

Université du Québec
Laboratoire antidopage - INRS-Santé

Effets de la contamination microbienne sur la stabilité des androgènes en milieu urinaire

Par
Stéphane Lapointe
B.Sc. Chimie (U de M)

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître es sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

Jury d'évaluation

Examineur externe

Dr. Jean-Guy Bisailon

Examineur interne et
codirecteur de recherche

Dr. Michel Sylvestre

Directrice de recherche

Dr. Christiane Ayotte

(21 août 1998)

© droits réservés de Stéphane Lapointe, 1998

Résumé

La découverte et le raffinement des méthodes de synthèse des stéroïdes depuis 1937 a permis l'utilisation de leurs propriétés androgéniques et anabolisantes à des fins thérapeutiques et suprathérapeutiques. La prévention et le traitement des maladies reliées au métabolisme des stéroïdes androgènes anabolisants (AAS) ainsi que le besoin de dépister leur consommation à des fins illicites ont forcé le développement des tests visant à étudier le profil d'excrétion urinaire des stéroïdes en milieu clinique et dans les laboratoires antidopages. L'échantillonnage des urines n'est pas effectué de manière stérile, ce qui augmente les chances de contamination par un grand nombre de micro-organismes. Les conditions de stockage et de transport ne sont pas toujours idéales et peuvent être favorables à l'activité bactérienne qui pourrait causer des dommages à la structure des stéroïdes. L'analyse d'une urine dont les stéroïdes furent dégradés est ou devrait automatiquement être déclarée non valide.

Il est dans l'intérêt des patients, des athlètes et des laboratoires de s'assurer que l'analyse des stéroïdes est représentative de l'état de l'échantillon au moment de la collecte. Pour s'en assurer, on se fie à la présence de deux stéroïdes normalement présents à l'état de trace dans l'urine : les 5(α/β)-androstandiones, et/ou des stéroïdes endogènes dans la fraction libre de l'extraction. En effet, un grand nombre de micro-organismes pouvant contaminer les urines ont la capacité de déconjuguer les stéroïdes sulfo et glucuroconjugués puis oxyder les groupements hydroxyyles, produisant ainsi les androstandiones. Les enzymes impliquées dans ces biotransformations, très répandues dans le règne animal et microbien, sont les 3(α/β) et 17(α/β)-hydrogénases d'hydroxystéroïdes et les réductases.

Très peu d'études avaient été faites au moment de débiter celle-ci sur la stabilité des stéroïdes dans une urine stérile ou contaminée, en fonction de paramètres variables lors de la collecte, du transport et du stockage des échantillons avant l'analyse. De plus, on ne s'entendait pas de manière unanime sur les marqueurs de la dégradation des stéroïdes, ni sur les conditions de rejet de l'analyse d'une urine ayant subi des conditions de transport ou d'entreposage inadéquates. Nous avons décidé d'entreprendre une série d'études comportant quatre volets principaux.

- 1) la stabilité de certains stéroïdes androgènes conjugués d'intérêt en fonction du temps, de la température et du pH.
- 2) l'isolement et l'identification des micro-organismes généralement retrouvés dans les urines d'adultes sains.
- 3) l'étude générale et plus particulière des effets d'une contamination bactérienne sur les stéroïdes d'urines soumises à des conditions favorisant l'activité bactérienne.
- 4) l'étude de l'inhibition de la dégradation des stéroïdes d'urines fortement contaminées.

Nous avons constaté, dans un premier temps, que tous les stéroïdes androgènes sulfo et glucuroconjugués étaient très stables lorsque soumis aux conditions pouvant être imposées à certaines urines avant leur analyse. La seule exception étant la déhydroépiandrostérone (DHEA) sulfoconjuguée. Nous avons recensé les micro-organismes de 177 urines et constaté que plus de 95% étaient contaminées avant l'analyse, généralement par *E. coli* ou une variété de staphylocoques ou d'entérocoques. Nos expériences nous ont aussi permis de soutenir les résultats précédents du groupe de Ayotte et al., 1996 après avoir observé que la dégradation bactérienne des stéroïdes mène généralement à la déconjugaison des stéroïdes puis à leur oxydation, résultats reproduits à l'aide de standards authentiques et d'isolats bactériens ou de cellules en milieu artificiel. De plus, une souche bactérienne d'*Aeromonas salmonicida* a été incapable d'oxyder un stéroïde androgène sous sa forme glucuroconjugué tout en ayant de la facilité à oxyder la forme libre. Nous avons aussi observé la production de stéroïdes d'intérêt tels la testostérone et la 5 α -dihydrotestostérone à partir de précurseurs endogènes, soient la DHEA, l'androstèn-3 β ,17 β -diol et le 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol. Toutefois, la présence de ces intermédiaires, aussitôt oxydés, dans le milieu fut très brève. Enfin, nous nous sommes assurés que la congélation des échantillons et l'utilisation des agents bactéricides NaN₃ et HgCl₂ sont des moyens efficaces d'éviter l'éventuelle dégradation d'une urine fortement contaminée.

La mesure de la variation du pH au cours de l'incubation de 177 urines nous a permis de conclure que le pH élevé d'une urine lors de son analyse indique bel et bien l'activité microbienne mais pas nécessairement la dégradation des stéroïdes. La différence des pH au moment de la collecte et de l'analyse n'est pas un meilleur paramètre. Nous pouvons conclure par contre que l'analyse

de stéroïdes endogènes et/ou des androstandiones dans la fraction libre de l'extraction est un signe évident de dégradation des stéroïdes.

Remerciements

J'aimerais remercier en tout premier lieu Dr Christiane Ayotte pour avoir accepté d'être ma directrice de recherche durant deux brèves années. Une femme remarquable qui a su surmonter de nombreuses épreuves pour arriver où elle est présentement, et qui sait partager ses conclusions lorsque le besoin s'en fait sentir.

Un gros merci au Dr Michel Sylvestre, qui a bien voulu remplir le rôle de codirecteur de recherche. Ses conseils judicieux, son empressement et son incroyable disponibilité en font un directeur idéal aux yeux des étudiants l'ayant côtoyé.

Les amis(es) et connaissances que je me suis fait sont nombreux mais il importe de souligner l'omniprésence et le soutien de Diane Barriault (assistante de recherche) et de Yves Hurtubise (étudiant post doctorat). Ce sont là deux grands professionnels toujours prêts et jamais las de partager leur savoir.

Alain Charlebois et Danielle Goudreault (assistants de recherche, laboratoire antidopage de Montréal), Jean-François Lévesque (étudiant à la maîtrise sous la même direction) ainsi que le personnel du laboratoire comptent également parmi les figures de premier plan au cours de ma maîtrise.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner l'amabilité de toutes les personnes reliées de près ou de loin à mon projet. Les nommer serait trop long mais sans leur aide le temps aurait été plus long...

Enfin, un Merci tout particulier à ma conjointe Magalie Joly que j'ai connue au début de ma maîtrise et qui m'a supporté dans le meilleur et dans le pire. Merci à ma famille et mes amis pour leur appui et leur confiance, je vous aime tous très fort.

Table des Matières

Remerciements	ii
Résumé	iii
Table des Matières	vi
Liste des Tableaux	viii
Liste des Figures	iv
Chapitre I : INTRODUCTION	
1.1 Les androgènes	1
1.1.1 Biosynthèse et métabolisme des stéroïdes	4
1.2 Biotransformation des stéroïdes	7
1.2.1 Revue des réactions biocatalytiques répertoriées	7
1.2.2 Les principales enzymes impliquées dans la biotransformation des androgènes	13
1.3 Le milieu urinaire	16
1.3.1 L'urine	16
1.3.2 Microflore urinaire et stabilité des stéroïdes	17
1.4 Objectifs	21
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES	
2.1 Standards stéroïdiens	22
2.2 Réactifs	23
2.3 Préparation des courbes d'étalonnage	24
2.4 Isolement des stéroïdes urinaires	25
2.5 Échantillons biologiques	28
2.6 Stabilité thermique et chimiques des stéroïdes	29
2.7 Isolement et identification des micro-organismes	30
2.8 Dégradation bactérienne urinaire	32
2.9 Biotransformation de standards stéroïdiens par une bactérie en milieu minimal	34
2.10 Biotransformation de standards stéroïdiens par un lysat cellulaire d' <i>Aeromonas salmonicida</i>	36
2.11 Inhibition de la biotransformation bactérienne des stéroïdes en milieu urinaire	37

