  $\beta$ -glucuronidase a été achetée chez Sigma (St-Louis, MO, USA).

### **2.3. Méthode d'analyse du milieu de solvolysé par CLHP-UV**

#### **2.3.1. Isolement des stéroïdes du milieu réactionnel**

Quatre types d'échantillons sont analysés lors de cette procédure: un blanc, un contrôle contenant 5  $\mu$ g de testostérone libre et deux échantillons contenant soit 25  $\mu$ g de sel de sodium du glucuronide de testostérone ou 25  $\mu$ g de sel de sodium du sulfate de testostérone. Dans chacun des tubes, 25  $\mu$ g de standard interne (17 $\alpha$ -méthyltestostérone ou 19-nortestostérone) sont ajoutés. Les culots sont évaporés à sec puis solubilisés dans 1 mL du solvant étudié. Deux cents microlitres sont ensuite prélevés et transférés dans un tube de 7 mL. Un volume donné d'acide sulfurique 4M est ensuite ajouté au volume de 800  $\mu$ L restants. Le tout est chauffé pendant 60 minutes à une température donnée. Afin de suivre le cours de la réaction, 200  $\mu$ L sont prélevés du milieu réactionnel à 0, 10, 20 et 60 minutes. Ces 200  $\mu$ L sont déposés dans un tube de 7 mL contenant 0,5 mL de

NaHCO<sub>3</sub> 0,5 % (p/p) et le tout est mélangé. La phase organique est évaporée sous azote et 3 mL de tampon acétate (pH 5,2) sont ensuite ajoutés à la phase aqueuse restante. La solution est passée sur une cartouche Sep-pak Plus C<sub>18</sub><sup>®</sup> préalablement rincée avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau déionisée. La cartouche est ensuite rincée avec 5 mL d'eau déionisée et 5 mL d'hexane, puis les analytes sont élués à l'aide de 5 mL de méthanol. Le méthanol recueilli est évaporé à sec et le culot est solubilisé dans 50 µL de méthanol. La solution est ensuite transférée dans un vial conique et analysée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

### 2.3.2. Évaluation du rendement de la solvolysse par CLHP

Nous avons adopté une approche semi-quantitative afin d'évaluer le rendement de la solvolysse par CLHP. Pour ce faire, nous avons utilisé le rapport entre le nombre de moles de testostérone libérée et le nombre de moles de standard interne. Nous savons qu'un gramme de sel de glucuronide de testostérone ( $M_m = 486,5$  g/mol) contient  $2,06 \times 10^{-3}$  mole alors qu'une même quantité en sel de sulfate de testostérone ( $M_m = 390,5$  g/mol) contient  $2,56 \times 10^{-3}$  mole. Pour ce qui est des standards internes, un gramme de 17 $\alpha$ -méthyltestostérone ( $M_m = 302,4$  g/mol) contient  $3,31 \times 10^{-3}$  mole et un gramme de 19-nortestostérone ( $M_m = 274,3$  g/mol) contient  $3,64 \times 10^{-3}$  mole. Le nombre de moles sous la forme d'un conjugué correspond au nombre de mole de testostérone libérée suite à la solvolysse. À masse égale en standard interne et en conjugué, on peut déterminer une valeur limite du ratio  $\frac{[Testosterone]}{[Std.Int.]}$  à laquelle le rendement de la solvolysse sera maximal.

Si la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone est utilisée comme standard interne, les ratios limites seront de 0,62 et de 0,78 pour la testostérone glucuroconjuguée et la testostérone sulfoconjuguée. Dans le cas de la 19-nortestostérone, ces valeurs seront respectivement de 0,56 et de 0,70. Nous utiliserons l'absorbance de la testostérone et du standard interne à une longueur d'onde de 245 nm lors du calcul du rapport.

### 2.3.3. Chromatographie liquide de haute performance

Un chromatographe liquide de marque Hewlett-Packard modèle 1090 équipé d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV à diode a été utilisé. Une colonne de type Zorbax SB-C<sub>18</sub> de 4,6 mm de diamètre interne et de 250 mm de longueur provenant de chez Hewlett-Packard (Mississauga, Canada) est utilisée pour séparer les analytes. La colonne est gardée à la température ambiante. La phase mobile est constituée de deux solvants: du méthanol et de l'eau déionisée et filtrée. Un gradient est utilisé afin de hausser la teneur en méthanol de 85% après 2 minutes à 100% après 5 minutes. Lors des 2 dernières minutes, la phase mobile est exclusivement constituée de méthanol. Le volume d'analyte injecté est de 5 µL et le débit de la phase mobile est gardé à 1 mL/min. La longueur d'onde d'absorption utilisée est de 245 nm.

### 2.4. Courbes d'étalonnage

Des solutions stock de testostérone, épitestostérone, androstérone, étiocholanolone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, DHEA et épiandrostérone ont été préparées dans du méthanol et gardées à -18 °C. Cinquante microlitres de chacune des solutions et 25 µL d'une solution de standard interne contenant 100 ng/µL d'épiétiocholanolone et 10 ng/µL de 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol sont déposés dans des vials coniques pour être ensuite dérivés tel que décrit plus loin. Chacun des huit échantillons est analysé par CG/SM en mode de détection sélective d'ions. La quantification est réalisée en calculant le ratio des surfaces sous les pics chromatographiques des ions à m/z sélectionnés pour l'analyte et le standard interne. Pour l'épitestostérone, la testostérone, l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, le 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, le 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et l'épiandrostérone, le standard interne utilisé est le 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol alors que pour l'androstérone, l'étiocholanolone et la DHEA il s'agit de l'épiétiocholanolone.

#### 2.4.1. Quantification de la testostérone et de l'épitéstostérone

Pour la testostérone et l'épitéstostérone, l'ion à  $m/z$  432 [ $M^+$ ] (dérivé TMS-énol, TMS-éther) est utilisé et les concentrations vont de 2,64 à 528,0 ng/mL pour la testostérone et de 4,92 à 492,0 ng/mL pour l'épitéstostérone. Les équations des régressions linéaires sont respectivement de  $C_T = 3,68 \times R_T + 5,50 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,999$ ) et de  $C_E = 3,48 \times R_E - 1,43 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,998$ ). Les rapports T/E varient de 0,54 à 10,73 et l'équation de régression linéaire est de  $C_{T/E} = 1,09 \times R_{T/E} - 7,68 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,997$ ).

#### 2.4.2. Quantification de l'androstérone et de l'étiocolanolone

Les huit solutions d'étalonnage contiennent des concentrations finales variant de 101,3 à 9119 ng/mL en androstérone et de 251,4 à 9050 en étiocolanolone. Les régressions linéaires obtenues pour chacune des courbes sont les suivantes:  $C_A = 0,888 \times R_A + 4,10 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,989$ ) et  $C_E = 0,797 \times R_E - 9,80 \times 10^{-3}$  ( $r^2 = 0,999$ ) où  $C$  représente la concentration en analyte et  $R$  le ratio des surfaces des pics chromatographiques de l'analyte sur le standard interne. L'ion à  $m/z$  419 [ $M^+ - 15$ ] (dérivé TMS-énol, TMS-éther) est utilisé pour ces deux analytes. Pour ce qui est du ratio A/Et, les valeurs vont de 0,11 à 9,07 et la régression linéaire est de  $C_{A/Et} = 1,16 \times R_{A/Et} + 2,99 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 1,000$ ).

#### 2.4.3. Quantification du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol

Pour ces deux diols, l'ion à  $m/z$  256 est utilisé et les concentrations vont de 5,00 à 301,2 ng/mL pour le 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et de 5,00 à 747,0 ng/mL pour le 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol. Les équations des régressions linéaires sont respectivement de  $C_{5\alpha} = 1,66 \times R_{5\alpha} + 4,69 \times 10^{-3}$  ( $r^2 = 0,995$ ) et de  $C_{5\beta} = 3,40 \times R_{5\beta} - 3,08 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,999$ ). Les

rapports  $5\alpha$ -diol/  $5\beta$ -diol varient de 0,10 à 5,02 et l'équation de régression linéaire est de  $C_{5\alpha/5\beta} = 0,647 \times R_{5\alpha/5\beta} - 8,52 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,995$ ).

#### 2.4.4. Quantification de l'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol, l'androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol, la DHEA et l'épiandrostérone

Les solutions standards contiennent de 2,60 à 205,0 ng/mL en androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol et l'équation de la régression linéaire est de  $C_{5\Delta 3\beta 17\alpha} = 1,39 \times R_{5\Delta 3\beta 17\alpha} - 1,57 \times 10^{-2}$  ( $r^2 = 0,999$ ) alors que pour l'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol, les concentrations varient de 2,55 à 204,4 ng/mL et l'équation est  $C_{5\Delta 3\beta 17\beta} = 1,30 \times R_{5\Delta 3\beta 17\beta} - 1,94 \times 10^{-4}$  ( $r^2 = 0,997$ ). Les ions à m/z 344 et 434 sont utilisés. Dans le cas de la DHEA, les valeurs vont de 99,7 à 8975 ng/mL, l'équation de la régression est de  $C_{DHEA} = 0,724 \times R_{DHEA} + 4,16 \times 10^{-4}$  ( $r^2 = 0,997$ ) et l'ion à m/z 432 est utilisé. Les concentrations en épiandrostérone varient de 5,10 à 1529 ng/mL, l'équation est de  $C_{\text{épiandro}} = 2,44 \times R_{\text{épiandro}} + 1,82 \times 10^{-1}$  ( $r^2 = 0,990$ ) et l'ion à m/z mesuré est le 419.

#### 2.4.5. Contrôles de qualité de la quantification et de l'hydrolyse

Trois autres solutions sont utilisées comme contrôle de quantification. Celles-ci sont préparées comme les huit solutions étalons sauf qu'une dilution finale 1 pour 20 dans 20 mL d'urine d'enfant prépubère est effectuée. Il est à noter que les solutions mères de ces contrôles urinaires de quantification sont préalablement analysées afin de vérifier l'exactitude de la courbe d'étalonnage.

Une autre solution urinaire contenant de l'androstérone et de l'étiocolanone glucuroconjuguées ainsi que de la testostérone et de l'épitéstostérone sulfoconjuguées a été préparée afin de vérifier l'hydrolyse des conjugués. Cette solution contient l'équivalent de 4022 ng/mL en androstérone libre, 3861 ng/mL en étiocolanone libre, 201,9 ng/mL en épitéstostérone libre et 203,5 ng/mL en testostérone libre. Lors des procédures d'isolement des glucuronides ou des sulfates de stéroïdes, 1,5 mL de cette

solution seront extraits afin de vérifier la qualité et la sélectivité de la solvolysse et de l'hydrolyse avec la  $\beta$ -glucuronidase.

## 2.5. Isolement des stéroïdes libres

Des volumes d'urine de 1,5 à 10 mL, déterminés en fonction de la gravité spécifique, sont prélevés et déposés dans un tube en présence d'un volume équivalent de tampon acétate (pH 5,2) et de 2,5  $\mu$ g d'épiétiocholanolone et de 250 ng de 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Les analytes sont isolés par extraction sur phase solide tel que décrit précédemment (section 2.3.1.). Suite à l'évaporation du méthanol, 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,5% (p/p) et 5 mL d'éther diéthylique sont ajoutés et le tout est agité, centrifugé et extrait. La phase organique est évaporée à sec et les résidus sont dissous dans 200  $\mu$ L de méthanol, puis transférés dans un vial conique. Suite à l'évaporation du méthanol, le vial est scellé sous azote et les extraits stéroïdiens sont ensuite dérivés comme décrit dans la section 2.9.

## 2.6. Isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués

Des volumes d'urine de 1,5 à 10 mL, déterminés en fonction de la gravité spécifique, sont prélevés et déposés dans un tube en présence d'un volume équivalent en tampon acétate (pH 5,2) et de 2,5  $\mu$ g d'épiétiocholanolone et de 250 ng de 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Les analytes sont isolés par extraction sur phase solide tel que décrit précédemment (section 2.3.1.). Le méthanol recueilli est évaporé à sec sous un jet d'azote à environ 50°C. Le culot est dissous dans 1 mL de tampon phosphate (pH 6,9) et 50  $\mu$ L d'une solution de ce même tampon contenant de 1500 à 2000 U de  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli* de type IX-A sont ajoutés. Après une incubation d'une heure à 50°C, l'hydrolyse est complétée et l'hydrolysate est refroidi à la température ambiante. Trente microlitres d'une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M et 5 mL d'éther diéthylique sont ensuite ajoutés et le tout est agité, centrifugé et extrait. La phase organique est évaporée à sec sous un jet d'azote à environ 50°C et le résidu est dissous dans le méthanol et transféré

dans un vial conique pour être ensuite évaporé à nouveau. Le vial est bouché sous azote et les extraits stéroïdiens sont ensuite dérivés comme décrit dans la section 2.9.

### **2.7. Isolement des stéroïdes libres et sulfoconjugués**

Des volumes d'urine de 1,5 à 10 mL, déterminés en fonction de la gravité spécifique, sont prélevés et déposés dans un tube en présence d'un volume équivalent en tampon acétate (pH 5,2) et de 2,5 µg d'épiétiocholanolone et de 250 ng de 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Les analytes sont isolés par extraction sur phase solide tel que décrit précédemment (section 2.3.1.). Le culot est solubilisé dans 1 mL de tétrahydrofurane (THF) et 2 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (aq) 4 M sont ajoutés. Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 60 minutes pour ensuite être neutralisé à l'aide de 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,5% (p/p). Il est à noter que le THF est miscible dans l'eau. Cinq millilitres d'éther diéthylique sont ensuite ajoutés et le mélange est agité, centrifugé et extrait. La phase organique est évaporée à sec sous un jet d'azote à environ 50°C et le résidu est dissous dans le méthanol et transféré dans un vial conique pour être ensuite évaporé de nouveau. Le vial est scellé sous azote et les extraits stéroïdiens sont ensuite dérivés comme décrit dans la section 2.9.

### **2.8. Isolement des stéroïdes sulfoconjugués**

Suite à une double extraction des stéroïdes libres ou des stéroïdes libres et glucuroconjugués, le pH de la phase aqueuse résiduelle est amené à environ 5 à l'aide de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (aq) 4 M. Par la suite, 1 mL de tampon acétate (pH 5,2) ainsi que 2,5 µg d'épiétiocholanolone et de 250 ng de 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (standards internes) sont ajoutés à la phase aqueuse. Les étapes subséquentes sont identiques à celles décrites à la section 2.7.

## 2.9. Dérivations chimiques des extraits stéroïdiens

Les stéroïdes sont dérivés sous la forme d'éther et d'énol de TMS suite à l'ajout dans le vial conique scellé de 50  $\mu\text{L}$  d'un mélange contenant 3,0 mL de MSTFA, 60  $\mu\text{L}$  d'éthanthiol et 60  $\mu\text{L}$  d'une solution de TMIS 0,1 M. La solution de TMIS contient quant à elle 70  $\mu\text{L}$  de TMIS, 1  $\mu\text{L}$  de triéthylamine et 430  $\mu\text{L}$  de dichlorométhane. Le mélange est par la suite chauffé à 70°C pendant 30 minutes. Les dérivés éthers de TMS des stéroïdes sont préparés par l'ajout de 10  $\mu\text{L}$  de MSTFA, 1  $\mu\text{L}$  de TMCS et 90  $\mu\text{L}$  de pyridine dans le vial. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 20 minutes, puis le réactif est évaporé sous un jet d'azote et le culot est ensuite dissous dans 50  $\mu\text{L}$  d'hexane (la pyridine et son chlorhydrate causant une détérioration du port d'injection).

## 2.10. Analyse par CG/SM

L'analyse des extraits urinaires a été effectuée par CG/SM à l'aide d'un détecteur sélectif de masse HP 5970 (Hewlett-Packard, Mississauga, Canada) couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 (Série II) équipé d'un injecteur automatique HP 7673. Le contrôle des instruments et le traitement des données se fait à l'aide d'un ordinateur Hewlett-Packard de type Vectra VL2 opérant le logiciel MS ChemStations de Hewlett-Packard. Deux appareils différents ont été utilisés afin de séparer et détecter les stéroïdes mentionnés plus haut. La testostérone, l'épitéstostérone et le rapport T/E ont été déterminés à l'aide d'un chromatographe muni d'une colonne capillaire HP-5 ayant une phase 5% de phényle polyméthyle siloxane (25 m x 0,25 mm de diamètre interne et une épaisseur de phase de 0,33  $\mu\text{m}$ ). Quant aux autres analytes, ils ont été étudiés à l'aide d'un chromatographe muni d'une colonne capillaire HP-1 ayant une phase 1% de phényle polyméthyle siloxane (15 m x 0,25 mm d.i. et 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de phase).

Lors de l'analyse de stéroïdes androgènes par CG/SM, 1  $\mu\text{L}$  du mélange contenant les stéroïdes dérivés est injecté en mode débit non-partagé (30 secondes de délai) dans un port d'injection contenant un manchon de verre et de la laine de verre silanisés. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur et la programmation de température est la suivante pour le

chromatographe contenant la colonne HP-5 : 100°C (1 min) à 220°C à un gradient de 20 °C/min et finalement à 320 °C à un gradient de 4,4 °C/min. La température finale est maintenue à 320 °C pendant 5,3 minutes. Pour ce qui est du deuxième chromatographe, la programmation est la suivante: 150 °C (0,5 min) à 200 °C à un gradient de 20 °C/min, à 220 °C à un gradient de 2,0 °C/min et à 310 °C à un gradient de 30 °C/min. La température finale est maintenue à 310 °C pendant 5 minutes. Dans les deux cas, la température du port d'injection est de 270 °C alors que pour l'interface entre le chromatographe et le spectromètre de masse, la température est de 320 °C. Le détecteur sélectif de masse est utilisé en mode de détection sélective d'ions (DSI) et en mode de balayage répétitif pour la détection et l'enregistrement de spectres de masse complets afin d'identifier les divers pics chromatographiques.

## **Chapitre 3**

### **Résultats et Discussion**

#### **3.1. Introduction**

Ce projet traitant de l'importance des stéroïdes sulfoconjugués urinaires lors de contrôles antidopage est subdivisé en trois parties. Dans un premier temps, nous avons mis au point une procédure analytique permettant d'étudier le milieu réactionnel de la solvolysé chimique. Nous avons optimisé les conditions réactionnelles de la solvolysé à l'aide de cette méthode et ensuite développé une procédure complète d'isolement des stéroïdes sulfoconjugués du milieu urinaire. Dans un second temps, nous avons utilisé cette méthode afin d'évaluer l'importance de considérer la concentration urinaire en sulfate d'épitéstostérone lors du calcul du rapport TG/EG ainsi que le potentiel discriminatoire de 4 sondes proposées par Dehennin (Dehennin, 1994b; Dehennin et Pérès, 1996). Nous avons étudié les profils stéroïdiens d'une population de référence et d'une population d'athlètes mâles ayant des TG/EG élevés. Nous avons finalement caractérisé des métabolites sulfoconjugués de la DHEA permettant d'en diagnostiquer l'administration.

#### **3.2. Hydrolyse chimique**

##### **3.2.1. Solvolysé chimique**

Nous avons comparé l'efficacité des différentes méthodes d'hydrolyse chimique des dérivés conjugués de stéroïdes urinaires afin de libérer sélectivement les sulfates des glucuronides. Le suivi des réactions a été effectué par CLHP en phase inverse avec détection UV/visible à une longueur d'onde de 245 nm. Les stéroïdes modèles utilisés sont la testostérone et ses dérivés sulfoconjugués et glucuroconjugués en utilisant la 17 $\alpha$ -

méthyltestostérone et la 19-nortestostérone comme standards internes (voir à la section 2.3. pour les conditions de séparation). L'analyse directe des milieux réactionnels très acides est impossible et l'évaporation de ceux-ci conduit à des réactions secondaires. Nous avons donc neutralisé le milieu réactionnel à l'aide d'une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  0,5%, évaporé la phase organique et ajusté le pH par l'ajout d'un tampon acétate. Les stéroïdes sont par la suite isolés par extraction sur phase solide élués avec du méthanol et analysés par CLHP.

À l'aide de cette procédure analytique, nous avons optimisé la solvolysse chimique en variant les conditions réactionnelles. Quatre des principaux paramètres étudiés sont le solvant, le volume d'acide, la température du milieu réactionnel et le temps alloué à la solvolysse. Les conditions optimales doivent permettre de faire une solvolysse complète des stéroïdes sulfoconjugués et ce, dans un laps de temps le plus court possible, sans qu'il y ait hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués et sans qu'aucun stéroïde ne soit dégradé. Pour procéder à ces études, nous avons utilisé des standards de stéroïdes et non des milieux urinaires.

La méthode de solvolysse utilisée lors de travaux précédents (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996) consiste en l'ajout de 2  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique 4M aux stéroïdes urinaires isolés par extraction en phase solide et dissous dans 1 mL d'acétate d'éthyle. Le mélange réactionnel est chauffé à 40 °C pendant 1 heure. Nous avons débuté avec l'étude de ce milieu de solvolysse. Le rendement de la solvolysse du sulfoconjugué dans l'acétate d'éthyle est en moyenne de plus de 90% et la réaction est très sélective (voir tableau 1). Nous pouvons observer que les changements de température et de concentrations en acide n'affectent que très peu le rendement final de la réaction (voir tableaux 1 et 2). Ces observations nous poussent à conclure qu'il serait préférable d'ajouter seulement 2  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique 4M (pour une concentration finale de  $8 \times 10^{-3}$  M) et de chauffer le milieu réactionnel à 50°C afin de maximiser le rendement de la solvolysse chimique.

**Tableau 1**

**Étude semi-quantitative portant sur la solvolysse chimique des conjugués de la testostérone dans l'acétate d'éthyle à 40°C en présence de volumes variables d'acide sulfurique 4M.**

Temps (min)	volume de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M (μL)	Rendement de la solvolysse du TS (%)	Rendement de la solvolysse du TG (%)
20	2	88%	0%
60	2	91%	0%
20	5	92%	0%
60	5	93%	0%
20	10	87%	0%
60	10	88%	0%

**Tableau 2**

**Étude semi-quantitative portant sur les effets de la température lors d'une solvolysse chimique des conjugués de la testostérone dans l'acétate d'éthyle en présence de 2 μL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M.**

Temps (min)	Température (°C)	Rendement de la solvolysse du TS (%)	Rendement de la solvolysse du TG (%)
20	40	88%	0%
60	40	91%	0%
20	50	92%	0%
60	50	93%	0%

La nature du solvant semble être un des paramètres importants à considérer lors de l'optimisation de la solvolysse et déterminante pour la vitesse de la réaction. Selon Burstein et Lieberman (1958b), la polarité et la disponibilité des doublets d'électrons libres de l'oxygène pourraient entrer en ligne de compte quant au rendement de la solvolysse. Ils affirment que la présence d'un solvant de faible polarité dans le milieu réactionnel favoriserait la libération des stéroïdes sulfoconjugués. De plus, l'usage d'éthers tels le dioxane, le THF et l'éther diéthylique hausserait significativement la constante de vitesse (Burstein et Lieberman, 1958b).

Les indices de polarités  $P'$  présents dans le tableau 3 sont normalement utilisés en chromatographie liquide afin d'évaluer la polarité d'une phase mobile. Un solvant non-polaire tel l'hexane a un indice  $P'=0,1$  alors que l'eau, qui est très polaire, a un indice de  $P'=10,3$  (Skoog et Leary, 1992). Lors du métabolisme des stéroïdes, l'organisme cherche à inactiver ces hormones et à hausser leur polarité afin de favoriser leur excrétion dans le milieu aqueux qu'est l'urine. Ces conjugués risquent donc d'être peu solubles dans les phases organiques ayant un faible indice de polarité. Ainsi, les rendements inférieurs à 50% qu'offrent l'hexane ( $P'=0,1$ ) et le 1-chlorobutane ( $P'=1,0$ ) peuvent être reliés au manque de solubilité des conjugués de stéroïdes dans ces milieux non polaires. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 3.

Le rendement de la solvolysse avec le méthanol comme solvant est de 23% après 20 minutes et de 54% après 60 minutes. Dans ces conditions, la solvolysse n'est que partielle. Pour ce qui est des six autres solvants, soit l'éther éthylique, l'acétone, le THF, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile, ils offrent tous des rendements de plus de 90% après 60 minutes. Par contre, seuls l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle et le THF amènent des rendements de plus de 90% et ce, après seulement 20 minutes.

Tableau 3

Étude semi-quantitative portant sur les effets du solvant utilisé lors d'une solvolysse chimique des conjugués de la testostérone en présence de 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4M.

Solvant utilisé	Indice de polarité P'	Température (°C)	Temps aloué à la solvolysse (min)	Rendement de la solvolysse du TS (%)	Rendement de la solvolysse du TG (%)
Hexane	0,1	50	20	0%	0%
			60	0%	0%
1-Chlorobutane	1,0	50	20	14%	5%
			60	50%	10%
Ether diéthylique	2,8	24	20	84%	0%
			60	96%	0%
Acétone	-	50	20	85%	0%
			60	85%	5%
THF	4,0	50	20	91%	0%
			60	93%	0%
Chloroforme	4,1	50	20	59%	0%
			60	95%	27%
Acétate d'éthyle	4,4	50	20	92%	0%
			60	93%	0%
Méthanol	5,1	50	20	23%	0%
			60	54%	0%
Acétonitrile	5,8	50	20	98%	0%
			60	98%	5%

Le 1-chlorobutane, l'acétone, le chloroforme et l'acétonitrile sont des milieux qui entraînent un manque de sélectivité puisqu'à la fois le sulfate de testostérone et de 5 à 27% du glucuronide de testostérone présents sont hydrolysés. De plus, nous avons observé en présence de 1-chlorobutane, chloroforme et acétonitrile la dégradation de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone utilisée comme standard interne par déshydratation du groupement hydroxyle du carbone tertiaire en C-17 tel que démontré par l'analyse des spectres de masse présenté à la figure 3.1. La présence de ce produit de dégradation a déjà été noté par Bi et Massé en 1991. Il est donc impossible d'utiliser ces solvants. La présence de 1 à 2% d'eau ne semble pas affecter le rendement de la réaction alors que des concentrations supérieures en diminuent nettement l'efficacité (voir tableau 4).

**Tableau 4**  
**Étude semi-quantitative portant sur les effets de traces d'eau dans un milieu de solvolysé contenant 1 mL de THF, 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M.**

Volume d'eau ( $\mu$ l)	Temps (min)	Rendement de la solvolysé du TS (%)	Rendement de la solvolysé du TG (%)
10 (1% v/v)	10	84%	0%
	20	86%	0%
	60	86%	0%
20 (2% v/v)	10	84%	0%
	20	84%	0%
	60	84%	0%
50 (4,8% v/v)	10	44%	0%
	20	64%	0%
	60	84%	0%
100 (9,1% v/v)	10	9%	0%
	20	15%	0%
	60	43%	0%

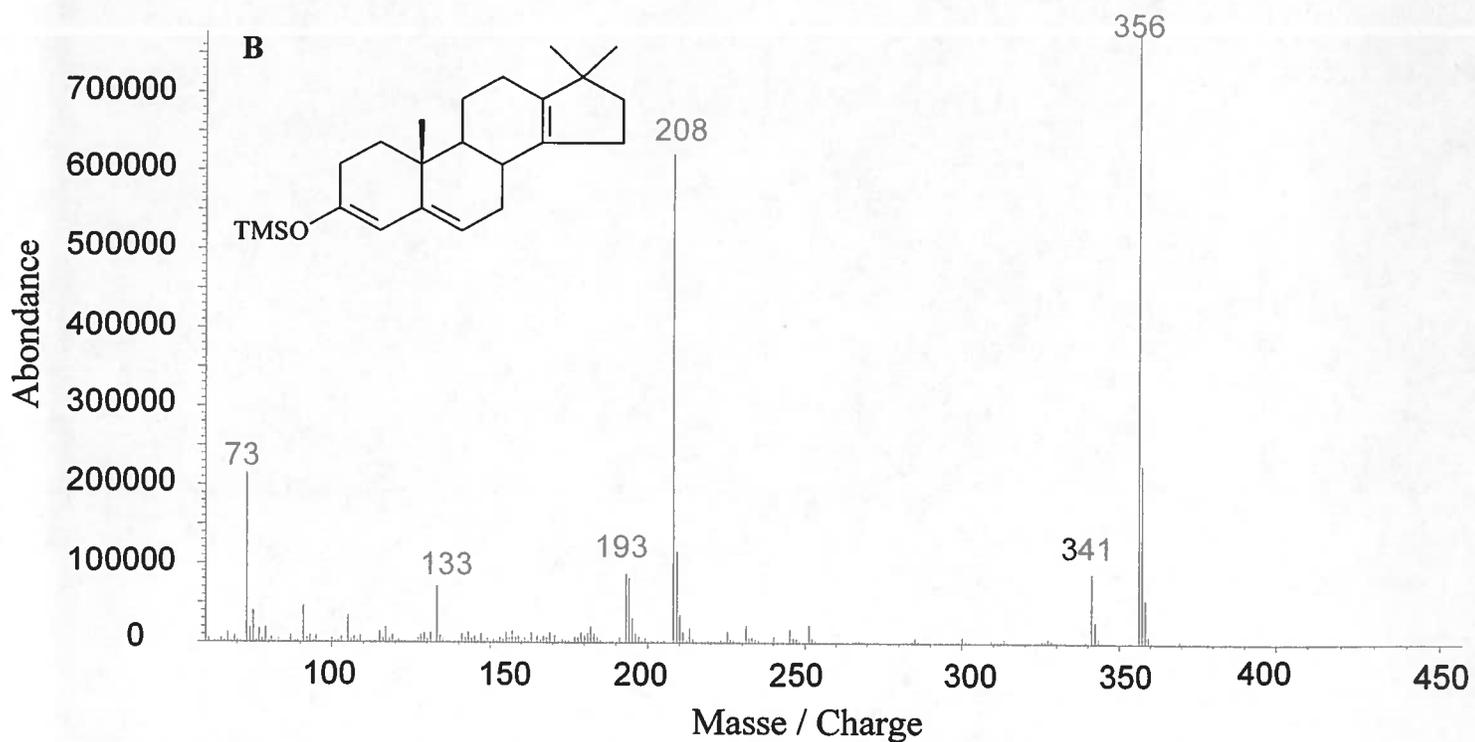
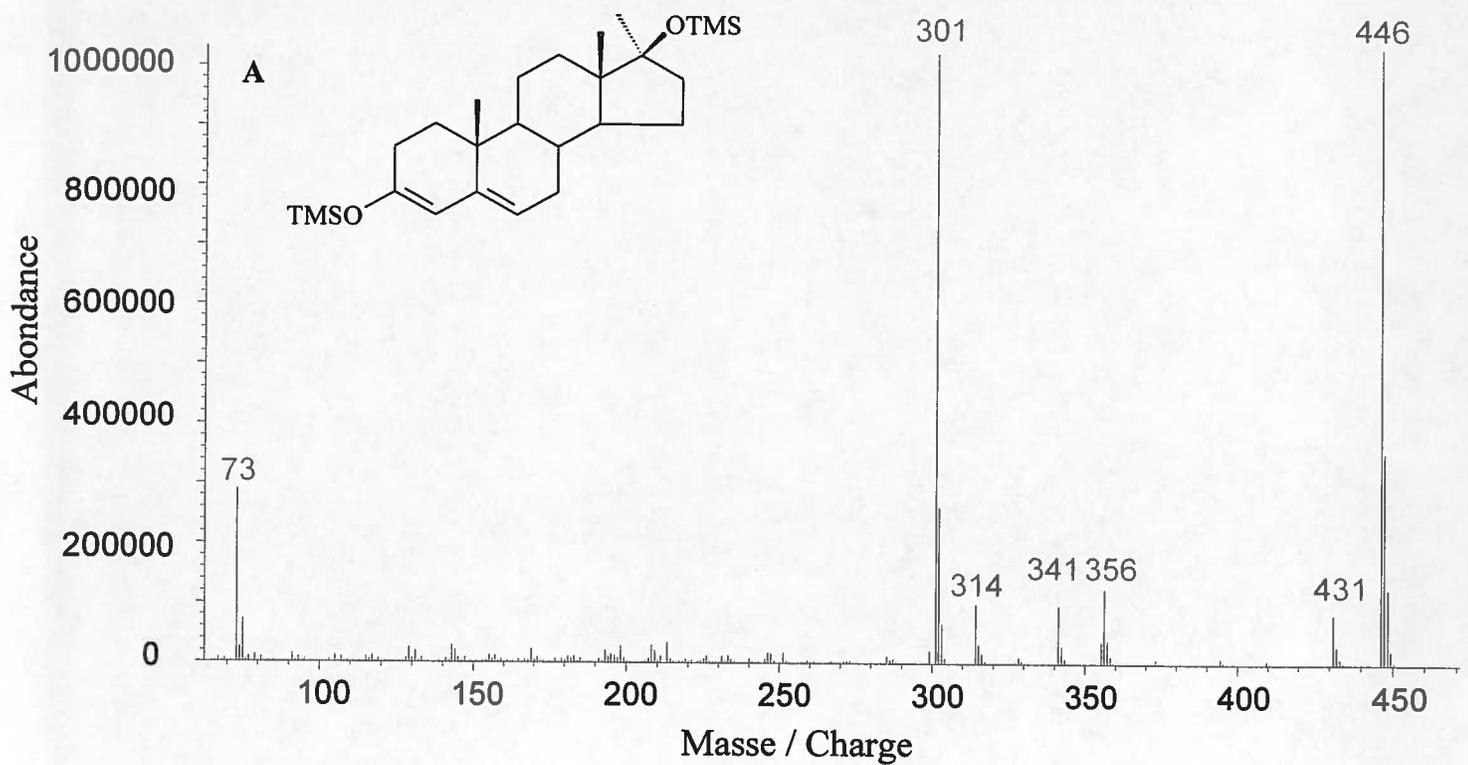


Figure 3.1: Spectres de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éther de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone (A) et de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone déshydratée en C-17 (B) présents dans le milieu réactionnel suite à une solvolysé dans de l'acétonitrile acidifiée.



l'attaque de la molécule d'eau sur le soufre central. Bien que la présence de traces d'eau dans le milieu soit nécessaire, de trop grandes concentrations pourraient conduire à la solvataion du dipôle III. Dans le cas de solvants polaires aprotiques comme l'acétonitrile, le THF et l'acétate d'éthyle, l'espèce réactive serait stabilisée sans qu'il y ait formation de ponts hydrogènes pouvant nuire à l'attaque nucléophile sur l'atome de soufre. Ceci hausserait le rendement de la solvolysse. Voici donc le mécanisme proposé:

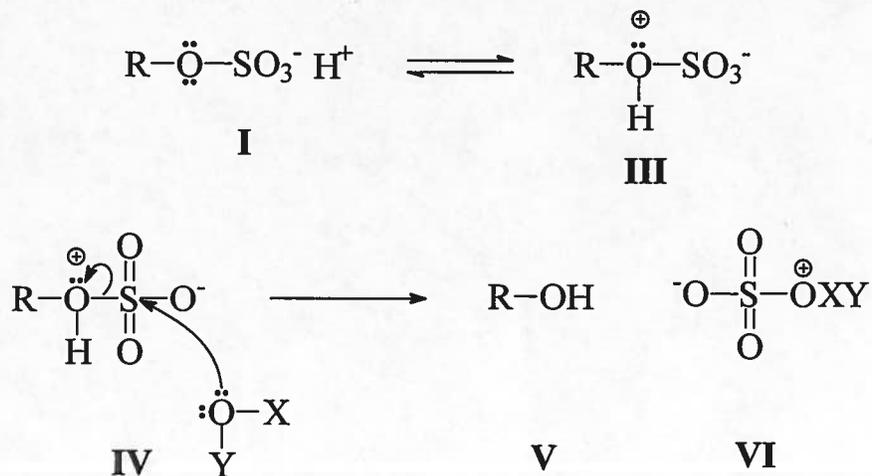


Figure 3.2 Mécanisme proposé de la solvolysse chimique.

### 3.2.2. Méthanolyse

Les conditions de méthanolyse décrites par Tang et Crone (1989) permettent d'hydrolyser tant les dérivés sulfoconjugués que glucuroconjugués, par l'addition de fortes concentrations d'acide dans le méthanol anhydre. Nous avons évalué l'applicabilité de cette méthode d'hydrolyse en effectuant des prélèvements du mélange réactionnel chauffé à 60 °C aux temps 0, 10, 20 et 60 minutes. Les résultats sont présentés au tableau 5.

L'hydrolyse de la testostérone sulfoconjuguée est complète après seulement 10 minutes alors que dans le cas du glucuronide de testostérone, 60 minutes sont nécessaires afin d'obtenir un rendement de 95%. Ces données sont contraires aux affirmations de Tang et Crone (1989) qui avancent qu'une méthanolyse complète des

deux conjugués serait obtenue après moins de 10 minutes en présence de HCl 1M dans du méthanol anhydre. De plus, jusqu'à 20% de la 17 $\alpha$ -méthyl-testostérone présente dans le milieu se dégrade vers sa forme déshydratée après 60 minutes. Cette méthode n'est donc pas applicable.

**Tableau 5**

**Étude semi-quantitative de la méthanolyse dans du méthanol anhydre contenant du HCl 3M à 60°C.**

Temps (min)	Rendement de la méthanolyse du TS	Rendement de la méthanolyse du TG
10	98%	37%
20	~100%	64%
60	~100%	95%

### 3.2.3. Autres conditions de solvolysé et de méthanolyse

Deux procédures ont été utilisées par L. Dehennin au fil des années. La première méthode consiste à séparer les conjugués de stéroïdes par chromatographie ionique pour ensuite hydrolyser séparément les glucuroconjugués et les sulfoconjugués par hydrolyse enzymatique et solvolysé respectivement. La méthode de solvolysé décrite se déroule dans du méthanol contenant de 0,5 à 1M en HCl et le tout était chauffé à 60°C pendant 4 heures (Dehennin, 1993; Dehennin et Matsumoto, 1993). Nous avons étudié cette méthode et les résultats sont présentés au tableau 6.

La réaction n'est que partielle après 10 minutes alors qu'après 60 minutes, la totalité de la testostérone sulfoconjuguée est sous la forme libre. Dans les conditions proposées par Dehennin, la réaction manque de sélectivité puisqu'après 240 minutes, 11% du glucuronide de testostérone présent dans le milieu est hydrolysé. Nous avons également remarqué l'apparition d'un dérivé de la testostérone glucuroconuguée par CLHP. Une quantité de 10% de la TG serait dégradée

**Tableau 6**  
**Étude semi-quantitative de la solvolysse dans le méthanol contenant du HCl 0,5M à 60°C.**

Temps (min)	Rendement de la méthanolyse du TS	Rendement de la méthanolyse du TG
10	57%	0%
60	~100%	0%
240	~100%	11%

probablement par estérification de l'acide carboxylique du glucuronide de testostérone. Les conditions réactionnelles drastiques mènent à la formation de produits secondaires et à un manque de sélectivité. Bien que les stéroïdes soient séparés par chromatographie ionique avant même cette solvolysse, le manque de sélectivité de cette réaction pourrait mener à l'hydrolyse de résidus glucuroconjugués présents dans la fraction sulfate.

La deuxième procédure décrite par Dehennin consiste à effectuer une méthanolyse des deux types de conjugués ainsi qu'à une hydrolyse des glucuroconjugués à l'aide de la  $\beta$ -glucuronidase. Les concentrations en sulfates de stéroïdes sont déterminées en soustrayant les concentrations en glucuroconjugués des concentrations totales en conjugués obtenues suite à la méthanolyse. La méthanolyse est effectuée en présence de triméthylchlorosiloxane (TMCS) 1M (Dehennin *et al*, 1996; Dehennin *et al*, 1998). Nous avons constaté qu'à la fois la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone et la 19-nortestostérone sont dégradées dans ces conditions. Après 60 minutes, il ne reste qu'environ 10% de la quantité initiale de 19-nortestostérone et 50% en 17 $\alpha$ -méthyl-testostérone. L'analyse des échantillons par CG/SM nous a permis d'observer la présence de [19-nortestostérone-2H] ( $M^+$  à m/z 416) et de [19-nortestostérone-4H] ( $M^+$  à m/z 414) (voir figure 3.3).