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION		
3.1	Stabilité thermique et chimique des stéroïdes sulfo et glucuroconjugués	38
3.2	Isolement des micro-organismes urinaires et identification bactérienne	41
3.3	Dégradation bactérienne urinaire	43
	3.3.1 Effets observés	43
	3.3.2 Suivi de la dégradation urinaire en fonction du temps	46
	3.3.3 Comparaison des effets de la dégradation d'une urine stérile par diverses souches bactériennes	47
	3.3.4 Comparaison du profil de dégradation de plusieurs urines inoculées par une même souche bactérienne	49
3.4	Biotransformation des stéroïdes en milieu minimal	50
	3.4.1 Biotransformation de stéroïdes par les cellules d' <i>A. salmonicida</i> en milieu minimal	51
	3.4.2 Dégradation de stéroïdes par un lysat cellulaire de la souche 80	53
	3.4.3 Biotransformation de la déshydroépiandrostérone et de l'androstèndiol	54
	3.4.4 Patron de biotransformation en conditions oxydantes de la déshydroépiandrostérone, de l'androst-4-èn-3 β ,17 β -diol et du 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol	56
	3.4.5 Biotransformation en conditions oxydantes d'un stéroïde glucuroconjugué	57
3.5	Inhibition de la dégradation du profil stéroïdien urinaire	60
 Chapitre IV : CONCLUSION		 61
 Bibliographie		 65
 Liste des Abréviations		 68
 Liste des Analytes		 69

Liste des tableaux

Tableau 1	Liste des différentes catégories des réactions de biotransformations	8
Tableau 2	Exemples de biotransformations bactériennes de stéroïdes	10
Tableau 3	Bactéries urinaires	18
Tableau 4	Bactéries intestinales	19
Tableau 5	Analyse CG/SM (mode SIM) des stéroïdes d'intérêts. RRT par rapport au standard interne : 17 α -méthyl-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (m/z 435,4)	27
Tableau 6	Stéroïdes utilisés pour l'étude de la stabilité chimique et thermique	39
Tableau 7	Déconjugaison des standards à pH 5 et 9 après 3 ½, 7 et 14 jours à -20 à 50 °C	40
Tableau 8	Bactéries isolées dans des urines non stériles	41
Tableau 9	Dégradation statistique des stéroïdes de 177 urines	44
Tableau 10	Variation du pH des urines lors d'une incubation à 37 °C	45
Tableau 11	pH de dix urines non stériles incubées 7 jours à 37 °C	46
Tableau 12	Dégradation en fonction du temps	47
Tableau 13	Dégradation de huit urines produite par l'inoculation individuelle de trois souches bactériennes	49
Tableau 14	Biotransformation de stéroïdes par <i>A. salmonicida</i> en milieu minimal	51
Tableau 15	Biotransformation des stéroïdes authentiques par <i>A. salmonicida</i> en milieu minimal	53

Liste des figures

Figure 1	Exemple de quelques dérivés synthétiques de la testostérone	3
Figure 2	La stéroïdogénèse	5
Figure 3	Métabolisme des androgènes	6
Figure 4	Voie catabolique microbienne menant à la dégradation totale des stéroïdes	9
Figure 5	Biotransformation de la testostérone <u>19</u> par <i>Corynebacterium spp.</i>	11
Figure 6	Biotransformation de la progestérone <u>18</u> par <i>Pseudomonas spp.</i>	12
Figure 7	Patron de dégradation du β -sitostérol <u>1</u> par <i>Pseudomonas spp.</i> NCIB 10590 en conditions aérobies	12
Figure 8	Description et identification des principales caractéristiques des HSDH	13
Figure 9	Réactions enzymatiques catalysées par les isoformes de la 3β -HSDH	14
Figure 10	Exemple de la diversité métabolique dans la production de testostérone par biotransformation microbienne	20
Figure 11	Chromatogramme TIC d'une urine dégradée après 1 à 7 jours d'incubation à 37 °C	44
Figure 12	Résumé des principales biotransformations des stéroïdes urinaires.	48
Figure 13	Présentation des principales biotransformations observées	52
Figure 14	Patron de transformation de la DHEA et de l'Aèndiol en testostérone	55
Figure 15	Dégradation de la DHEA, de l'Aèndiol et de la 5 α -Adiol par <i>A. salmonicida</i>	56
Figure 16	Chromatogramme TIC de l'oxydation du diol libre par <i>A. salmonicida</i> après 30, 120 min. et 20 hres à 37 °C	59

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les androgènes

Les androgènes forment l'une des quatre classes d'hormones stéroïdiennes (stéroïdes) dérivées du perhydro-1,2-cyclopentanophénantrène, aussi appelé gonane. Majoritairement sécrétés par les testicules, ils jouent un rôle très important lors de la différenciation du genre masculin étant responsables entre autre du développement et du maintien des caractéristiques sexuelles mâles primaires et secondaires.

Les AAS (stéroïdes androgènes anabolisants) forment l'ensemble des androgènes et des anabolisants responsables de l'apparition des traits de masculinité : mue de la voix, pilosité, etc., et de l'augmentation de la masse musculaire. Chez l'homme la testostérone (T) est l'androgène le plus puissant tandis que la 5 α -dihydrotestostérone (5 α -DHT) est l'anabolisant par excellence.

Le découverte de ces deux intéressantes propriétés allait conduire à leur utilisation pour des fins thérapeutiques et non thérapeutiques. En effet, les Allemands furent les premiers à avoir utilisé

des stéroïdes mâles pendant la 2^e guerre mondiale dans le but d'accroître leur agressivité, tandis que les Soviétiques consommaient de la testostérone peu de temps après pour améliorer leurs performances athlétiques [Wade, 1972].

Les nombreux AAS sont des dérivés synthétiques de la testostérone, de la 5 α -DHT et de la 19-nortestostérone. Ils furent premièrement développés dans le but d'augmenter les effets anaboliques au détriment des effets androgéniques, et deuxièmement, pour réduire la vitesse de leur métabolisme afin d'obtenir un effet anabolique fort et prolongé à de faibles concentrations.

Quatre modifications chimiques principales ont mené à ces dérivés synthétiques : modification en C₁₇ et en C₃, modification de la structure cyclique et substitution des hydrogènes par différents radicaux. L'estérification du groupement 17 β -OH a conféré un caractère plus liposoluble à la molécule, prolongeant son temps de demi-vie dans l'organisme. Jusqu'alors, on devait se limiter à l'administration intra musculaire car la voie orale réduisait énormément l'effet du stéroïde, on a donc procédé à l'alkylation en C₁₇. [Voir les modifications à la structure cyclique (Figure 1) telles l'insertion de doubles liaisons créant la méthandiénone, ou l'addition de structures cycliques sur le cycle A]. D'autre part, l'aromatisation du cycle A en éliminant le groupement méthyl en C₁₉, produisant les dérivés de la 19-nortestostérone aura permis d'agrandir la voie de synthèse vers les oestrogènes à potentiel anabolique. Enfin, l'insertion de radicaux Cl, F, OH, CH₃, CHO, etc., créant par exemple la fluoxymestérone est une autre voie servant à augmenter le temps de demi-vie de la molécule dans l'organisme.

Les médecins se servent des AAS afin de traiter diverses conditions pathologiques telles : retard de croissance, ostéoporose, carcinome mammaire, aplasie médullaire, hypogonadisme, oedème de Quincke, traumatisme et brûlure grave [Wilson et Griffin, 1980], [Haupt et Rovere, 1984] et [Kopera, 1985]. Par contre, l'utilisation de quelques 10 à 20 AAS à des fins illicites a aussi atteint tous les paliers de notre société. Autrefois exclusivement réservés aux athlètes d'élite, ils sont de plus en plus utilisés par quiconque cherche à profiter de leurs propriétés, même s'il ne s'agit parfois que d'embellissement corporel.

L'érection de nouvelles barrières entre les athlètes dopés et non dopés, ainsi que le besoin de connaître les effets secondaires nocifs tel que l'hépatotoxicité ont encouragé le développement de méthodes analytiques et de centres spécialisés.

La popularité toujours croissante des stéroïdes et le désir de vaincre certains problèmes génétiques par la thérapie stéroïdienne ont lancé de nombreux chercheurs du monde sportif, médical et vétérinaire sur la piste de nouveaux anabolisants. Ce qui a forcé la création de nouvelles méthodes analytiques servant à dépister ces molécules et leurs métabolites dans le sang et l'urine. Aujourd'hui, les laboratoires antidopages sont les premiers à courir derrière les utilisateurs illicites de nouveaux produits pouvant procurer des effets androgéniques et anaboliques.