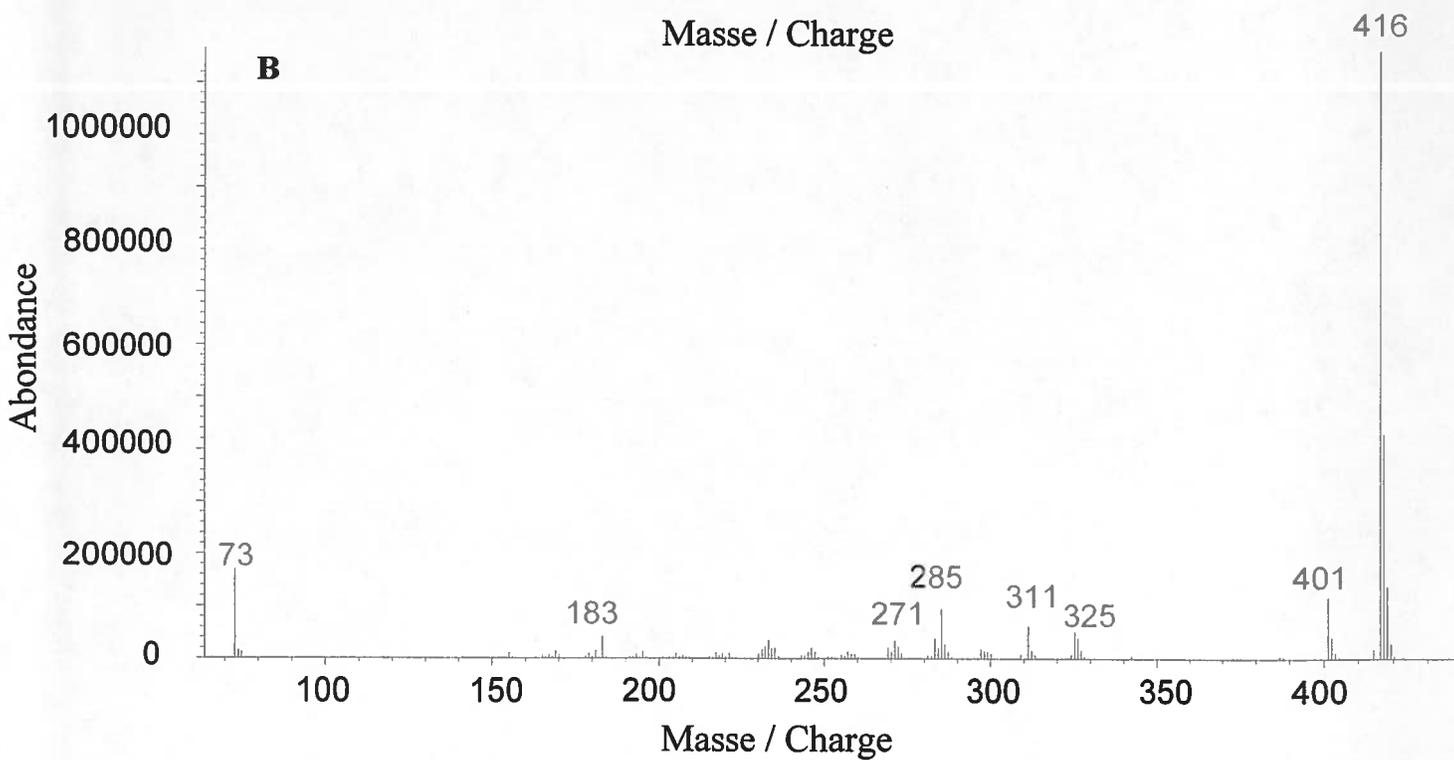
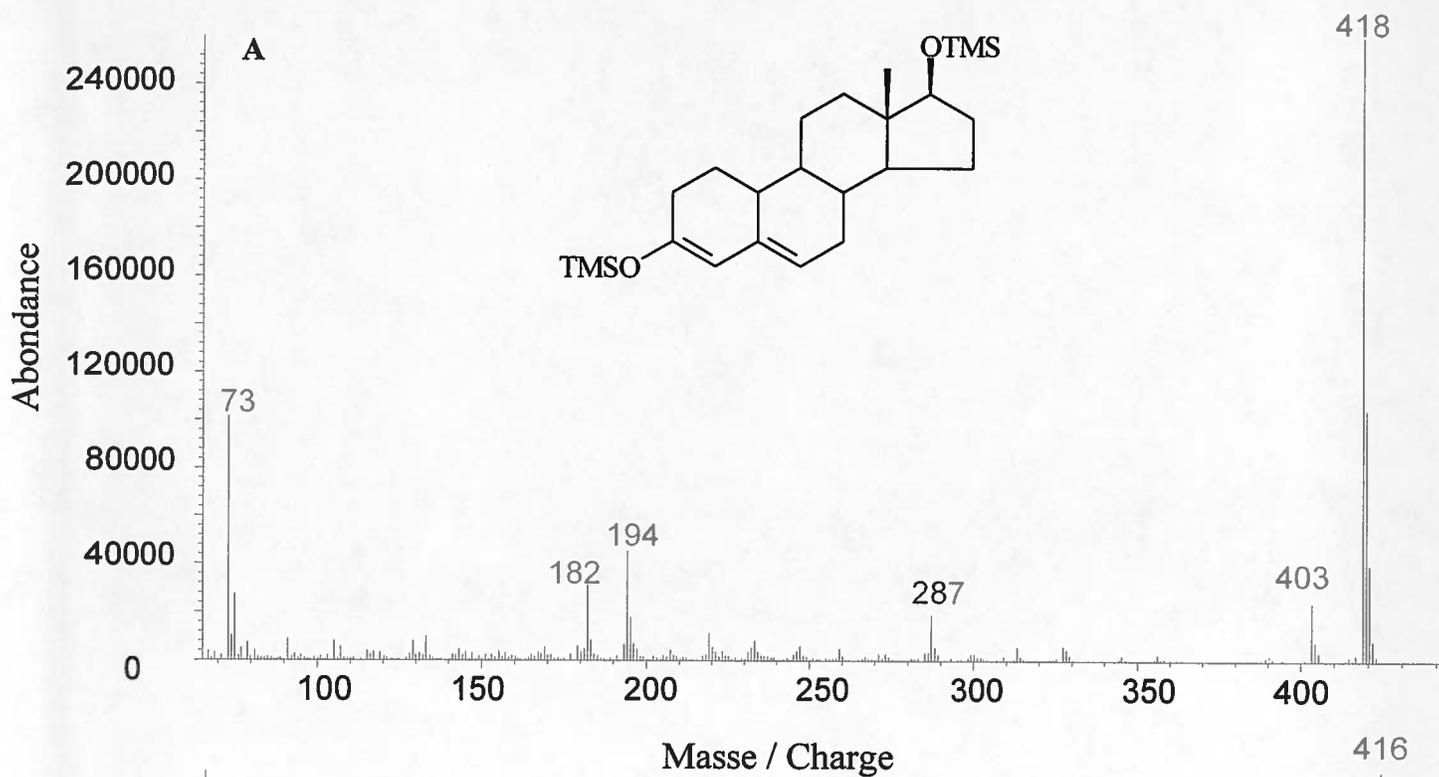


Figure 3.3: Spectres de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éther de la 19-nortestostérone (A) et de la [19-nortestostérone-2H] (B) présentes dans le milieu réactionnel suite à une méthanolyse à l'aide de méthanol contenant du TMCS 1M.

Comme mentionné plus tôt, la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone quant à elle serait transformée en sa forme déshydratée.

### 3.2.4. Conclusion

Nous avons pu constater que le rendement de la solvolyse est optimal en milieu polaire et aprotique. Certains milieux tels l'acétonitrile, le 1-chlorobutane et le chloroforme ont entraîné une déshydratation de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone. À la fois les dérivés sulfoconjugués et les glucuroconjugués ont été hydrolysés dans ces mêmes milieux. La présence de grandes concentrations d'acide et de hautes températures n'augmente que très peu le rendement de la solvolyse alors que la présence de traces d'eau peut nuire à la solvolyse au point d'en diminuer considérablement le rendement. Nous avons également proposé un nouveau mécanisme pour la solvolyse n'impliquant pas la forme non-discociée du groupement sulfate.

Nous en concluons donc que les meilleures conditions de solvolyse sont les suivantes: 1 mL de THF auquel 2  $\mu$ L d'acide sulfurique 4M sont ajoutés et le tout est chauffé à une température de 50°C pendant au moins 20 minutes. Dans ces conditions, la solvolyse chimique peut être considérée comme étant une méthode sélective, rapide et offrant un bon rendement ainsi qu'aucun signe de dégradation. Il serait possible d'utiliser l'acétate d'éthyle comme solvant et ce, dans les mêmes conditions réactionnelles. Il faut par contre retenir qu'il y a des risques d'estérification entre un groupement alcool d'un stéroïde et l'acétate d'éthyle.

### 3.3. Étude de la solvolysse en milieu urinaire

#### 3.3.1. Sélectivité et durée de la solvolysse

À partir des conditions réactionnelles établies à la section 3.2, nous avons établi une procédure analytique (voir section 2.7) permettant d'étudier les stéroïdes sulfoconjugués présents dans le milieu urinaire. Afin d'étudier la sélectivité et le temps nécessaire à une solvolysse chimique complète, nous avons utilisé des urines témoins enrichies en testostérone (TS) et épitestostérone (ES) sulfoconjuguées ainsi qu'en androstérone (AG) et étiocholanolone (EtG) glucuroconjuguées. Les milieux réactionnels sont chauffés de 10 à 60 minutes et la procédure exposée plus tôt est utilisée afin d'isoler les analytes.

**Tableau 7**

**Étude quantitative portant sur la sélectivité et le temps de solvolysse à l'aide d'urines témoins enrichies**

Temps (min)	Rendement de la solvolysse du ES (%)	Rendement de la solvolysse du TS (%)	Rendement de la solvolysse du AG (%)	Rendement de la solvolysse du EtG (%)
10	67	77	< L.Q.	1
30	73	85	< L.Q.	1
60	83	97	< L.Q.	1

Nous pouvons observer au tableau 7 que 60 minutes sont nécessaires pour que la solvolysse de ces urines témoins enrichies soit complète. Après 60 minutes, 83% de l'épitestostérone sulfoconjuguée et 97% du sulfate de testostérone sont sous la forme libre alors que seulement 1% de l'étiocholanolone glucuroconjuguée est hydrolysé. Pour ce qui est du glucuronide d'androstérone, les valeurs obtenues sont sous la limite de quantification (L.Q.). La solvolysse de milieux urinaires à l'aide de THF est donc très

sélective et offre un bon rendement après 60 minutes. Il nous est donc possible de procéder à la solvolysé directe des sulfoconjugués urinaires. Un manque de sélectivité aurait eu comme conséquence l'obligation d'extraire les glucuroconjugués afin d'éviter leur hydrolyse lors de la solvolysé. Il est à noter que les seringues utilisées lors de l'ajout d'acide sulfurique doivent être exemptes de toute trace de solvant organique et ce, afin d'éviter que divers produits de dégradation soient déposés dans le milieu réactionnel. De plus, le THF utilisé doit être frais et les teneurs en eau et agents de stabilisations doivent être minimales.

### **3.3.2. Solvolysé de stéroïdes sulfoconjugués urinaires dans de l'acétate d'éthyle et du THF**

L'encombrement stérique des groupements sulfate affecterait la vitesse d'hydrolyse des stéroïdes sulfoconjugués. Ainsi, le sulfate d'androstérone serait solvolysé plus lentement que l'étiocolanolone sulfoconjuguée à cause des différences de conformations. Par contre, la présence d'un lien double en C-5 n'affecterait pas la solvolysé (Burstein et Lieberman, 1958b). Nous nous proposons donc d'étudier l'acétate d'éthyle et le THF comme milieux de solvolysé afin d'évaluer les effets conformationnels des stéroïdes sur le rendement de la solvolysé. Pour ce faire, nous avons procédé à la solvolysé d'une urine d'un mâle de 24 ans en triplicata dans deux solvants. Les résultats sont présentés au tableau 8.

Nous pouvons tout d'abord observer que les concentrations en sulfate de testostérone (TS) et en sulfate d'épitéstostérone (ES) ainsi que le rapport TS/ES sont similaires dans les deux milieux. Par contre, l'écart-type pour la concentration en ES est plus élevée pour le THF et ce, à cause d'une faible valeur de 1,18 ng/mL. Le ratio AS/EtS est de 32% plus élevé suite à une solvolysé dans du THF. Ceci est dû au fait que la concentration en étiocolanolone sulfoconjuguée (EtS) est 2,4 fois plus élevée dans le THF alors que celle en sulfate d'androstérone (AS) n'est que de 61% plus élevée. Pour

Tableau 8

Étude des effets conformationnels des stéroïdes sulfoconjugués urinaires sur le rendement: Solvolysé en triplicata d'une urine d'un homme dans du THF (avec ou sans les stéroïdes libres et glucuroconjugués) et dans de l'acétate d'éthyle.

Nom	TS/ES	[TS] ng/mL	[ES] ng/mL	AS/EtS	[AS] ng/mL	[EtS] ng/mL	[DHEAS] ng/mL	[épiAS] ng/mL	[5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ S] ng/mL	[5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\beta$ S] ng/mL
THF sur urine #1	0,24	1,13	1,18	3,57	494	146	1486	65,5	177	208
THF sur urine #2	0,31	1,91	3,70	3,83	400	115	1226	67,4	164	182
THF sur urine #3	0,32	1,84	3,42	3,73	413	121	1273	70,2	169	191
Moyenne	0,29	1,63	2,77	3,71	436	128	1328	67,7	170	194
Écart-type	0,04	0,43	1,4	0,13	51,0	16,6	139	2,4	6,4	13,2
EtAc sur urine #1	0,34	1,73	2,83	2,81	167	74,4	600	30,1	50,3	73,6
EtAc sur urine #2	0,32	1,85	3,39	2,88	194	80,3	661	31,6	52,2	83,0
EtAc sur urine #3	0,52	2,30	3,07	2,76	180	83,0	580	31,0	44,3	69,9
Moyenne	0,39	1,96	3,10	2,82	180	79,2	613	30,9	48,9	75,5
Écart-type	0,11	0,30	0,28	0,06	13,2	4,4	42,4	0,8	4,1	6,8
THF sans Gluc. & Libres #1	0,30	1,61	2,75	3,83	410	115	1337	59,5	203	161
THF sans Gluc. & Libres #2	0,46	2,29	3,37	3,73	371	111	1091	67,4	176	143
THF sans Gluc. & Libres #3	0,34	1,55	2,24	3,70	407	119	1195	68,3	198	157
Moyenne	0,37	1,82	2,79	3,75	396	115	1208	65,1	193	153
Écart-type	0,08	0,41	0,57	0,07	21,9	3,9	124	4,8	14,2	9,5

ce qui est des sulfates de DHEA (DHEAS), d'épiandrostérone (épiAS), d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol (5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ S) et d'androst-5-ène-3 $\beta$ 17 $\beta$  (5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\beta$ S), leurs concentrations sont de 2 à 3 fois plus élevées suite à une solvolysé dans du THF. Quant aux 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol sulfoconjugués, les valeurs obtenues sont sous la limite de quantification.

Afin de s'assurer que ces différences ne sont pas attribuables à un manque de sélectivité de notre méthode dans le THF, nous avons isolé les stéroïdes glucuroconjugués et libres du même milieu urinaire pour ensuite procéder à une solvolysé de la phase aqueuse résiduelle contenant uniquement les sulfoconjugués. Nous pouvons ainsi constater que ces concentrations coïncident à -10% près avec celles obtenues plus tôt suite à une solvolysé directe. Par contre dans le cas de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, la perte de 26% pourrait être due à l'absence des stéroïdes libres dans la phase aqueuse et à une perte en sulfoconjugués lors de l'extraction des stéroïdes libres suite à l'hydrolyse enzymatique. Pour ce qui est de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, la hausse de 13% entre la solvolysé de la phase aqueuse et celle du milieu urinaire pourrait être liée à la double conjugaison de ce stéroïde. L'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol pourrait être conjugué en C-3 $\beta$  à un groupement sulfate et en C-17 $\alpha$  à l'acide glucuronique. Il ne serait possible d'observer ce double conjugué que suite à une hydrolyse enzymatique du glucuronide et à une solvolysé du sulfate. Donc, le THF est un milieu de solvolysé sélectif et les différences entre l'acétate d'éthyle et le THF ne peuvent être dues à un manque de sélectivité.

Ces deux milieux de solvolysé offrent donc des rendements similaires lors de l'hydrolyse des groupements sulfates en C-17  $\alpha$  et  $\beta$ . Si nous considérons la solvolysé dans le THF comme étant complète pour tous les analytes, nous pouvons alors affirmer que seulement de 29 à 46% des androgènes dont le groupement sulfate est en C-3 $\beta$  seraient hydrolysés suite à une solvolysé dans de l'acétate d'éthyle. Dans le cas des 5 $\xi$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one, l'orientation du proton en C-5 affecte beaucoup le rendement de la solvolysé. Seulement 41% du sulfate d'androstérone serait hydrolysé dans l'acétate d'éthyle comparativement à 62% pour l'étiocolanolone sulfoconjuguée. Ceci entraînerait une baisse de 24% du rapport AS/EtS. Des différences de conformation au niveau du cycle A pourraient expliquer ces variations. Sachant que le rendement de solvolysé des sulfates de DHEA et d'épiandrostérone sont tous deux de 46%, nous pouvons avancer que la présence d'un lien double en C-5 n'affecte en rien le cours de la réaction

dans l'acétate d'éthyle. Ces deux dernières observations sont en accord avec les affirmations de Burstein et Lieberman (1958b) citées plus tôt. L'orientation du groupement alcool en C-17 affecte la solvolysse des androst-5-ène-17 $\xi$ -ol-3 $\beta$ -sulfates dans l'acétate d'éthyle. Le rendement semble légèrement supérieur dans le cas de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol par rapport à l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. La conformation C-17 $\beta$  serait ainsi favorisée.

### 3.3.3. Conclusion

Il faut donc retenir qu'une solvolysse dans l'acétate d'éthyle peut mener à la formation de divers produits secondaires et que les rendements dépendent énormément des diverses conformations des stéroïdes sulfoconjugués. Seul le THF offre un milieu de solvolysse sélectif face aux sulfates de stéroïdes, de forts rendements et l'absence de réactions secondaires. De plus, l'orientation des groupements chimiques présents sur les stéroïdes n'affectent pas les rendements de la solvolysse.

### **3.4. Étude du profil stéroïdien de trois populations et application des sondes secondaires impliquant des stéroïdes sulfoconjugués**

Nous avons étudié le profil stéroïdien d'une population référence afin d'évaluer l'excrétion urinaire en sulfates et en glucuronides d'androgènes. Nous avons évalué l'importance de considérer la concentration urinaire en sulfate d'épitestostérone lors du calcul du rapport TG/EG ainsi que le potentiel discriminatoire de quatre sondes proposées par Dehennin. Pour ce faire, nous avons étudié des échantillons négatifs ayant des rapports TG/EG supérieurs à 3 et une autre population formée de positifs avérés dont le TG/EG est supérieur à 6. La procédure de solvolysé mise au point dans la section précédente ainsi qu'une méthode d'hydrolyse enzymatique ( $\beta$ -glucuronidase) ont été utilisées afin d'hydrolyser et d'isoler les analytes. Il est à noter que des contrôles de quantification et d'hydrolyse ont été insérés dans chacune des séquences afin de s'assurer de la qualité de l'extraction et de l'hydrolyse des stéroïdes.

#### **3.4.1. Étude du profil stéroïdien d'une population référence**

Nous avons sélectionné au hasard parmi les échantillons reçus au laboratoire canadien de contrôle antidopage 63 urines d'athlètes mâles pour ensuite procéder à l'isolement et à l'analyse des fractions libres, glucuronides et sulfates. Les fractions libres ont été analysées et nous avons pu constater que ces 63 urines étaient exemptes de signes de dégradation bactérienne (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). En général, les concentrations en stéroïdes libres comptaient pour moins de 3% des concentrations urinaires totales. Il est à noter que les stéroïdes libres n'ont pas été isolés avant l'extraction des fractions sulfates et glucuronides des milieux urinaires. Nous avons ainsi évalué à la fois les concentrations urinaires en conjugués et en libres dans chacune des fractions de conjugués.

Nous avons choisi de quantifier dix stéroïdes androgènes dans chacune des deux fractions. Ces androgènes sont présents en différentes proportions sous les formes sulfoconjuguée et glucuroconjuguée et ce, à cause de leurs caractéristiques structurales (voir tableau 9).

Tableau 9

**Étude des proportions de stéroïdes androgènes urinaires dans les fractions glucuronides et sulfates chez une population référence.**

Androgènes urinaires	Pourcentages d'androgènes dans la fraction glucuronide (moyenne)	Pourcentages d'androgènes dans la fraction sulfate (moyenne)
Testostérone	80%	20%
Épitestostérone	71%	29%
Androstérone	84%	16%
Étiocholanolone	92%	8%
Épiandrostérone	< L.Q.	~ 100%
5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	~ 100%	< L.Q.
5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	~ 100%	< L.Q.
Androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol	19%	81%
Androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	< L.Q.	~ 100%
Déhydroépiandrostérone	13%	87%

Ainsi, les stéroïdes tels la DHEA, l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, l'épiandrostérone et l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ayant un groupement alcool en position C-3 $\beta$  sont principalement voire exclusivement présents sous la forme sulfoconjuguée. Il est à noter que l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol peuvent se lier à deux groupements sulfates et ainsi former des stéroïdes disulfoconjugués (Setchell *et al*, 1976; Axelson, Sahlberg et Sjövall, 1981).

Les stéroïdes ayant une fonction hydroxyle en C-3 $\alpha$ , en C-17 $\alpha$  ou en C-17 $\beta$  peuvent aussi se lier à un groupement sulfate mais en de moindres proportions. Ainsi, 16% de l'androstérone est sulfoconjuguée alors que l'on retrouve seulement 8% en sulfate d'étiocholanolone. Cette différence pourrait être due à la conformation *cis* que les cycles A et B adoptent en présence d'un atome d'hydrogène en C-5 $\beta$ . Ces données sont en accord avec celles mentionnées dans

l'introduction (section 1.5.2) (Leunissen, 1979; Jayle et Pasqualini, 1974). Dehennin (1996) a décrit des pourcentages de sulfates nettement plus élevés pour l'androstérone (42%) et pour l'étiocolanolone (46%). Ces données nous semblent surestimées par la méthode analytique employée. Nous avons en effet observé que la méthanolyse était non sélective et qu'elle causait des réactions secondaires.

La testostérone est sulfoconjuguée à 20% tandis que l'épitestostérone se retrouve dans la fraction sulfate à 29%. L'orientation du groupement alcool en C-17 semble également affecter le processus de sulfoconjugaison. Dans le cas des sulfates de  $5\alpha$  et de  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, les concentrations sont sous les limites de détections.

Il est intéressant de noter que l'androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol est présent sous la forme de glucuronide (19%) alors que son épimère est uniquement sulfoconjugué. Il semble que l'acide glucuronique ne se lierait qu'au groupement alcool en C- $17\alpha$  et non en C- $17\beta$  chez ces diols. Par contre dans le cas de la testostérone et de l'épitestostérone, ces deux épimères sont principalement glucuroconjugués. Les substrats possédant un lien double en C-5 et/ou un groupement alcool en C- $3\beta$  ne semble pas être excrété sous la forme de dérivés glucuroconjugués en C- $17\beta$ . Notons que leur isomère C- $17\alpha$  sont eux excrétés sous la forme glucuroconjuguée.

Les variations interindividuelles des concentrations urinaires en stéroïdes dépendent du débit urinaire et de la dilution des urines en cause. Ces deux paramètres peuvent être considérés en mesurant la gravité spécifique de l'urine. Dans les laboratoires de contrôle du dopage, la mesure de la créatinine urinaire n'est pas effectuée de routine. La seule méthode de comparaison universelle doit tenir compte de la gravité spécifique. À une gravité spécifique urinaire donnée peut être associée une fourchette de concentrations. Nous pouvons donc faire des distributions des concentrations urinaires des analytes en fonction des gravités spécifiques pour les différentes populations étudiées. De plus, dans le cas de la testostérone et de l'épitestostérone, ces distributions peuvent être utilisées comme des outils diagnostiques. Suite à l'administration de testostérone, les concentrations urinaires en conjugués de testostérone seraient haussées et ne correspondraient plus à la concentration généralement reliée à la gravité spécifique de l'échantillon. Nous avons donc construit ces distributions pour les fractions glucuronide et sulfate

de la population de référence et nous avons pu constater que les concentrations urinaires des stéroïdes sont toujours proportionnelles aux gravités spécifiques des échantillons. Il est à noter que ces distributions seront utilisées comme base de comparaison lors de l'étude des deux autres populations dans la prochaine section.

**Tableau 10**

**Étude des rapports d'androgènes urinaires dans les fractions glucuronides et sulfates chez une population référence.**

Valeurs statistiques	TG/EG	TS/ES	AG/EtG	AS/EtS
Moyenne	1,17	0,37	1,66	7,08
Écart-type	0,85	0,28	0,80	6,02
Valeur minimale	0,13	0,15	0,59	0,77
Valeur maximale	3,65	1,61	5,57	36,50

Nous avons également procédé à l'analyse des rapports urinaires TG/EG, TS/ES, AG/EtG et AS/EtS (voir tableau 10). Pour le rapport TG/EG, les valeurs correspondent approximativement aux valeurs publiées (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996) et à celles obtenues par notre équipe à partir d'une importante population formée de 9775 athlètes mâles. Dans ce dernier cas, les rapports vont de 0,01 à 6,88, la moyenne est de 1,44 et l'écart-type de 1,07. Les valeurs statistiques du rapport AG/EtG concordent elles aussi avec celles calculées par notre équipe avec un échantillonnage de 8116 urines, la moyenne étant de 1,62, l'écart-type de 0,73 et les valeurs minimales et maximales de 0,01 et 9,44 respectivement. Les rapports AS/EtS, quant à eux, semblent être distribués en deux sous-populations, une dont le mode est de 5 et une autre ayant un mode de 10 à 12,5. Nous avons pu observer que les concentrations urinaires en androstérone sulfoconjuguée sont relativement stables alors que celles en sulfate d'étiocolanolone varient beaucoup plus. Les grandes variations du rapport AS/EtS ainsi que la présence de deux sous-populations seraient donc attribuables aux concentrations urinaires changeantes en sulfate d'étiocolanolone. Une population beaucoup plus importante devrait être

étudiée afin de vérifier ces affirmations et de définir clairement ces deux sous-populations. Pour ce qui est du rapport  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol glucuronide sur  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol glucuronide, la moyenne est de 0,68 et l'écart-type de 0,38 alors que les valeurs minimale et maximale sont de 0,26 et de 2,12.

### **3.4.2. Étude du profil stéroïdien d'urines dont les rapports TG/EG sont supérieurs à 3**

Au cours des cinq dernières années, près d'une trentaine d'athlètes ayant des TG/EG élevés ont été déclarés positifs à l'utilisation de testostérone et ce, suite à un suivi à l'aide d'études longitudinales. Ces 29 urines ainsi que celles de 25 athlètes déclarés négatifs dont les TG/EG sont supérieurs à 3 ont été sélectionnées afin d'évaluer et de comparer leurs profils stéroïdiens. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les données recueillies dans la section 3.4.1. chez une population référence pour des fins de comparaisons.

Lors de l'analyse des distributions de concentrations de la fraction glucuronide en fonction des gravités spécifiques des deux populations, nous avons déterminé les régressions linéaires des limites de 95% et 97,5%. Selon nos calculs statistiques, 95% ou 97,5% des échantillons du groupe référence ont des concentrations urinaires inférieures à ces valeurs limites et ce, pour une gravité spécifique donnée. La distribution des concentrations de glucuronide de testostérone de la population de T/E élevés est similaire à celle de la population de référence (voir figure 3.4). Par contre, les positifs ont deux fois plus de testostérone glucuroconjuguée, ce qui est sûrement relié à l'administration de testostérone chez ces athlètes. Dans le cas du glucuronide d'épitéstostérone, les concentrations urinaires sont cinq fois plus faibles chez ces deux populations que chez la population de référence (voir figure 3.5). Dans le cas des positifs, cette baisse serait due à la suppression de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire suite à l'administration de testostérone exogène. Cette suppression vise principalement à diminuer la production d'androgènes. Ce processus affecterait également l'épitéstostérone ce qui entraînerait une diminution de sa production et de son excrétion. Quant aux individus dont les TG/EG sont physiologiquement élevés, ces résultats appuient l'hypothèse de Dehennin selon laquelle cette baisse serait attribuable à une modification du métabolisme hépatique au profit de métabolites autres que l'épitéstostérone glucuroconjuguée (Dehennin et Matsumoto, 1993).

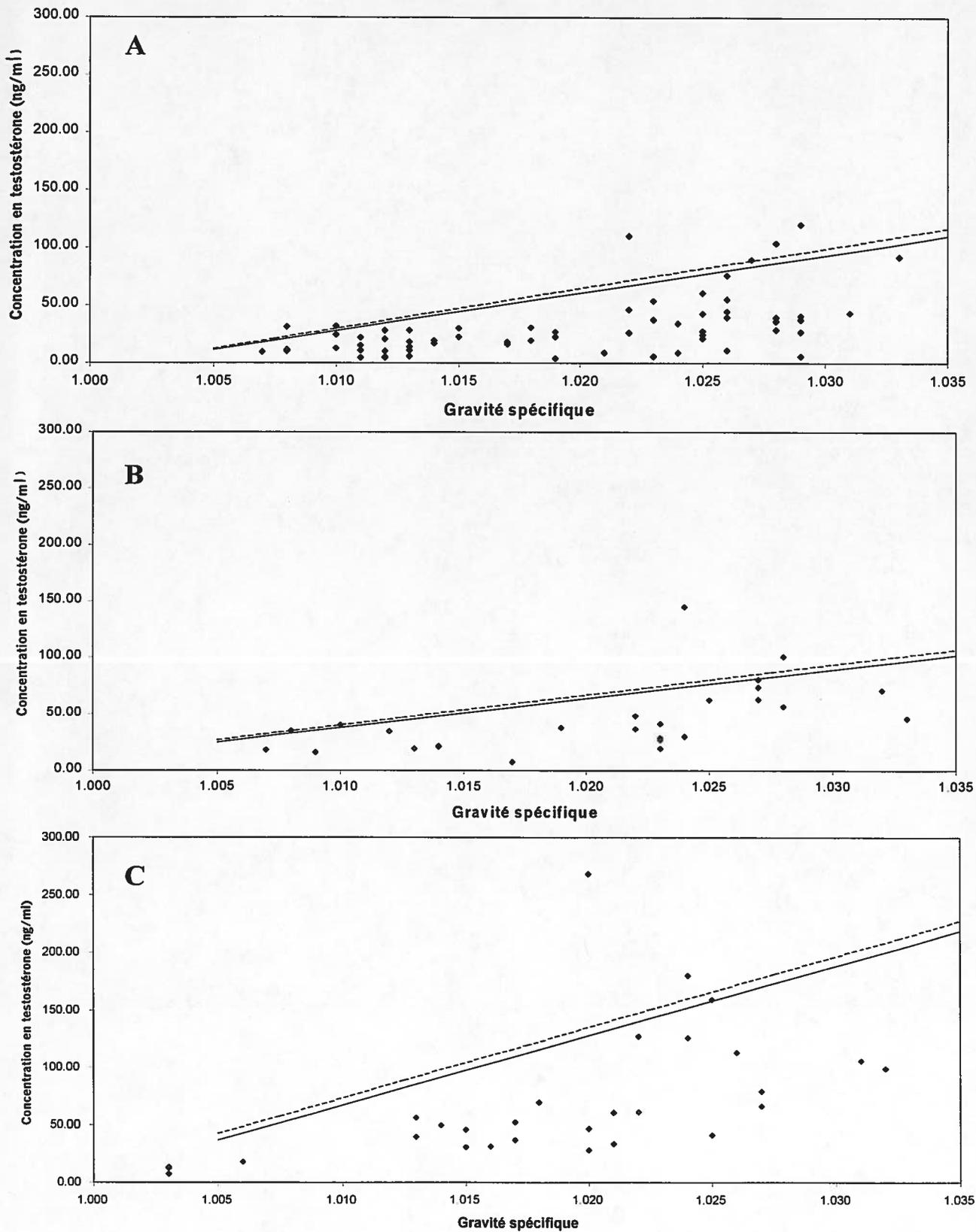


Figure 3.4: Distributions des concentrations urinaires en glucuronide de testostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence (A), 25 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

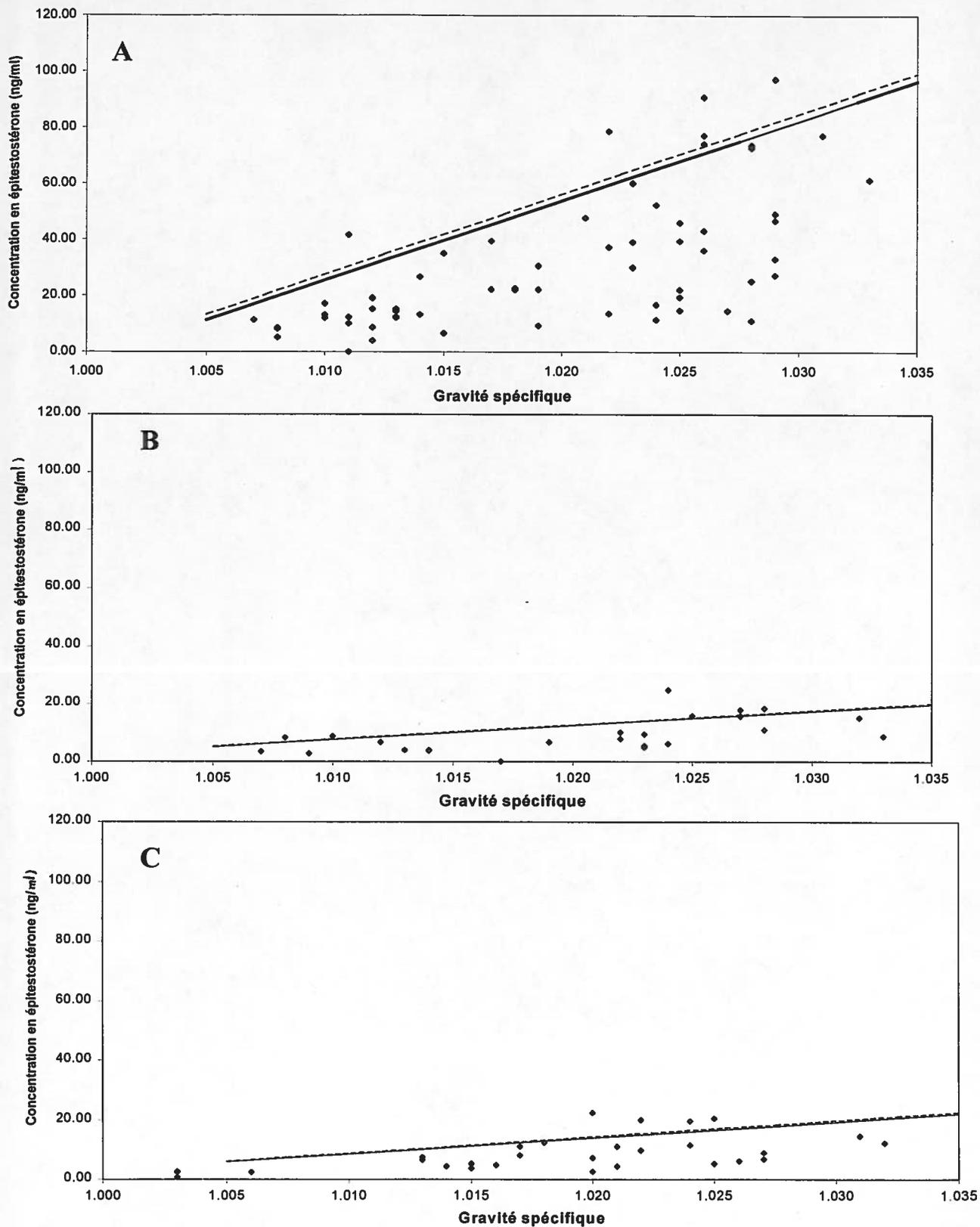


Figure 3.5: Distributions des concentrations urinaires en glucuronide d'épitestostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence (A), 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

La faible teneur en glucuronide d'épitéstostérone entraînerait une hausse du rapport TG/EG chez ce groupe d'individus. Les distributions pour les glucuronides de testostérone et d'épitéstostérone de la population référence sont similaires à celles publiées par notre équipe en 1996 (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Pour ce qui est des glucuronides d'androstérone, d'étiocholanolone, du  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, d'androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol et de DHEA, les distributions sont similaires à celles obtenues pour la population référence.

Dans le cas des sulfates d'androgènes, on peut noter beaucoup plus de différences entre les profils stéroïdiens de ces 3 populations. Tout d'abord, plus le rapport TG/EG de la population est élevé, plus la teneur en testostérone sulfoconjuguée est importante (voir figure 3.6). Ainsi, les athlètes dont le TG/EG est normalement élevé ont une excrétion environ quatre fois supérieure en TS que la population référence alors que pour les positifs, ce facteur est de cinq. Dans le cas de l'épitéstostérone sulfoconjuguée, aucune différence n'est observée entre les trois populations. Par rapport à la population référence, les sujets ayant des TG/EG normalement élevés ont trois fois moins d'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol sulfoconjuguée, alors que chez les positifs on en retrouve deux fois moins (voir figure 3.7). Pour ce qui est du sulfate de DHEA, les concentrations sont plus faibles chez les athlètes dont le TG/EG est élevé (voir figure 3.8). Chez les positifs et les individus ayant un TG/EG naturellement élevé, ces concentrations sont environ deux fois moins élevées que celles de la population de référence. Dans le cas des sulfates d'androstérone, d'étiocholanolone, d'androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol et d'épiandrostérone, les distributions sont similaires à celles obtenues pour la population référence.