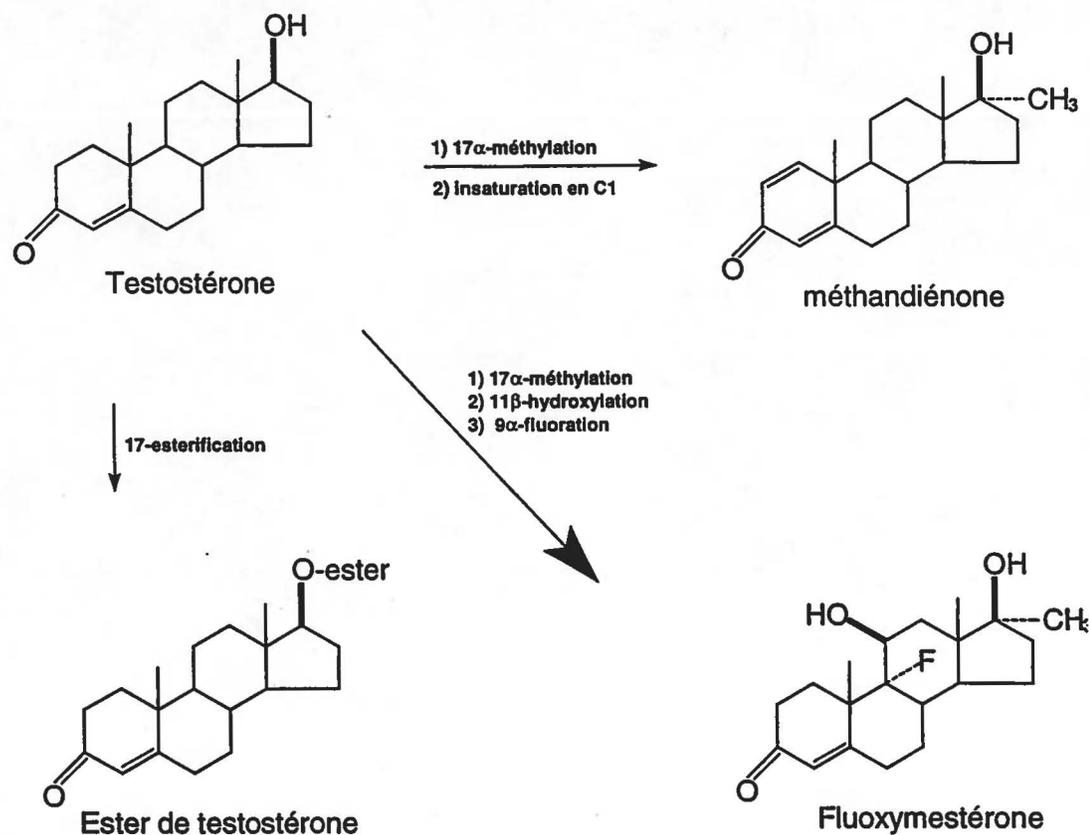


Figure 1 : Exemples de quelques dérivés synthétiques de la testostérone.

1.1.1 Biosynthèse et métabolisme des stéroïdes

La scission de la chaîne latérale par l'action de la 20 α , 22-C-27-desmolase dans le foie fait du cholestérol l'unique précurseur de tous les stéroïdes dans la biosynthèse humaine. C'est donc de cette stéroïdogénèse, présentée à la Figure 2, que proviennent les androgènes, les oestrogènes, les prégnanes et les corticostéroïdes.

Par ailleurs, le métabolisme de la testostérone (Figure 3) mène à des composés stéroïdiens physiologiquement très actifs comme la 5 α -DHT et l'estradiol ou à des composés inactifs tels l'androstérone (A) et l'étiocolanolone (Étio). L'activation ou l'inactivation est subséquente à l'action de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme humain, soient : les 5(α/β)-réductases, les 17(α/β)-déshydrogénases d'hydroxystéroïdes (HSDH), les 3(α/β)-HSDH et l'aromatase. Certaines de ces conversions peuvent être réversibles. Les principales voies de biosynthèses réunies dans les Figures 2 et 3 impliquent au moins une des quatre étapes suivantes selon Leunissen, 1979 :

- a) Réduction de la double liaison en C₄ et formation des 5(α/β)-androstanes, puis réduction subséquente du groupement 3-oxo en 3(α/β)-OH,
- b) Réduction du groupement 20-oxo en 20(α/β)-OH,
- c) Oxydation du groupement 17-OH en 17-céto,
- d) Hydroxylation à différentes positions.

Malgré sa plus grande polarité, le métabolite libre d'un stéroïde demeure très liposoluble et devra être conjugué à une autre molécule le rendant hydrophile afin de pouvoir être excrété dans l'urine. Les produits finaux seront donc liés à une ou deux molécules d'acide glucuronique ou de sulfate ou formeront des dérivés mixtes. Les métabolites androgéniques majeurs (A et Étio) se retrouvent à environ 90% sous la forme 3-glucuroconjuguée (A-G et Étio-G, voir Figure 3) et les androstandiols (Adiols) sont pratiquement complètement diglucuroconjugués. Par ailleurs, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et les androstèndiols (Aèndiols) sont davantage sulfatés. Enfin, la T et l'épitéstostérone (ÉpiT) se retrouvent sous les deux formes [Deslypere *et al.*, 1981].

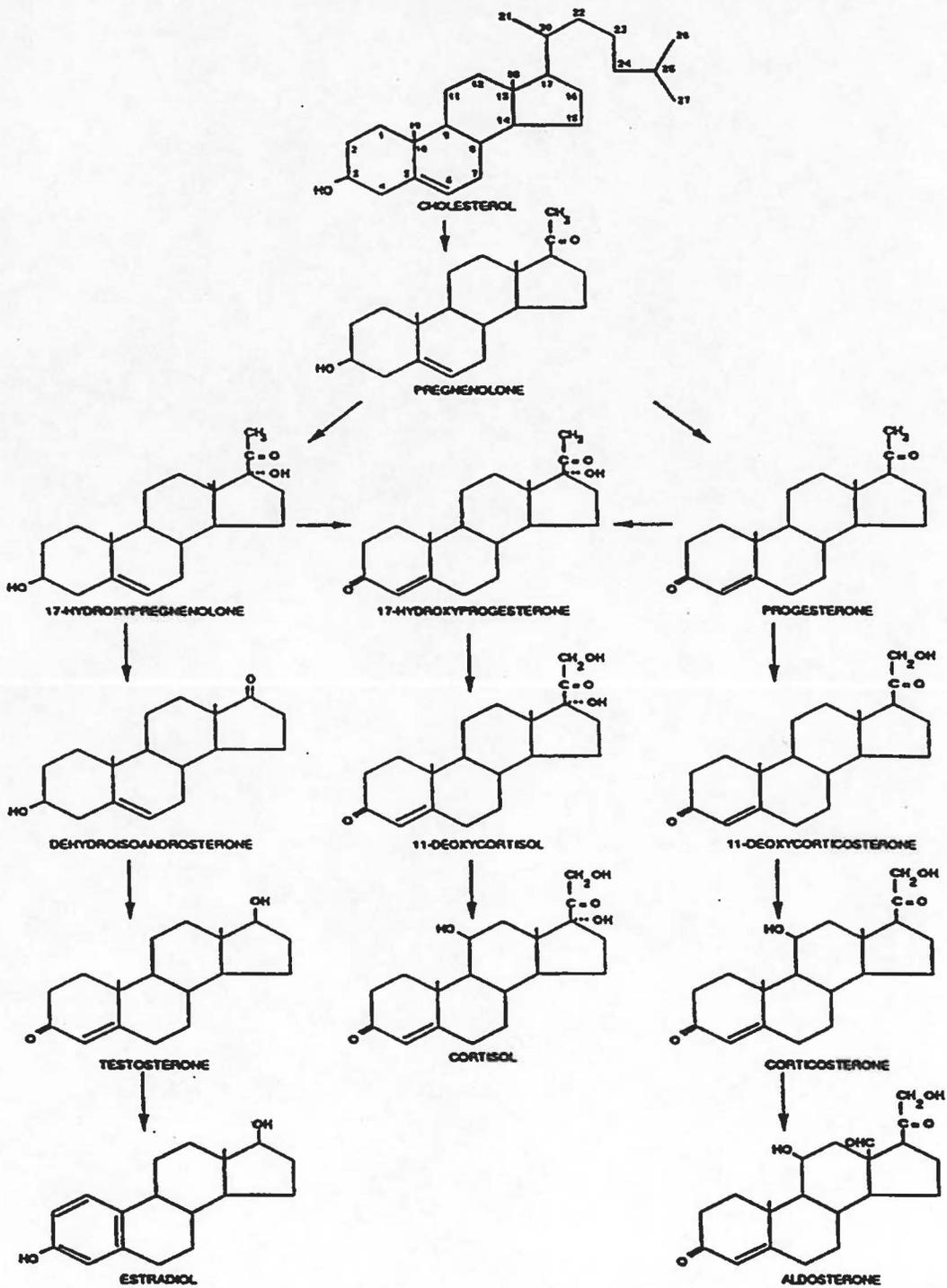


Figure 2 : La stéroïdogénèse [Castagnetta *et al.*, 1990 : p. 2].

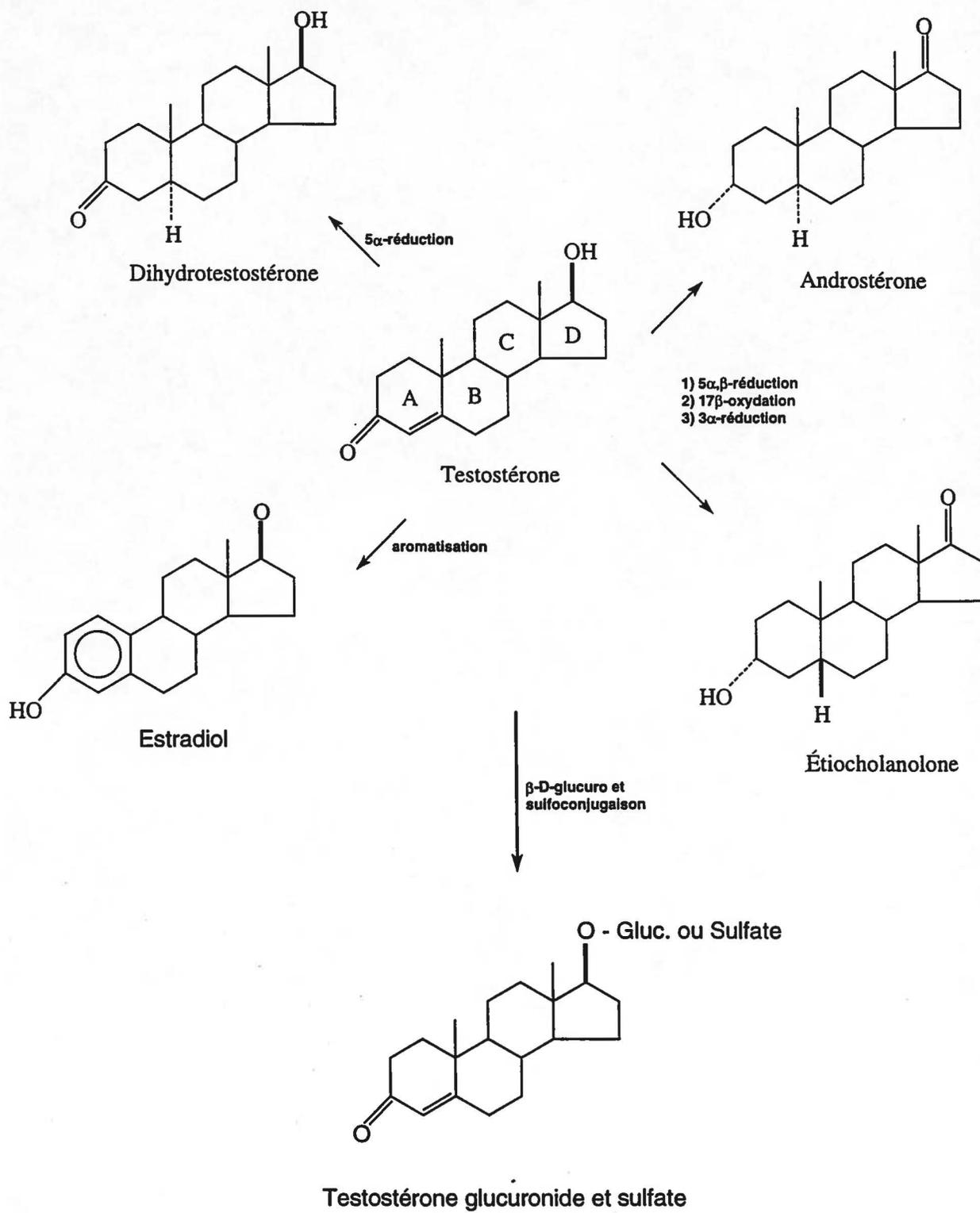


Figure 3 : Métabolisme des androgènes [Goodman & Gilman's, 1990].

1.2 Biotransformation des stéroïdes

Bien qu'on pourrait s'attendre à ce que la collecte des urines destinées à l'analyse des stéroïdes soit effectuée en conditions stériles, ce n'est pas le cas. En fait, la procédure la plus stérile serait la collecte par cathéter mais c'est aussi très fastidieux. On procède alors dans certains cas à la décontamination des voies d'excrétion externes et de la peau entourant ces régions, mais ce n'est pas toujours suffisant pour éliminer toute trace de micro-organismes. En outre, ces derniers se retrouvent en grand nombre dans la microflore intestinale, sur la peau et parfois dans l'urine même. Il n'est donc pas rare que les échantillons soient contaminés. D'autre part, un grand nombre de micro-organismes ont la capacité de biotransformer les stéroïdes, altérant ainsi les concentrations initiales. C'est donc le traitement que l'on porte aux échantillons, les espèces microbiennes présentes et leur nombre qui décidera du sort des stéroïdes urinaires. Il est pourtant primordial que les échantillons demeurent intacts afin que l'analyse soit intègre. Une étude menée par le groupe de Ayotte et al. en 1996 révèle que ce n'est pas toujours le cas. En effet, ils ont trouvé que près de 4% des analyses des échantillons urinaires furent déclarées non valides suite à la production d'androstandione, indiquant l'oxydation de stéroïdes. Les auteurs ont postulé que les modifications avaient été causées par des activités microbiennes. Hypothèse supportée par la détection dans les urines anormales de bactéries des groupes *Staphylococcus spp.* et *Enterococcus spp.*

1.2.1 Revue des réactions biocatalytiques répertoriées

Les transformations microbiennes des composés organiques sont connues de manière empirique depuis les débuts de l'histoire. Nous n'avons qu'à penser au processus de fermentation des fruits, des grains ou du lait. La production du vin 3000 ans avant J.-C. en témoigne tout autant. Mais ce sont les travaux de Louis Pasteur en 1857 sur la fermentation des sucres qui mirent à jour le pouvoir qu'a un micro-organisme d'effectuer une altération chimique précise sur un substrat particulier. La publication de ces travaux fut d'ailleurs intitulée '*La naissance de la microbiologie*' [Vallery-Radot, 1957].

Dès 1937, Mamoli et Vercellone ont démontré la conversion des stéroïdes 17-céto en 17 β -OH lors de la fermentation par une levure [Mamoli et Vercellone, 1937]. Cette découverte rendait possible la synthèse de stéroïdes tels la testostérone pour des fins thérapeutiques. On a pu dès lors se rendre compte du très haut potentiel que possèdent les micro-organismes pour transformer les stéroïdes. Charney et Herzog en 1967 et Mahato et Garai en 1997 ont présenté une liste exhaustive des multiples réactions biocatalytiques des micro-organismes. Le Tableau 1 présente une liste qui se limite toutefois aux exemples de biotransformations microbiennes pouvant affecter la structure des stéroïdes auxquels nous nous intéressons : T, 5 α -DHT, DHEA et leurs métabolites. Comme on peut le constater, ces biotransformations comprennent une grande diversité de réactions d'oxydation, de réduction, d'isomérisation, d'addition, de réarrangement, d'élimination et de résolution de mélanges racémiques. Il importe aussi de mentionner qu'il existe un exemple de transformation microbienne à partir d'au moins un stéroïde pour chacune de ces réactions.

Tableau 1 Liste des différentes catégories des réactions de biotransformations

<p>1. Oxydations Nombreuses hydroxylations, déshydrogénation (insertion d'une double liaison), époxydation, oxydation d'un alcool en cétone ou en aldéhyde, oxydation d'une cétone en ester ou en lactone, aromatisation du cycle A sans dégradation, dégradation du noyau stéroïdien (une séquence de réactions), coupure de la chaîne latérale en C₂₀.</p>
<p>2. Réductions a) d'une cétone, d'un aldéhyde ou d'un acide en alcool b) d'une double liaison en position C₁, C₄, C₅</p>
<p>3. Isomérisations : Δ^5 à Δ^4 et $\Delta^{5(11)}$ à Δ^4</p>
<p>4. Additions diverses, réarrangements, éliminations</p>
<p>5. Résolutions de mélanges racémiques</p>

La biotransformation d'un stéroïde est une simple modification d'une de ses fonctions alors que sa minéralisation est une dégradation totale. Comme nous venons de le constater, un grand nombre de biotransformations peuvent altérer la structure d'un stéroïde. Talalay, 1957, Charney et Herzog, 1967 et Owen et al., 1985 ont étudié la voie catabolique menant à la dégradation totale de stéroïdes suivant une cascade de réactions biochimiques présentes chez certains micro-organismes. Comme on peut le remarquer à la Figure 4, cette voie requiert initialement une déshydrogénation en C₁ d'une cétone α,β-insaturée en C₃ précédée ou suivie, dépendant du micro-organisme, d'une α-hydroxylation en C₉. Les bactéries capables de ce genre de réactions sont entre autres : *Corynebacterium spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* et *Nocardia spp.* [Talalay, 1957], [Owen et al., 1985].