Cette baisse de production des sulfates de DHEA et d'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol chez les positifs est probablement due à l'effet de rétroaction négative que cause la testostérone exogène. Par contre, l'excrétion de la forme glucuronide de la DHEA ne semble peu ou pas affectée par ce même mécanisme de suppression. Nous en déduisons que nous avons affaire à deux voies de biosynthèse différentes menant à la formation de conjugués d'androgènes. Tel qu'expliqué au chapitre 1, la première voie impliquerait uniquement des stéroïdes libres et mènerait à la production d'androgènes libres. Ceux-ci seraient par la suite métabolisés sous forme de

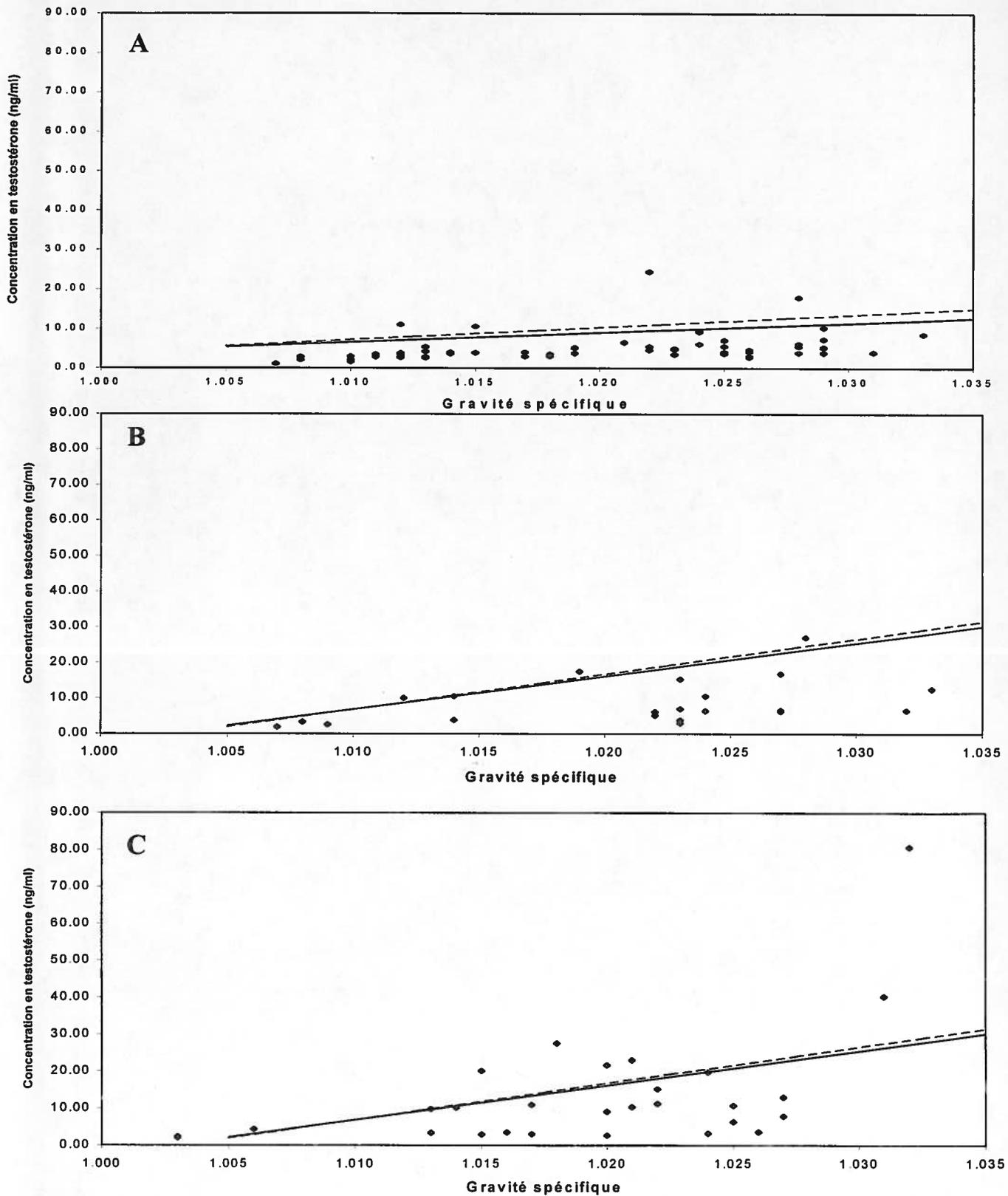


Figure 3.6: Distributions des concentrations urinaires en sulfate de testostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence (A), 25 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

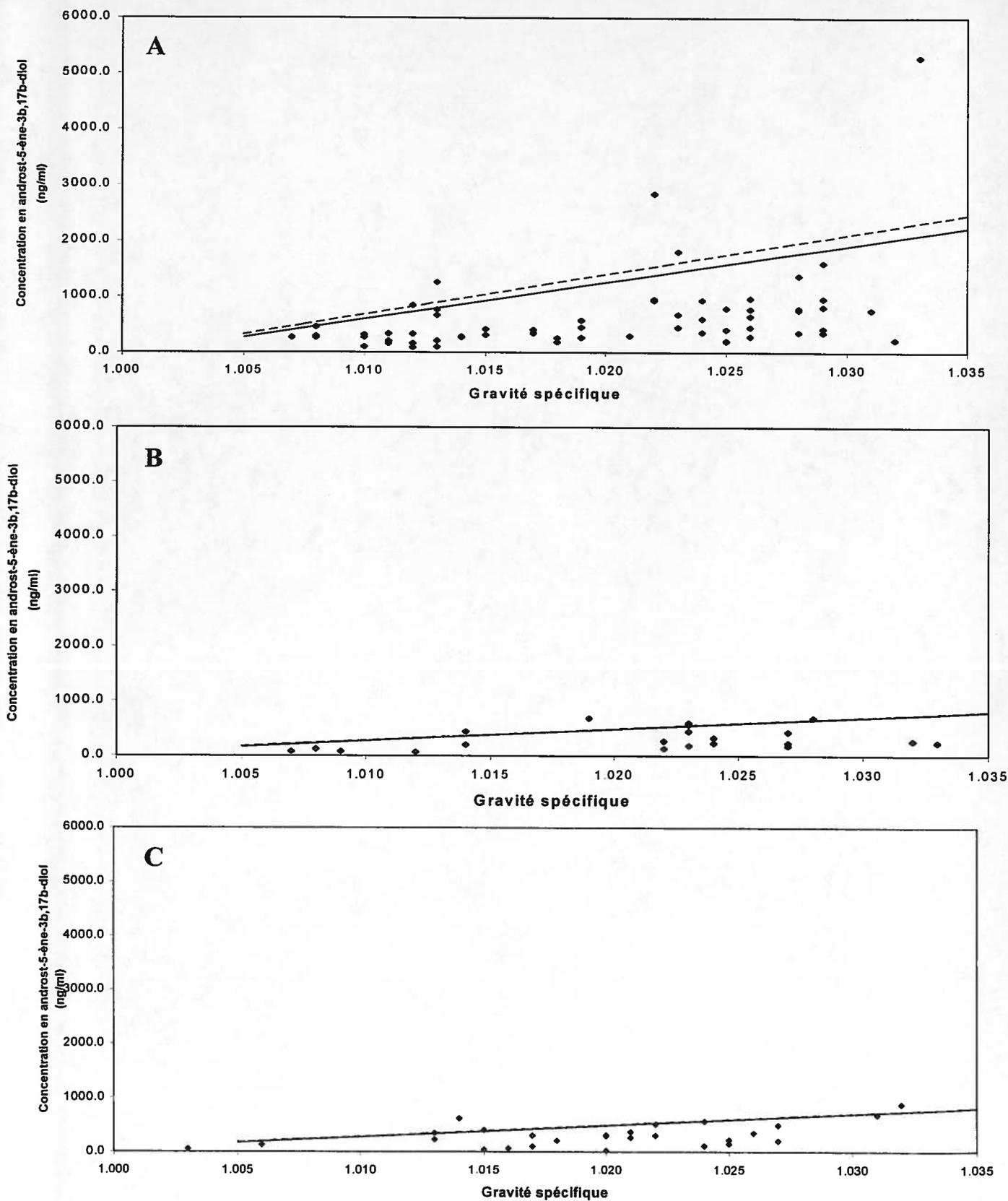


Figure 3.7: Distributions des concentrations urinaires en sulfate d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence (A), 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

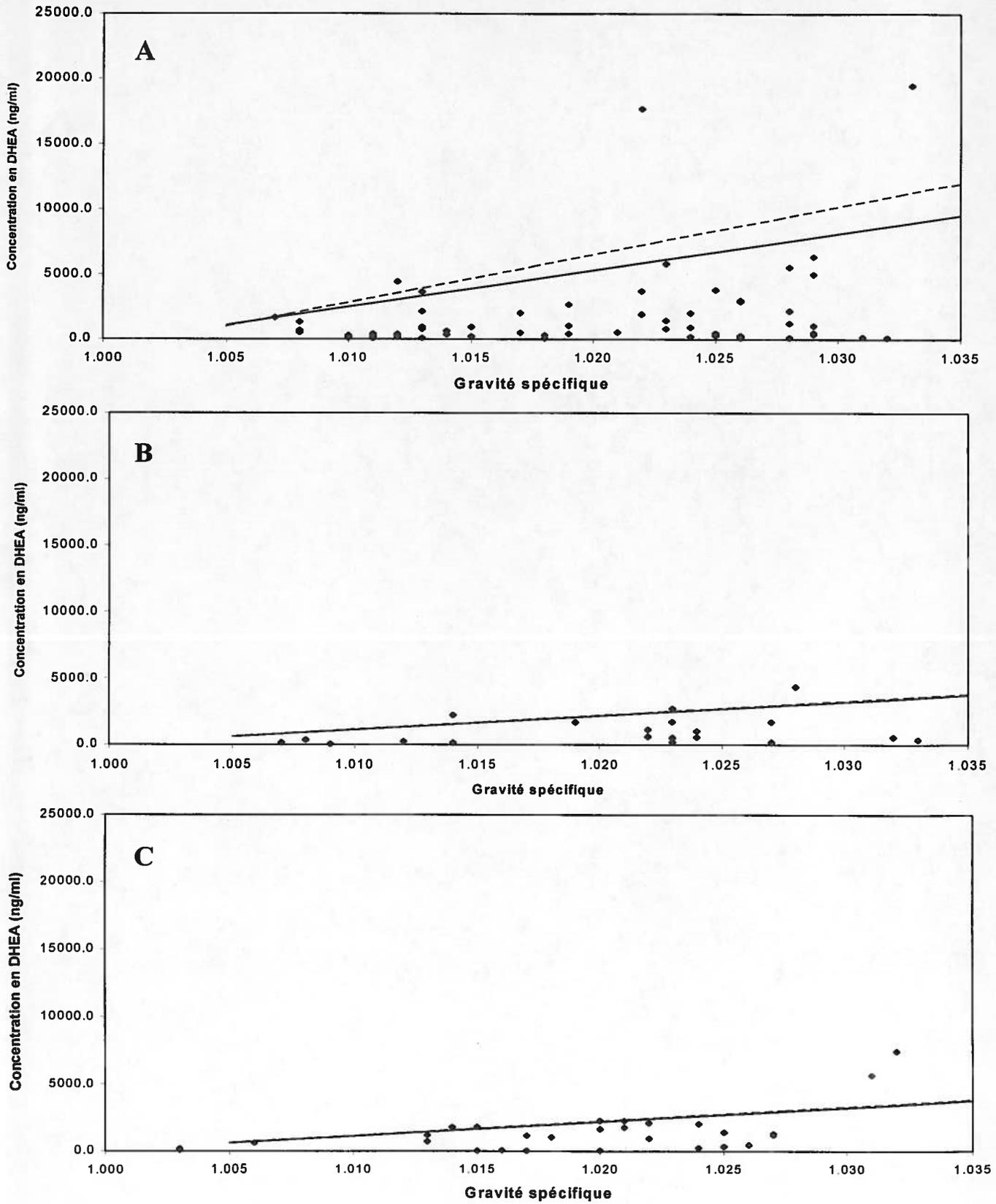


Figure 3.8: Distributions des concentrations urinaires en sulfate de déhydroépiandrostérone en fonction de la gravité spécifique des urines chez une population référence (A), 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

glucuroconjugués et de sulfoconjugués puis excrétés. Si cette voie de biosynthèse était touchée, à la fois les sulfates et les glucuronides d'androgènes seraient affectées.

La deuxième voie quant à elle impliquerait exclusivement des sulfates de stéroïdes ( , 1979). Ceux-ci doivent obligatoirement comporter un groupement alcool en C-3 $\beta$  afin qu'un sulfate puisse s'y lier. Le stéroïde initial serait le sulfate de cholestérol et la séquence biosynthétique mènerait à la formation des sulfates de pregnénolone, de 17 $\alpha$ -hydroxypregnénolone, de DHEA et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Comme nous avons pu l'observer plus tôt, ce diol peut être conjugué à un sulfate à la fois en C-3 $\beta$  et en C-17 $\beta$  (Setchell *et al*, 1976). Ainsi, la testostérone sulfoconjuguée pourrait être produite à partir du diol di-sulfaté suite à l'hydrolyse du sulfate en C-3 $\beta$ , à l'oxydation de l'alcool pour mener à la formation d'une fonction cétone et au transfert du lien double de C-5 en C-4 à l'aide d'une isomérase. L'administration de testostérone exogène entraînerait une hausse des niveaux de sulfate de testostérone ce qui conduirait à la suppression de l'axe sulfate de biosynthèse des androgènes et par le fait même à une baisse de la production en sulfates de DHEA et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Dans le cas des athlètes négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3, nous avons pu constater que les concentrations de testostérone sulfoconjuguée sont quatre fois plus importantes que la norme. Ceci pourrait également causer une suppression de l'axe sulfate de biosynthèse des androgènes. Il nous est toutefois impossible d'expliquer la présence de ces fortes concentrations en TS chez ce groupe d'individus.

Nous avons déterminé les pourcentages en sulfates d'androstérone, d'étiocolanolone, de testostérone et d'épitéstostérone des deux populations. Pour les trois premiers stéroïdes, les données sont similaires à celles obtenues plus tôt pour la population de référence. Dans le dernier cas, la suppression de la synthèse du glucuronide d'épitéstostérone entraînerait une hausse du pourcentage de sulfoconjugué. On retrouve ainsi 48% de ES chez les athlètes dont le TG/EG est supérieur à 3 et 58% chez les positifs. Pour ce qui est des rapports AG/EtG et AS/EtS, les données sont similaires à celles déjà obtenues chez la population de référence.

### 3.4.3. Application des sondes secondaires impliquant des stéroïdes sulfoconjugués.

Nous avons voulu vérifier l'hypothèse de Dehennin (Dehennin et Matsumoto, 1993) selon laquelle les cas de TG/EG physiologiquement élevés seraient dus à une excrétion soutenue en glucuronide de testostérone (TG) et en sulfate d'épitéstostérone (ES) jumelée à une faible excrétion en glucuronide d'épitéstostérone (EG). Quatre sondes ponctuelles qui aideraient à éliminer les faux-positifs reliés à des TG/EG élevés ont été proposées.

Nos résultats indiquent que le TG/EG moyen de la population référence est de 1,17 (écart-type de 0,85) et les données varient de 0,13 à 3,65. Dans le cas des positifs, la valeur moyenne est de 8,36, l'écart-type de 2,80 et les valeurs minimale et maximale sont de 6,10 et 20,70. Enfin pour les échantillons de TG/EG naturellement élevés, la moyenne est de 5,16, l'écart-type de 0,74 et les données vont de 3,88 à 6,35. Évidemment, les positifs ont tous un ratio au-dessus de la valeur limite de 6 alors que les TG/EG élevés en sont tous près. Tous les cas limites ont été suivis à l'aide d'études longitudinales et quoique nous ne puissions écarter dans tous les cas la prise de testostérone, les TG/EG individuels sont stables en contrôles inopinés.

Puisque les faibles concentrations de EG semblent responsables de la hausse naturelle du rapport TG/EG chez certains sujets, Dehennin a proposé que l'on considère la concentration totale en épitéstostérone (Dehennin et Matsumoto, 1993). Le rapport proposé est donc le suivant:

$$\frac{TG}{(EG + ES)}$$

Nous avons déterminé ce rapport pour les trois populations. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11 et à la figure 3.9.

La valeur limite est déterminée en ajoutant 4,5 fois l'écart-type à la valeur moyenne obtenue pour la population de référence. Dans notre étude, cette valeur est de 3,15 alors que pour Dehennin elle est de 3,00 (Dehennin, 1994). Dans le cas des positifs, seulement 9 des 29 sujets présentent un rapport supérieur à 3,15 alors que 11 franchissent la limite de 3,00. Ces résultats indiquent que de 18 à 20 faux-négatifs auraient été déclarés ainsi.

Tableau 11

**Étude des rapports urinaires chez une population de référence (n=63), un groupe d'athlètes dont les TG/EG sont naturellement élevés (n=25) et un groupe de positifs (n=29).**

Populations	Valeurs statistiques	TG/EG	TG/(EG+ES)	EG/ES	TS/ES	TG/5Δ3β17αG
Population référence	Moyenne	1,17	0,82	4,17	0,37	0,37
	Écart-type	0,85	0,44	5,94	0,28	0,28
	Valeur minimale	0,13	0,09	0,61	0,15	0,04
	Valeur maximale	3,65	2,08	42,4	1,61	1,85
TG/EG naturellement élevé	Moyenne	5,16	2,50	1,09	0,74	0,70
	Écart-type	0,74	0,46	0,40	0,44	0,30
	Valeur minimale	3,88	1,77	0,55	0,18	0,20
	Valeur maximale	6,35	3,46	1,97	1,69	1,29
Positifs dont le TG/EG>6	Moyenne	8,36	3,64	0,94	0,96	1,29
	Écart-type	2,80	1,42	0,53	0,77	0,79
	Valeur minimale	6,1	2,18	0,41	0,15	0,06
	Valeur maximale	20,7	7,35	2,69	3,29	4,26

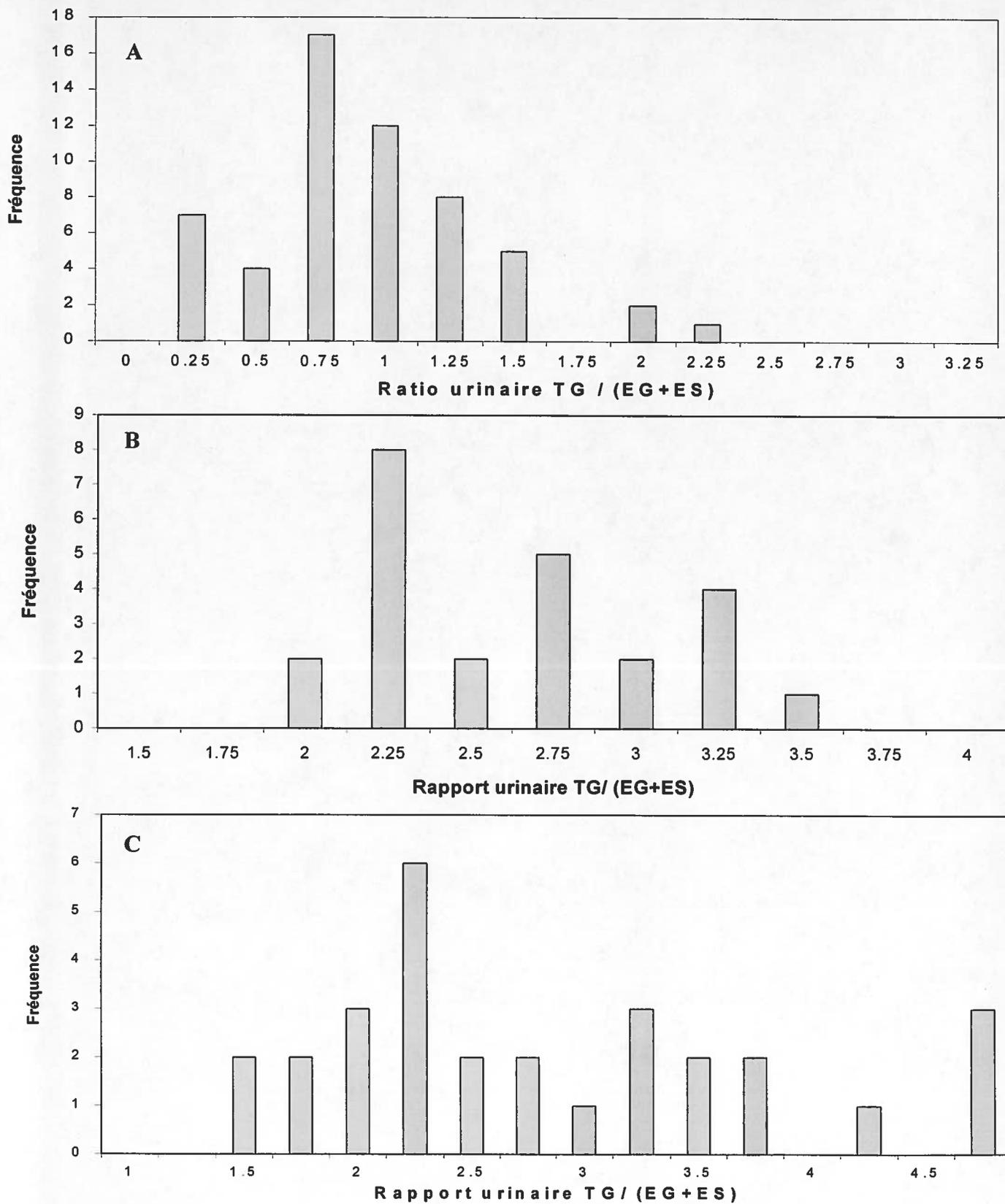


Figure 3.9: Distributions du rapport urinaire TG/(EG+ES) chez une population référence (A), 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

Pour ce qui est des TG/EG naturellement élevés, 1 (avec une limite de 3,15) ou 5 (avec une limite de 3,00) des 24 cas résulteraient en de faux-positifs si le rapport  $\frac{TG}{(EG + ES)}$  était utilisé comme sonde. La majorité des sujets de ces deux populations sont donc déclarés négatifs alors que seuls les cas évidents d'usage de testostérone peuvent être identifiés. Bien qu'en théorie ce rapport semble intéressant, en pratique il n'est d'aucune utilité puisqu'il rend impossible la discrimination entre les positifs et les TG/EG élevés et qu'il n'apporte rien au rapport TG/EG et à son suivi.

Par ailleurs, les individus ayant des TG/EG normalement élevés auraient un rapport EG/ES de quatre fois inférieur à celui de la population de référence ce qui indiquerait une excrétion prédominante de la forme sulfoconjuguée de l'épitéstostérone (Dehennin, 1994). Les résultats que nous avons obtenus sont similaires. En effet, la moyenne du EG/ES est abaissée de 4,17 chez la population de référence à 1,09 chez les TG/EG élevés tandis que pour les positifs, la valeur moyenne est de 0,94. Nous pouvons constater que plus le TG/EG est élevé, plus le EG/ES est faible. Par contre, ce rapport ne permet pas de différencier entre les positifs et les TG/EG élevés puisqu'aucune valeur limite ne peut être fixée et que les valeurs sont semblables (voir figure 3.10).

Le rapport TS/ES constitue la troisième sonde proposée et sa valeur limite a été fixée à 2,00 (Dehennin, 1994; Dehennin et Pérès, 1996). Nous avons établi de nos travaux, une valeur moyenne de 0,37 pour la population de référence, alors que pour les deux autres groupes, les TS/ES moyens sont près de deux à trois fois plus élevés. Cette hausse est principalement attribuable à la forte excrétion en TS chez les positifs et les TG/EG élevés. Chez les positifs, seuls trois sujets ont des rapports supérieurs à 2,00 alors que chez les TG/EG naturellement élevés, il n'y en a aucun (voir figure 3.11).

L'administration d'épitéstostérone pourrait évidemment masquer la prise de testostérone en abaissant le TG/EG. Le C.I.O. a adopté une concentration limite urinaire de 200 ng/mL d'épitéstostérone et quelques cas positifs ont été rapportés depuis. Dehennin propose l'utilisation du rapport TG/5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ G comme sonde diagnostique de l'administration d'épitéstostérone.

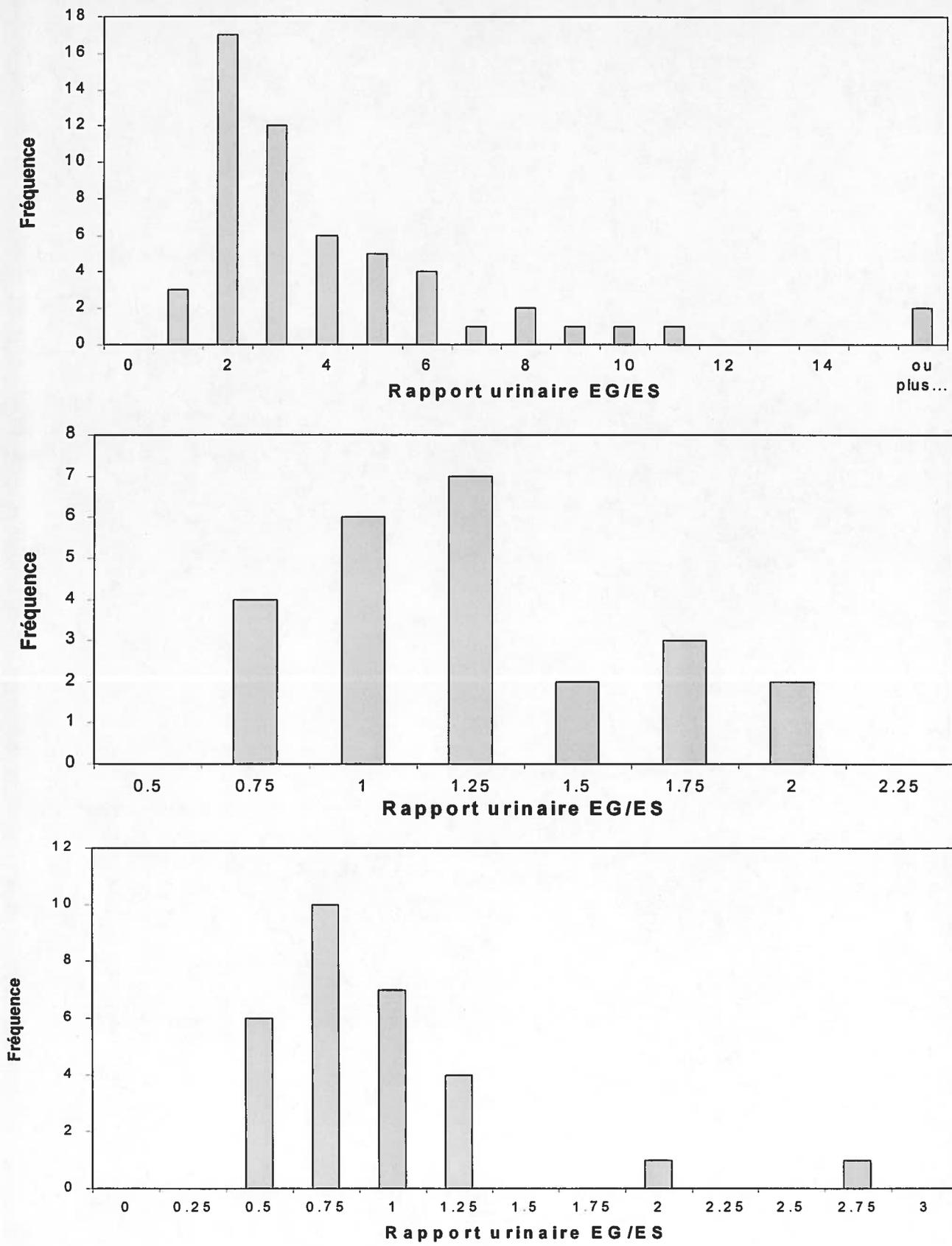


Figure 3.10: Distributions du rapport urinaire EG/ES chez une population référence (A), 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes trouvés positifs à l'utilisation de testostérone (C).

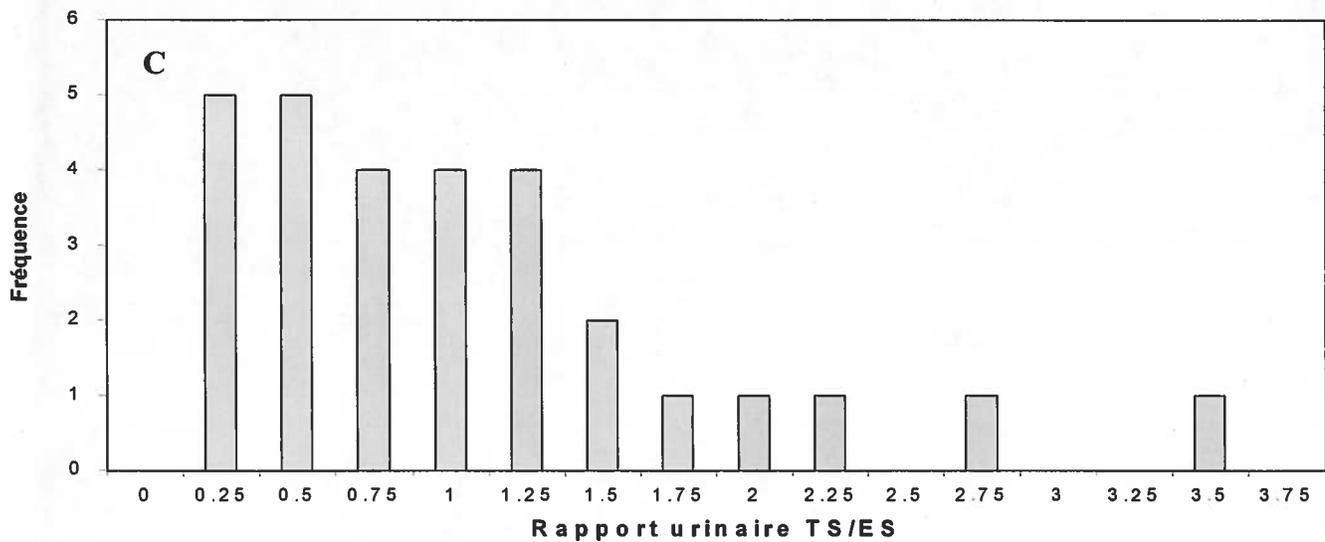
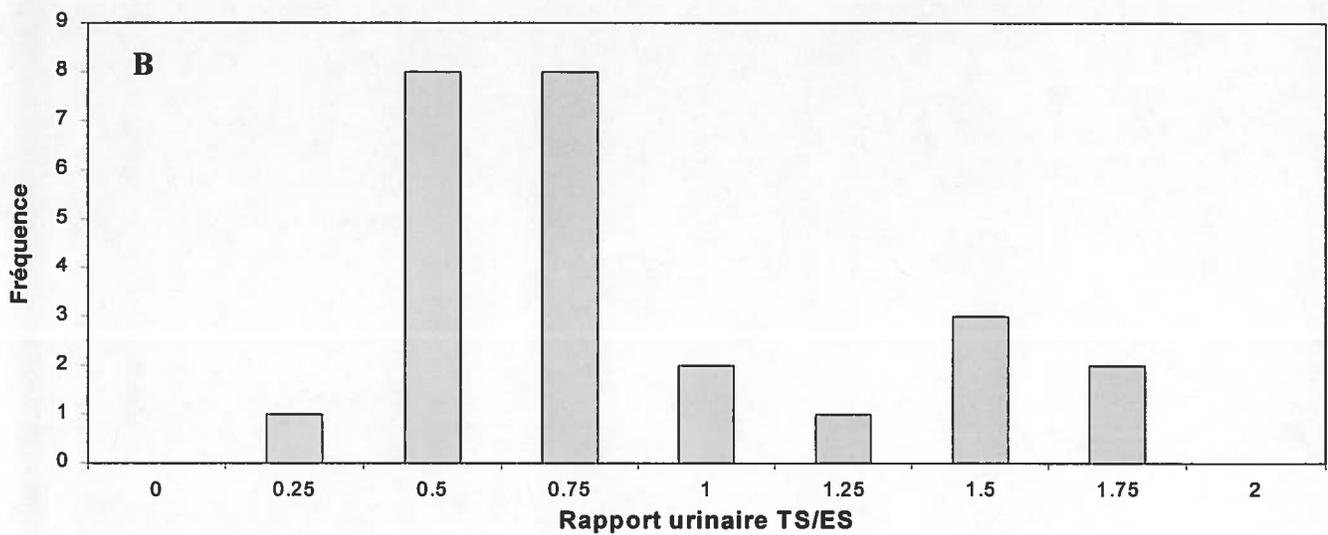
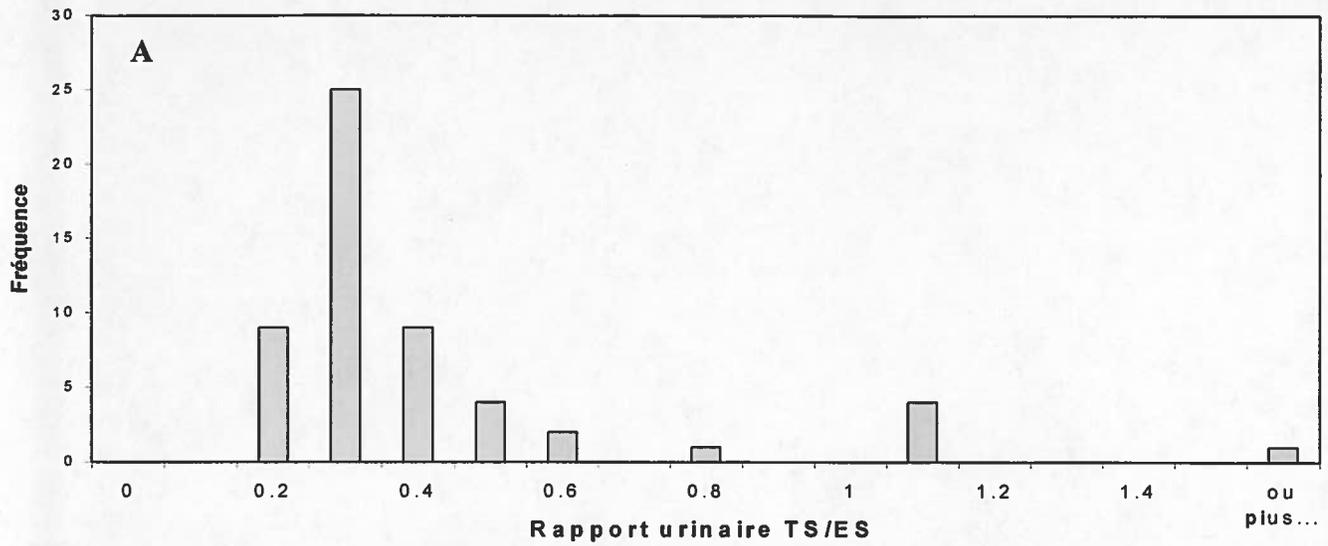


Figure 3.11: Distributions du rapport urinaire TS/ES chez une population référence (A), 25 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes positifs à l'utilisation de testostérone (C).

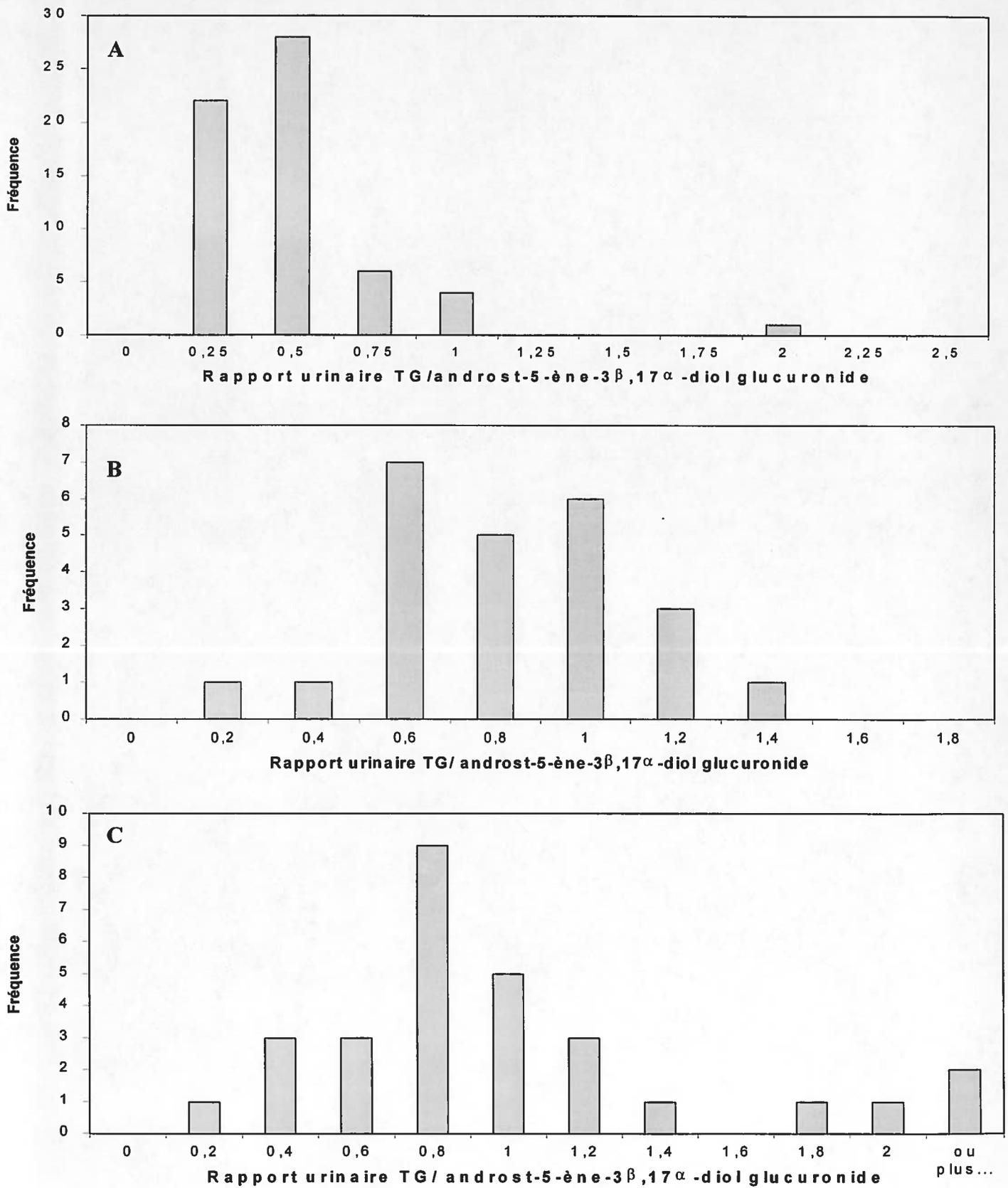


Figure 3.12: Distributions du rapport TG/androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol glucuronide chez une population référence (A), 24 hommes trouvés négatifs dont le TG/EG est supérieur à 3 (B) et 29 hommes positifs à l'utilisation de testostérone (C).

L'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol (5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ ) semble être le précurseur de l'épitestostérone. Sécrété par les testicules, son excrétion sous forme de glucuronide serait significativement diminuée suite à l'utilisation à long terme de testostérone (Dehennin, 1994). Ce ratio pourrait s'avérer un bon marqueur de l'administration de testostérone et ce, en présence ou non d'épitestostérone exogène (Dehennin et Pérès, 1996). La valeur limite proposée du rapport TG/5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ G serait de 2,5. Nos résultats indiquent une valeur moyenne de 0,37 pour la population de référence alors que pour les positifs, cette valeur est de 1,25. Dans le cas des TG/EG naturellement élevés, la moyenne est de 0,70. Cette sonde ne présente donc aucun potentiel discriminatoire puisque seulement un des 29 positifs possède un ratio supérieur au seuil de 2,5 (voir figure 3.12). De plus, l'administration de DHEA pouvant mener à une hausse des concentrations urinaires en conjugués d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol entraînerait par le fait même une baisse du rapport.

#### 3.4.4. Conclusion

Nous avons étudié le profil stéroïdien d'une population de référence formée de 63 urines d'athlètes sélectionnées au hasard. Nous avons constaté que moins de 3% des stéroïdes sont sous la forme libre en milieu urinaire, la majorité étant excrétée sous la forme de conjugués ce qui est en accord avec la littérature. Le type de conjugaison semble déterminé par la structure de l'androgène. Ainsi, les stéroïdes tels la DHEA, l'épiandrostérone, l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol ayant un groupement alcool en C-3 $\beta$  semblent principalement liés à des sulfates. Les glucuroconjugués sont favorisés dans le cas des stéroïdes dont la fonction hydroxyle est en C-3 $\alpha$ , en C-17 $\alpha$  ou en C-17 $\beta$ . Nous avons également étudié une population de 29 échantillons positifs à la testostérone ainsi que 25 échantillons présentant des rapports TG/EG physiologiquement élevés. Les concentrations de sulfate de testostérone de ces deux populations sont plus élevées que chez la population de référence. Il semble que ces niveaux élevés en TS entraînent une suppression de l'axe sulfate de biosynthèse des androgènes, ce qui expliquerait la baisse des concentrations des sulfates de DHEA et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol chez ces deux populations. Des baisses en épitestostérone glucuroconjuguée pour ces deux mêmes groupes ont également été observées. Dans le cas des positifs, cette diminution serait due à la suppression de

l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire consécutif à l'administration de testostérone. Quant aux individus dont les TG/EG sont physiologiquement élevés, nos résultats semblent confirmer l'hypothèse de Dehennin selon laquelle cette baisse serait attribuable à une modification du métabolisme hépatique au profit de métabolites autres que l'épitéstostérone glucuroconjugée (Dehennin et Matsumoto, 1993). Cette baisse entraînerait une hausse du rapport TG/EG.

Quant au potentiel discriminatoire des rapports TG/(EG+ES), EG/ES, TS/ES et TG/5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ G, malheureusement, aucun de ceux-ci ne permet de distinguer clairement les positifs des individus ayant un TG/EG physiologiquement élevé.

L'utilisation de testostérone et de ses précurseurs ainsi que d'agents masquants tels l'épitéstostérone rend difficile l'interprétation de rapports TG/EG ponctuels. Ainsi, des athlètes dont les rapports sont physiologiquement élevés risqueraient d'être faussement déclarés positifs alors que d'autres ayant des TG/EG naturellement bas pourraient utiliser de la testostérone sans jamais franchir la limite de 6. C'est entre autres le cas des Orientaux qui ont généralement de faibles niveaux urinaires de glucuronide de testostérone comparativement aux Caucasiens alors que les concentrations urinaires de glucuronide d'épitéstostérone sont dans la norme (de la Torre *et al*, 1997). Puisque l'utilisation de ces sondes secondaires est inutile et que le rapport TG/EG est définitivement le paramètre urinaire le plus déterminant de l'administration de testostérone, l'étude des variations de ce rapport dans le temps s'avère être encore la meilleure approche. Bien qu'elle soit statistiquement fondée, il a été démontré que la limite de 6 fixée pour le rapport TG/EG est trop élevée et l'abaissement de cette valeur limite ainsi qu'une collecte plus fréquente d'échantillons urinaires permettraient de minimiser les risques de résultats erronés.

### **3.5. Étude des effets de la déhydroépiandrostérone sur le profil stéroïdien et la production de métabolites sulfoconjugués.**

La détection d'agents anabolisants synthétiques et de la testostérone (à l'aide du TG/EG) étant de plus en plus efficace, certains athlètes se tournèrent notamment vers ses deux principaux précurseurs naturels: la déhydroépiandrostérone et l'androstènedione. À ce jour, un seul groupe s'est penché sur l'utilisation de la DHEA comme agent dopant (Dehennin *et al*, 1998) et aucune explication claire n'a été avancée afin d'expliquer précisément les effets de ce stéroïde sur le profil stéroïdien et d'identifier de bons indicateurs de son utilisation. Dans le cadre de nos recherches, nous avons identifié les métabolites sulfo- et glucuroconjugués de la DHEA ainsi que les effets produits sur le profil stéroïdien.

Dans un premier temps, une approche quantitative a été utilisée afin d'étudier les effets de ce précurseur sur le profil des stéroïdes sulfoconjugués et glucuroconjugués déjà mesurés. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'identification des métabolites urinaires qui pourraient ultimement servir de marqueurs de l'utilisation de DHEA. La DHEA est considérée comme un « supplément naturel » et est disponible aux États-Unis. Les doses suggérées sur internet vont de 50 à 400 mg par jour. Suite à l'administration orale de deux doses de 200 mg de DHEA à 0 et 24 heures par un volontaire (blanc caucasien sain fumeur), 18 urines ont été recueillies de 0 à 102 heures suivant la dose initiale. C'est afin de vérifier si un lien métabolique peut être établi entre deux doses successives que nous avons utilisé un tel protocole. La procédure de solvolysé mise au point plus tôt ainsi que l'hydrolyse enzymatique ( $\beta$ -glucuronidase) ont été utilisées. Dans les échantillons où les concentrations urinaires dépassent les limites de quantification, 50  $\mu$ L et non pas 1 mL d'urine ont été prélevés. Des contrôles de quantification et d'hydrolyse ont été insérés dans chacune des séquences d'analyses afin de s'assurer de la qualité de l'extraction et de l'hydrolyse des stéroïdes.