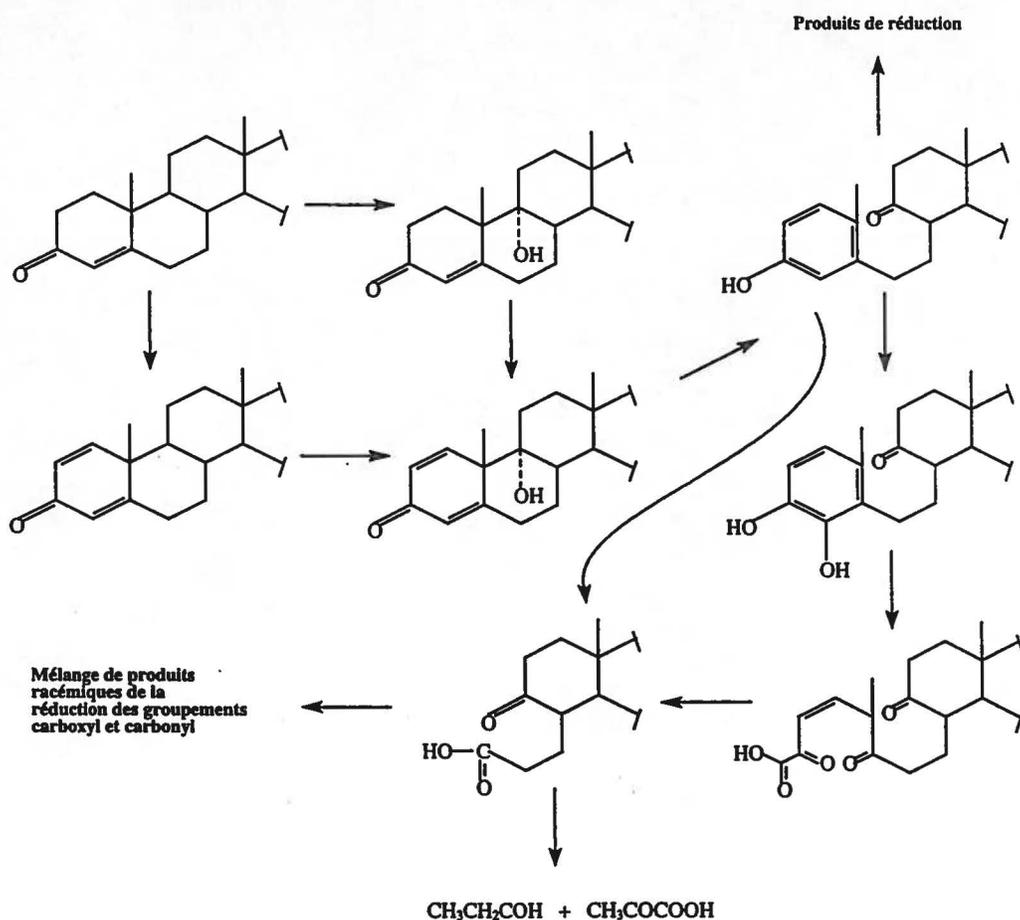


Figure 4 : Voie catabolique microbienne menant à la dégradation totale des stéroïdes [Charney et Herzog, 1967 : p. 49].

Plusieurs autres réactions biocatalytiques peuvent conduire à la conversion d'un stéroïde sans toutefois mener à sa minéralisation. L'oxydoréduction des groupements cétone ou hydroxyle en 3 α/β ou 17 α/β avec ou sans insaturation en C₄ ou en C₅ sont des exemples fréquents. En voici quelques-uns répertoriés par Mahato et Garai en 1997 qui tirent leur importance du fait qu'ils impliquent la conversion de stéroïdes naturels :

Tableau 2 Exemples de biotransformations bactériennes de stéroïdes

Substrat(s)	Produit(s)	Bactérie(s)
Aèndiol (3 β , 17 β)	T	<i>Corynebacterium, Micrococcus dehydrogenans, Flavobacterium, Nocardia</i>
Aèndiol (3 α , 17 β)	T, ÉpiT	<i>Penicillium, Steptomycetes</i>
DHEA	Aèndione	<i>Alcaligenes faecalis, Flavobacterium, E. coli</i>
A, Étio, DHEA	Aèndione	<i>Mycobacterium</i>
T	Aèndione	<i>Nocardia</i>

Nixon *et al.*, 1986 ont étudié le patron de dégradation de la testostérone par *Corynebacterium spp.* Le schéma présenté à la Figure 5 indique que dans ce cas précis la testostérone **19** fut transformée en 14 produits, notamment la 5 α et la 5 β -DHT **7** et **8**, différents Adiol, l'Aèndione **10**, la 5 β -Adione **6**, le 5 β diol **4** et l'ÉpiÉtiocholanolone (ÉpiÉtio) **15**.

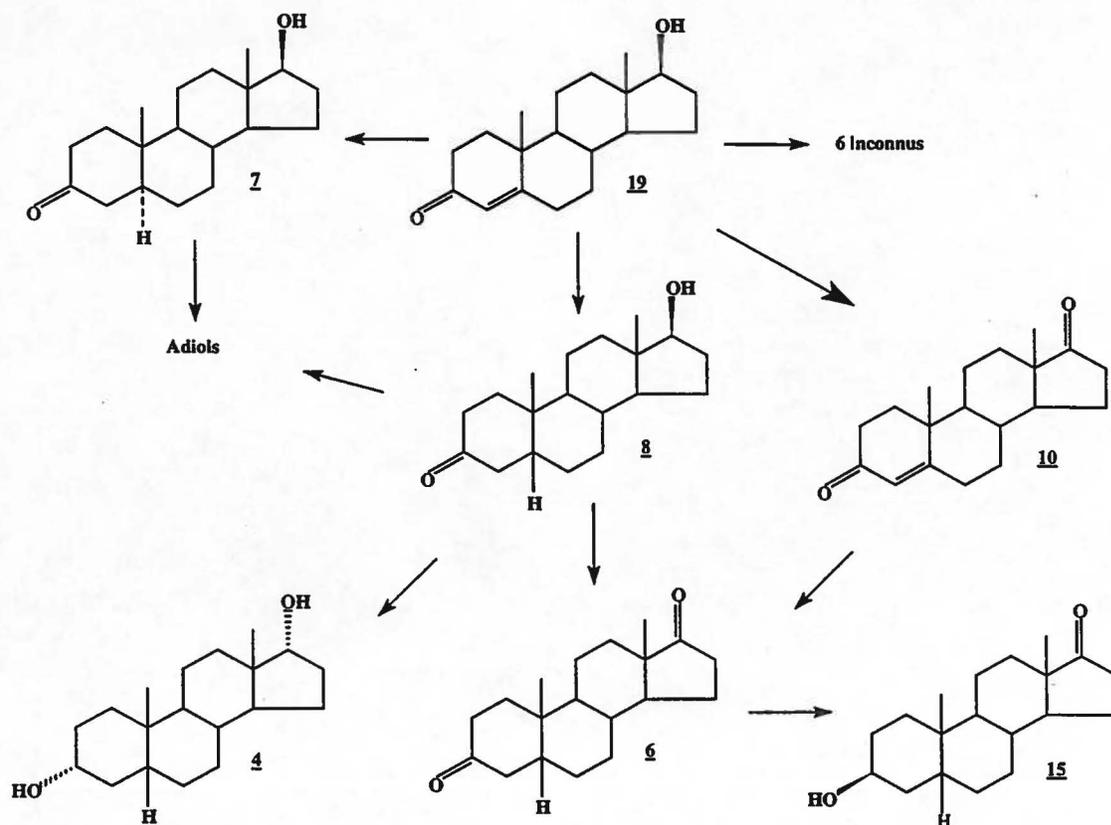


Figure 5 : Biotransformation de la testostérone **19** par *Corynebacterium spp.*
 [Nixon *et al.*,1985].

Un autre type de réaction implique la scission de la chaîne latérale en C₂₀ des cholestanes, prégnanes et autres. Leur biotransformation en stéroïde d'intérêt pourrait aussi fausser les concentrations et mener à l'analyse d'un faux négatif ou d'un faux positif. Dhar *et al.*, 1993 ainsi que Owen *et al.*, 1985 ont étudié ce type de transformation en condition aérobie présentée dans les figures 6 et 7. La première décrit notamment la biotransformation de la progestérone **18** en Aèndione **10** et en androsta-1,4-dièndione via la testostérone **19** et un certain nombre d'intermédiaires. La deuxième décrit la minéralisation du β-sitostérol **1** au cours d'oxydations successives générant notamment l'Aèndione **10** et l'androstan-1,3-dièn-3,17-dione.