### 3.5.1. Modification du profil stéroïdien par administration de DHEA

Nous avons évalué les profils d'excrétion urinaires et comparé les concentrations urinaires de l'étude de volontaire à celles obtenues chez la population de référence.

Dans un premier temps, dix stéroïdes ainsi que 3 rapports ont été mesurés dans chacune des deux fractions de conjugués. Puisque les gravités spécifiques varient d'une urine à l'autre, nous avons ajusté les concentrations urinaires à une gravité spécifique de 1,020 g/mL à l'aide du calcul suivant, tel que proposé par Donike et son équipe en 1992:

$$C_f = \frac{(1.020 - 0.998)}{(\rho_E - 0.998)} \cdot C_m$$

Où  $\rho_E$  correspond à la gravité spécifique de l'échantillon (g/mL),  $C_m$  à la concentration mesurée du stéroïde dans l'urine,  $C_f$  à la concentration finale ajustée et 0,998 à la gravité spécifique de l'eau (g/mL). Ceci nous permet de construire les profils d'excrétion de divers analytes sans avoir à nous soucier du débit urinaire ou de la dilution de l'urine. Il est à noter que lors de l'interprétation de ces profils d'excrétion, nous avons utilisé le temps total en heure suivant la première dose.

Le profil de variation du rapport TG/EG comporte deux pics reliés à chacune des doses administrées (voir figure 3.13). Le TG/EG initial de 0,26 est augmenté jusqu'à une valeur de 0,38 treize heures après la première dose, puis retourne à la normale après 29 heures. Le même phénomène se produit suite à la deuxième dose. Le maximum atteint est de 0,56 à 33,5 heures et le retour à la valeur initiale se fait à 52 heures. Quoique la DHEA soit un précurseur indirect de la testostérone, celle-ci n'est pas haussée suffisamment pour que le rapport TG/EG soit augmenté au-dessus de la limite de 6,0 aux doses administrées et de plus, la hausse du ratio TG/EG est trop faible pour être significative.

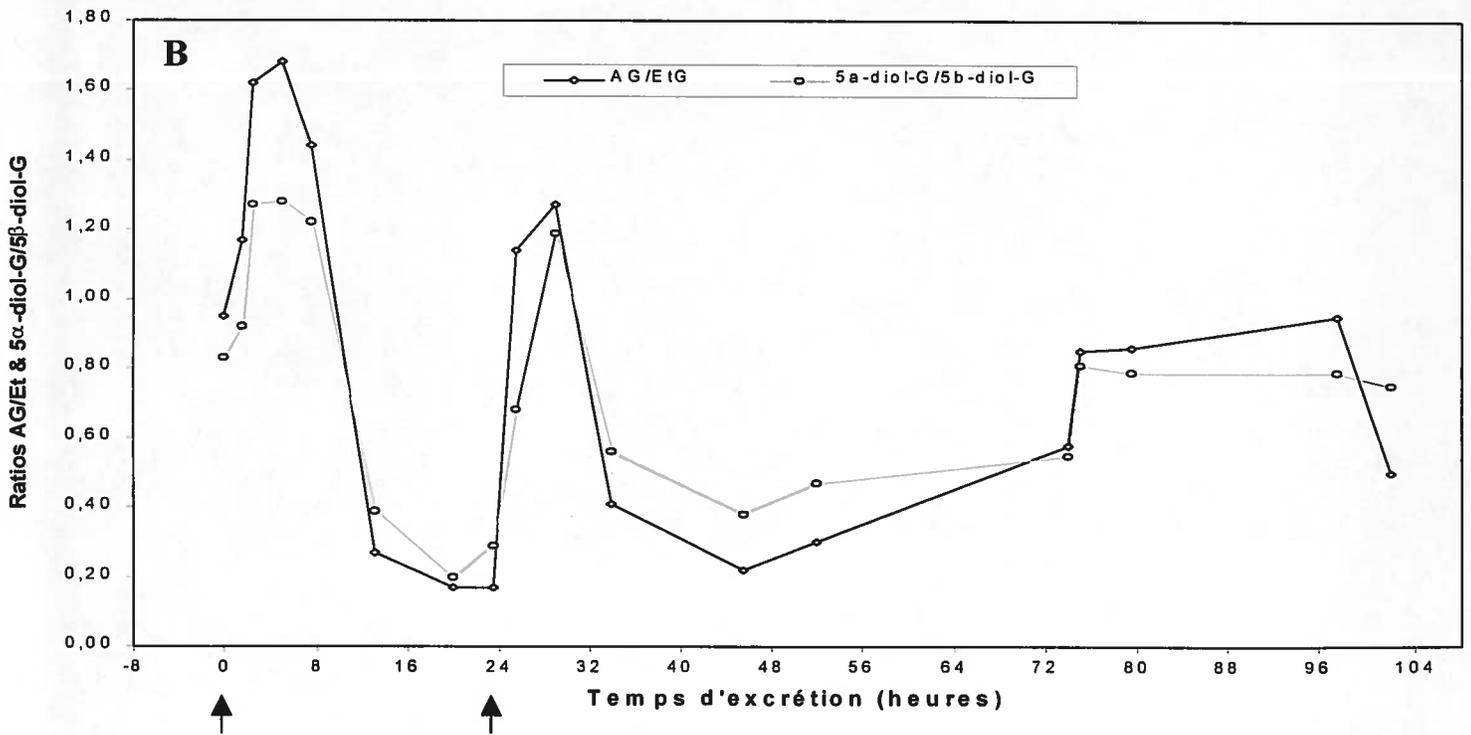
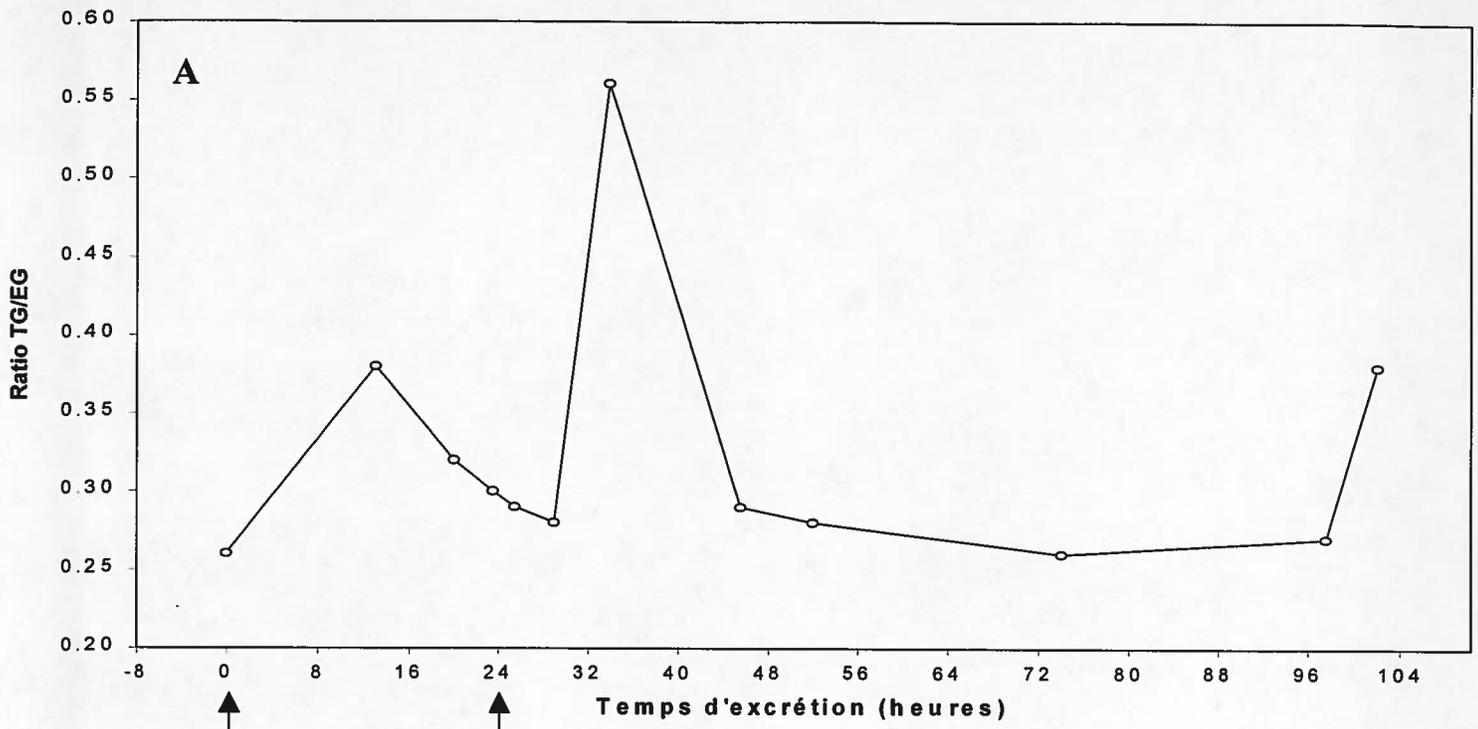


Figure 3.13: Profil d'excrétion urinaire des rapports TG/EG (A), AG/EtG et 5 $\alpha$ -diol-G/5 $\beta$ -diol-G (B) suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

La variation des concentrations urinaires de testostérone est non significative. Par ailleurs, la détermination de l'épitéstostérone urinaire est faussée par la présence de la  $5\alpha$ -androstane-3,17-dione glucuronide, métabolite de la DHEA. Certaines faibles concentrations en sulfoconjugués n'ont pu être mesurées adéquatement à cause d'un seuil de détection plus élevé.

Il est intéressant d'observer les variations du ratio AG/EtG (figure 3.13). La première hausse du rapport est suivie d'une baisse et d'un retour à la normale. Tout d'abord, le rapport passe de 0,95 à 1,68 dans les cinq heures suivant la première dose puis il baisse à 0,17 après 20 heures pour ensuite s'y maintenir pendant environ 40 heures après la deuxième dose. Cinquante heures après l'administration, le AG/EtG retourne à sa valeur initiale. Des profils identiques sont observés après chacune des doses mais puisque ces deux doses ont été administrées à 24 heures d'intervalle, il nous est impossible d'observer la troisième étape consécutive de la première dose. Dans le cas du ratio  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol glucuronide sur  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol glucuronide ( $5\alpha$ -diol-G/ $5\beta$ -diol-G), nous avons observé un profil d'excrétion identique et en parfait synchronisme avec à celui du AG/EtG: suite à la deuxième dose, le ratio hausse à 1,28 puis baisse à 0,20 pour ensuite revenir à 0,75 à 75 heures.

L'étude du profil d'excrétion urinaire de l'androstérone glucuroconjuguée nous permet de constater qu'un seul pic est présent suite à chacune des doses (voir figure 3.14). Les concentrations varient donc de 4009 ng/mL à 36265 ng/mL en l'espace de cinq heures pour ensuite revenir à la valeur initiale après environ 23 heures, ce qui se répète suite à la deuxième dose. Pour ce qui est du glucuronide d'étiocolanolone, on ne retrouve pas un mais bien deux pics après chacune des doses. Après la première dose, le premier maximum à 2,5 heures est de plus faible intensité que le second à 20 heures. La valeur initiale de 4100 ng/mL passe à 21687 ng/mL au premier pic alors que la valeur maximale du deuxième est de 47460 ng/mL. Les données obtenues suite à la deuxième dose sont similaires à celles présentées ci-haut sauf pour ce qui est du premier maximum. Sa hausse en intensité est causée par le cumul du deuxième maximum de la première dose au premier maximum de la deuxième dose. Le retour à des valeurs dites normales se fait 50 heures après la deuxième dose.

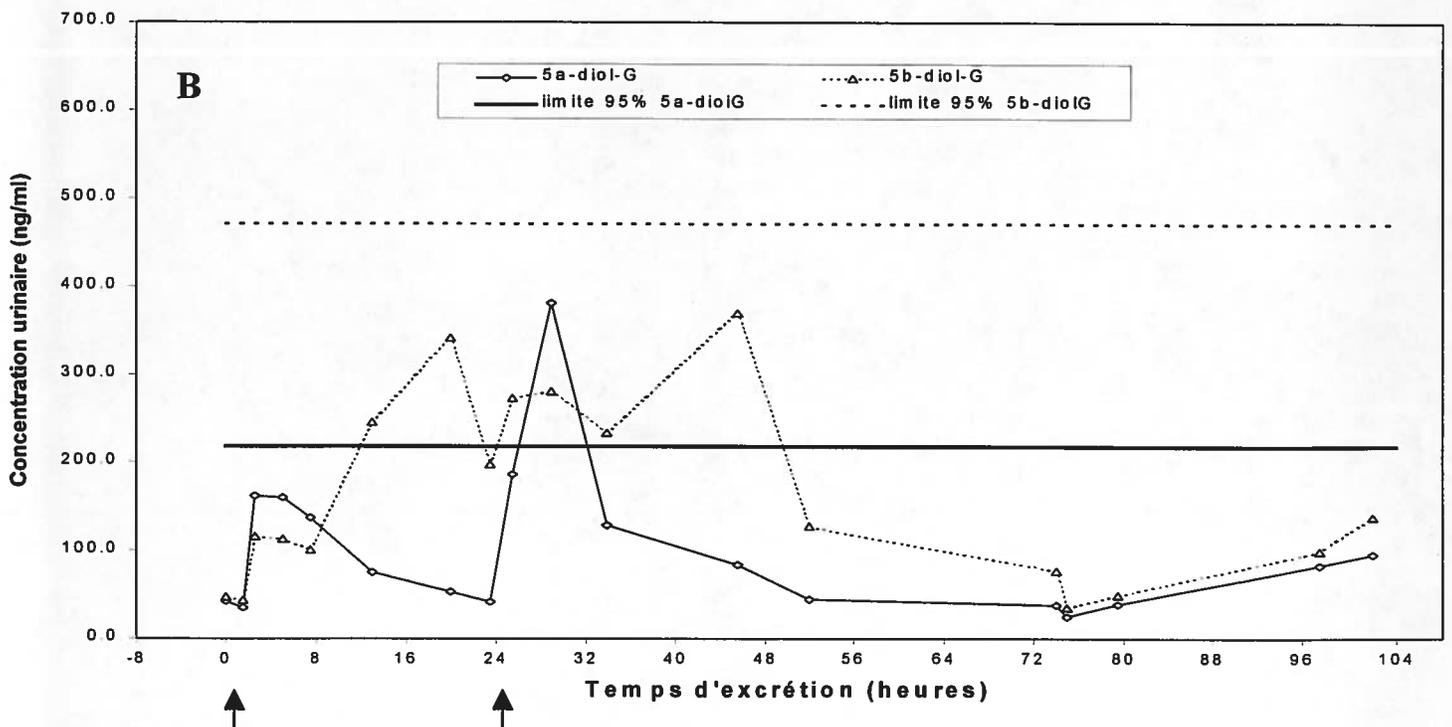
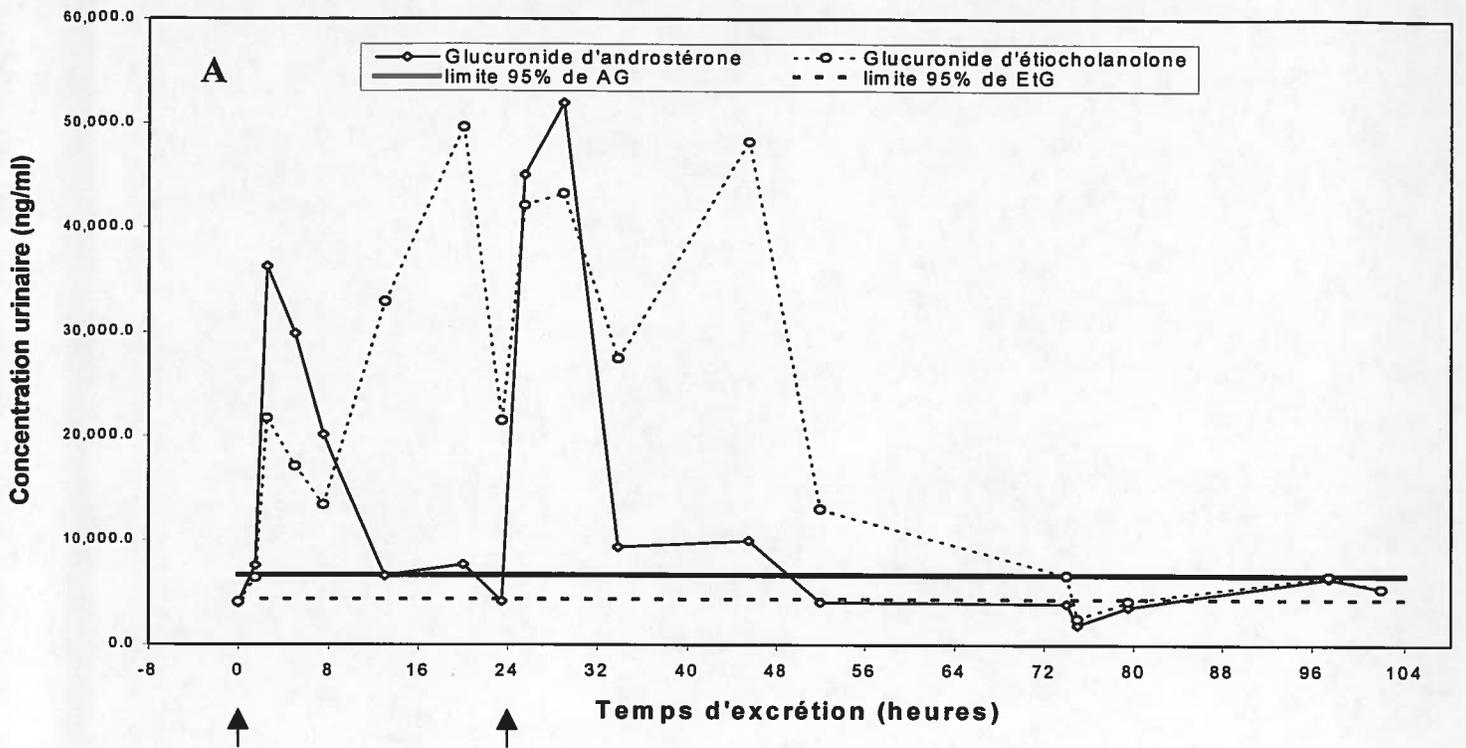


Figure 3.14: Profil d'excrétion urinaire des glucuronides d'androstérone et d'étiocolanolone (A) ainsi que de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (B) suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

Sur chacun des profils présentés aux figures suivantes, une droite représentant un seuil limite a été insérée. Cette valeur n'est présente qu'à titre indicatif et ne peut être considérée comme un outil diagnostique. Selon nos observations, 95% des urines du groupe de référence, à 1,020 g/mL de gravité spécifique, auraient une concentration urinaire inférieure à cette valeur limite. Dans le cas des glucuronides d'androstérone et d'étiocolanolone, ces valeurs limites de 95% sont respectivement de 6681 ng/mL et de 4387 ng/mL.

Les profils d'excrétion des  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol et de l'androstérone ainsi que du  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol et de l'étiocolanolone sont quasi identiques. Après la première dose, la concentration urinaire corrigée du  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol augmente jusqu'à 159 ng/mL puis retourne à la valeur initiale après 23,5 heures. Après la deuxième dose, la concentration maximale observée est de 381 ng/mL (29 heures) puis baisse à une concentration normale de 45 ng/mL à 52 heures. Pour le  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, on retrouve deux pics suite à chacune des doses et le premier de ces deux pics est toujours de moindre importance. Dans le temps, le synchronisme est parfait avec l'étiocolanolone glucuroconjugée et seules les concentrations urinaires diffèrent.

À la fois chez les glucuronides d'androstérone et d'étiocolanolone et chez les  $5\alpha$ - et  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol glucuroconjugés, les variations des concentrations expliquent l'allure en trois temps du profil d'excrétion de leur ratio respectif. Suite à la première dose, la hausse en  $5\alpha$ -androstane est plus importante que celle en  $5\beta$ -androstane ce qui entraîne une augmentation des deux rapports. Ensuite, les concentrations en  $5\alpha$ -androstane diminuent alors qu'un second pic de  $5\beta$ -androstane fait son apparition. Ceci mène à une baisse importante des ratios jusqu'à ce que les concentrations en  $5\beta$ -androstane reviennent à la normale. Nous traiterons de ces variations peu communes plus loin dans cette section.

Suite à chacune des deux doses, les concentrations urinaires en androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol glucuroconjugée haussent (voir figure 3.15). Le premier pic est à 20 heures (140 ng/mL), le second pic à 45,5 heures (136 ng/mL) et le retour à la normale se fait entre 52 et 74 heures. Il est à noter qu'il nous est impossible d'expliquer l'importante hausse à 97,5 heures.

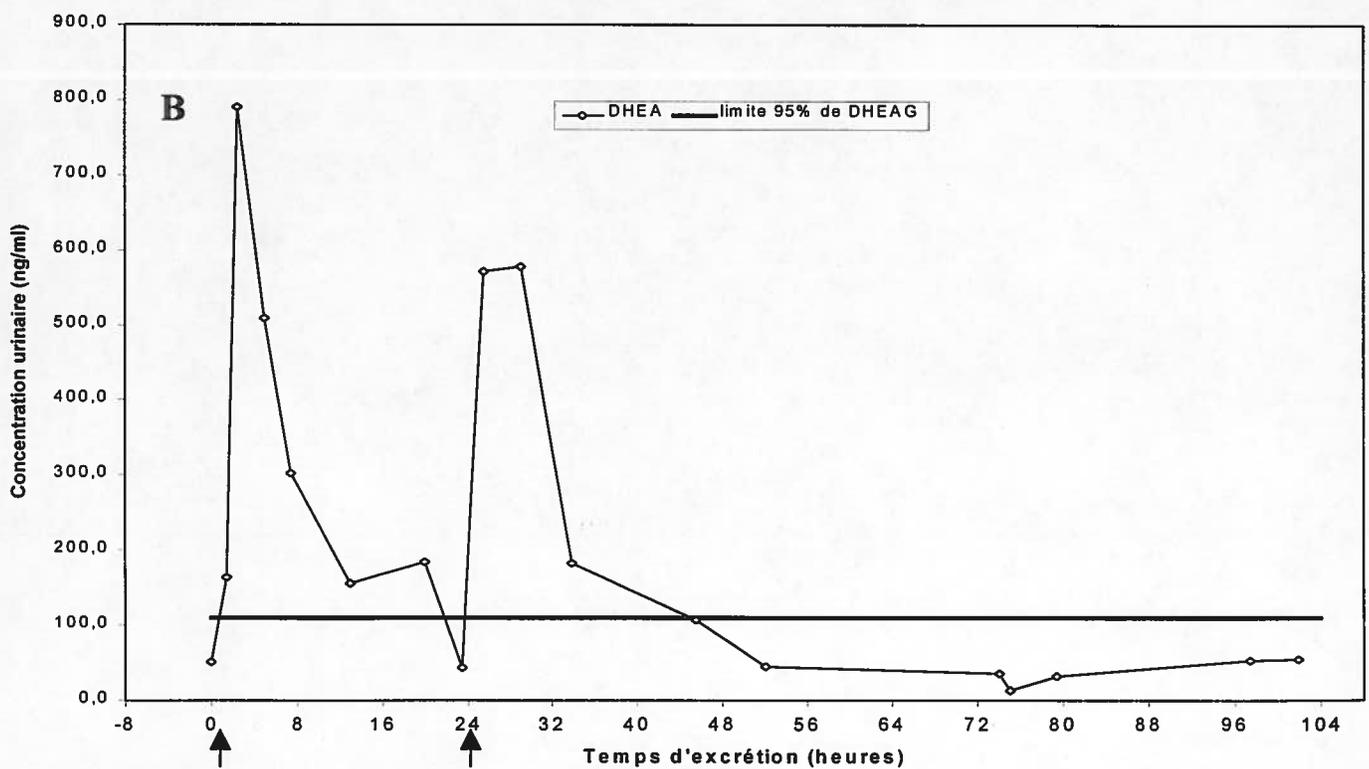
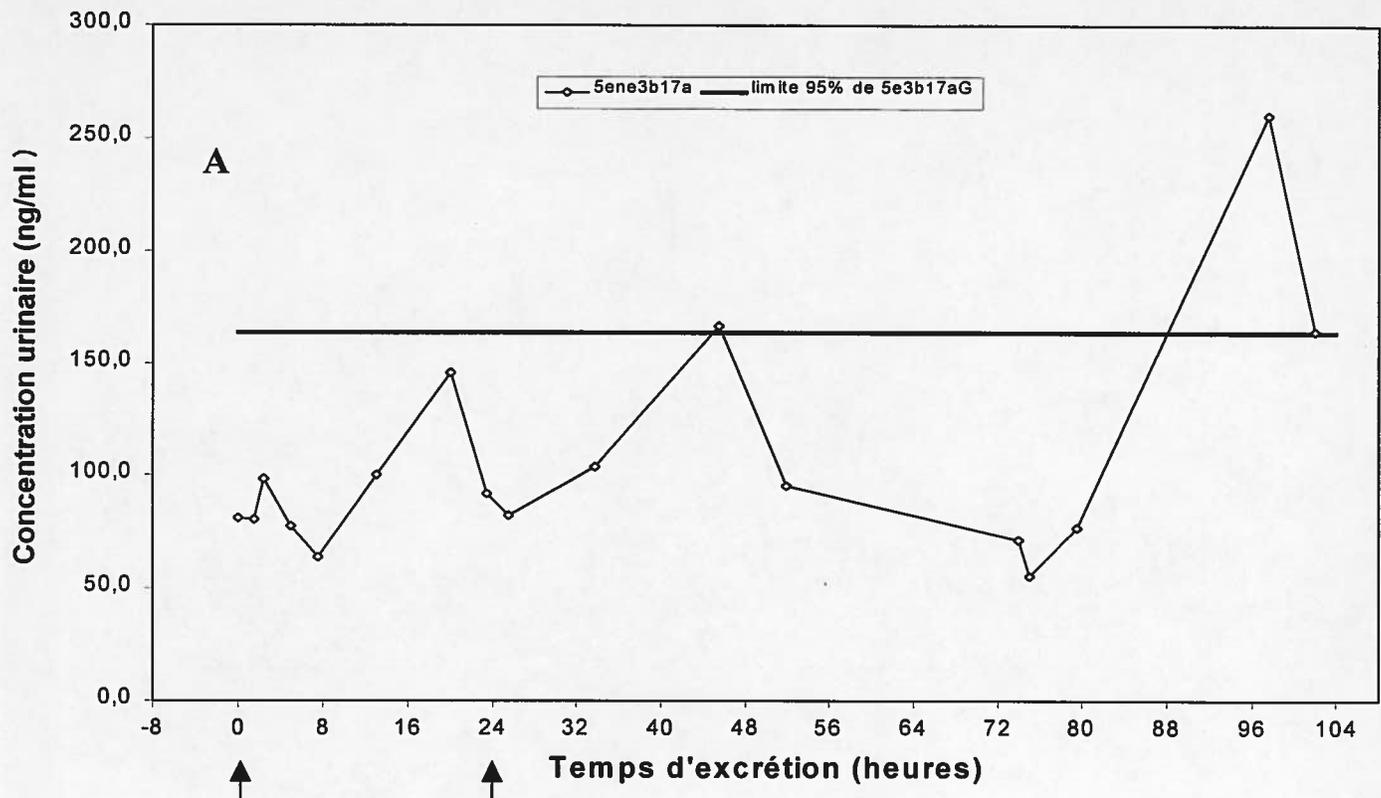


Figure 3.15: Profil d'excrétion urinaire des glucuronides d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol (A) et de déhydroépiandrostérone (B) suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

Tout comme pour l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, il n'y a qu'un seul pic de DHEA après chacune des doses. On note une importante hausse de la concentration urinaire jusqu'à 791 ng/mL après cinq heures puis une lente baisse jusqu'à la valeur initiale de 44 ng/mL 23,5 heures après la dose. Le même phénomène se produit suite à la deuxième dose.

La 5 $\alpha$ -androstanedione est formée et excrétée de 13 à 20 heures post-administration. L'identité de ce métabolite dont le spectre de masse du dérivé di-TMS est caractérisé par les ions à m/z 432 ( $M^+$ ), 290 et 275 est confirmée par comparaison avec le standard authentique. La dégradation bactérienne des stéroïdes urinaires mène également à l'accumulation de 5 $\alpha$ -androstanedione et de 5 $\beta$ -androstanedione sous la forme libre via la déconjugaison et l'oxydation de stéroïdes tels l'androstérone, l'étiocolanolone et l'épiandrostérone (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). La 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione est glucuroconjuguée lorsque formée suite à l'administration de DHEA et son profil d'excrétion est parfaitement synchronisé à celui des autres analytes. La formation d'un énol serait donc nécessaire afin de permettre à l'acide glucuronique de se lier à la fonction cétone de la 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione.

L'administration de DHEA entraîne une hausse importante des concentrations urinaires après 2,5 heures chez la majorité des analytes glucuroconjugués étudiés. Seules la testostérone et l'épitéstostérone ne suivent pas ce profil d'excrétion. Dans le cas des 5 $\beta$ -androstanes tels l'étiocolanolone et le 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, les profils d'excrétion comportent un second maximum à 20 heures ce qui entraîne une importante baisse des rapports AG/EtG et 5 $\alpha$ -diol-G/5 $\beta$ -diol-G.

Le rapport TS/ES ainsi que les concentrations en testostérone et en épitéstostérone sulfoconjuguées n'ont pu être mesurés, car les niveaux présents étaient sous la limite de détection de l'appareil utilisé pour cette étude. Le rapport A/Et dans la fraction sulfate est différent de celui de la fraction glucuronide (voir figure 3.16). Suite à la première dose, le ratio AS/EtS passe de 2,81 à 3,39 en l'espace de 1,5 heures pour ensuite diminuer jusqu'à 0,70 après 23,5 heures.

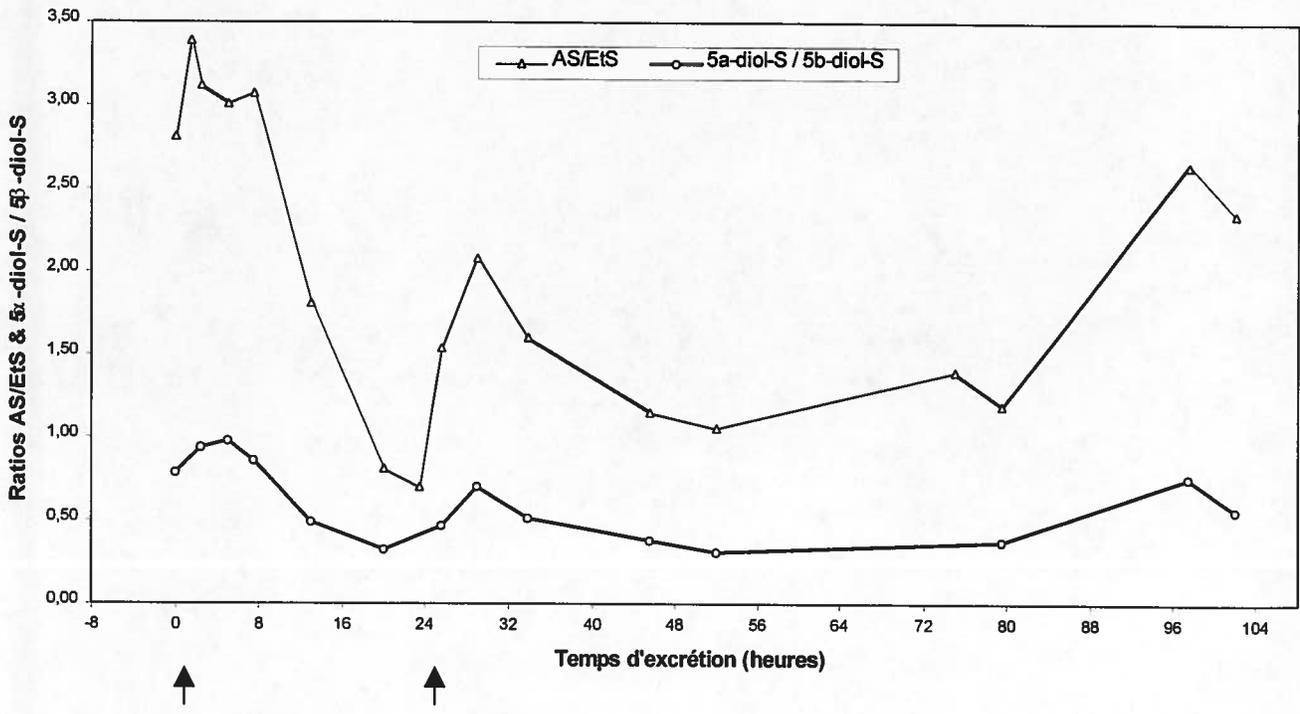


Figure 3.16: Profil d'excrétion urinaire des rapports AS/EtS et 5 $\alpha$ -diol-S/5 $\beta$ -diol-S suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

Encore une fois, le court laps de temps séparant les deux doses nous empêche d'étudier davantage ce profil d'excrétion. Ces mêmes variations sont observées dans le cas de la deuxième dose et il nous est maintenant possible d'évaluer à 73,5 heures le temps que prend le rapport pour revenir aux valeurs initiales. Le profil d'excrétion du rapport  $5\alpha$ -diol-S/ $5\beta$ -diol-S est identique à celui du ratio AS/EtS dans le temps et seules les valeurs des ratios diffèrent.

Les profils d'excrétion urinaire des sulfates d'androstérone et d'étiocolanone sont déphasés dans le temps (voir figure 3.17). Suite à la première dose, nous observons une hausse de la concentration en androstérone atteignant un maximum de 6964 ng/mL à 7,5 heures. Par la suite, les concentrations urinaires diminuent lentement jusqu'à la deuxième dose après laquelle le retour à des valeurs normales prend de 28 à 50 heures. Pour ce qui est de l'étiocolanone sulfoconjuguée, seul un pic évasé à 20 heures est présent suite à la première dose alors que pour la deuxième, le premier des deux pics semble dû au cumul des deux doses. La baisse du rapport semble donc résulter d'une lente hausse des concentrations en sulfates d'étiocolanone jumelée à une baisse en androstérone sulfoconjuguée.

Dans le cas des diols, les profils d'excrétion sont similaires à ceux des sulfates d'androstérone et d'étiocolanone. On observe la présence d'un premier maximum de  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol 7,5 heures suite à la première dose alors que les concentrations en  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol augmentent lentement pour atteindre une valeur maximale de 123 ng/mL à 20 heures. Le retour à la normale se fait 28 heures après la deuxième dose pour le  $5\alpha$ -diol et le  $5\beta$ -diol. Les variations des ratios AS/EtS et  $5\alpha$ -diolS/ $5\beta$ -diolS semblent donc provoquées par le déphasage entre les  $5\alpha$ -androstanes (hâtifs) et les  $5\beta$ -androstanes (tardifs).

Nous avons également étudié le profil d'excrétion de l'androst-5-ène- $3\beta,17\alpha$ -diol sulfoconjuguée ainsi que celui de son isomère, l'androst-5-ène- $3\beta,17\beta$ -diol (voir figure 3.18). Dans le premier cas, on observe une faible hausse suite à chacune des doses menant à des maximums de 855 et 1060 ng/mL après 20 heures. Le retour à la normale se fait 24 heures suite à la deuxième dose.

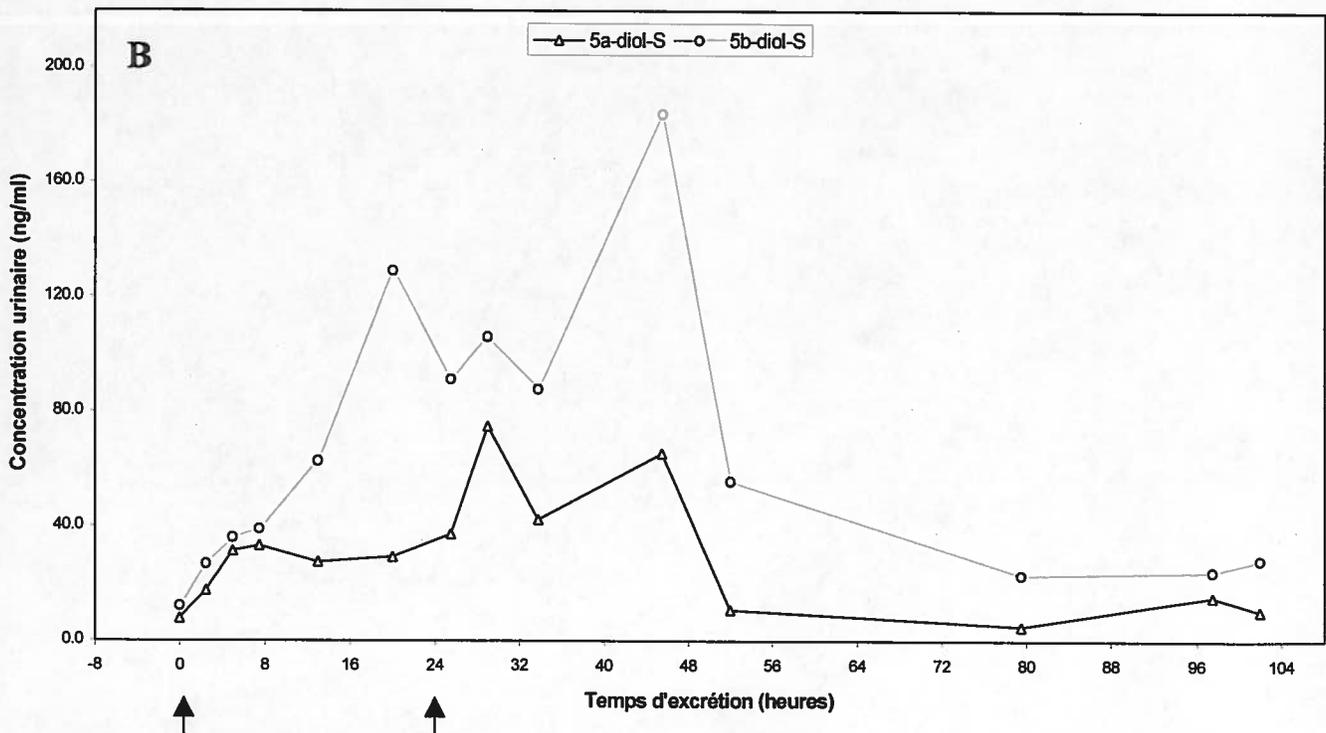
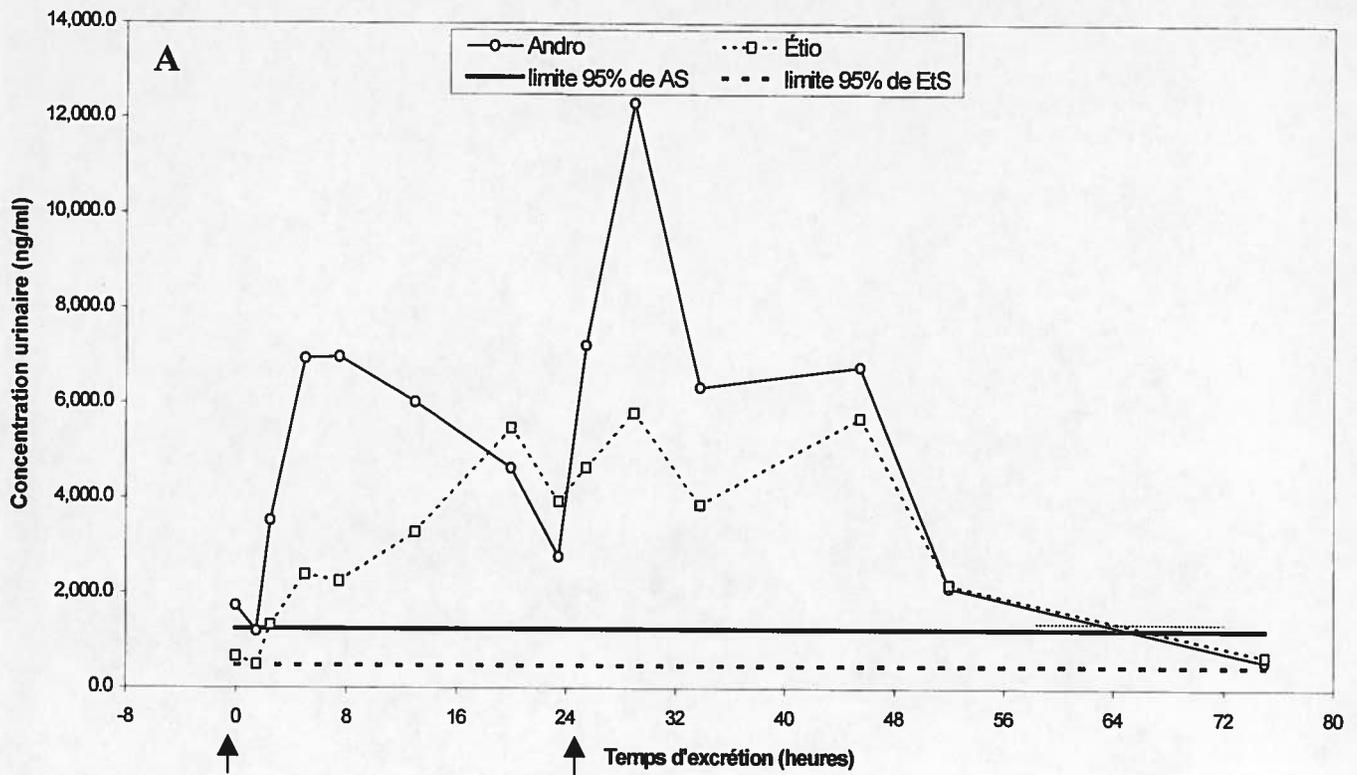


Figure 3.17: Profil d'excrétion urinaire des sulfates d'androstérone et d'étiocholanolone (A) ainsi que de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (B) suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

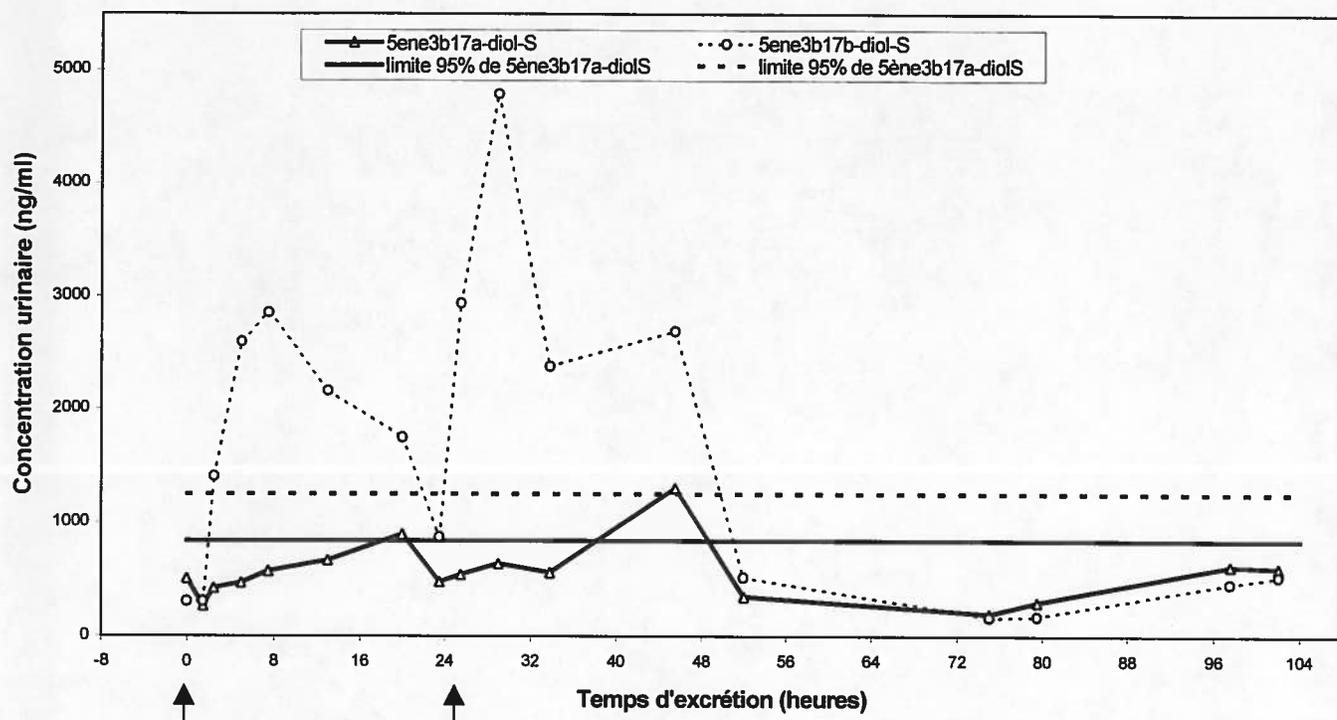


Figure 3.18: Profil d'excrétion urinaire des sulfates d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrosterone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

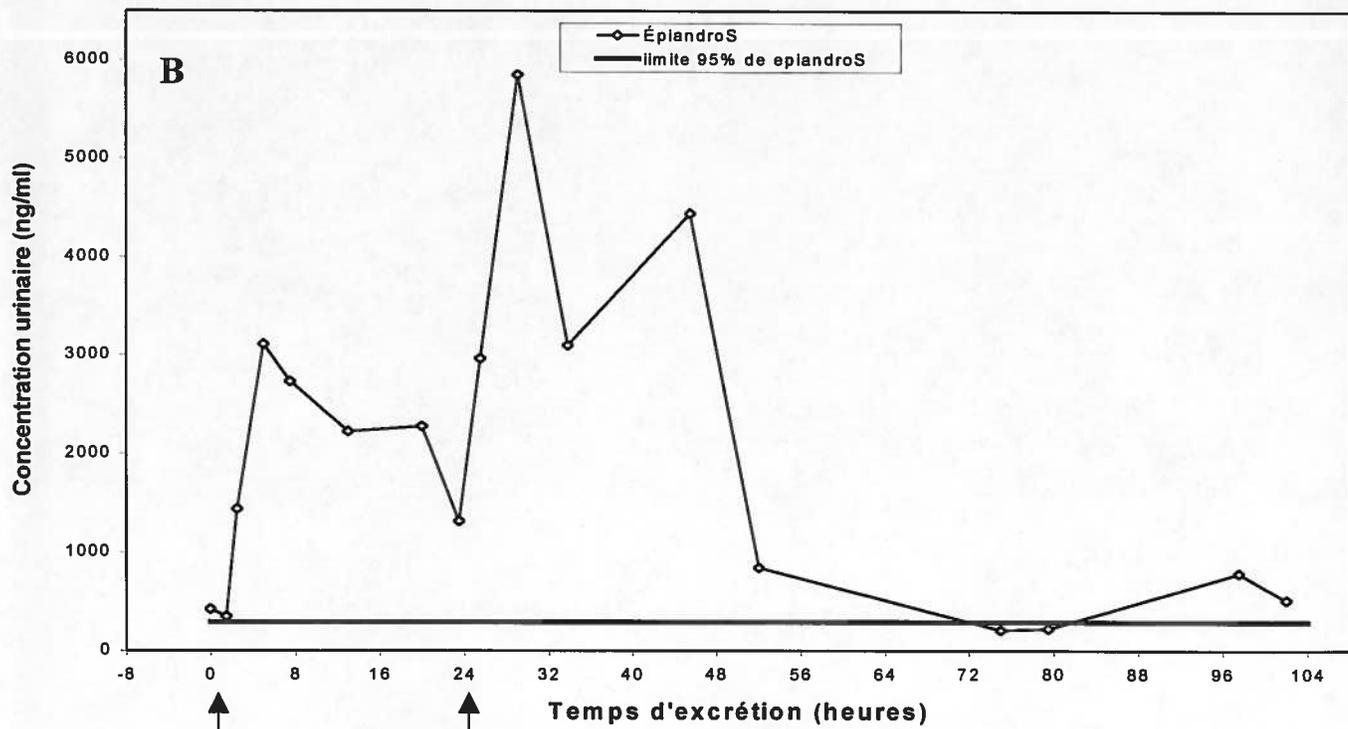
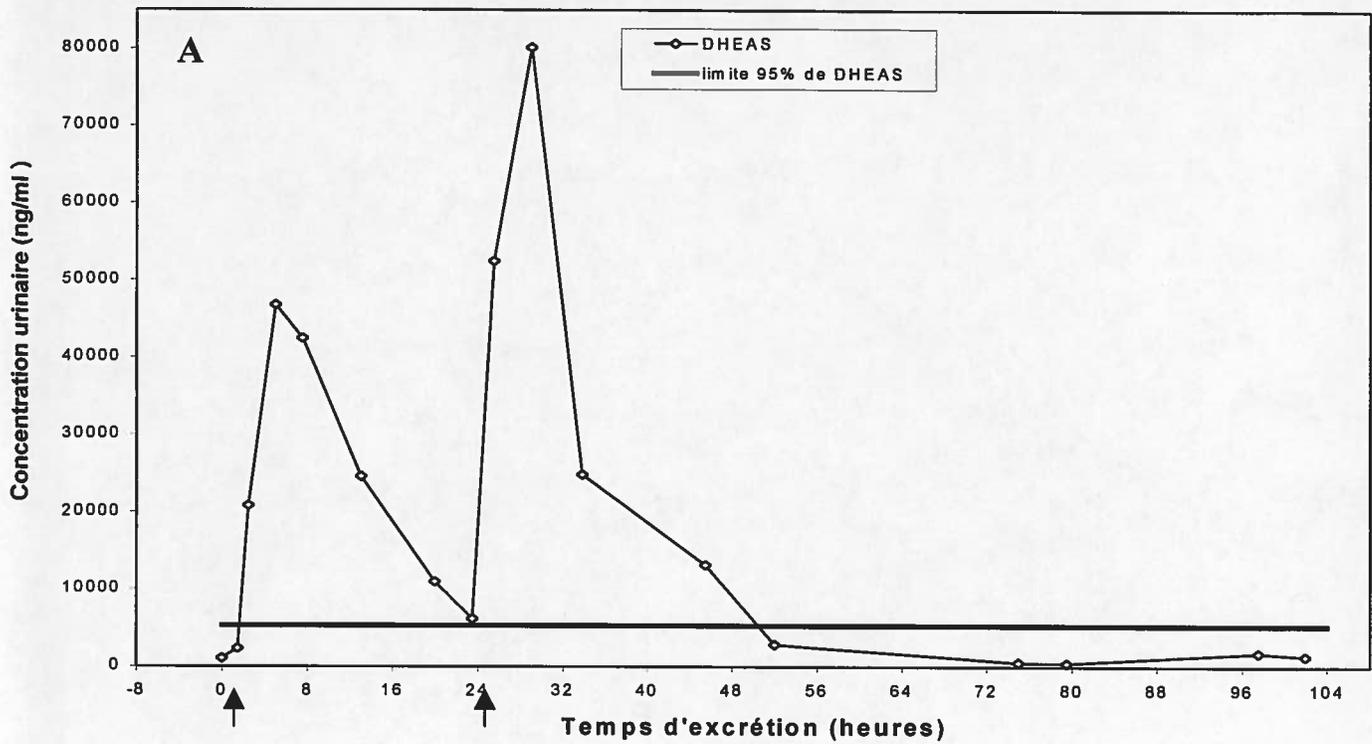


Figure 3.19: Profil d'excrétion urinaire des sulfates de déhydroépiandrostérone (A) et d'épiandrostérone (B) suivant l'administration orale de deux doses de 200 mg de déhydroépiandrostérone à des temps de 0 et 24 heures à un volontaire sain.

Pour ce qui est de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, les concentrations urinaires atteignent un maximum après seulement 7,5 heures puis retournent lentement aux valeurs initiales. Nous avons pu observer la présence d'un épaulement au deuxième maximum qui ne semble pas être dû au chevauchement des deux doses. Pour l'épiandrostérone, le profil d'excrétion est identique à celui de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (voir figure 3.19). On observe une hausse rapide des concentrations urinaires et la présence d'un épaulement. Dans le cas de la DHEA sulfoconjuguée, chacune des doses engendre un seul pic très intense. La concentration en DHEA hausse jusqu'à 80162 ng/mL cinq heures après la deuxième dose et le retour à la normale se fait environ 24 heures plus tard.

En résumé, des observations importantes concernant les effets de la DHEA sur le profil stéroïdien ont été obtenues. Tout d'abord, l'androstérone et le 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol sont excrétés tous deux après cinq heures en un seul pic et ce, à la fois dans les fractions glucuronide et sulfate. Par contre, les profils d'excrétion de l'étiocolanolone et du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol glucuroconjuguées comportent deux pics à des temps de 2,5 et 20 heures alors que dans la fraction sulfate, ce premier pic est absent et seul le second à 20 heures est présent. Dans tous les cas, les premiers pics proviendraient d'une même voie métabolique puisqu'ils sont tous synchronisés dans le temps. Il semble donc s'agir du métabolisme normal illustré à la figure 1.3 de l'introduction. Dans le cas du deuxième pic des 5 $\beta$ -androstanes, la voie métabolique impliquée est très spécifique puisque leurs isomères ne sont que peu ou pas affectés. Le seul élément structural qui différencie l'androstérone et le 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol de l'étiocolanolone et du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol est l'orientation de l'atome d'hydrogène en C-5. Sachant que la sélectivité des 5 $\alpha$  et 5 $\beta$ -réductases est faible lorsque le précurseur comporte une fonction cétone en C-17 (Schanzer, 1997), nous pouvons en déduire que l'androst-4-ène-3,17-dione ne semble pas impliquée dans cette deuxième voie métabolique. Par contre, la formation du 5 $\beta$ -androstane est favorisée dans des proportions de 83:17 comparativement au 5 $\alpha$ -androstane lorsque le précurseur possède une fonction alcool en C-17 (Schanzer, 1997) suggérant la présence d'une fonction hydroxyle en C-17 sur le précurseur. Fait à noter, les sulfates d'étiocolanolone, de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et d'épiandrostérone sont les seuls analytes pour lesquels nous avons observé soit un pic ou un épaulement dans le profil d'excrétion après 20 heures.



Ces produits pourraient donc être impliqués dans cette deuxième voie menant à la production d'un deuxième pic de 5 $\beta$ -androstanes. Le mécanisme proposé est présenté à la figure 3.20.

Comme mentionné plus tôt, une voie métabolique parallèle impliquant exclusivement des stéroïdes sulfoconjugués pourrait mener à la production d'androgènes. Suite à la prise de DHEA orale, un équilibre s'établirait entre les formes libres et sulfatées dans l'organisme. Dans le sang, on retrouve environ 200 fois plus de sulfate de DHEA que de DHEA libre (Sulcova *et al*, 1997). Comme hypothèse, nous posons que le sulfate de DHEA serait transformé en sulfate d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et ce, sans que le groupement sulfate en C-3 $\beta$  soit affecté (Gower, 1979). Il semble que le sulfate d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol puisse être le précurseur responsable de la sélectivité de la réaction enzymatique. Les 5 $\alpha$  et 5 $\beta$ -réductases entraîneraient la production de sulfates de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol en un rapport 13:87 à partir du sulfate d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Le 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol sulfoconjugué produit serait ensuite transformé en épiandrostérone sulfoconjuguée *via* la première voie. La faible production en sulfate de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol expliquerait la faible hausse du deuxième pic d'épiandrostérone sulfate lors de l'étude d'excrétion. Le sulfate de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol pourrait être hydrolysé vers sa forme libre et mener à la formation d'androstérone et de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (Jacolot *et al*, 1981). Mais à nouveau, la faible production en sulfate de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol expliquerait la faible ou l'absence même de hausse du deuxième pic d'excrétion des 5 $\alpha$ -androstanes. D'autre part, le sulfate de 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol formé serait hydrolysé à l'aide d'une sulfatase et le groupement hydroxyle en C-3 $\beta$  serait oxydé afin de générer de la 5 $\beta$ -dihydrotestostérone (5 $\beta$ -DHT) *via* la seconde voie, celle-ci menant à la formation de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et indirectement de l'étiocolanolone. Il semble que le laps de temps séparant les deux pics d'excrétions observés chez les 5 $\beta$ -androstanes serait attribuable à l'encombrement stérique que cause le groupement sulfate lors de la réaction enzymatique. La réduction en C-5 serait plus lente chez les sulfoconjugués que chez les stéroïdes libres. Bien qu'elle soit minoritaire, nous croyons que cette voie sulfoconjuguée mènerait à la production de quantités non négligeables de métabolites en présence de fortes concentrations du sulfate de DHEA dans l'organisme. Il est à noter qu'aucune trace d'épiétiocholanolone n'a été observée jusqu'à ce jour en milieu urinaire (Schanzer, 1996). Dans le cas des 5 $\alpha$  et 5 $\beta$ -

androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, il nous a été impossible de les mesurer lors de nos analyses puisqu'ils co-éluent respectivement avec l'épitestostérone et l'étiocolanolone.

Suite à l'administration de DHEA, les rapports TG/EG, AG/EtG et AS/EtS varient sans toutefois sortir de la distribution normale de ces ratios. Il nous est donc impossible d'utiliser ces sondes pour détecter l'usage de ce précurseur de la testostérone. Comme mentionné plus tôt, les distributions des concentrations urinaires des analytes en fonction des gravités spécifiques des échantillons urinaires peuvent être utilisées comme outil diagnostique, une fourchette de concentrations normales pouvant être associée à une gravité spécifique donnée chez une population référence. Ainsi, suite à la prise de DHEA, les concentrations urinaires en conjugués d'androgènes augmentent et risquent de ne plus correspondre aux valeurs généralement reliées à la gravité spécifique de l'urine. Afin d'évaluer cette approche, nous avons intégré les données obtenues lors de l'étude d'excrétion aux distributions de la population de référence étudiée à la section 3.4. Les concentrations urinaires non corrigées des deux fractions de conjugués ont été utilisées. Encore une fois, la mesure de la créatinine urinaire n'étant pas effectuée de routine, la seule méthode de comparaison universelle doit tenir compte des gravités spécifiques.

Pour les glucuronides de testostérone, d'épitestostérone, de 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, de 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, l'ensemble des données recueillies lors de l'étude d'excrétion sont dispersées dans leurs distributions respectives sans toutefois se démarquer de celles de la population référence. Ainsi, l'administration de DHEA n'affecterait pas suffisamment ces concentrations urinaires pour nous permettre de déceler une anomalie en relation avec la gravité spécifique. Dans le cas de l'androstérone glucuroconjuguée, les valeurs sortent de la distribution de 2,5 à 7,5 heures suite à la première dose et de 1,5 à 5 heures suite à la deuxième dose (voir figure 3.21A). Nous avons observé plus tôt que le profil d'excrétion de l'étiocolanolone glucuroconjuguée comporte deux pics et que le second pic est le plus intense. Dans la distribution des concentrations urinaires en glucuronide d'étiocolanolone en fonction de la gravité spécifique (voir figure 3.21B), seules les valeurs de ce deuxième pic (environ de 10 à 20 heures) se démarquent de celles de la population référence. Les données du premier pic font plus ou moins partie intégrante de la distribution dite normale.

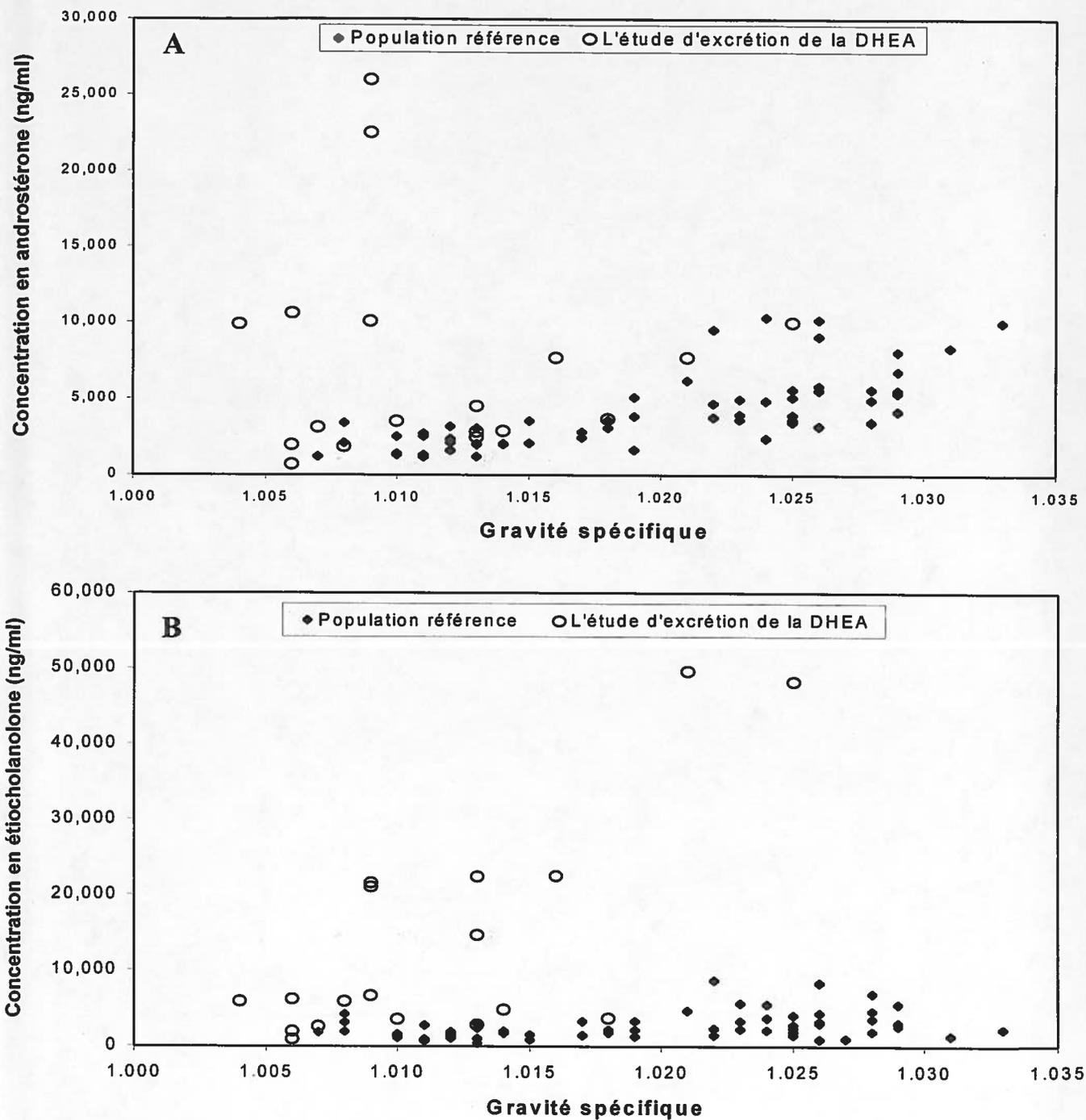


Figure 3.21: Distribution des concentrations urinaires en glucuronides d'androsténone (A) et d'étiocholanolone (B) en fonction de la gravité spécifique des urines: Comparaison entre une population référence et l'étude d'excrétion de la déhydroépiandrosténone chez un volontaire sain.

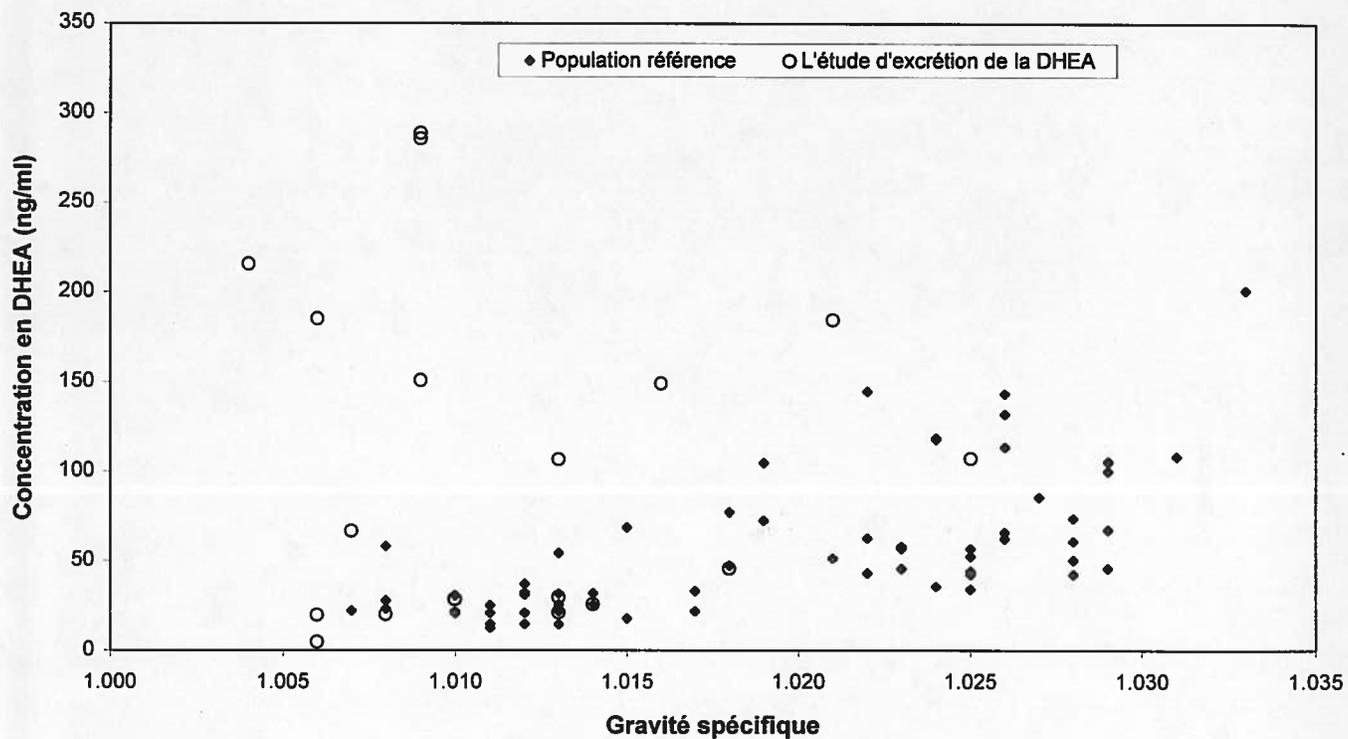


Figure 3.22: Distribution des concentrations urinaires en glucuronides de déhydroépiandrostérone en fonction de la gravité spécifique: Comparaison entre une population référence et l'étude d'excrétion de la déhydroépiandrostérone chez un volontaire sain.

Les urines correspondant aux temps d'excrétion de 1,5 à 13 heures ont des concentrations en DHEA glucuroconjuguée beaucoup trop élevées pour leur gravité spécifique (voir figure 3.22). Après 13 heures, les concentrations baissent et les valeurs retournent dans la distribution normale. Une étude a été réalisée dernièrement par Dehennin et son équipe afin d'évaluer les effets d'une dose orale de 50 mg en DHEA sur le profil stéroïdien. Suite à ces travaux, ils ont proposé une concentration urinaire limite de 300 ng/mL en glucuronide de DHEA comme outil diagnostique (Dehennin *et al*, 1998). Nos résultats démontrent qu'aucune des concentrations non corrigées en glucuronide de DHEA n'a franchi cette limite et ce, malgré une dose de quatre fois supérieure à celle utilisée. La valeur mesurée la plus élevée est de 216 ng/mL suite à la première dose et de 286 ng/mL suite à la seconde dose, celle-ci étant plus élevée à cause du cumul des deux doses. D'un point de vue quantitatif, nous croyons que l'utilisation d'une distribution comme celle présentée à la figure 3.22 est beaucoup plus diagnostique qu'une concentration limite puisqu'elle permet de détecter des concentrations anormalement élevées jusqu'à 13 heures suite à l'administration de la DHEA.

Pour ce qui est de la fraction sulfate, l'allure des distributions de l'androstérone, l'étiocolanolone, l'épiandrostérone, la DHEA et de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol est semblable. Seuls les échantillons dont les temps d'excrétion sont entre 2,5 et 13 heures sortent du profil de distribution de la population de référence suite à chacune des doses. Le chevauchement des deux doses mène à une hausse des concentrations à peine 1,5 heures suite à la seconde dose. Dans le cas de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol, il nous est impossible de distinguer ces valeurs de celles de la distribution de référence. Comparativement aux glucuroconjugués, les distributions des stéroïdes sulfatés semblent beaucoup plus affectées par l'administration de DHEA, d'où l'importance d'étudier ce type de conjugués. Il nous semble donc que les concentrations urinaires des sulfates d'épiandrostérone et de DHEA sont les plus diagnostiques puisque les valeurs de notre étude d'excrétion s'en démarquent beaucoup plus de celles de la population référence. Les distributions des glucuronides et sulfates d'androstérone et d'étiocolanolone et de la DHEA glucuroconjuguée semblent être également diagnostique.

Il est important de noter que des situations de stress aigu ainsi que des maladies (infection virale, infarctus du myocarde et fièvre rhumatoïde) peuvent mener à une hausse des

concentrations urinaires en DHEA (Birke, 1954). Deux types de réponses ont été observés en situation de stress psychologique. Immédiatement suite à un stress émotionnel, une hausse de 10 à 20 fois des concentrations urinaires en DHEA est notée chez la majorité des sujets. Chez le deuxième groupe, les niveaux de DHEA sont peu affectés mais une augmentation des corticostéroïdes est observée. Les auteurs ont de plus noté que les concentrations urinaires en DHEA ne sont pas affectées par des sessions d'exercice physique (Ludwig *et al*, 1977). Alors que l'excrétion relative de presque tous les stéroïdes ne varie que très peu chez les individus normaux, les concentrations urinaires de DHEA sont sujettes à d'importantes variations. Une proportion de 20% des sujets d'une population donnée présenterait des niveaux jusqu'à 50 fois supérieurs à ceux des autres (le 80% restant). Ces taux d'excrétion élevés en DHEA seraient similaires à ceux observés chez les gens exposés à des stress psychologiques importants. Les échantillons urinaires des individus chez lesquels une forte excrétion de DHEA a été observée démontrent une forte variation des concentrations journalières. Les maximums sont observés en milieu de journée (vers midi) alors que les minimums sont atteints suite à des périodes de repos (en soirée et le matin) (Pfeifer et Spitteller, 1981).

Ainsi, les effets du stress ou de la maladie pourraient, dans certains cas, fausser des résultats obtenus à l'aide d'outils diagnostiques quantitatifs tels la limite de 300 ng/mL en glucuronide de DHEA et la distribution des concentrations urinaires en sulfate de DHEA en fonction de la gravité spécifique. En présence de cas limites, la prudence sera de mise quant aux verdicts rendus à l'aide de ce type de sondes.

### **3.5.2. Identification des métabolites urinaires de la DHEA**

Nous avons identifié des métabolites sulfoconjugués et glucuroconjugués apparaissant suite à la prise de DHEA orale. Puisqu'aucun métabolite bi-oxygéné sulfoconjugué caractéristique n'a pu être observé, nous nous sommes attardés aux métabolites tri-oxygénés. Au cours des trente dernières années, quelques études ont été menées afin d'identifier certains métabolites tri-oxygénés en milieu urinaire. La plupart de ces métabolites portent des groupements oxygénés en position C-3 et C-17 ainsi qu'en C-7 ou C-11 ou C-16 (Jänne, 1970; Jänne, 1971; Setchell *et al*, 1976; Axelson, Sahlberg et Sjövall, 1981). Peu d'informations quant

au profil des sulfates de stéroïdes tri-oxygénés et à leurs spectres de masse nous sont fournies dans ces publications. On y traite d'avantage de la séparation des conjugués de stéroïdes par chromatographie ionique ou des stéroïdes comportant trois fonctions hydroxyles (les triols). Des résultats préliminaires ont démontré que les métabolites urinaires formés suite à la prise de DHEA orale ne sont pas des triols mais comportent plutôt des fonctions diol-one. Les temps de rétention sont supérieurs et les spectres de masse des dérivés triméthylsilyles sont caractérisés par la présence d'ions moléculaires à  $m/z$  520 et 522.

Tous les échantillons ont été analysés par CG/SM en mode DSI pour la quantification et en mode de balayage continu afin d'obtenir des spectres de masse complets des analytes d'intérêt. Les premières analyses effectuées sur les urines du volontaire ont indiqué des modifications de l'excrétion de stéroïdes tri-oxygénés. Dans la fraction sulfate, nous avons identifié cinq stéroïdes tri-oxygénés, les deux premiers composés co-éluant dans les conditions chromatographiques utilisées. En changeant la phase de la colonne pour une autre contenant 5% de phényl-méthyl silicone, nous avons pu résoudre les deux pics dont l'un est nettement majoritaire. Le spectre de masse du dérivé TMS-énol, TMS-éther de ce composé est caractérisé par la présence d'un ion moléculaire à  $m/z$  520 et de peu de fragments à  $m/z$  505 [ $M-CH_3$ ], 415 [ $M-TMSOH-CH_3$ ] et 147 [ $TMSO=Si(Me)_2$ ] (voir figure 3.24). La présence de l'ion à  $m/z$  147 indique la proximité de deux groupements TMSO (voir figure 3.23).

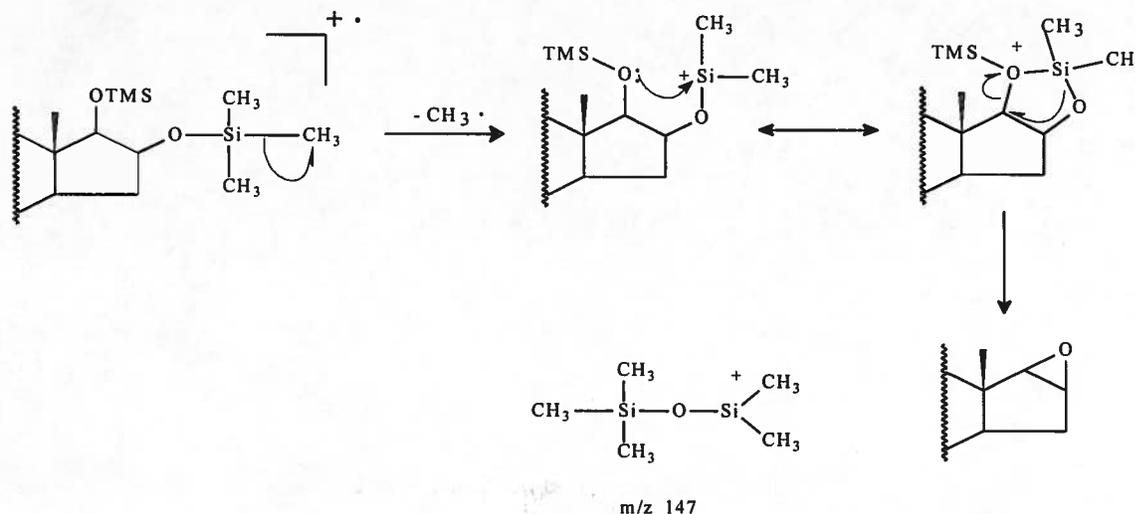


Figure 3.23 Mécanisme de fragmentation menant à l'ion à  $m/z$  147

(Sloan, Harvey et Vouros, 1971).

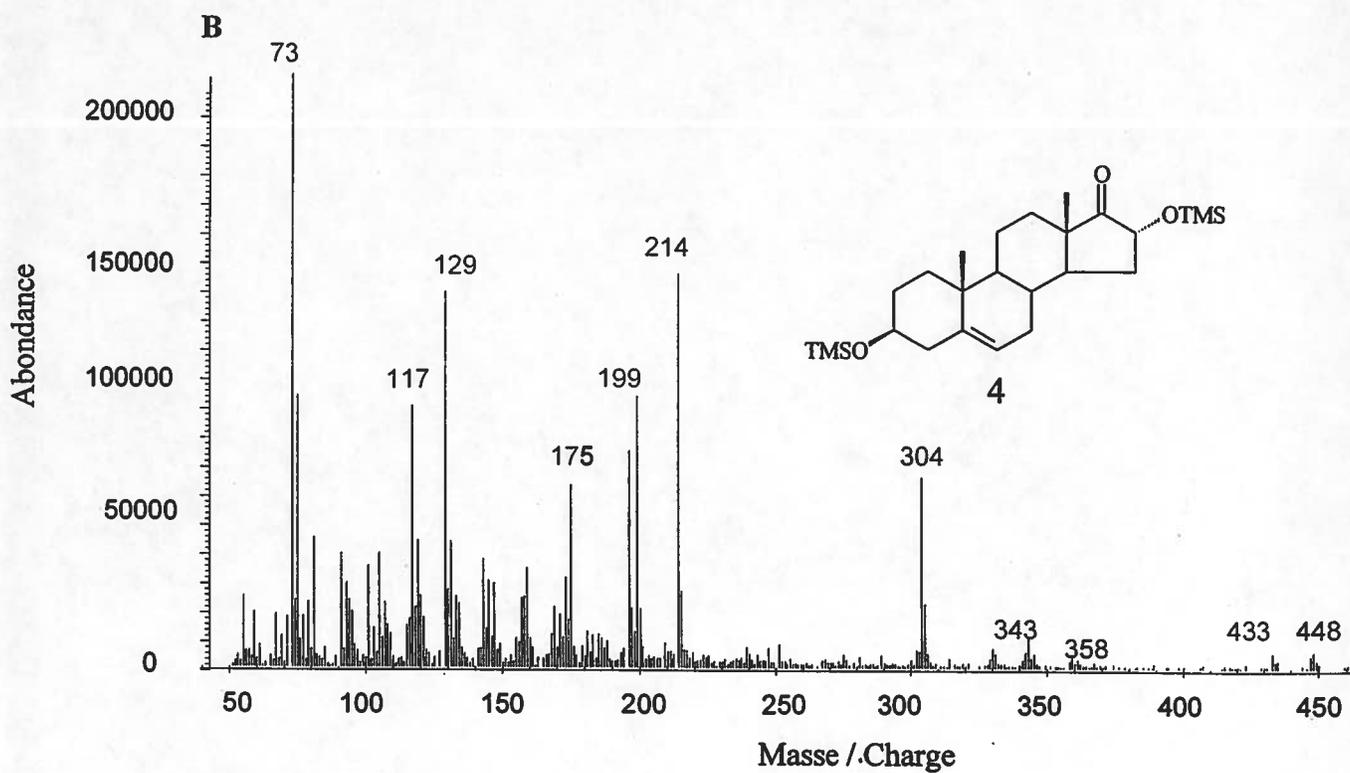
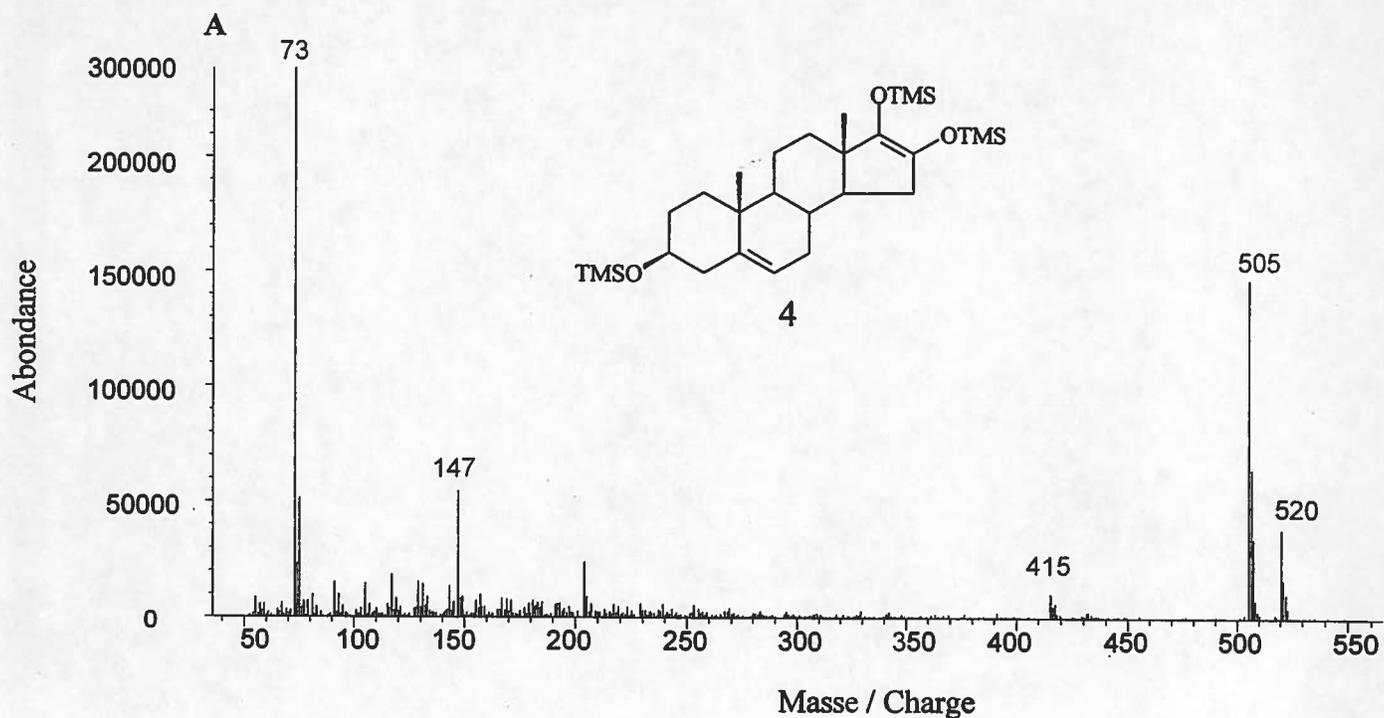


Figure 3.24: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers (A) et TMS-éthers (B) de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one.

La présence d'un ion  $[M-CH_3]^+$  intense est caractéristique des stéroïdes dérivés TMS ayant une fonction TMS-énol en C-17 et un groupement TMS-éther en C-16 (voir figure 3.25). La stabilité du fragment serait due à la formation de liens doubles conjugués suite à la perte d'un radical méthyle. Sous la forme énol, la présence d'un lien double en C-16 rend impossible la détermination de l'orientation du groupement OTMS.