1.2.2 Les principales enzymes impliquées dans la biotransformation des androgènes

Le groupe d'enzymes responsables de l'oxydoréduction des fonctions hydroxyle et cétone fait partie de deux super familles d'enzymes soient : les aldo-céto réductases (AKR) et les déshydrogénases d'alcools à courte chaîne (SDR). Largement étudiées au cours des dernières années dans les modèles bactériens, animaux et humains, ces enzymes se subdivisent aussi en sous groupes plus spécifiques. La Figure 8 tirée d'une étude de caractérisation menée par Penning et al. en 1997 présente une brève description de ces enzymes et identifie les principales réactions catalysées par les déshydrogénases d'hydroxystéroïdes (HSDH) appartenant à l'un ou l'autre de ces groupes :

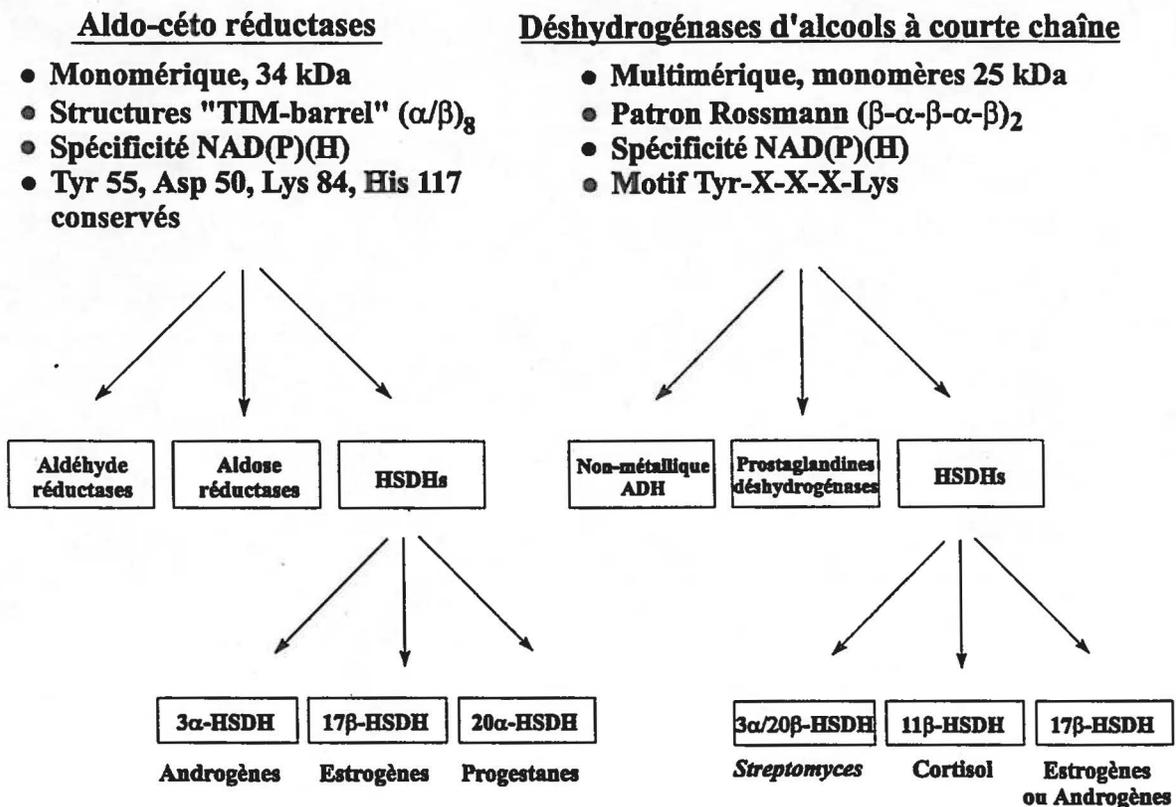


Figure 8 : Description et identification des principales caractéristiques des HSDH

[Penning et al., 1997].

Tel que décrit par Payne *et al.*, 1997 et présenté à la Figure 9, les oxydoréductions effectuées par les HSDH dépendent de la nature des substrats et du cofacteur préférentiel. Les oxydations sont favorisées à pH ~9 et les réductions le sont à pH ~6. D'autre part, certaines oxydations auront lieu en présence de NAD^+ et d'autres en présence de NADP . Bien que les exemples soient rares, l'action de certaines enzymes comme la 3β -HSDH type II est réversible. Il semble par ailleurs selon ces mêmes auteurs que les concentrations intracellulaires des cofacteurs ne soient pas les mêmes, étant grandement en faveur du NADPH et du NAD^+ chez l'humain. Ce qui a pour conséquence de favoriser l'un ou l'autre des types de réactions selon la spécificité de l'enzyme.

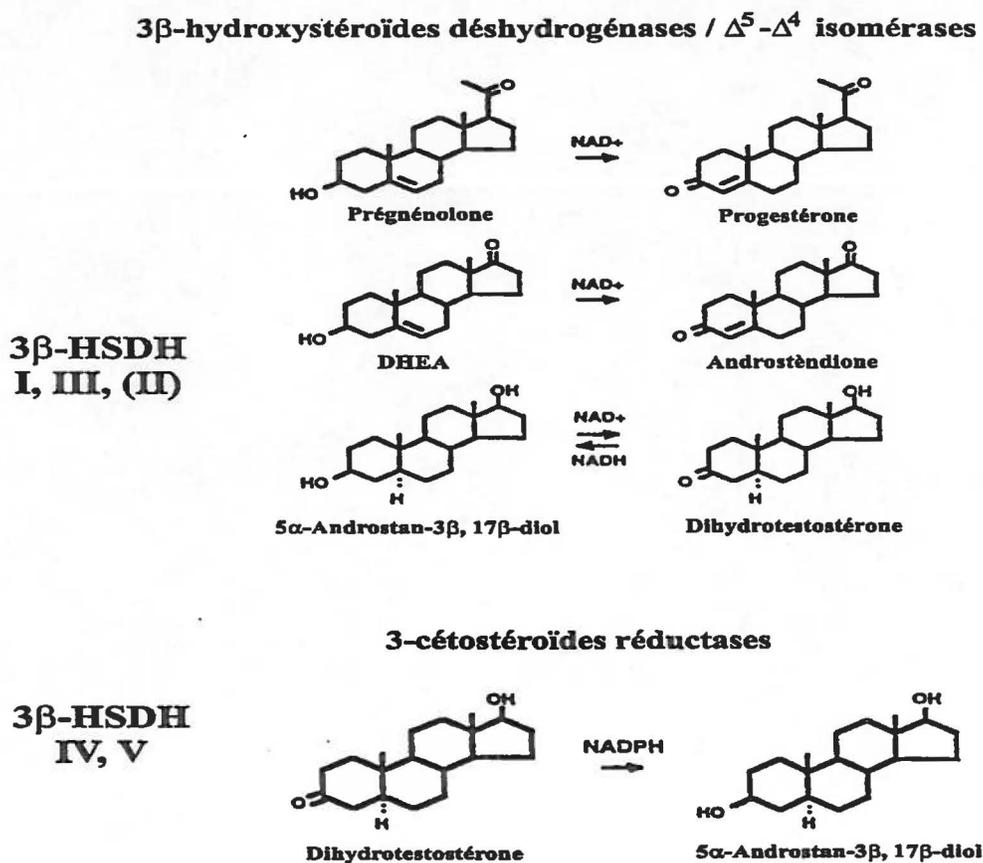


Figure 9 : Réactions enzymatiques catalysées par les isoformes de la 3β -HSDH
[Payne et al., 1997].

Il existe une multitude d'autres enzymes plus ou moins spécifiques aux stéroïdes dont nous ne traiterons pas ici. Mais il est quand même important de garder en mémoire qu'une molécule, aussi originale soit elle, synthétique ou naturelle, pourra subir une modification mineure ou majeure de sa structure.

1.3 Le milieu urinaire

Afin de pouvoir isoler les facteurs pouvant influencer la dégradation des stéroïdes, il importe de connaître le milieu étudié, soit l'urine.