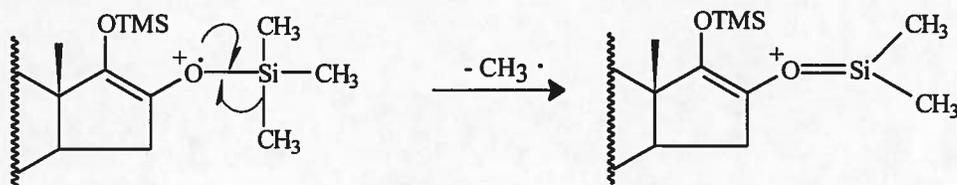


Figure 3.25 Mécanisme proposé de fragmentation menant à l'ion  $[M-15]^+$   
(Diekman et Djerassi, 1967).

La présence de ce composé uniquement dans la fraction sulfate suggère une conformation  $3\beta$ -hydroxyle. Le spectre de masse du dérivé TMS-éther est plus informatif et est caractérisé par la présence de l'ion moléculaire à  $m/z$  448, ainsi que des fragments à  $m/z$  358, 343  $[M-TMSOH-CH_3]^+$ , 304, 214, 199, 175, 129 et 117. L'ion à  $m/z$  129 nous indique la présence d'une double liaison en C-5 et d'un groupement hydroxyle en C-3 (Diekman et Djerassi, 1967) alors que l'ion moléculaire à  $m/z$  448 confirme la présence d'une fonction cétone. Nous avons établi l'identité du composé **4** comme étant le  $16\alpha$ -hydroxy-déhydroépiandrostérone et confirmé cette hypothèse en comparant les temps de rétention et les spectres de masse des dérivés TMS-éther et TMS-énol, TMS-éther du standard authentique.

Le deuxième stéroïde inconnu est présent dans la fraction sulfate mais également sous la forme glucuronide. Le spectre de masse du dérivé TMS-énol, TMS-éther présenté à la figure 3.26 est encore une fois peu informatif. Les ions caractéristiques sont observés à  $m/z$  522  $[M]^+$ , 507  $[M-CH_3]^+$ , 417  $[M-TMSOH-CH_3]^+$  et 147. L'analyse des spectres semble donc suggérer la présence de fonctions cétone en C-17 et hydroxyle en C-16. La présence de ce stéroïde dans les fractions glucuronides et sulfates serait consécutive à une conformation C- $3\alpha$  d'un groupement hydroxyle.

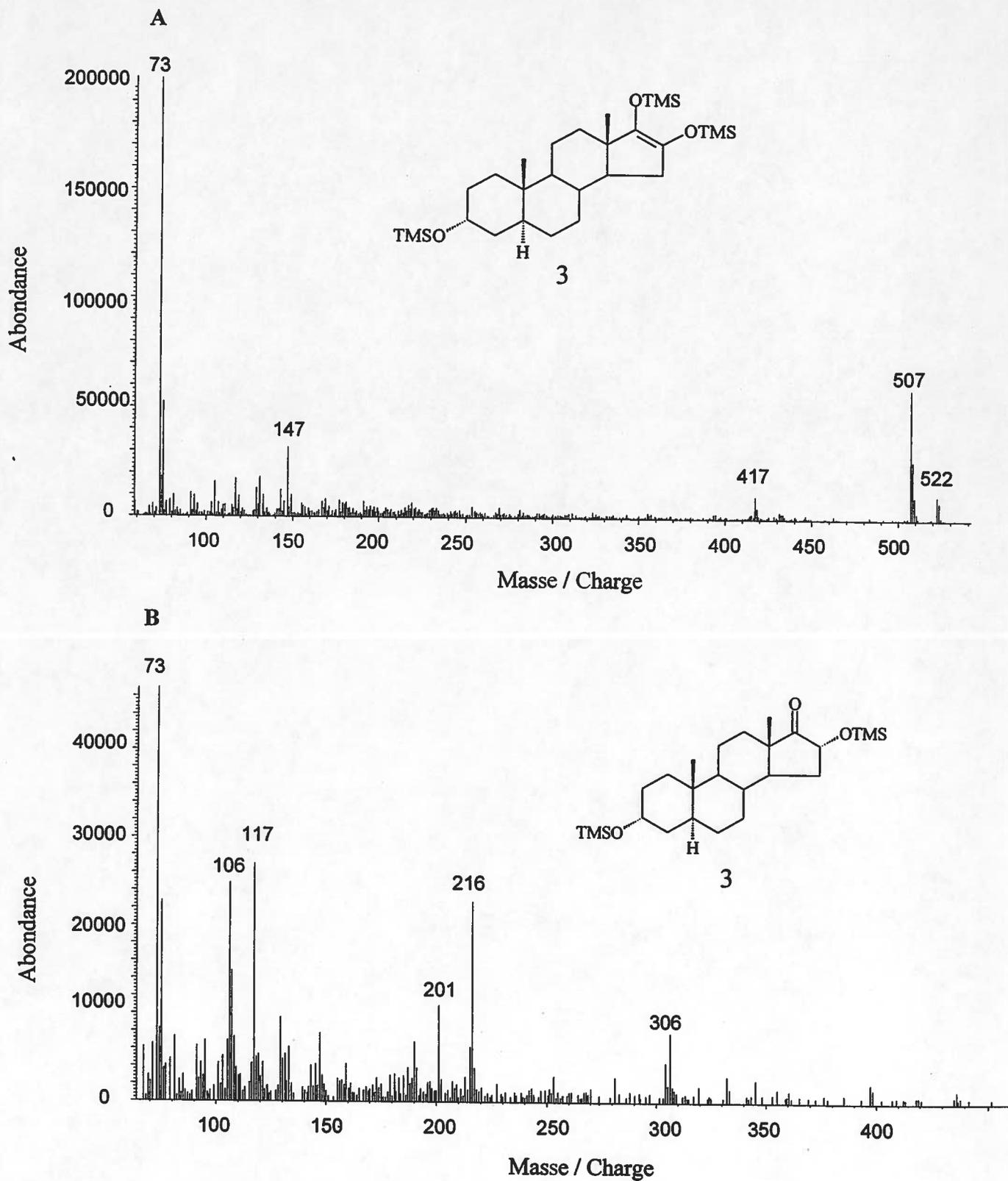


Figure 3.26: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers (A) et TMS-éthers (B) du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one.

Le spectre de masse du dérivé TMS-éther montre la présence de l'ion  $[M-CH_3]^+$  à  $m/z$  435 et des ions à  $m/z$  306, 216 et 117. La comparaison des temps de rétention et des spectres de masse des dérivés TMS-éther et TMS-énol, TMS-éther du standard authentique nous confirme l'identité de ce stéroïde **3** comme étant le  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one (16 $\alpha$ -hydroxyandrostérone).

Deux autres stéroïdes inconnus co-éluent dans les conditions chromatographiques utilisées et sont séparés par l'emploi d'une phase 5% phényle-méthyle silicone. Les spectres de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éther de ces deux composés (**2a** et **2b**) sont présentés respectivement aux figures 3.28 et 3.30. Les ions majeurs du produit **2a** sont à  $m/z$  147, 301, 391, 430 et 520  $[M^+]$ . L'ion à  $m/z$  169 nous indique la présence d'une cétone en C-17 et l'absence d'un groupement hydroxyle sur le cycle D et l'ion à  $m/z$  147, la proximité de deux groupements OTMS. Puisque cet analyte n'est présent que sous la forme de sulfoconjuguée, nous en déduisons qu'il possède un groupement hydroxyle en C-3 $\beta$ . La présence de l'ion 129 et du  $[M-129]$  nous indique que l'alcène serait en C-5, car ces deux ions ne sont produits qu'en présence d'un lien double en C-5 et d'un groupement alcool en C-3 $\beta$  (Diekman et Djerassi, 1967). Les deux pertes consécutives de TMSOH confirment que l'on retrouve bien deux éthers de TMS.

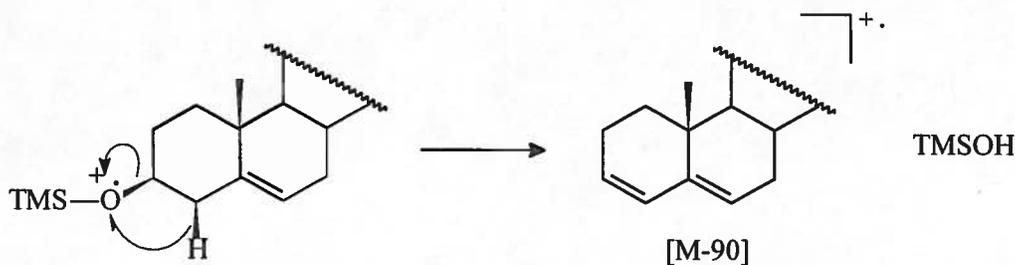


Figure 3.27 Mécanisme proposé de fragmentation menant à l'ion  $[M-90]$  (Diekman et Djerassi, 1967).

La forte intensité de l'ion  $[M-90]$  dans le spectre de masse serait attribuable à la formation de deux alcènes conjugués en C-3 et C-5 (voir figure 3.27). L'ion à  $m/z$  301 serait formé par la perte de TMSOH de l'ion  $[M-129]$ . Nous en concluons que suite à la perte des carbones C-1, 2 et 3 et du OTMS en C-3 $\beta$ , le fragment  $[M-129]$  formé porterait toujours le deuxième éther de TMS et que la perte de ce groupement mènerait à la formation du  $[M-129-TMSOH]$ .

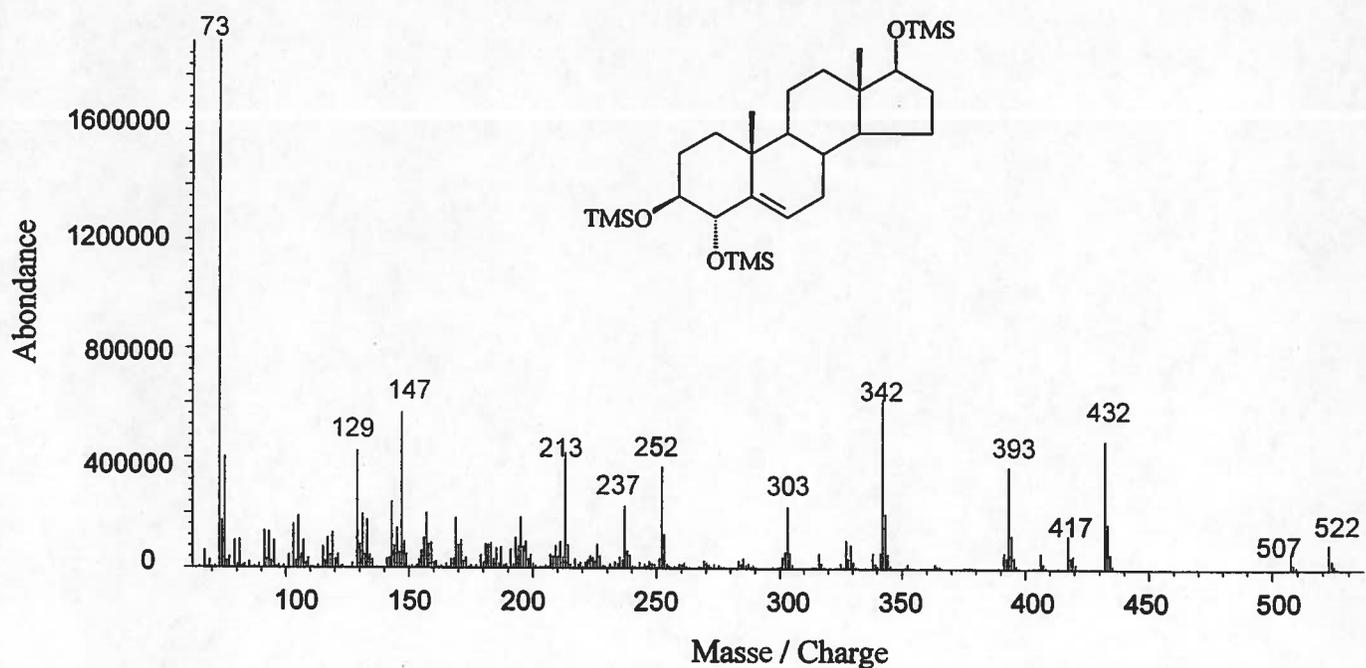
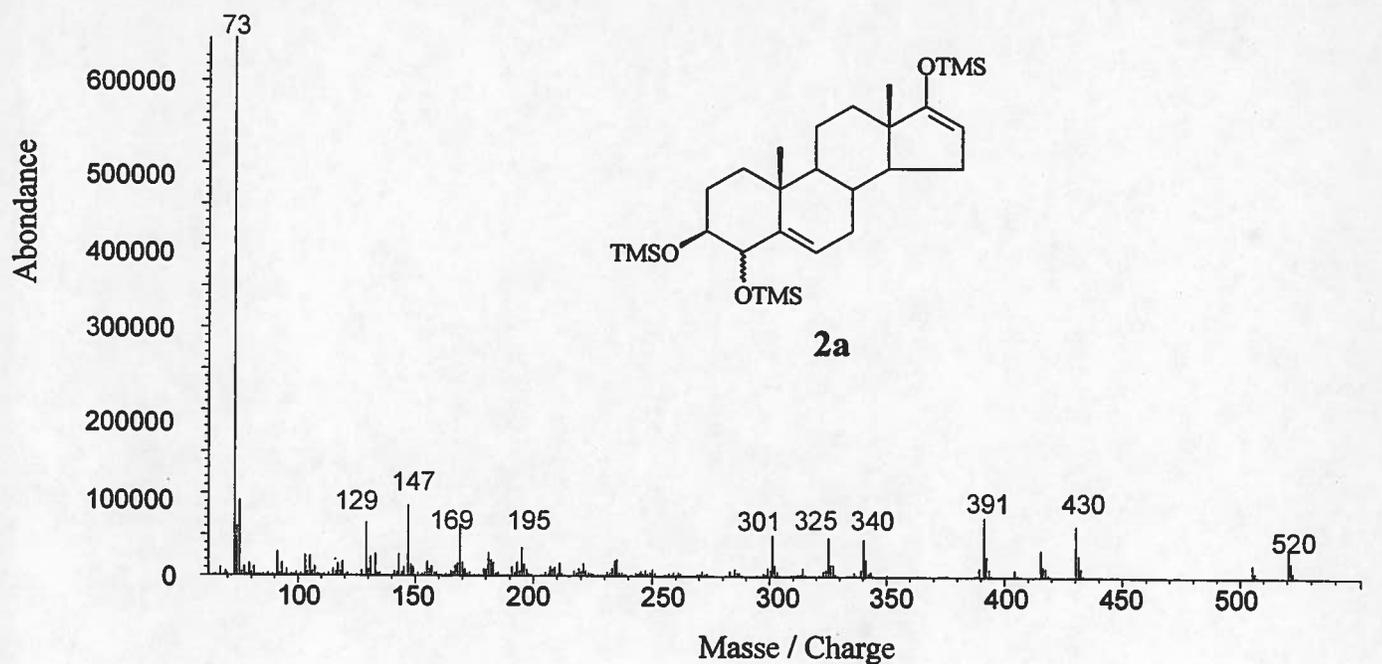


Figure 3.28: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\xi$ -diol-17-one (A) et de l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (B).

Nous savons également que ce groupement doit être près de l'hydroxyle en C-3 $\beta$  afin qu'il puisse y avoir formation de l'ion 147. Le deuxième groupement alcool serait donc sur le carbone C-4. La structure proposée est présentée à la figure 3.29.

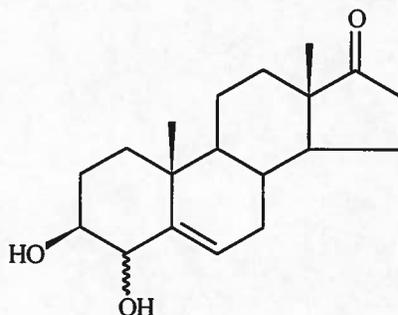


Figure 3.29 L'androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\xi$ -diol-17-one (2a)

Bien qu'aucun standard de ce composé ne soit disponible, nous avons analysé le spectre de masse du dérivé triméthylsilyle du standard authentique d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol. L'allure des deux spectres est identique, les m/z des ions du standard sont à deux unités plus élevées (figure 3.28). Les ions [M-129], [M-129-TMSOH], 129 et 147 sont présents dans les spectres des deux produits. La présence de l'ion à m/z 252 serait due à la troisième perte de TMSOH chez le triol. Il est à noter que ce produit est minoritaire comparativement au 2b.

L'hydroxylation de stéroïdes en position C-16 $\alpha$  et C-4 est surtout observée chez les estrogènes. Suite à l'oxydation du groupement alcool en C-17 $\beta$  de l'estradiol, l'estrone formée peut être hydroxylée en position C-4, C-2 et enfin en C-16 $\alpha$  et ainsi mener à la formation de 4-hydroxyestrone, de 2-hydroxyestrone et de l'estriol. Ces deux derniers produits sont majoritaires alors que la voie impliquant l'hydroxylation en C-4 est minoritaire. L'étude de ces trois voies métaboliques vise principalement à tenter d'expliquer les rôles et effets de ces métabolites de l'estradiol au niveau du cancer du sein (Bradlow *et al*, 1995; 1996).

Les spectres de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éther des inconnus 1 et 2b, présentés à la figure 3.30, sont caractérisés par les ions à m/z 520 [M<sup>+</sup>, faible], 430 [M - TMSOH], 415 [M - TMSOH-CH<sub>3</sub>], 325 [M - TMSOH - TMSOH - CH<sub>3</sub>] et 169.

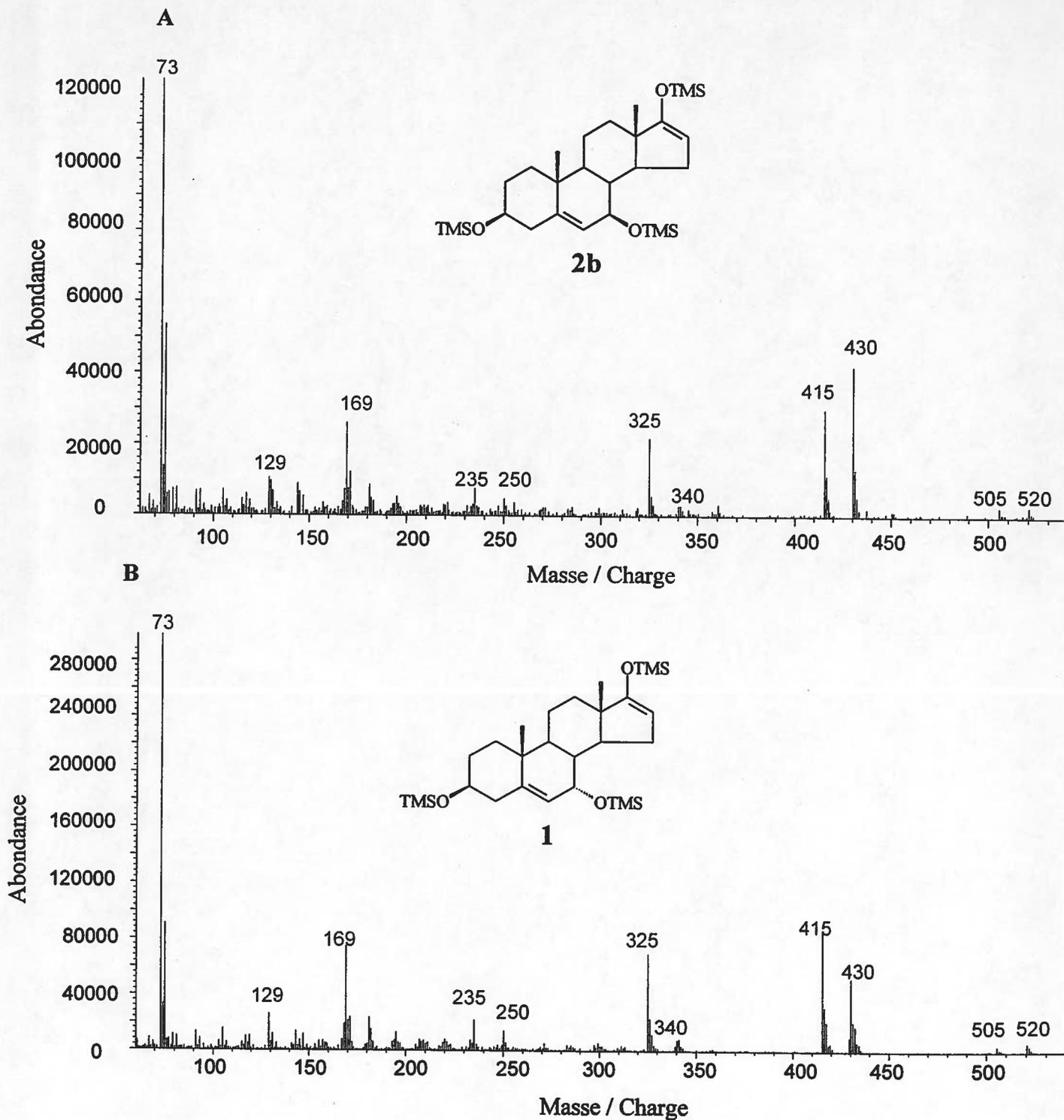


Figure 3.30: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de l'androst-5-ène- $3\beta,7\beta$ -diol-17-one (A) et de l'androst-5-ène- $3\beta,7\alpha$ -diol-17-one (B).

L'ion à  $m/z$  169 nous indique la présence d'une cétone en C-17 alors que le faible  $M^+$  combiné au  $[M-90]$  intense nous signalent que le fragment formé serait plus stable que l'ion mère. Encore ici, le groupement alcool en C-3 a la conformation  $\beta$  puisque ce produit est présent majoritairement dans la fraction sulfate. La présence de l'ion à  $m/z$  129 quoique faible est caractéristique des fonctions 3-ol et 5-ène. De plus, la perte du TMSOH mènerait à la formation d'un lien double conjugué à celui en C-5, ce qui expliquerait la forte intensité de l'ion à  $m/z$   $[M-90]$ . L'absence de l'ion 147 dans le spectre de masse du 2b indique que le deuxième hydroxyle n'est pas présent sur les cycles A et D. De plus, les fragments caractéristiques de groupements TMSO en C-11 ( $m/z$  à 256 et 283) et C-12 ( $m/z$  à 270) sont absents nous indiquant que ce groupement hydroxyle serait en C-7. Les spectres de masse des dérivés TMS-énol, TMS-éther de standards gracieusement fournis par le professeur Robert Morfin du Conservatoire National des Arts et Métiers de Paris confirment l'identité des inconnus 1 et 2b comme étant respectivement l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol-17-one (7 $\alpha$ -OH-DHEA) et l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol-17-one (7 $\beta$ -OH-DHEA).

Peu d'études portant sur les stéroïdes hydroxylés en C-7 ont été publiées au fil des ans. Les enzymes 7-hydroxylases seraient largement distribuées dans les organes des divers mammifères étudiés. Jusqu'à présent, aucune homologie n'a été découverte entre les trois types de 7-hydroxylases. Chacun de ces types d'enzymes serait caractérisé par les substrats impliqués lors de l'hydroxylation. Ainsi, une 7-hydroxylase hépatique ou testiculaire agirait sur la testostérone et l'androstènedione alors que le deuxième type d'enzyme serait une cholestérol-7-hydroxylase hépatique. Enfin, les stéroïdes ayant un groupement alcool en C-3 $\beta$  seraient spécifiquement hydroxylés en C-7 $\alpha$  et  $\beta$  par un complexe cytochrome P450 NADPH (Morfin et Couchay, 1994). Ce dernier type d'enzyme a été étudié chez le chien, le rat, la souris et chez l'humain sur des tissus prostatiques (Morfin *et al*, 1980; Isaacs, McDermott et Coffey, 1979; Morfin et Couchay, 1994; Morfin *et al*, 1977). Des études chez la souris ont démontré que la 7 $\alpha$ -OH-DHEA serait produite suite à l'incubation d'homogénats de divers tissus en présence de DHEA marquée. Pour ce qui est de la 7 $\beta$ -OH-DHEA, les concentrations produites seraient beaucoup plus faibles. Les dérivés 7-hydroxylés des stéroïdes ayant un groupement alcool en C-3 $\beta$  n'auraient pas d'effets endocriniens, ce qui pousse l'auteur à considérer ces stéroïdes tri-

oxygénés comme étant des métabolites d'excrétion sans plus. Par contre, ils entraîneraient une réponse immunitaire ainsi qu'une production en IgG supérieure à celles générées par la DHEA (Morfin et Courchay, 1994). Nos travaux sont donc, à notre connaissance, les premiers à traiter de l'excrétion urinaire de métabolites hydroxylés en C-4 et C-7 chez l'humain suite à l'administration de DHEA.

Lors de l'analyse du profil des stéroïdes tri-oxygénés chez les 63 hommes de la population référence, nous avons constaté que la  $16\alpha$ -hydroxy-DHEA (4) est toujours majoritaire dans la fraction sulfate et qu'elle y est de 4 à 5 fois plus abondante si on compare son fragment à  $m/z$  505 à celui à  $m/z$  507 de la  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (3). Quant aux  $7\alpha$ -hydroxy-DHEA (1) et  $7\beta$ -hydroxy-DHEA (2b), l'abondance de leur ion à  $m/z$  430 est toujours inférieure ou égale à celle à  $m/z$  507 de la  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (3). Un profil identique est observé chez le volontaire au temps zéro. Le profil des stéroïdes tri-oxygénés change radicalement suite à l'administration de DHEA. Les chromatogrammes présentés aux figures 3.31 à 3.33 illustrent ces variations du profil dans le temps. Ces chromatogrammes ont été générés en mode de balayage continu et seuls les ions caractéristiques à  $m/z$  522, 507, 520, 505, 430 et 435 (standard interne) y sont présentés. Moins de trois heures après la prise de DHEA, il semble y avoir suppression de la  $16\alpha$ -hydroxy-DHEA (4) et de la  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (3) alors que l'intensité de la  $7\alpha$  et  $7\beta$ -hydroxy-DHEA (1 et 2b) hausse environ d'un facteur de 5 à 10. Après 7,5 heures, la  $16\alpha$ -hydroxy-DHEA (4) est de retour à la normale alors que la  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (3) n'est présente qu'en de faibles concentrations. Pas moins de 20 heures sont nécessaires afin que le profil soit considéré comme normal et que les intensités des pics 2 et 3 redeviennent similaires. L'étude du profil stéroïdien des tri-oxygénés semble donc être un outil diagnostique intéressant qui nous permettrait de détecter des signes d'utilisation de DHEA.

**Tableau 12**  
**Identité de métabolites urinaires tri-oxygénés de la DHEA présents dans la fraction sulfate**  
**chez l'homme**

Numéro	Stéroïde
<u>1</u>	androst-5-ène-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol-17-one
<u>2a</u>	androst-5-ène-3 $\beta$ ,4 $\xi$ -diol-17-one
<u>2b</u>	androst-5-ène-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol-17-one
<u>3</u>	5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one
<u>4</u>	androst-5-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one

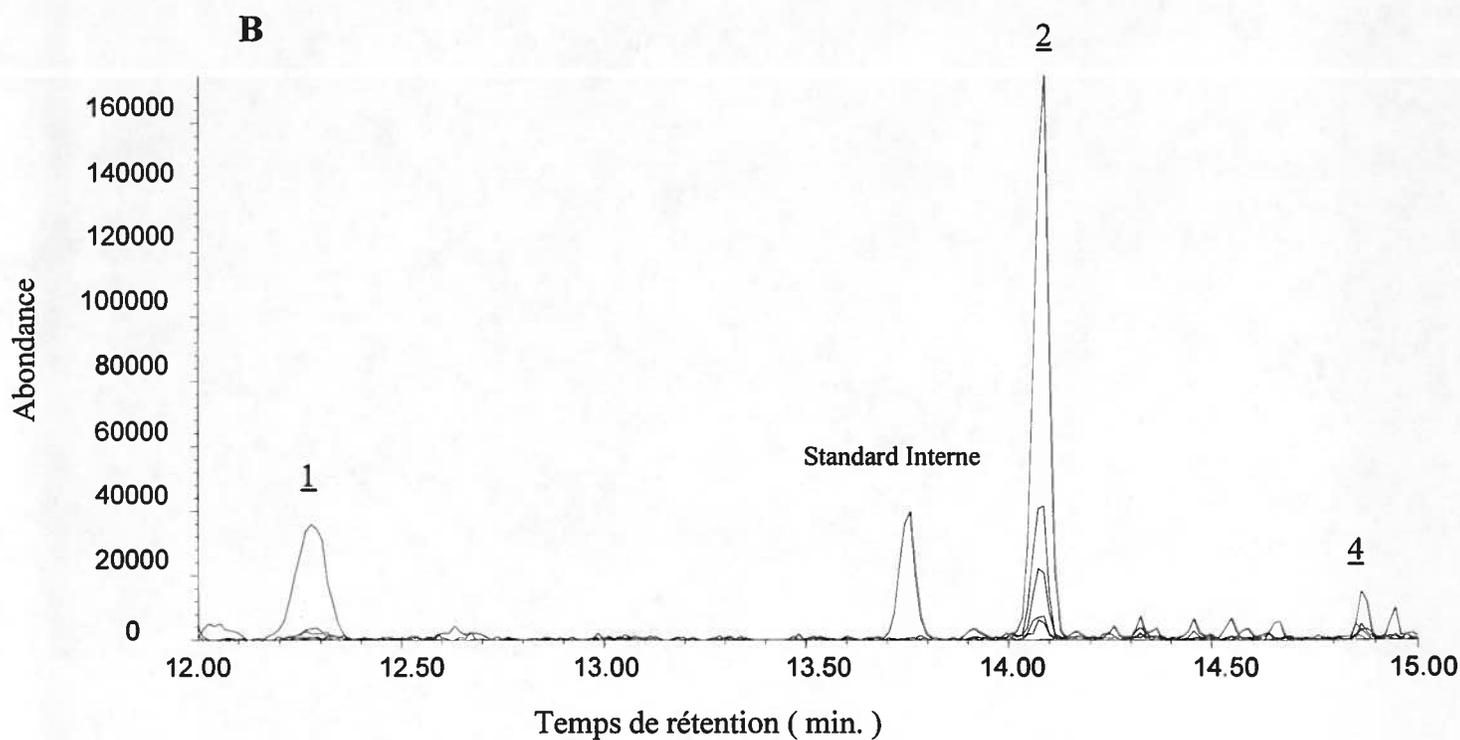
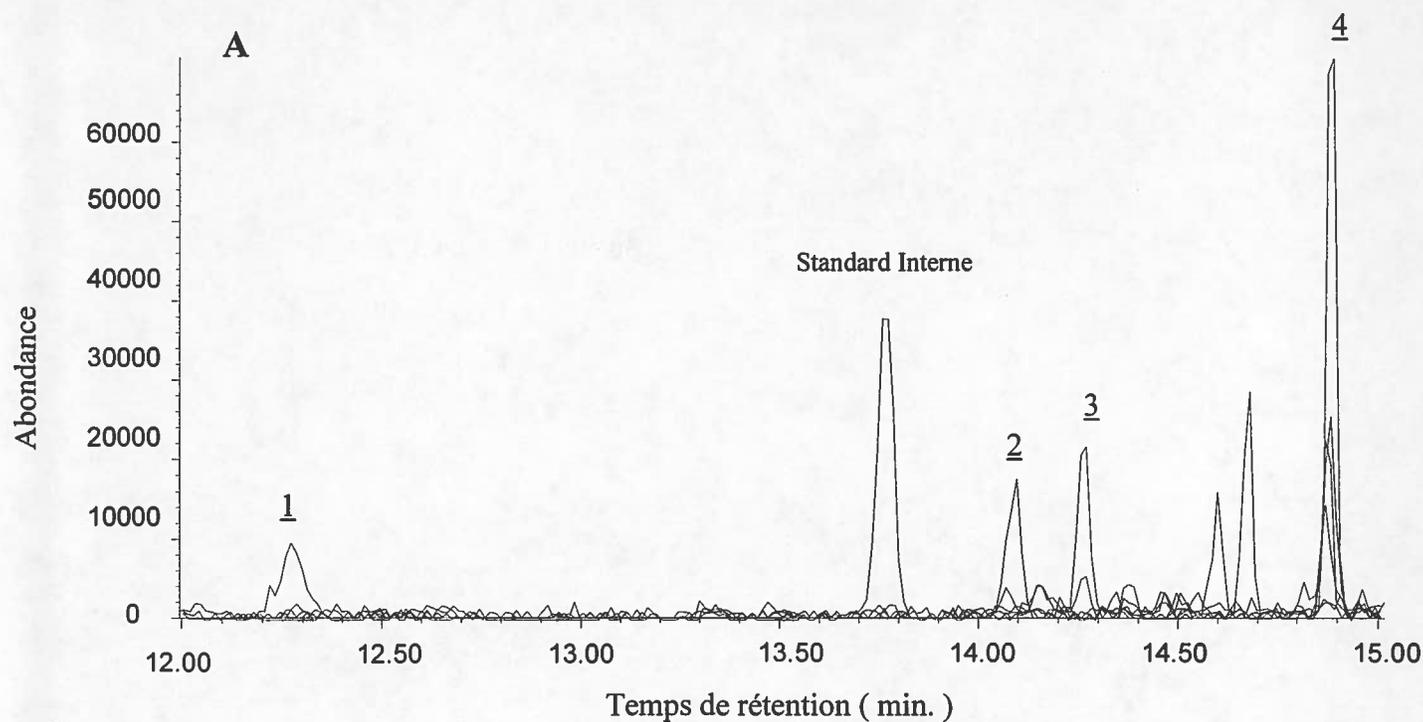


Figure 3.31: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( $m/z$  à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis au temps zéro (A) et 2.5 heures (B) suite à l'administration orale d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.

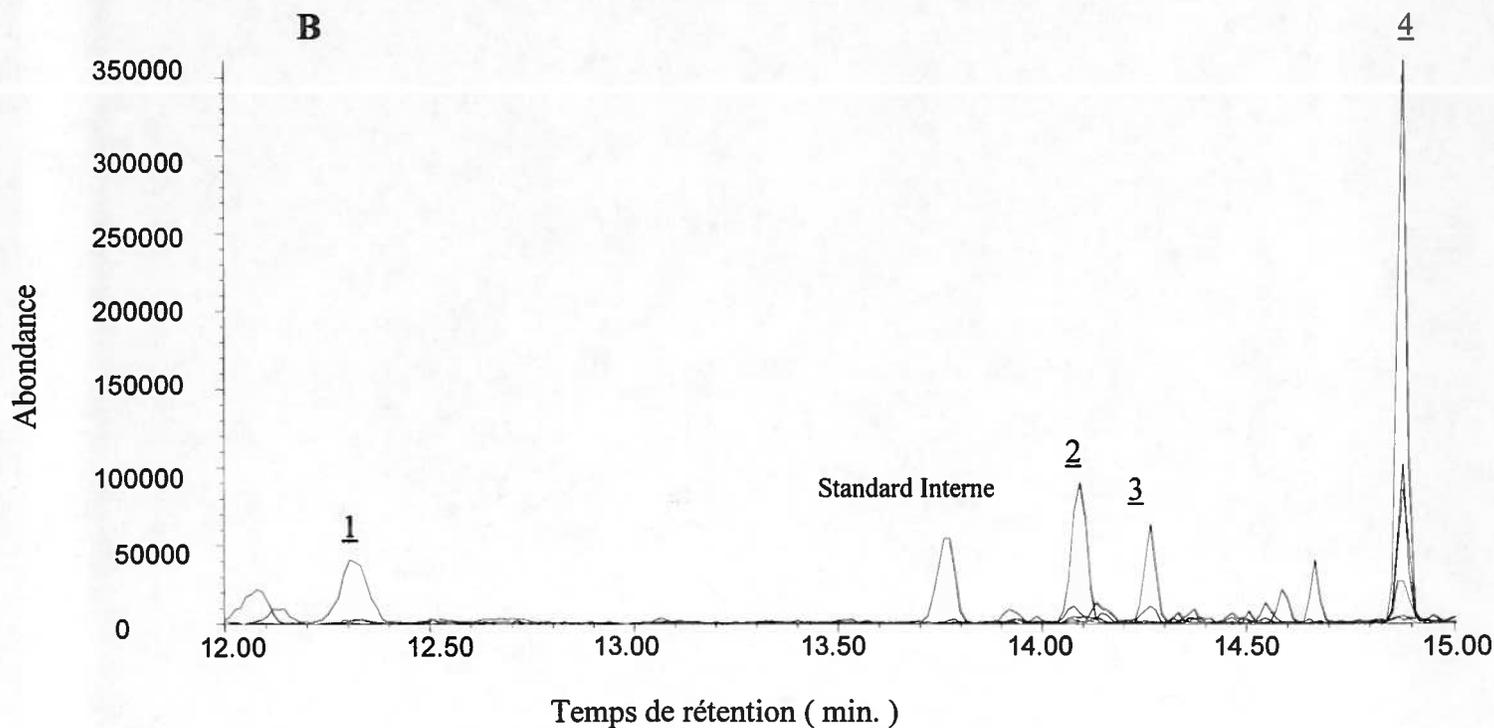
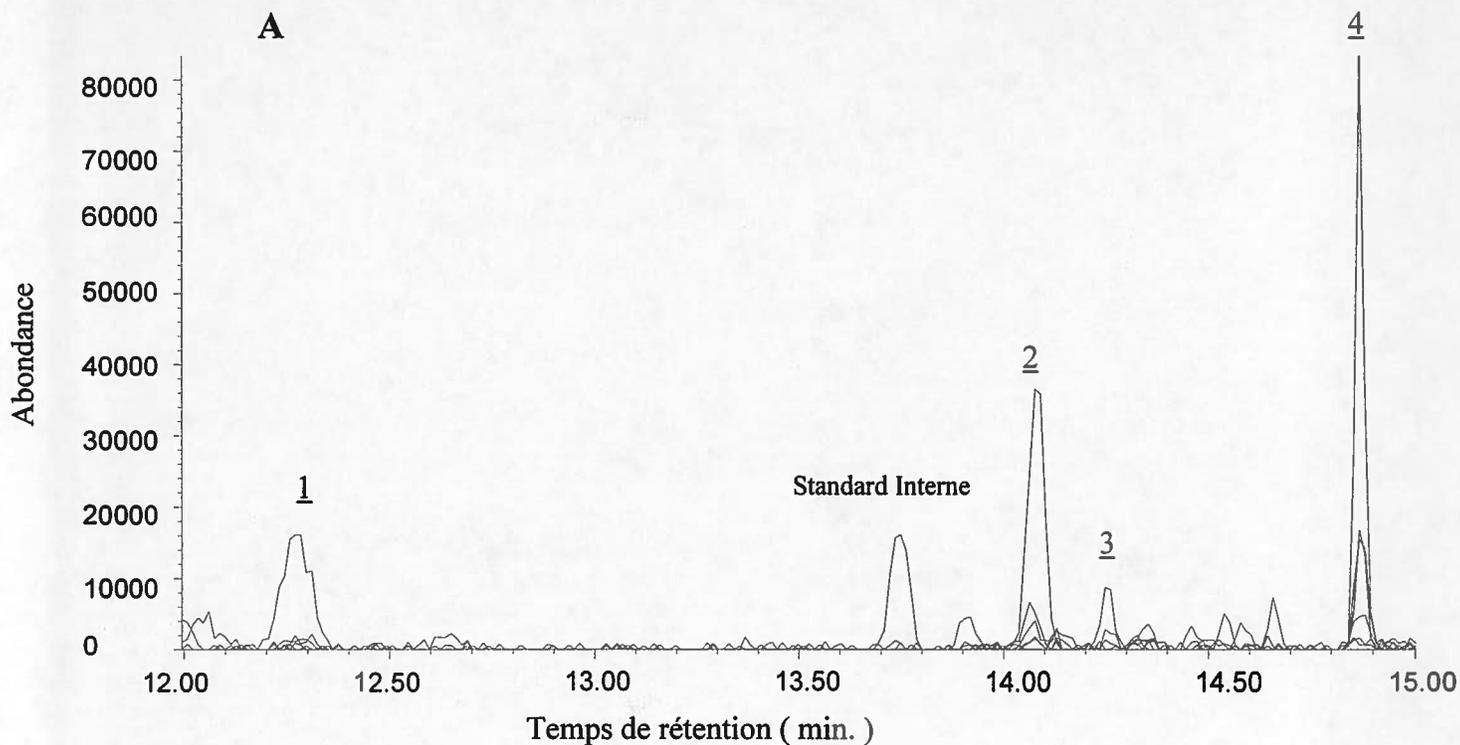


Figure 3.32: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( $m/z$  à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 7.5 (A) et 13.0 heures (B) suite à l'administration orale d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.

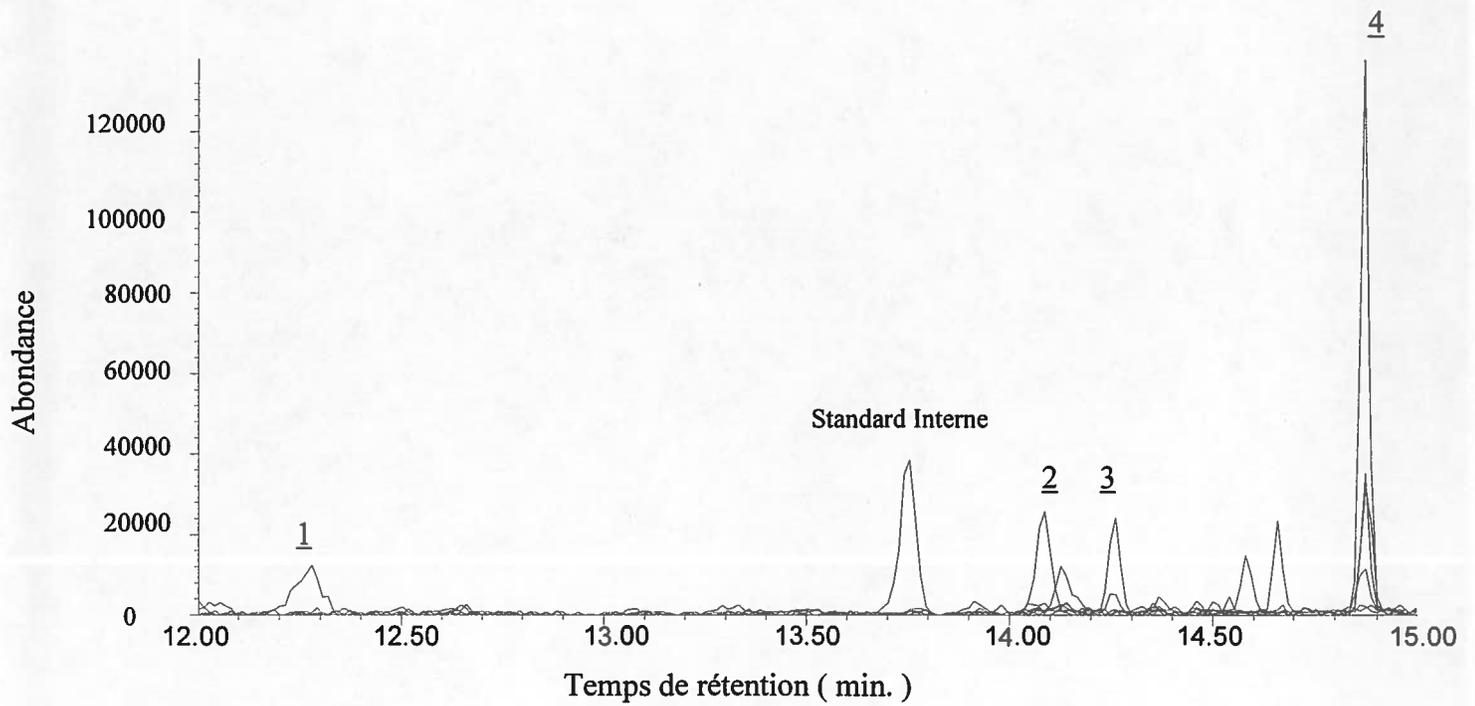


Figure 3.33: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( $m/z$  à 522, 507, 520, 505, 430 et 435) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 20 heures suite à l'administration orale d'une dose de 200 mg de déhydroépiandrosterone à un volontaire sain.

La prise de 200 mg de DHEA par la voie orale semble causer une hausse des concentrations en  $7\beta$ -OH-DHEA et en  $7\alpha$ -OH-DHEA ainsi qu'une importante baisse en  $16\alpha$ -OH-DHEA et en  $16\alpha$ -OH-androstérone. L'étude du profil des sulfates de stéroïdes tri-oxygénés des premiers échantillons recueillis (moins de 13 heures après la dose) nous permet de détecter des signes clairs et indiscutables d'utilisation de ce précurseur de la testostérone. De plus, l'étude de la population référence formée nous confirme que ces profils sont toujours stables et identiques. Puisque la suppression du  $16\alpha$ -OH-androstérone persiste environ 20 heures et que les niveaux de  $7\beta$ -OH-DHEA prennent environ 13 heures pour revenir à la normale, nous croyons qu'un rapport entre ces deux analytes pourrait constituer un outil diagnostique intéressant.

Nous avons également étudié six métabolites tri-oxygénés présents dans la fraction glucuronide. Les deux premiers analytes sont en fait deux stéroïdes tri-oxygénés bien connus. Il s'agit de la  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-one ( $11\beta$ -OH-androstérone) et de la  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-one ( $11\beta$ -OH-étiocholanolone). Dans chacun des spectres de masse (présentés à la figure 3.34), nous retrouvons les fragments caractéristiques à  $m/z$  256 et 283 et l'ion moléculaire à  $m/z$  522. Ces stéroïdes sont principalement produits au niveau des glandes surrénales lors du métabolisme du cortisol et de l'androstènedione (Leunissen, 1979). Il est à noter que la présence d'un groupement hydroxyle en position C-11 est caractéristique des corticostéroïdes tels l'aldostérone et le cortisol. Suite à l'étude d'une population formée de 452 cyclistes amateurs, Donike et son équipe ont estimé que 95% de ces individus ont des concentrations urinaires en  $11\beta$ -OH-androstérone et en  $11\beta$ -OH-étiocholanolone comprises entre 95 et 2804 ng/mL et entre 31 et 1655 ng/mL alors que pour le ratio  $11\beta$ -OH-A/ $11\beta$ -OH-Et, les limites inférieure et supérieure sont de 0,46 et 13,11 (Donike, Rauth et Wolansky, 1993).

Le spectre de masse du dérivé TMS-énol, TMS-éther et le temps de rétention de notre troisième analyte concordent exactement avec ceux du  $7\beta$ -OH-DHEA identifié plus tôt. Il est par contre étrange que ce métabolite soit présent dans la fraction glucuronide alors qu'il comporte un hydroxyle en position C- $3\beta$ . Nous savons qu'un groupement alcool en C- $3\beta$  mène presque

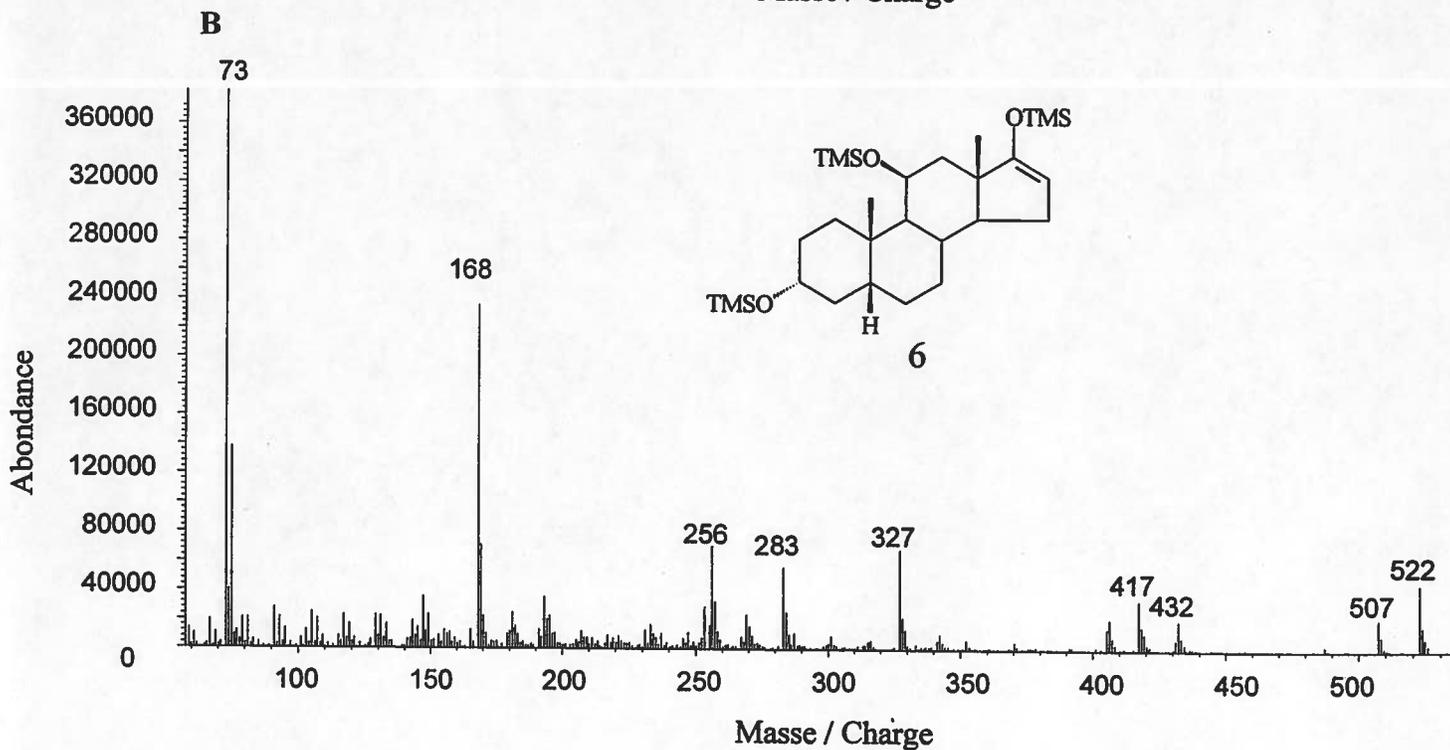
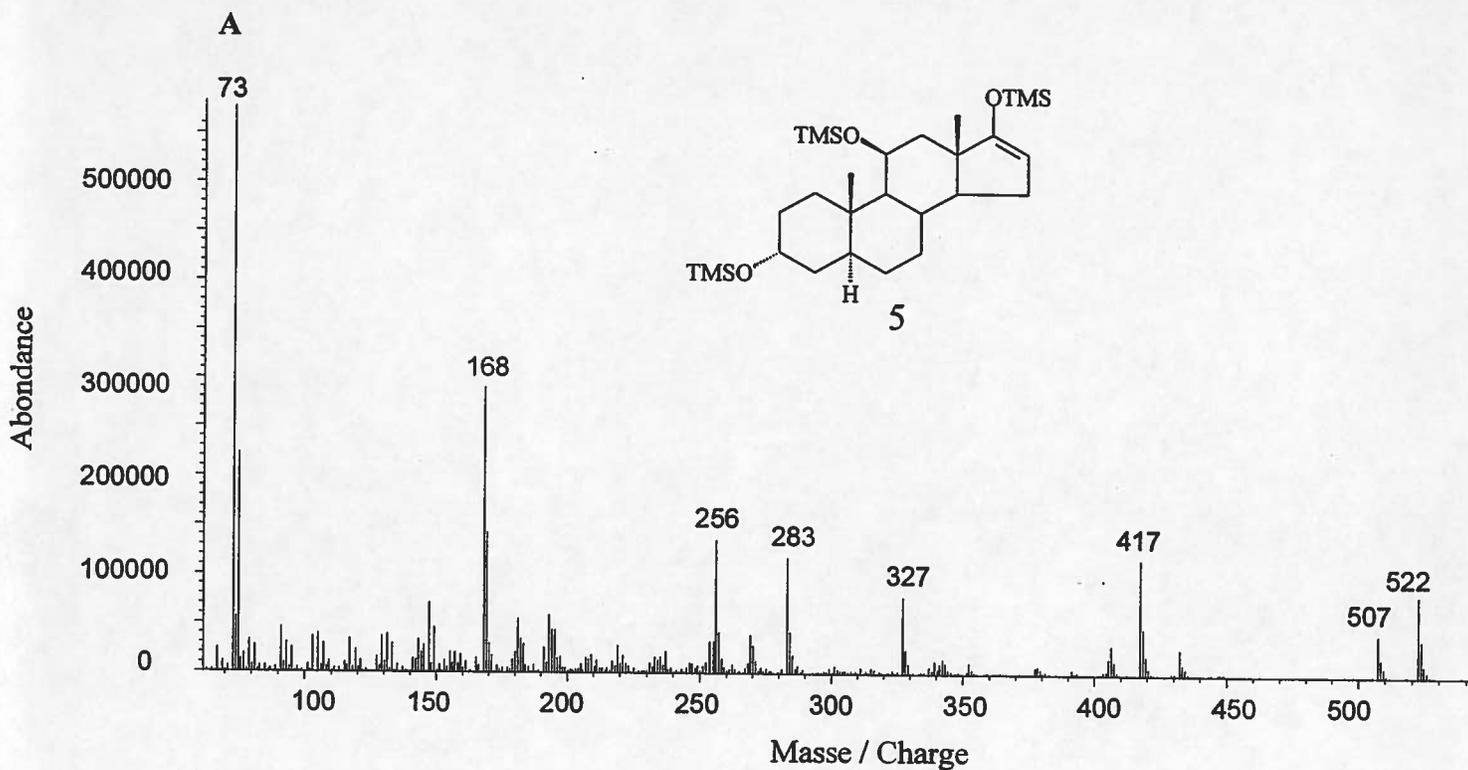


Figure 3.34: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers du 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-one (A) et du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-one (B).

exclusivement à la formation de sulfoconjugués. Ainsi, l'acide glucuronique serait lié à l'hydroxyle en C-7 $\beta$ . La glucuronidation en C-7 serait très sélective puisqu'aucune trace de 7 $\alpha$ -OH-DHEA glucuroconjuguée n'a été détectée dans l'urine. Donc, la 7 $\beta$ -OH-DHEA pourrait être conjuguée à un sulfate en C-3 $\beta$  ou à l'acide glucuronique en C-7 $\beta$  alors que la 7 $\alpha$ -OH-DHEA ne serait que sous la forme de sulfoconjugué.

La 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one identifiée dans la fraction sulfate est présente dans la fraction glucuronide (9) mais en de plus fortes concentrations. L'orientation de l'hydroxyle en C-3 $\alpha$  favorise la formation de glucuronide et tout comme l'androstérone, nous avons estimé qualitativement à environ 1:5 le rapport entre les formes sulfoconjuguées et glucuroconjuguées.

Le spectre de masse du dérivé TMS du produit 8 nous indique qu'il y a co-élution de deux stéroïdes tri-oxygénés dont les ions moléculaires sont à m/z 520 et 522. Nous avons analysé de nouveau l'échantillon en utilisant une autre colonne chromatographique possédant une phase stationnaire de type 5% phényle-méthyle silicone afin de séparer nos deux analytes. Les spectres de masses de ces deux produits sont présentés aux figures 3.35 et 3.36.

Le spectre de masse du dérivé TMS-énol, TMS-éther du premier produit (8b) est peu informatif (figure 3.35). Des ions caractéristiques sont observés à m/z 520 [ $M^+$ ], 505 [ $M - CH_3$ ] et 147 [ $TMSO=Si(CH_3)_2^+$ ]. Le spectre de masse du dérivé TMS-éther montrant un ion moléculaire à m/z 448 nous indique la présence d'une fonction cétone. Comme mentionné plus tôt, la présence de l'ion à m/z 147 indique la proximité de deux groupements OTMS tandis que l'ion à m/z 129 place le lien double en C-5. Les spectres obtenus sont identiques à ceux du standard authentique de la 16 $\alpha$ -hydroxy-déhydroépiandrostérone mais les temps de rétention sont différents. La présence de ce métabolite dans la fraction glucuronide et non sulfate serait conséquente à la présence d'un groupement hydroxyle en C-3 $\alpha$ . L'identité du composé serait donc la 16 $\alpha$ -hydroxy-déhydroandrostérone. Nous comptons effectuer la synthèse de ce composé lors de travaux ultérieurs.

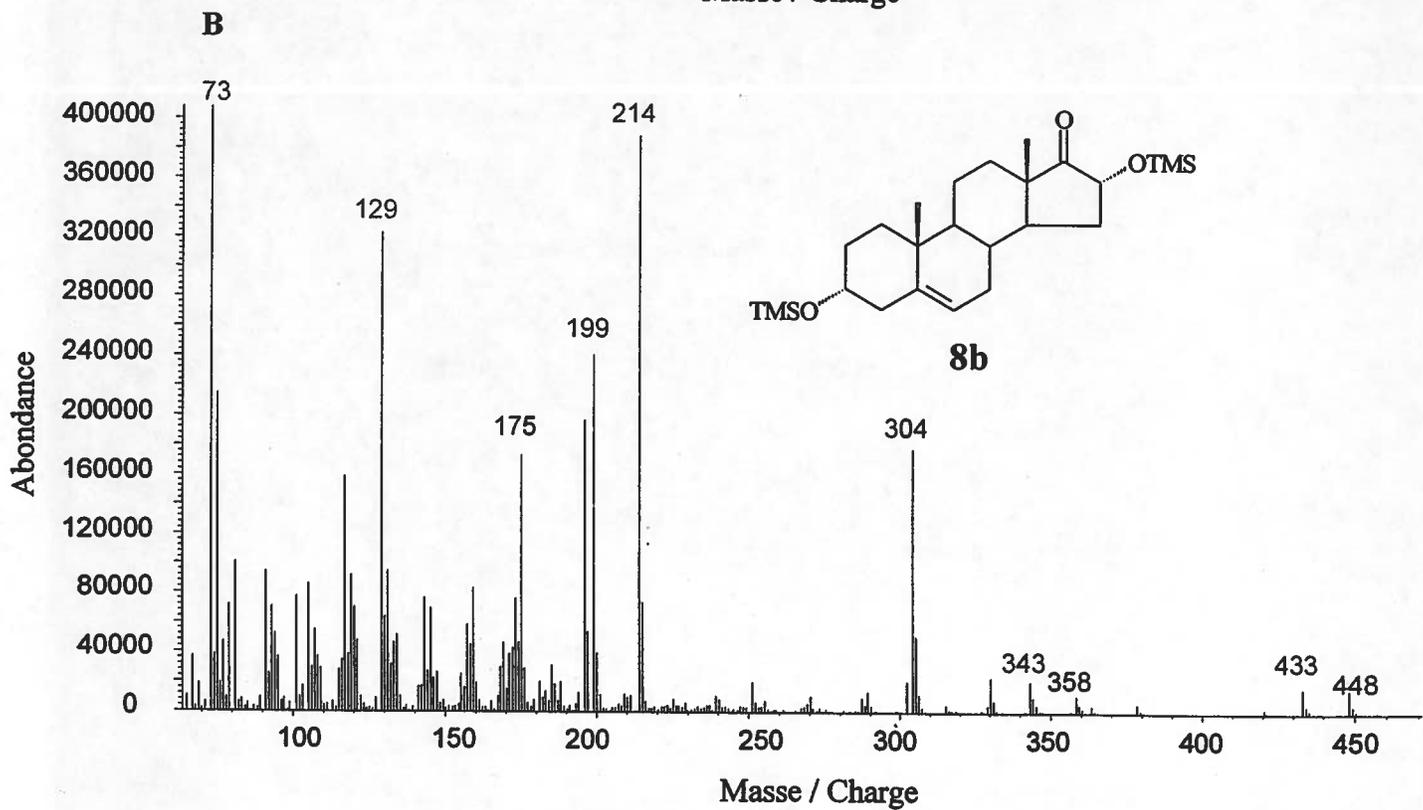
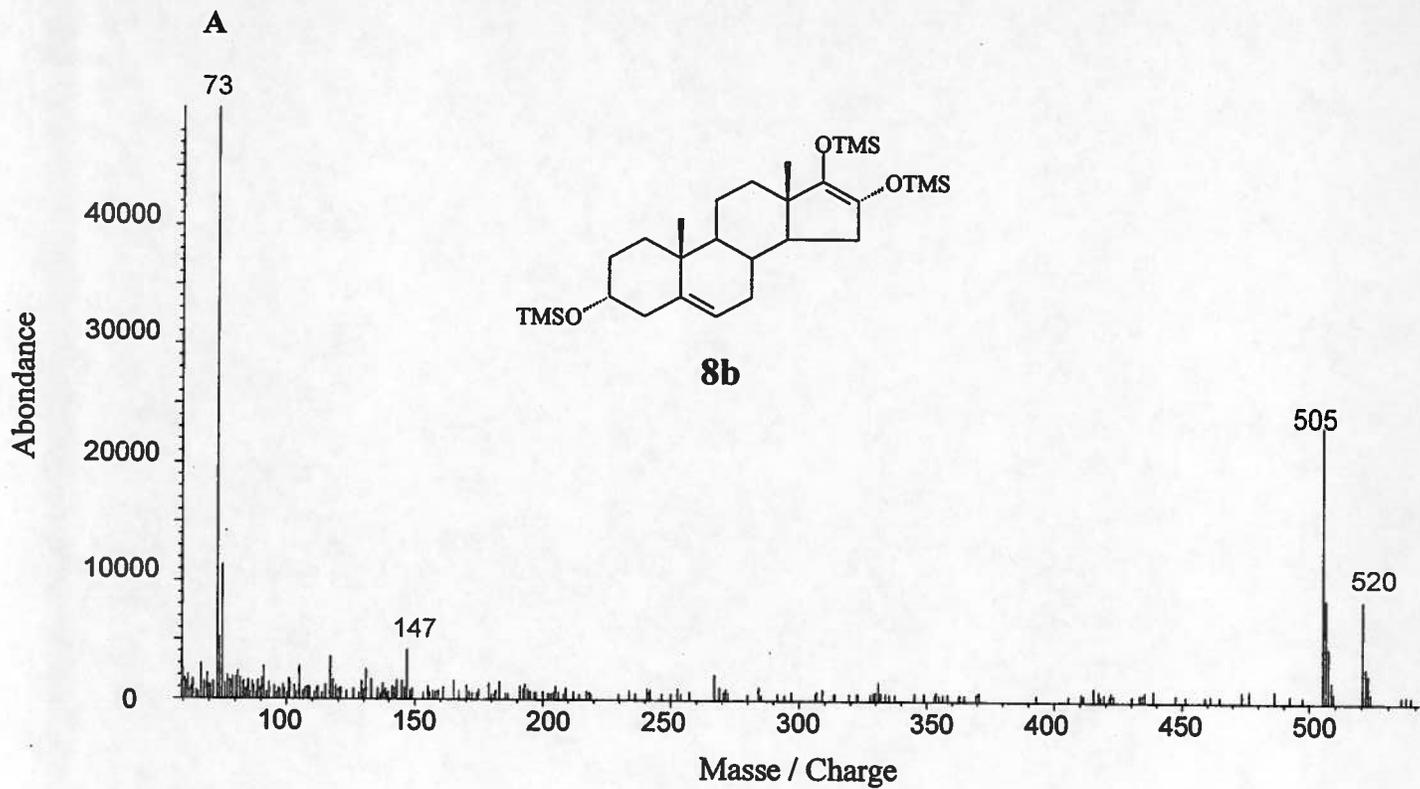


Figure 3.35: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers (A) et TMS-éthers (B) de l'androst-5-ène-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one.

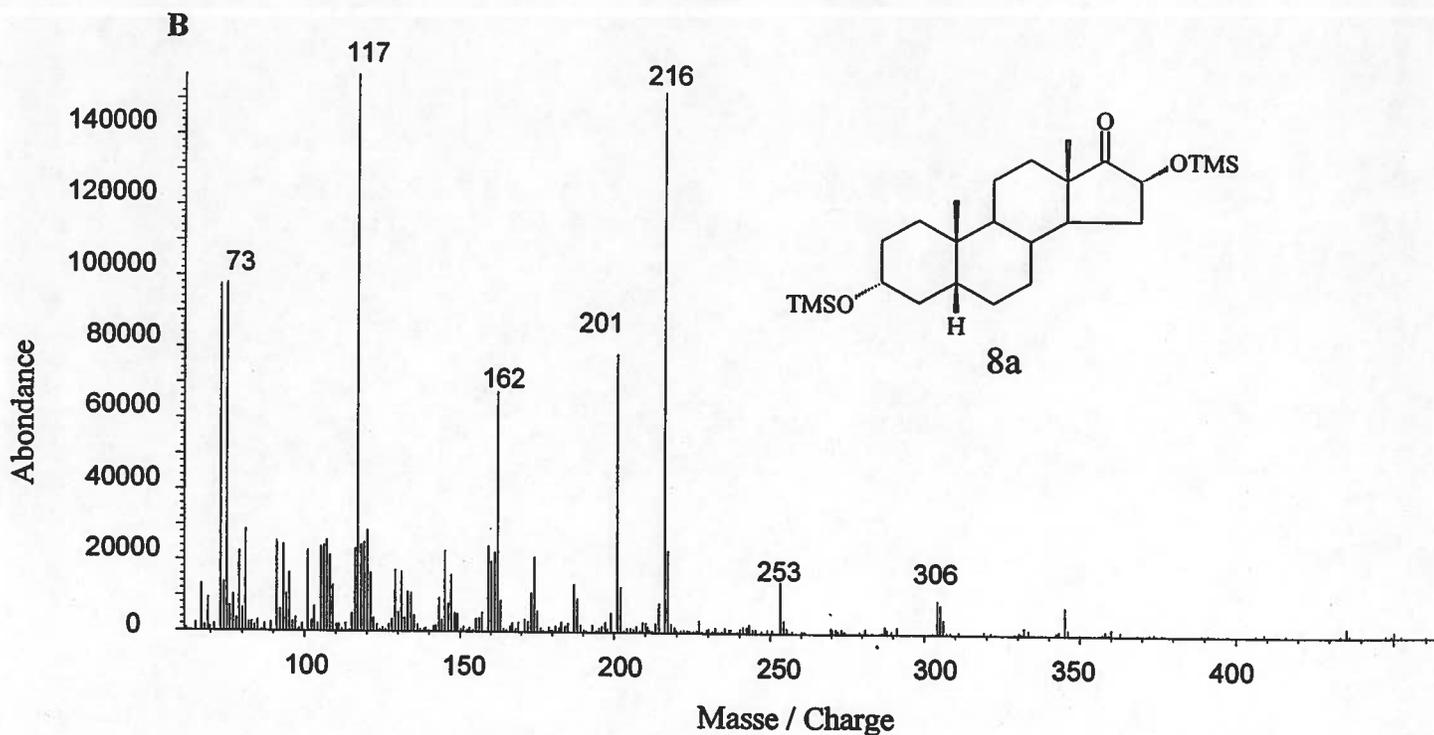
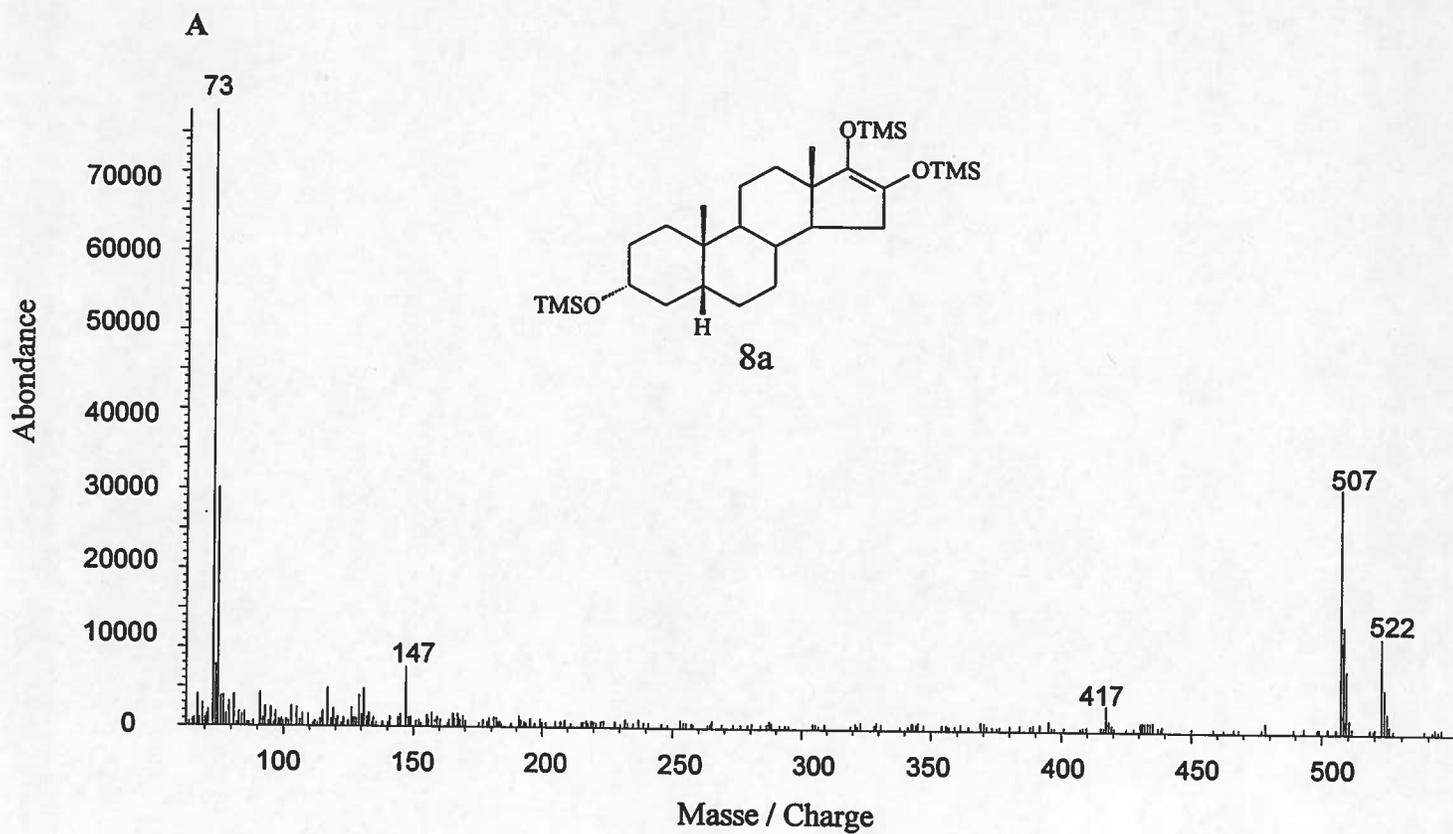


Figure 3.36: Spectres de masse des dérivés TMS-énols, TMS-éthers (A) et TMS-éthers (B) du 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-one.

Le spectre de masse de l'inconnu 8a dérivé TMS-énol, TMS-éther (figure 3.36) montrant les ions à  $m/z$  522 [ $M^+$ ], 507 [ $M-CH_3$ ] et 147 [ $TMSO=Si(CH_3)_2^+$ ] nous indique la présence d'une cétone en C-17 et d'un groupement alcool en C-16. Le groupement alcool en C-3 a la conformation  $\alpha$  puisque ce stéroïde n'est présent que sous la forme de glucuroconjugués. La comparaison du temps de rétention et du spectre de masse du dérivé TMS-énol, TMS-éther de notre analyte à celui du standard authentique de  $5\beta$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one nous confirme la structure.

Suite à l'analyse du profil urinaire des stéroïdes tri-oxygénés chez une population référence de 63 hommes, nous constatons que le profil est toujours similaire à celui du volontaire présenté à la figure 3.37. Il y a toujours un rapport 2 pour 1 entre les pics de la  $11\beta$ -hydroxy-androstérone (5) et de la  $11\beta$ -hydroxy-étiocholanolone (6) (à  $m/z$  de 522) alors que les intensités de la  $16\alpha$ -hydroxy-étiocholanolone (8a) (à  $m/z$  de 507), de la  $16\alpha$ -hydroxy-DHA (8b) (à  $m/z$  de 505) et de la  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (9) (à  $m/z$  de 507) sont approximativement les mêmes. Quant à la  $7\beta$ -hydroxy-DHEA (7), elle est toujours minoritaire et co-élue partiellement avec le pic 8. Suite à l'administration de DHEA, le profil urinaire des stéroïdes tri-oxygénés subit de nombreuses variations tel qu'illustré aux chromatogrammes présentés aux figures 3.37 à 3.39. Ceux-ci ont été générés en mode de balayage continu et seuls les ions caractéristiques à  $m/z$  522, 507, 520, 505, 430 et 435 (standard interne) y sont présentés. Tout d'abord, l'intensité des pics de  $7\beta$ -hydroxy-DHEA (7) et  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (9) augmente drastiquement alors qu'une suppression à la fois des pics 5 et 6 est observée. Ces quatre stéroïdes tri-oxygénés sont de retour à la normale près de 24 heures après l'administration. Pour ce qui est du pic 8, composé de la  $16\alpha$ -hydroxy-étiocholanolone (8a) et de la  $16\alpha$ -hydroxy-DHA (8b), il est dans un rapport un pour un avec le  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone (9) dans les trois heures suivant la dose. Par la suite, le pic 9 diminue graduellement alors que le pic 8 reste stable. Près de 51 heures sont nécessaires afin que le pic 8 retourne à des niveaux dans la norme. En examinant attentivement les ions du pic 8, nous pouvons constater qu'à la fois l'ion à  $m/z$  505 de la  $16\alpha$ -hydroxy-DHA (8b) et l'ion à  $m/z$  507 de la  $16\alpha$ -hydroxy-étiocholanolone (8a) augmentent dans les 2,5 premières heures et que seul l'ion à  $m/z$  505 est de retour à la normale après 23,5 heures. L'ion à  $m/z$  507, quant à lui,

subit une seconde hausse qui persistera jusqu'à 51 heures suite à la deuxième dose. Ainsi, le deuxième pic de  $16\alpha$ -OH-étiocholanolone (8a) proviendrait de la seconde voie métabolique expliquée plus tôt tout comme son précurseur, l'étiocholanolone sous la forme libre.

**Tableau 13**

**Identité de métabolites urinaires tri-oxygénés de la DHEA présents dans la fraction glucuronide chez l'homme**

Numéro	Stéroïde
<u>5</u>	$5\alpha$ -androstane- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-one
<u>6</u>	$5\beta$ -androstane- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-one
<u>7</u>	androst-5-ène- $3\beta,7\beta$ -diol-17-one
<u>8a</u>	$5\beta$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one
<u>8b</u>	androst-5-ène- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one
<u>9</u>	$5\alpha$ -androstane- $3\alpha,16\alpha$ -diol-17-one

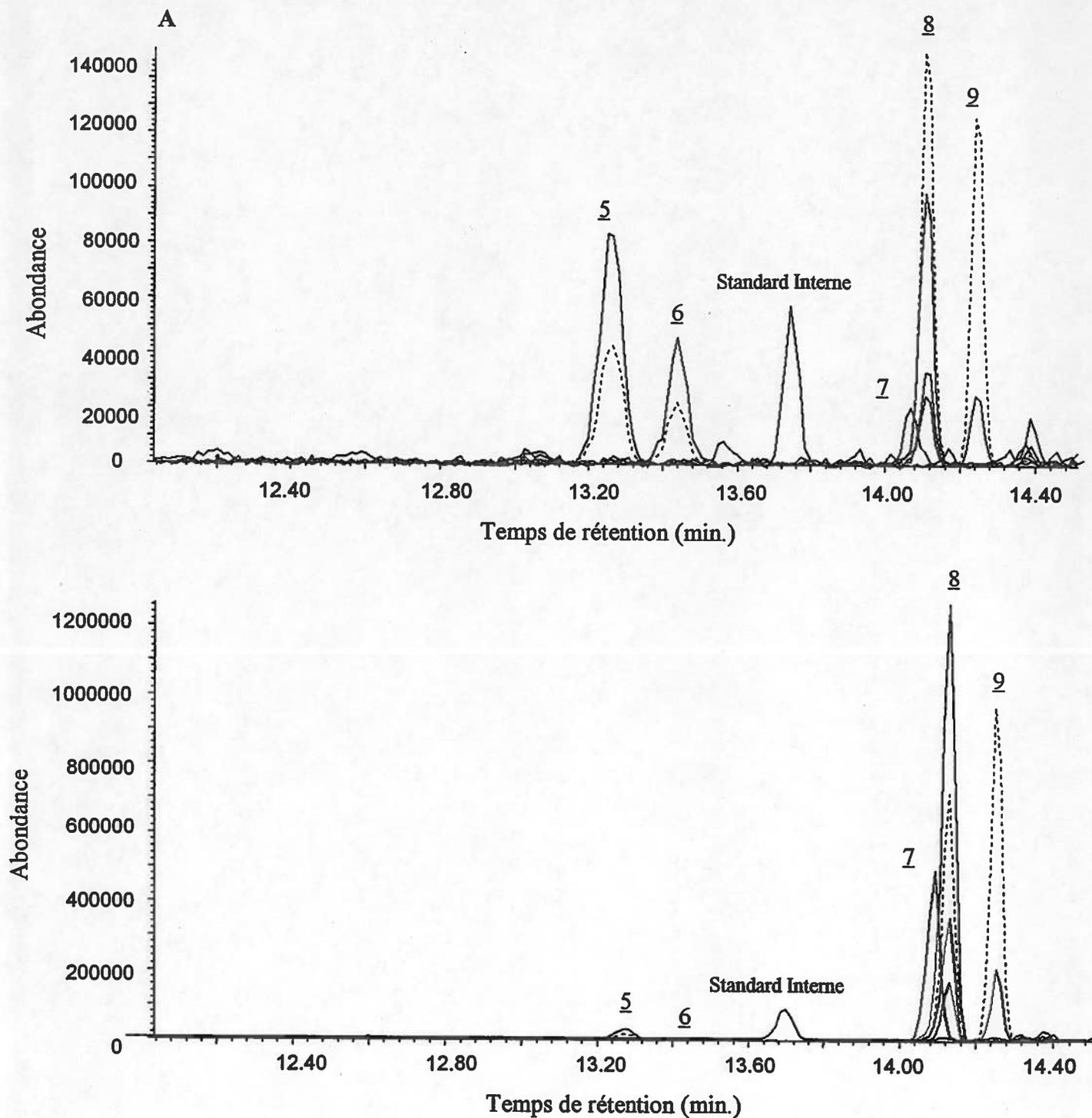


Figure 3.37: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de glucuronides de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( à  $m/z$  522, 507 (en pointillé), 520, 505, 430 et 435 ) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis au temps zéro (A) et 2.5 heures (B) suite à l'administration orale de la première dose de 200mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.

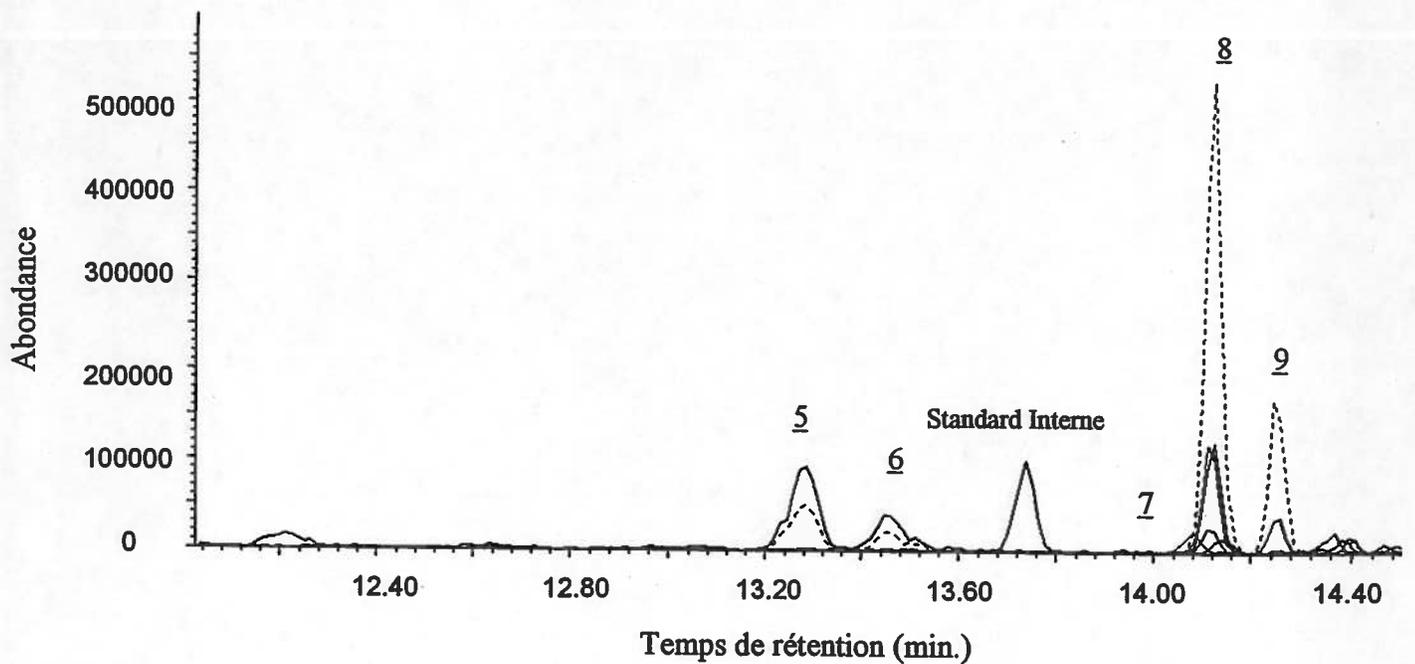
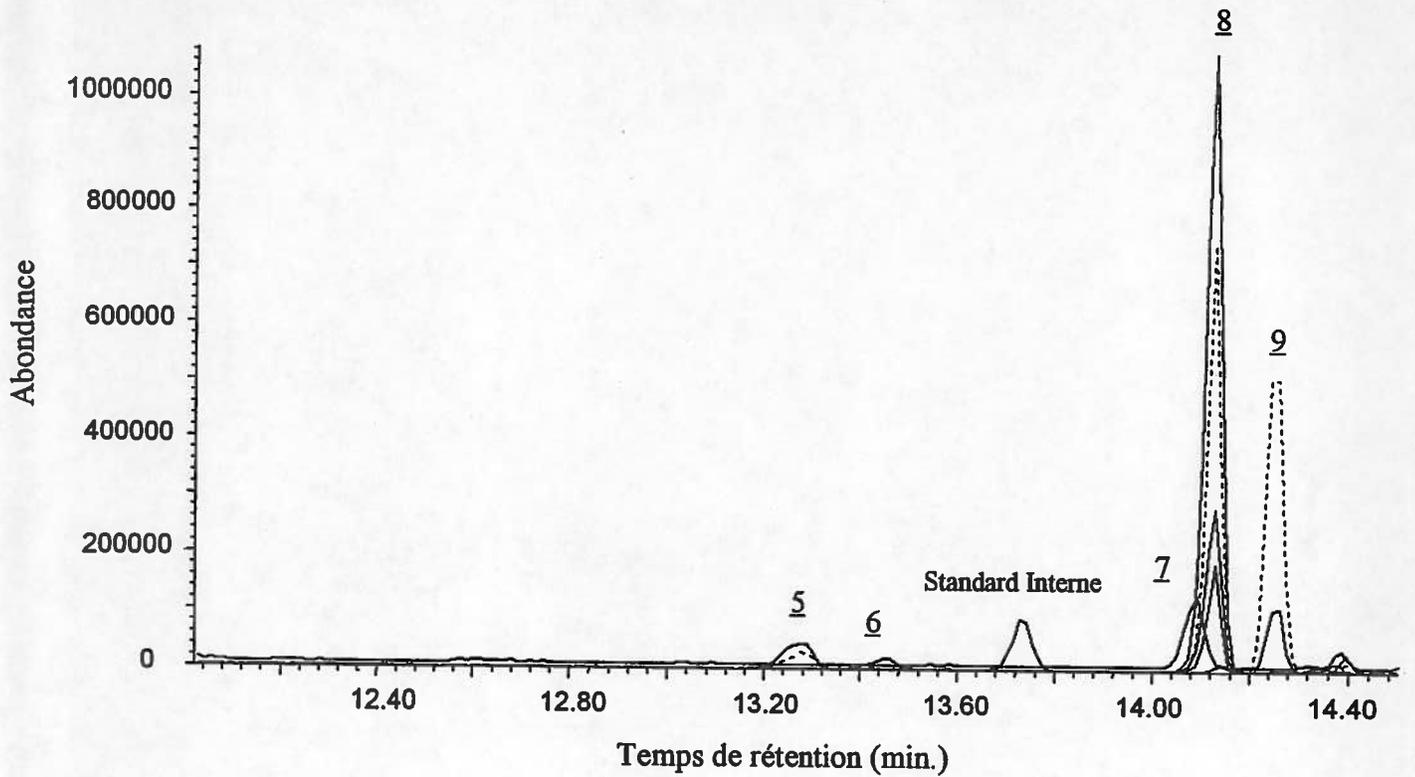


Figure 3.38: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de glucuronides de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( à  $m/z$  522, 507 (en pointillé), 520, 505, 430 et 435 ) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 7.5 (A) et 23.5 heures (B) suite à l'administration orale de la première dose de 200mg de déhydroépiandrostérone à un volontaire sain.