1.3.1 L'urine

La formation de l'urine est un processus très complexe en soit qui implique de nombreux mécanismes. Une personne en santé excrète chaque jour de 600 à 2500 mL d'urine. Cet volume variera en fonction de la quantité d'eau ingérée, de la température ambiante, de l'alimentation, de la transpiration, ainsi que de l'état mental et physique du sujet. Sa densité varie entre 1,001 et 1,035 et son pH, normalement légèrement acide, va de 4,7 à 8,0 (moyenne de 6,0). Il sera plus acide si l'alimentation est riche en protéines, car le catabolisme de ces dernières augmente la production du phosphate et du sulfate, ou si le sujet est très actif physiquement. Par contre, l'urine a tendance à devenir alcaline au repos entre autre parce que l'urée se transforme en ammoniacque. Sa couleur est généralement jaune pâle ou ambrée, suivant le volume de la diurèse et la concentration de l'urine. Elle est ordinairement limpide mais elle peut devenir trouble par précipitation de phosphate de calcium à pH alcalin et dépôt des sels de l'acide urique sous forme de nuages roses à pH acide. Quant à l'odeur d'une urine fraîche, elle est souvent caractéristique des aliments et peut être modifier par son vieillissement [H.A. Harper, 1977].

L'urine compte aussi un grand nombre de constituants organiques et inorganiques. Parmi les constituants minéraux on retrouve quelques grammes de chlorures, de sodium, de phosphore, de potassium, de soufre, de calcium, de magnésium ainsi que quelques traces d'iode, d'arsenic et de plomb. Du côté des constituants organiques, quelques grammes d'urée, de créatinine, d'ammoniacque et d'acide urique, et quelques mg de protéines et créatine, ainsi que des traces de sucre, des acides organiques tels ascorbique, hippurique, oxalique, des bases puriques, des corps cétoniques et des phénols sont présents. On retrouve également les métabolites des hormones dont font partie les androgènes ainsi que les métabolites des médicaments et d'autres substances [H.A. Harper, 1977].

1.3.2 Microflore urinaire et stabilité des stéroïdes

Très peu d'études portant sur la stabilité des stéroïdes conjugués dans l'urine d'un point de vue strictement chimique et thermique ont été faites. Toutefois, il a été démontré que leur mesure n'est pas altérée lorsque les échantillons sont conservés à -20 °C pendant plus d'un an [Robards *et al.*, 1990]. Par contre, la contamination des urines est un troisième facteur d'importance majeure. En effet, nous avons vu plus tôt que les micro-organismes ont la capacité d'effectuer un grand nombre de réactions à partir des stéroïdes ou d'autres substrats. Le milieu urinaire est un milieu riche qui peut aussi bien favoriser l'activité microbienne que lui nuire étant donné la grande diversité moléculaire. Des moyens préventifs tels la congélation des urines peuvent être envisagés mais rien ne semble être certain. D'ailleurs, une autre équipe de chercheurs ont noté la production de testostérone dans une urine réfrigérée 6 mois à 4 °C [Shänzer *et al.*, 1995].

La dégradation des stéroïdes urinaires se traduit généralement par une déconjugaison suivie d'une oxydation des groupements hydroxyles. Les stéroïdes déconjugés ainsi que ceux qui furent oxydés se retrouvent donc dans la fraction libre. Le résultat dépend toutefois des conditions. Hemmersbach *et al.*, 1996 rapportèrent une forte déconjugaison des stéroïdes des urines incubées 5 jours à 37 °C mais aucune de ceux des échantillons conservés à 20 °C et moins. La même étude a révélé une hausse significative des concentrations de 5(α/β)-androstane-3 α ,17 β -diol libres à 37 °C comparativement à -20 °C, conjuguée à une production d'androstandione ainsi qu'à une élévation du pH.

Des études récentes menées par Meers et Chow, 1990, Guillenwater et Clark, 1996 ainsi que Martin *et al.*, 1995 ont permis de caractériser la microflore présente dans les urines recueillies en conditions aseptiques et non aseptiques. Un inventaire des espèces microbiennes incluant des bactéries Gram (-), des bactéries Gram (+) et des levures est présenté au tableau 3. Il est important de noter que l'isolement 'clinique' de ces bactéries nécessitait une population supérieure à 5×10^4 bactéries/mL, ce qui constitue un nombre d'unités viables considérable, toutefois atteint lors d'infections urinaires souvent contractées à cause de deux espèces bactériennes particulières, *E. coli* et *Proteus spp.* Selon ces travaux, il semble que ce soit des espèces de *Klebsiella*, de *Pseudomonas*, d'entérocoques et de staphylocoques qui sont les plus souvent retrouvées dans les urines.

Parallèlement, Hirayama *et al.*, 1995 ont identifié les bactéries peuplant généralement la microflore intestinale humaine. Ces espèces bactériennes apparaissant au Tableau 4 ont elles aussi de fortes chances de contaminer l'urine dû principalement à la proximité entre les régions anale et vaginale chez la femme. Ici, on parle majoritairement des *Bacteroidaceae*, des *Bifidobacteria* et des Streptocoques.

Tableau 3 Micro-organismes urinaires

Gram -	% / 191 bact. ¹	% / 14 306 urines ²	% / 247 bact. ³	% / 205 urines ³
<i>E. coli</i>	12	39,5	47	56
<i>Klebsiella spp.</i>	11	10,7	9	11
<i>Proteus spp.</i>	8	5,5	10	11
<i>Enterobacter spp.</i>	7	3		
<i>Citrobacter spp.</i>	6	2,6	2	2
<i>Morganella morganii</i>	4	0,5		
<i>Pseudomonas spp.</i>	9	9,2	5	6
<i>Aeromonas spp.</i>			0,5	0,5
<i>Serratia spp.</i>		2,4		
<i>Acinetobacter spp.</i>	8	0,2		
<i>Providencia spp.</i>		0,7		
<i>Salmonella spp.</i>	4			
Gram +				
<i>Enterococci</i>		11,9	21	26
<i>Staphylococci</i>	16	12,3	5	6
<i>Corynebacterium spp.</i>				
<i>Streptococci</i>	13	1,4	1	1
Autres microbes				
<i>Candida albicans</i>	3			
Levures		0,1	0,5	0,5

¹ Meers et Chow, 1990

² Gillenwater et Clark, 1996

³ Martin *et al.*, 1995

Tableau 4 Bactéries intestinales

Majoritaires	Minoritaires
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Clostridia</i>
<i>Eubacteria</i>	<i>C. perfringens</i>
<i>Bifidobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Peptococcaceae</i>
	<i>Lactobacillus</i>

Hirayama *et al.*, 1995.

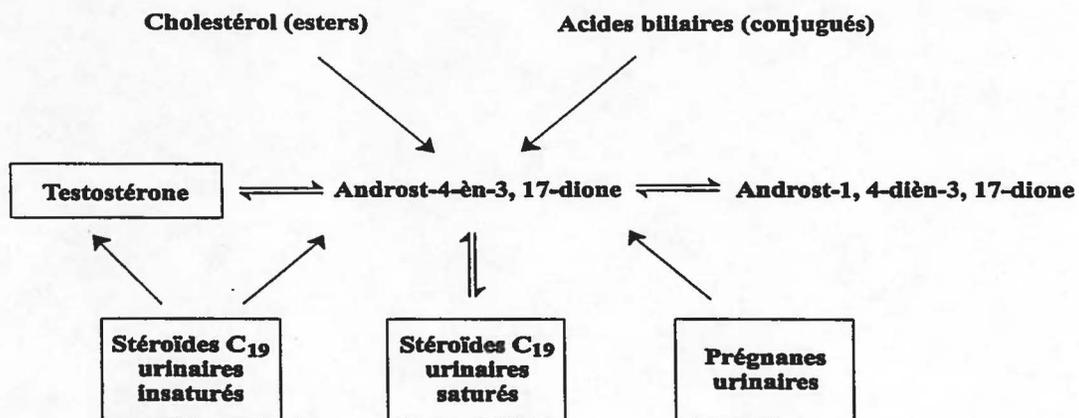
Il est connu de la littérature que le pH et l'urée jouent un grand rôle dans la colonisation bactérienne. Selon Lauvetz *et al.*, 1995 l'activité antibactérienne est directement proportionnelle à la concentration d'urée et inversement à l'acidité urinaire. D'un autre côté, la croissance des bactéries dans l'urine aura des répercussions sur le pH et la teneur en urée car certaines bactéries peuvent scinder l'urée et d'autres ne le peuvent pas. En effet, la même étude a révélé que sur 121 urines contaminées, deux tiers des bactéries isolées, dont principalement *E. coli*, étaient incapables de scinder l'urée, tandis que l'autre tiers, principalement *Proteus*, en avait la capacité. Ces dernières transformaient l'urée en ammoniac, ce qui avait pour effet d'augmenter le pH.

Par ailleurs, il ne semble pas que la mesure du pH soit indicatif de dégradation bactérienne des stéroïdes. En effet, Ayotte *et al.*, 1996 ont démontré que seulement 50% des échantillons urinaires ayant un pH se situant entre 8 et 9 présentaient des signes de dégradation invalidant la mesure des stéroïdes ciblés (il faut cependant spécifier que la dégradation dont on fait mention dans cet article n'invoque qu'une oxydation avancée des stéroïdes. Elle ne tient pas compte de la déconjugaison). De plus, seulement 4% des échantillons reçus ont présenté des signes d'oxydation sévères au cours des trois dernières années.