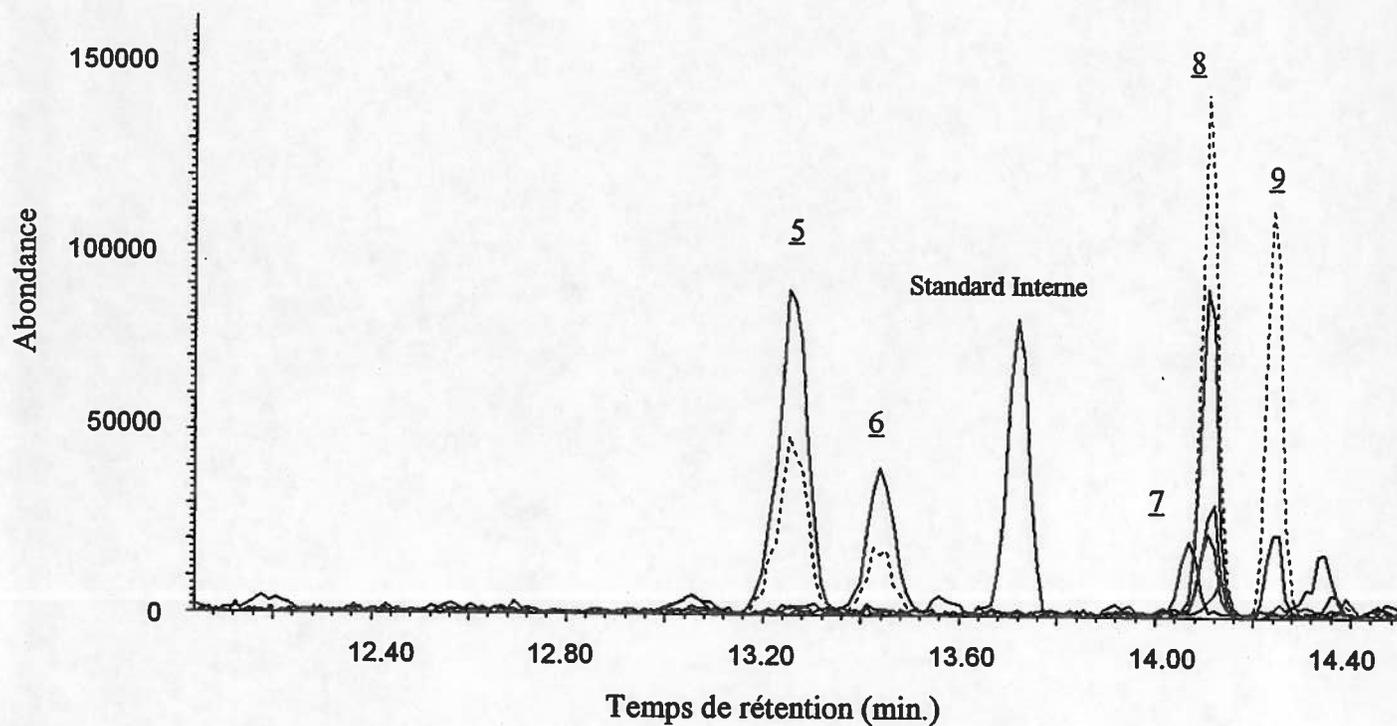


Figure 3.39: Chromatogrammes des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de glucuronides de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( à  $m/z$  522, 507 (en pointillé), 520, 505, 430 et 435 ) extraits du chromatogramme intégral d'échantillons urinaires recueillis 51 heures suite à l'administration orale de la deuxième dose de 200mg de déhydroépiandrosterone à un volontaire sain.

Suite à la prise de DHEA, les concentrations urinaires en  $7\beta$ -OH-DHEA,  $16\alpha$ -OH-étiocholanolone,  $16\alpha$ -OH-DHA et en  $16\alpha$ -OH-androstérone augmentent alors que les niveaux de  $11\beta$ -OH-androstérone et de  $11\beta$ -OH-étiocholanolone diminuent. La glucuronyltransférase serait très stéréosélective en C-7 puisqu'aucune trace de  $7\alpha$ -OH-DHEA n'est retrouvée dans la fraction glucuronide contrairement à son isomère. Vingt-quatre heures sont nécessaires afin que les concentrations en  $16\alpha$ -OH-androstérone, en  $16\alpha$ -OH-DHA et en  $7\beta$ -OH-DHEA retournent à leurs valeurs initiales alors que pour la  $16\alpha$ -OH-étiocholanolone, ce laps de temps est de 51 heures. Tout comme chez les sulfoconjugués, les signes d'utilisation de DHEA sont évidents à court terme alors qu'à long terme (plus de 24 heures), seuls les effets sur les niveaux de  $16\alpha$ -OH-étiocholanolone, de  $11\beta$ -OH-androstérone et de  $11\beta$ -étiocholanolone semblent persistants.

Il est intéressant de noter que suite à la prise de DHEA, les stéroïdes tri-oxygénés ayant un groupement alcool en C- $16\alpha$  sont affectés différemment selon qu'ils sont sulfoconjugués ou glucuroconjugués. Dans la fraction sulfate, on note une suppression de la  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone et de la  $16\alpha$ -hydroxydéhydroépiandrostérone alors que les concentrations urinaires en  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone,  $16\alpha$ -hydroxyétiocholanolone et  $16\alpha$ -hydroxydéhydroandrostérone augmentent dans la fraction glucuronide suite à l'administration de ce précurseur de la testostérone. Cette suppression des sulfates de stéroïdes hydroxylés en C- $16\alpha$  concorde parfaitement avec une importante hausse des niveaux de  $7\alpha$ - et  $7\beta$ -hydroxy-DHEA. Nous en déduisons donc qu'en présence de concentrations supra-physiologiques de DHEA dans l'organisme, la formation de métabolites sulfoconjugués hydroxylé en C-7 est favorisée au détriment de la position C- $16\alpha$ . De plus, il est intéressant de noter que les concentrations de la  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone augmentent dans la fraction glucuronide et diminuent simultanément dans la fraction sulfate. Tout comme pour le glucuronide de  $16\alpha$ -hydroxyétiocholanolone, nous croyons que le précurseur direct de la  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone sous la forme glucuronide serait l'androstérone. Ainsi, suite à l'administration de DHEA, la hausse des niveaux de glucuronide de  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone serait attribuable à l'augmentation de la production métabolique d'androstérone. Pour ce qui est de la forme sulfate, il nous est difficile d'expliquer la suppression de l'excrétion de la  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone. La seule hypothèse avancée est que la production en sulfate de  $16\alpha$ -hydroxyandrostérone soit intimement liée à celle en  $16\alpha$ -hydroxy-DHEA et

que la suppression de cette dernière mènerait à une baisse de son excrétion urinaire. Il nous est également impossible pour le moment d'expliquer les faibles niveaux de  $16\alpha$ -hydroxyétiocholanolone sulfoconjuguée dans le milieu urinaire.

### 3.5.3. Étude des signes d'utilisation de la DHEA chez des urines d'athlètes ayant un TG/EG élevé

Les études effectuées suite à la prise de deux doses de DHEA *per os* n'ont pas démontré d'augmentation significative du ratio TG/EG. Bowers (1998) a observé une hausse significative de la valeur du ratio après plusieurs doses. Nous nous sommes donc intéressés à vérifier chez la population d'athlètes dont les échantillons ont des TG/EG élevés (positifs et négatifs), la présence des indicateurs de l'administration de DHEA. Il s'agit en partie des mêmes urines que celles traitées à la section 3.5.1. Il faut noter que cette étude n'est effectuée qu'à titre indicatif, la validation des conclusions ne pouvant être faite.

Dans un premier temps, nous avons comparé les concentrations des stéroïdes sulfoconjugués et glucuroconjugués aux distributions de la population de référence. Comme mentionné plus tôt, l'administration de DHEA affecte les concentrations urinaires et mène à des irrégularités quant à leurs relations avec la gravité spécifique. Aucun signe d'utilisation de ce précurseur n'a été détecté à l'aide de l'approche quantitative.

Nous avons également analysé le profil d'excrétion des stéroïdes tri-oxygénés dans la fraction sulfate de chacune des urines. Dans 8 de ces 58 urines, nous avons observé des profils d'excrétion similaires à ceux résultant de l'administration de DHEA. Dans tous les cas, les rapports entre le sulfate de  $7\beta$ -OH-DHEA et la  $16\alpha$ -OH-androstérone sulfoconjuguée étaient plus élevés qu'à la normale, ce qui serait attribué à une baisse en  $16\alpha$ -OH-androstérone et à une hausse en  $7\beta$ -OH-DHEA. De plus, les niveaux en  $7\alpha$ -OH-DHEA étaient toujours au-dessus des valeurs dites normales et on notait dans certains cas une suppression de la  $16\alpha$ -OH-DHEA. Cinq de ces athlètes avaient été déclarés positifs à cause de leurs TG/EG élevés alors que les trois autres étaient considérés comme négatifs.

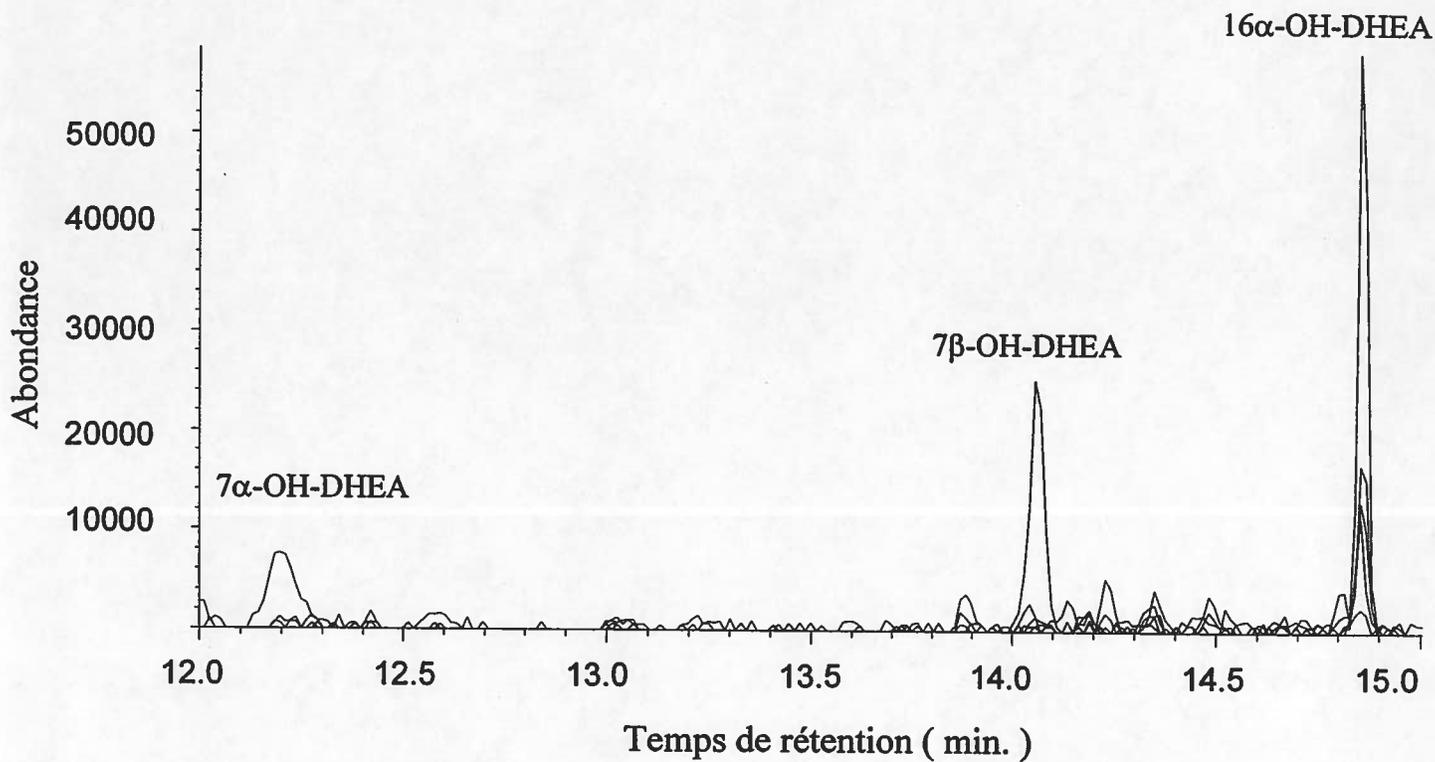


Figure 3.40: Chromatogramme des dérivés TMS-énols, TMS-éthers de sulfates de stéroïdes tri-oxygénés composés d'ions ( $m/z$  à 522, 507, 520, 505 et 430) extraits du chromatogramme intégral d'un échantillon urinaire d'un athlète mâle déclaré négatif en 1996 présentant des signes d'utilisation de DHEA.

Il faut noter que ces trois derniers cas ont été exclus lors de l'étude du profil stéroïdien d'une population d'individus négatifs dont les rapports sont supérieurs à 3 à la section 3.4. Le profil des sulfates de stéroïdes tri-oxygénés de l'un de ces faux-négatifs est présenté à titre d'exemple à la figure 3.40. Son rapport TG/EG est de 5,29 (sous la valeur limite de 6) et son rapport AG/EtG est de 1,71. Pour ce qui est de ses concentrations urinaires, elles ne se démarquent pas de celles de la population référence. Par contre, l'absence de  $16\alpha$ -hydroxy-androstérone et les faibles niveaux de  $16\alpha$ -hydroxy-DHEA jumelés aux concentrations élevées en  $7\alpha$ -hydroxy-DHEA et en  $7\beta$ -hydroxy-DHEA semble suggérer l'administration de déhydroépiandrostérone.

#### 3.5.4. Conclusion

La détermination de concentrations anormalement élevées en androstérone, étiocholanolone et en déhydroépiandrostérone n'est utile que dans les 2,5 à 13 heures suivant l'administration de DHEA alors que les concentrations urinaires anormalement élevées risquent de sortir des distributions de référence. Par ailleurs, l'étude des profils des stéroïdes tri-oxygénés des fractions sulfate et glucuronide semble nous permettre de détecter l'utilisation de la DHEA sur un laps de temps de plus de vingt heures. De plus, l'étude d'une population référence nous confirme que les profils normaux des stéroïdes tri-oxygénés sont similaires chez les athlètes masculins. Les rapports entre la  $7\beta$ -OH-DHEA et le  $16\alpha$ -OH-androstérone sulfoconjugués et entre le  $16\alpha$ -OH-androstérone et le  $16\alpha$ -OH-étiocholanolone glucuroconjugués pourraient constituer des outils diagnostiques pertinents. Il nous reste maintenant à établir chez une plus grande population les seuils et à vérifier la stabilité individuelle des profils. Cette étude sera également effectuée chez les femmes.

## Chapitre 4

### Conclusion

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié le potentiel diagnostique des métabolites sulfoconjugués dans diverses problématiques liées au contrôle antidopage. Tout d'abord, nous avons optimisé les conditions de solvolyse chimique afin d'en maximiser le rendement et la sélectivité et de minimiser les réactions secondaires. Nous avons constaté que le rendement de la solvolyse est optimal en milieu polaire et aprotique. La présence de fortes concentrations en acide et de hautes températures n'augmente que très peu le rendement de la solvolyse alors que la présence de traces d'eau peut nuire au cours de la réaction. Nous en concluons que les meilleures conditions de solvolyse sont les suivantes: 1 mL de tétrahydrofurane (THF) auquel 2  $\mu$ L d'acide sulfurique 4M sont ajoutés et le tout est chauffé à 50°C pendant 60 minutes. Il est à noter que les milieux de méthanolyse étudiés ont mené à la déshydratation de la 17 $\alpha$ -méthyl-testostérone et à la dégradation de la 19-nortestostérone.

Nous avons ensuite appliqué cette méthode de solvolyse chimique à l'étude de problématiques impliquant des sulfates d'androgènes. Nous avons tout d'abord étudié le profil stéroïdien d'une population de référence formée de 63 urines d'athlètes mâles sélectionnées au hasard. Nous avons constaté que moins de 3% des stéroïdes sont sous la forme libre en milieu urinaire, la majorité étant excrétée sous la forme de conjugués. Le type de conjugué est déterminé par la structure de l'androgène. Ainsi, les stéroïdes ayant un groupement alcool en C-3 $\beta$  sont principalement liés à des sulfates alors que la formation de glucuroconjugués est favorisée chez les stéroïdes dont la fonction hydroxyle est en C-3 $\alpha$ , en C-17 $\alpha$  ou en C-17 $\beta$ . Nous avons également étudié une population de 29 échantillons provenant de cas positifs à la testostérone ainsi que 25 échantillons d'athlètes déclarés négatifs dont les rapports TG/EG sont physiologiquement élevés. Les

concentrations en sulfate de testostérone (TS) de ces deux populations sont plus élevées que chez la population référence. Nous croyons que ces niveaux élevés en TS entraîneraient une suppression de l'axe sulfate de biosynthèse des androgènes, ce qui expliquerait la baisse des concentrations en sulfates de DHEA et d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol chez ces deux populations. Des baisses en épitestostérone glucuroconjuguée pour ces deux même groupes ont également été observées. Dans le cas des positifs, cette diminution serait due à la suppression de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire suite à l'administration de testostérone exogène. Quant aux individus dont les TG/EG sont physiologiquement élevés, nos résultats appuient l'hypothèse de Dehennin selon laquelle cette baisse serait attribuable à une modification du métabolisme hépatique au profit de métabolites autres que l'épitestostérone glucuroconjuguée (Dehennin et Matsumoto, 1993), cette baisse entraînerait une hausse du rapport TG/EG.

C'est dans l'objectif d'éviter tout faux-positif relié à des TG/EG naturellement élevés que Dehennin et son équipe ont proposé quatre sondes ponctuelles: TG/(EG+ES), EG/ES, TS/ES et TG/5 $\Delta$ 3 $\beta$ 17 $\alpha$ G (Dehennin, 1994; Dehennin et Pérès, 1996). Après avoir évalué le potentiel discriminatoire de ces rapports à l'aide de trois populations, nous en concluons qu'aucune de ces quatre sondes ne permet de distinguer clairement entre les positifs et les individus ayant un TG/EG physiologiquement élevé. Puisque l'utilisation de ces sondes secondaires est inutile, nous croyons que l'étude du rapport TG/EG dans le temps, sous la forme d'étude longitudinale, s'avère être encore la meilleure approche.

Nous avons également étudié les effets de la déhydroépiandrostérone (DHEA) sur le profil stéroïdien et la production de métabolites sulfoconjugués caractéristiques. Nous croyons que deux voies métaboliques parallèles seraient impliquées lors du métabolisme de ce précurseur de la testostérone. La première voie n'impliquerait que des stéroïdes sous la forme libre et mènerait à une première hausse des concentrations urinaires en des 5 $\alpha$ -androstanes (androstérone et 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) et en 5 $\beta$ -androstanes (étiocholanolone et 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) dans les 5 premières heures suivant la dose de DHEA. La seconde voie, impliquant les sulfates de DHEA, d'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et de 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ainsi que la 5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol et la

5 $\beta$ -dihydrotestostérone sous la forme libre, entraînerait uniquement une hausse des 5 $\beta$ -androstanes après 13 heures. D'un point de vue diagnostique, la détermination de concentrations anormalement élevées en androstérone, étiocholanolone et DHEA n'est utile que dans les 2,5 à 13 heures suivant la dose, soit lorsqu'elles risquent de sortir des distributions de référence.

Par ailleurs, nous avons procédé à l'identification des stéroïdes tri-oxygénés suivants: la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, la 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA, la 4 $\xi$ -hydroxy-DHEA, la 16 $\alpha$ -hydroxy-androstérone et la 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA dans la fraction sulfate et la 11 $\beta$ -hydroxy-androstérone, la 11 $\beta$ -hydroxy-étiocholanolone, la 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA, la 16 $\alpha$ -hydroxy-étiocholanolone, la 16 $\alpha$ -hydroxy-androstérone et la 16 $\alpha$ -hydroxy-déhydroandrostérone dans la fraction glucuronide. Nos travaux sont, à notre connaissance, les premiers à traiter de l'excrétion urinaire de métabolites hydroxylés en C-4 et C-7 chez l'humain suite à l'administration de DHEA. L'étude des profils de stéroïdes tri-oxygénés des fractions sulfate et glucuronide semble permettre de détecter l'utilisation de la DHEA sur un laps de temps de plus de vingt heures. Les rapports entre la 7 $\beta$ -OH-DHEA et le 16 $\alpha$ -OH-androstérone sulfoconjugués et entre le 16 $\alpha$ -OH-androstérone et le 16 $\alpha$ -OH-étiocholanolone glucuroconjugués pourraient constituer des outils diagnostiques pertinents. À l'aide de ces outils, nous avons pu détecter chez 8 des 58 athlètes ayant une TG/EG supérieur à 3 ce qui semblait être des signes d'utilisation de DHEA. Il s'agit d'une toute nouvelle approche jamais abordée dans le monde du contrôle antidopage. Elle pourrait s'avérer particulièrement intéressante dans les cas d'utilisation d'autres anabolisants androgènes naturels tels l'androstènedione, la 5 $\alpha$ -dihydroxytestostérone et l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Nous comptons nous y attarder lors de travaux ultérieurs.

## **Références**

AYOTTE, C., D. Goudreault et A. Charlebois. 1996. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. J. Chromatogr., vol. 687, p. 3-25

AXELSON, M., B.L. Sahlberg et J. Sjövall. 1981. Analysis of profiles of conjugated steroids in urine by ion-exchange separation and gas chromatography mass spectrometry. J. Chromatogr., vol. 224, p. 355-370

BATTS, B.D., 1966, Alkyl hydrogen sulphates. Part 1. Hydrolysis in moist dioxan solution. J. Chem. Soc., B, Phys. Org. vol. 6, p. 547

BI, H. et R. Massé. 1992. Studies on anabolic steroids 12. Epimerization and degradation of anabolic 17 $\beta$ -sulfate-17 $\alpha$ -methyl steroids in human: Qualitative and quantitative GC/MS analysis. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., vol. 42, p. 533-546

BIRKE, G. et L.O. Plantin. 1954. Studies on urinary 17-ketosteroids. Acta Med. Scand., suppl. 291, p. 67

BLANCHARD, Y. et B. Robaire. 1997. Le mode d'action des androgènes et la 5 $\alpha$ -réductase. Médecine / Science, vol. 13, p. 467-473

BOWERS, L.D., 1998. Communication personnelle.

BOWERS, L.D. et Sanaullah. 1996. Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high performance liquid chromatography mass spectrometry. J. Chromatogr., vol. 687, p. 61-68

BRADLOW, H.L., N.T. Telang, D.W. Sepkovic et M.P. Osborne. 1996. 2-Hydroxyestrone : the good estrogen. J. Endocrinol., vol. 150, p. s259-s265

BRADLOW, H.L., D.L. Davis, G. Lin, D. Sepkovic et R. Tiwari. 1995. Effects of pesticides on the ratio of  $16\alpha/2$ -hydroxyestrone : A biologic marker of breast cancer risk. Environ. Health Perspect., vol. 103 (supp. 7, p. 147-150

BROOKS, R.V., G. Giuliani. 1964. Epitestosterone: isolation from human urine and experiments on possible precursors. Steroids. vol. 4, p. 101-116

BROOKS, R.V., G. Jeremiah, W.A. Webb et M. Wheeler. 1979. Detection of anabolic steroids administration to athletes. J. Steroid Biochem., vol. 11, p. 913-917

BURSTEIN, S. et S. Lieberman. 1958a. Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedure. J. Biol. Chem., vol. 233, p. 331

BURSTEIN, S. et S. Lieberman. 1958b. Kinetics and mechanism of solvolysis of steroid hydrogen sulfates. J. Am. Chem. Soc., vol. 80, p. 5232

BUTENANDT, A. 1931. Über die chemische Untersuchung des Sexualhormons, Z. Angew. Chem., vol. 44, p. 905-908

BUTENANDT, A., G. Hannisch. 1935. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosteron, ein Weg zur Darstellung des Testosteron aus Cholesterin. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., vol. 237, p. 89-97

CARLSTRÖM, K., E. Palonek, M. Garle, H. Oftebro, J. Stranghelle et I. Björkhem. 1992. Detection of testosterone administered by increased ratio between serum concentrations of testosterone and  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone. Clin. Chem., vol. 38, p. 1779-1784

CATLIN, D.H., C.K. Hatton, S.H. Starcevic. 1997. Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athlete's urine. Clin. Chem., vol. 43, p. 1280-1288

COMITÉ INTERNATIONAL OLYMPIQUE. 1995. Code médical du C.I.O. et document explicatif.

DAVID, K., E. Dingemans, J. Freud et E. Laqueur. 1935. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., vol. 233, p. 281-282

DE LA TORRE, X., J. Segura, Z. Yang, Y. Li et M. Wu. 1997. Testosterone detection in different ethnic groups. dans M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke et S. Rauth, Recent Advances in Doping Analysis (4) -Proceedings of the 14<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 71-90

DEHENNIN, L. et R. Scholler. 1990. Dépistage de la prise de testostérone comme anabolisant chez les adolescents par la détermination du rapport des excréments urinaires de testostérone et d'épitéstostérone. Pathol. Biol., vol. 38, p. 920-922

DEHENNIN, L.. 1993. Secretion by the human testis of epitestosterone, with its sulfoconjugate and precursor androgen 5-androstene-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -diol. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. vol. 44, p. 171-177

DEHENNIN, L., A.M. Matsumoto. 1993. Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alteration of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sport. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. vol. 44, p. 179-189

DEHENNIN, L.. 1994a. Detection of simultaneous self-administration of testosterone and epitestosterone in healthy men. Clin. Chem., vol. 40, p. 106-109

DEHENNIN, L.. 1994b. On the origin of physiologically high ratios of urinary testosterone to epitestosterone: consequences for reliable detection of testosterone administration by male athletes. J. Endocrinol., vol. 142, p. 353-360

DEHENNIN, L. et G. Pérès. 1996. Plasma and urinary markers of oral testosterone misuse by healthy men in presence of masking epitestosterone administration. Int. J. Sports Med., vol. 17, p. 315-319

DEHENNIN, L., P. Lafarge, Ph. Dailly, B. Bailloux et J.-P. Lafarge. 1996. Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: a simple screening procedure using GC/MS. J. Chromatogr., vol. 687, p. 85-91

DEHENNIN, L., M. Ferry, P. Lafarge, G. Pérès et J.P. Lafarge. 1998. Oral administration of dehydroepiandrosterone to healthy men: Alteration of the urinary androgen profile and consequences for the detection of abuse in sport by gas chromatography mass spectrometry. Steroids. vol. 63, p. 80-87

DESLYPERE, J.P., P.W. Wiers, A. Sayed et A. Vermeulen. 1981. Urinary excretion of androgen metabolites, comparison with excretion of radioactive metabolites after injection of (4-C<sub>14</sub>) testosterone. Influence of age. Acta Endocrinol. vol. 96, p. 265-272

DIEKMAN, J. et C. Djerassi. 1967. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXVI. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. J.Org.Chem., vol. 32, p. 1005-1012

DONIKE, M., K.R. Barwald, K. Klostermann, W. Schänzer et J. Zimmermann. 1982. Nachweis von exogenen testosteron. dans H. Heck, W. Hollmann et H. Liesen. Leistung und Gesundheit. Köln, Deutcher arzte-Verlag. p. 283-300

DONIKE, M., S. Rauth et B. Sample. 1993. Excretion of ephedrine and endogenous steroids under conditions of controlled water intake and of water diuresis. dans M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke et S. Rauth, Recent Advances in Doping Analysis -Proceedings of the 10<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 163-176

DONIKE, M., S. Rauth, U. Mareck-Engelke, H. Geyer et N. Nischke. 1994. Evaluation of longitudinal studies, the determination of subject based reference ranges of the testosterone/epitestosterone ratio. dans M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke et S. Rauth, Recent Advances in Doping Analysis (1) -Proceedings of the 11<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 33-39

DONIKE, M., S. Rauth et A. Wolansky. 1993. Reference ranges of urinary endogenous steroids determined by GC/MS. dans M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke et S. Rauth, Recent Advances in Doping Analysis (1) -Proceedings of the 10<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 69-86

DUTTON, G.J., 1978. Developmental aspects of drug conjugation with special reference to glucuronidation. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., vol. 18, p. 17-35

FRANKE, W.W. et B. Berendonk. 1997. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. Clin. Chem., vol. 43, p. 1267-1279

GARLE, M., R. Ocka, E. Palonek et I. Björkhem. 1996. Increased urinary testosterone / epitestosterone ratios found in Swedish athletes in connection with a national control program, Evaluation of 28 cases. J. Chromatogr., vol. 687, p. 55-59

GOWER, D.B., 1979. Steroid hormones. London. Croom Helm ltd publishers.

HECHTER, O., A. Grossman et R.T. Chatterton Jr. 1997. Relationship of dehydroepiandrosterone and cortisol in disease. Medical Hypothesis, vol. 49, p. 85-91

HORNING, S. et W. Schänzer. 1997. Steroid screening using GC/HRMS. dans M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke et S. Rauth, Recent Advances in Doping Analysis (4) -Proceedings of the 14<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 261-270

HORTON, R. et J.F. Tait. 1996. In vivo conversion of dehydroepiandrosterone to plasma androstenedione and testosterone in man. J. Clin. Endocrinol., vol. 27, p. 79-88

HOUGHTON, E., L. Grainger, M.C. Dumasia, P. Teale, L.S. Jackson, M. Close. 1990. Some recent developments in steroid analysis: A comparison of enzyme hydrolysis / solvolysis vs methanolysis for the hydrolysis of conjugates. dans Proceedings of the 8<sup>th</sup> international conference of racing analysts and veterinarians, Harare, p. 137-144

HOUGHTON, E., L. Grainger, M.C. Dumasia, P. Teale. 1992. Application of GC/MS to steroid analysis in equine sports: Problems with enzyme hydrolysis. Org. Mass Spectrom., vol. 27, p. 1061-1070

ISAACS, J.T., I.R. McDermott et D.S. Coffey. 1979. Characterization of two new enzymatic activities of the rat ventral prostate: 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol 6 $\alpha$ -hydroxylase and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol 7 $\alpha$ -hydroxylase. Steroids, vol. 33, p. 675-692

JACOBSON, G.M. et S. Lieberman. 1962. Studies on the chemical cleavage of the urinary glucuronosides of the 17-ketosteroids. J. Biol. Chem., vol. 237, p. 1469-1475

JACOLOT, F., F. Berthou, Y. Dreano, J.P. Bercovici et H.H. Floch. 1981. *In vivo* metabolism of <sup>14</sup>C labelled 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. J. Steroid Biochem., vol. 14, p. 663-669

JÄNNE, O., 1970. Quantitative determination of neutral steroid mono and di-sulfates in human urine. Clin. Chim. Acta, vol. 29, p. 529-540

JÄNNE, O., 1971. Identification and quantification of C<sub>19</sub> and C<sub>21</sub> steroid triol sulfates in adult human urine. J. Steroid Biochem., vol 2, p.33-41

JAYLE, M.F. et J.R. Pasqualini. 1974. dans H.U. Bergmeyer, Method of enzymatic analysis. New York, Verlag Chemie Weinheim

KICMAN, A.T., R.V. Brooks, S.C. Collyer, D.A. Cowan et M. Nanjee. 1990. Criteria to indicate testosterone administration. Br. J. Sports Med., vol. 24, p. 253-264

KICMAN, A.T., H. Oftebro, C. Walker, N. Norman et D.A. Cowan. 1993. Potential use of ketoconazole in a dynamic endocrine test to differentiate between biological outliers and testosterone use by athletes. Clin. Chem., vol. 39, p. 1798-1803

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

LONGSCOPE, C.. 1996. Dehydroepiandrosterone metabolism. J. Endocrinol., vol. 150, p. s125-s127

LUDWIG, H., M. Spitteller, H.J. Egger et G. Spitteller. 1977. Correlation of emotional stress and physical exertions with urinary metabolite profile. Isr. J. of Chem., vol. 16, p. 7-11

MASSÉ, R., C. Ayotte, R. Dugal. 1989. Studies on anabolic steroids: 1. Integrated methodologic approach to the GC/MS analysis of anabolic steroid metabolites in urine. J. Chromatogr., vol. 489, p. 23-50

MORFIN, R., S. Di Stefano, J.F. Charles et H.H. Floch. 1977. Precursors for  $6\xi$  and  $7\alpha$ -hydroxylation of  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol by normal and hyperplastic prostate. Biochimie, vol. 59, p. 637-644

MORFIN, R. et G. Courchay. 1994. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as precursors of native 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., vol. 50, p. 91-100

MORFIN, R., I. Leav, J.C. Orr, D. Picart et P. Ofner. 1980.  $C_{19}$ -steroid metabolism by canine prostate, epididymes and perianal glands. Application of the twin-ion technique of GC/MS to establish  $7\alpha$ -hydroxylation. Eur. J. Biochem., vol. 109, p. 119-127

NORET, A., 1981. Le dopage. Paris. Éditions Vigot

OFTEBRO, H.. 1992. Evaluating an abnormal urinary steroid profile. The Lancet. vol. 339, p. 941-942

ORENTREICH, N., J.L. Brind, R.L. Rizer et J.H. Vogelman. 1984. Age changes and sex differences in serum DHEA sulfate concentrations throughout adulthood. J. Clin. Endocrinol. Metab., vol. 59, p. 551-555

PARK, J., S. Park, D. Lho et B. Chung. 1995. Mass spectrometry in sports testing. Dans J. Yinon, Forensic applications of mass spectrometry, Boca Raton, Fl., CRC Series Press, p. 95-128

PFEIFER, P. et G. Spiteller. 1981. Steroid profiles on healthy individuals. J. Chromatogr., vol. 223, p. 21-32

RAYNAUD, E., M. Audran, J.F. Brun, C. Fedou, J.L. Chanal et A. Orsetti. 1992. False-positive cases in detection of testosterone doping. The Lancet, vol. 340, p. 1468-1469

RAYNAUD, E., M. Audran, J.Ch. Pagés, C. Fédou, J.F. Brun, J.L. Chanal et A. Orsetti. 1993a. Determination of urinary testosterone and epitestosterone during pubertal development: A cross-sectional study in 141 normal male subjects. Clin. Endocrinol., vol. 38, p. 353-359

RAYNAUD, E., M. Audran, J.Ch. Pagés, J.F. Brun, C. Fédou, J.L. Chanal et A. Orsetti. 1993b. Étude de l'excrétion urinaire des glucuronides de testostérone et d'épitéstostérone chez l'enfant et l'adolescent. Pathol. Biol., vol. 41, p. 159-163

RUZICKA L., et A. Wettstein. 1935. Synthetische Darstellung des Testis-hormons, Testosteron (Androsten-3-on-17-ol). Helv. Chim. Acta, vol. 18, p. 1264-1275

SCHÄNZER, W. 1996. Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clin. Chem., vol. 42, p. 1001-1020

SCHÄNZER, W. 1997. Metabolism of anabolic androgenic steroids: 5 $\alpha$  and 5 $\beta$ -reduction of 3-keto-4-ene steroids. dans M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke et S. Rauth, Recent Advances in Doping Analysis (4) -Proceedings of the 14<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 185-201

SETCHELL, K.D.R., B. Almé, M. Axelson et J. Sjövall. 1976. The multicomponent analysis of conjugates of neutral steroid in urine by lipophilic ion exchange chromatography and computerised gas chromatography mass spectrometry. J. Steroid Biochem., vol. 7, p. 615-629

SHACKELTON, C.H.L.. 1986. Profiling steroid hormones and urinary steroids. J. Chromatogr., vol. 379, p. 91

SKOOG, D.A. et J.J. Leary. 1992. Principles of Instrumental Analysis. 4<sup>e</sup> Ed., New York, Saunders College Publishing. p. 646

SLOAN, S., D.J. Harvey et P. Vouros. 1971. Interaction and rearrangement of trimethylsiloxy functional groups. The structural significance of the m/e 147 ion in the mass spectra of trimethylsilyl steroidal ethers. Org. Mass Spectrom., vol. 5, p. 789-799

STARKA, L., R. Hampl, M. Hill, O. Lapcik, R. Bilek, R. Petrik. 1997. Epitestosterone in human blood and prostate tissue. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., vol. 35, p. 469-473

STARKA, L., M. Bicikova, R. Hampl. 1989. Epitestosterone, an endogenous antiandrogen?. J. Steroid Biochem., vol. 33, p. 1019-1021

SULCOVA, J., M. Hill, R. Hampl et L. Starka. 1997. Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. J. Endocrinol., vol. 154, p. 57-62

TANG, P.W. et D.L. Crone. 1989. A new method for hydrolysing sulfate and glucuronyl conjugates of steroids. Anal. Biochem., vol. 182, p. 289-294

TRÄGER, L. 1977. Steroidhormone. Biosynthese Stoffwechsel Wirkung. Berlin. Springer-Verlag. p. 166-177

VANDER, A.J., J.H. Sherman, D.S. Luciano et R. Brière. 1995. Physiologie humaine. 3<sup>ième</sup> Édition. Montréal. McGraw-Hill

VANLUCHENE, E., W. Eechaute et D. Vandekerckhove. 1982. Conversion of free 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene steroids by incubation with *Helix Pomatia*. J. Steroid Biochem., vol. 16, p. 701-703

WADE, N. 1972. Anabolic steroids: Doctors denounce them, but athletes aren't listening. Science, vol. 176, p. 1399-1403

WILLIAMS, D.G. 1979. The biochemistry of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase. dans R. Hobkirk. Steroid biochemistry, vol. 1, Boca Raton, Fl., CRC Press, p. 83-110

WILSON, H. et M.B. Lipsett. 1966. Metabolism of epitestosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. vol. 26, p. 902-904

WILSON, J. D. 1995. Androgens. dans J. G. Hardman, A. Goodman Gilman, L. E. Linbird, 9<sup>ième</sup> éd., Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutic, New York, P.B. Molinoff & R.W. Ruddon editors, 1995, p. 1441-1457

YESALIS, C.E., J.E. Wright et J.A. Lombardo. 1993. dans H. Kopera, Anabolic-androgenic steroids towards the year 2000. Vienne. Blackwell-MZV.

ZIMMERMANN, J. 1986. Untersuchungen zum Nachweis von exogenem Gaben von Testosteron. Dissertation. Cologne. Sports University.