Il semble que l'oxydation des stéroïdes par les bactéries soit un phénomène plus connu de la littérature que ne l'est la réduction, et ce autant en milieu urinaire que synthétique, même si les expériences réalisées dans l'urine sont rares. Par exemple, dans une expérience tentant de démontrer le mécanisme de l'épimérisation 3 α -OH / 3 β -OH d'un acide biliaire par *Clostridium perfringens*, McDonald a constaté que l'équilibre entre l'intermédiaire cétonique et l'hydroxyle

favorise grandement la formation de la cétone à pH 10,5 [McDonald *et al.*, 1983]. Le même résultat fut observé lors de l'épimérisation en C₁₇ de la méthénolone [Goudreault, 1990]. Owen et Bilton en 1987 ont indiqué que les bactéries fécales réduisent les fonctions cétones en C₃ et C₁₇ des stéroïdes en conditions anaérobies mais que cette réduction n'a pas lieu en conditions aérobies, plus souvent retrouvées dans les milieux urinaires.

Plus directement lié au sujet de notre étude, Bilton souleva en 1995 l'importance de garder les échantillons urinaires cliniques sous congélation s'ils ne sont pas immédiatement analysés. L'auteur rapporte dans un schéma reproduit à la figure 10 les possibilités de formation de la T par transformation microbienne à partir de précurseurs tels le cholestérol, les acides biliaires, l'Andione, l'androsta-1,4-dièn-3,17-dione, les prégnanes et les stéroïdes C₁₉ saturés et non saturés. Certaines des bactéries mentionnées peuvent effectivement être souvent retrouvées dans l'urine, pensons à *E. coli*, *Nocardia*, *Pseudomonas* et *Klebsiella*. Il faut cependant noter que plusieurs d'entre elles ne se retrouveront jamais ou pratiquement jamais dans une urine à moins de l'introduire volontairement. De plus, certaines sont anaérobies et ne pourraient pas effectuer les réactions décrites en conditions aérobies.



Liste abrégée des bactéries capables de transformations stéroïdiennes urinaires

Microflore intestinale humaine
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Bacteroides fragilis
Bifidobacterium
Clostridium paraputrificum

Autres microbes
Arthobacter
Nocardia
Pseudomonas
Agrobacterium
Brevibacterium
Flavobacterium

Figure 10 : Exemple de la diversité métabolique dans la production de testostérone par biotransformation microbienne [Bilton, 1995].

1.4 Objectifs

L'objectif principal de ce projet de recherche était l'étude des effets de la contamination microbienne sur la stabilité des stéroïdes androgènes en milieu urinaire. Nous nous sommes d'abord proposé de cerner les causes potentielles de dégradation urinaire telles la température, le pH et la contamination microbienne, et d'en différencier les effets. Pour ce faire, nous avons premièrement étudié la stabilité thermique et chimique des stéroïdes authentiques en milieu aqueux soumis à diverses conditions de pH et de température. Le but était de différencier la déconjugaison thermique et chimique de la déconjugaison microbienne. Par la suite, nous nous sommes proposé d'observer les effets d'une incubation de 96 à 120 heures à 37 °C sur les stéroïdes androgènes, de manière à caractériser de manière générale la dégradation microbienne des stéroïdes. Nous avons aussi isolé et identifié les espèces microbiennes se trouvant dans quelques-unes de ces urines afin de voir s'il y avait correspondance entre les effets observés et les microbes présents. Dans une troisième étape, nous avons tenté de reproduire certains de ces effets en milieux synthétique afin de discriminer le rôle du milieu et d'étudier des dégradations particulières. Nous avons également étudié l'inhibition de la dégradation en conservant les urines à -20 °C ou en utilisant des bactéricides minéraux de manière à s'assurer que la dégradation était bien due à la présence de micro-organismes et qu'il est possible de l'éviter.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

2.1 Standards stéroïdiens

Les standards stéroïdiens suivants provenaient de Sigma Chem. Co. (St.-Louis, MO, É.U.) : le 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, le 5α -androstan- $3\beta-17\beta$ -diol, l'androstérone, l'androstérone glucuronide, la déhydroépiandrostérone, l'épiandrostérone, l'épiétiocholanolone (standard interne), l'épitéstostérone, l'épitéstostérone glucuronide, l'étiocholanolone, l'étiocholanolone glucuronide, la testostérone. Le 17α -méthyl- 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol (standard interne) provenait d'Amersham/Searle Corporation (Oakville, ON, Canada). La 5α -androstan- $3,17$ -dione, la 5β -androstandione, le 5α -androstan- $3\alpha-17\beta$ -diol 17-glucuronide, l'androst-4-èn-dione, l'androstérone sulfate, la déhydroépiandrostérone glucuronide, la déhydroépiandrostérone sulfate, l'épiandrostérone sulfate, l'épitéstostérone, l'étiocholanolone sulfate, la testostérone glucuronide et la testostérone sulfate provenaient de Steraloids, Inc. (Wilton, NH, É.U.). La testostérone USP provenait de U.S.P.C. Inc. (Rockville, MD, É.U.).

2.2 Réactifs

L'acide acétique, le phosphate de sodium dibasique anhydre, le phosphate de sodium monobasique, le carbonate de potassium, l'acétate de sodium, le bicarbonate de sodium et l'acide sulfurique étaient de qualité analytique et furent obtenus de J.T. Baker Chem. Co. (Phillipsburg, NJ, É.U.), de Fisher Scientific (Montréal, Qc., Canada), de BDH Canada (Ville St.-Laurent, Qc., Canada) ou de Malinckrodt (Paris, KY, É.U.). L'éther diéthylique, le dichlorométhane, l'hexane, le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'éthanol étaient de qualité HPLC et furent obtenus de Caledon Lab. Ltd. (Montréal, Qc., Canada). L'enzyme lyophilisée contenant 1 500 000-2 000 000 d'unités/g de β -D-glucuronidase type IX-A provenant de *Escherichia coli* fut obtenue de Sigma Chem. Co. (St.-Louis, MO, É.U.). L'eau était purifiée par osmose inverse et filtrée par un système Milli-Q (Millipore, Ville St.-Laurent, Qué., Canada). L'azote, grade zéro, fut obtenu d'Air Liquide Canada Ltée (Montréal, Qué., Canada). Le MSTFA (N-méthyl-triméthylsilyltrifluoroacétamide), le TMIS (triméthylsilyldiosilane), l'éthanthiol et la triéthylamine furent obtenus d'Aldrich (Milwaukee, WI, É.U.).

Les tampons biologiques (MES, CAPS, TRIS et Bicine), l'urée, l'azoture de sodium, le dichlorure de mercure, l'EDTA, le carbonate de calcium, le sulfate ferreux heptahydraté, le sulfate de magnésium heptahydraté, le sulfate de manganèse monohydraté, le sulfate de zinc heptahydraté, le sulfate de cuivre pentahydraté, le chlorure de calcium hexahydraté, le borate de sodium dibasique heptahydraté, le phosphate de sodium dibasique anhydre, le phosphate de potassium monobasique anhydre, le sulfate d'ammonium, le glucose, la tryptone, l'hydrolysate de caséine, les extraits de levure et les cofacteurs provenaient tous de Sigma Chem. Co. (St.-Louis, MO, É.U.), Boehringer, Fisher Scientific (Montréal, Qué., Canada), ICN (Cleveland, Ohio, É.U.) ou Difco (Détroit, Michigan, É.U.).

2.3 Préparation des courbes d'étalonnage

Sept courbes d'étalonnage ont servi à la quantification. Des courbes de testostérone et d'épitestostérone furent préparées de la manière suivante: huit (8) solutions étalons furent préparées en solubilisant des standards stéroïdiens dans une urine d'enfant prépubère de manière à obtenir des rapports T/ÉpiT se situant entre 0,54 et 10,73. La concentration finale des solutions étalons urinaires variait entre 1,8 et 352 ng/mL pour la T et entre 1,6 et 328 ng/mL pour l'ÉpiT. Les courbes d'androstérone et d'étiocolanolone furent préparées en ajoutant aux solutions étalons urinaires décrites ci-haut de l'A-G et de l'Étio-G dans des concentrations équivalentes à 332-2657 ng/mL d'A-L et 320-2561 ng/mL d'Étio-L. Les rapports A/Étio de ces standards variaient entre 0,13 et 8,30. Les courbes de 5(α/β)-androstandiones furent préparées en diluant les standards stéroïdiens dans du méthanol avant de les dériver et de les injecter. Les concentrations finales variaient entre 0,5 et 40,0 ng/ μ L injecté. La courbe de déhydroépiandrostérone fut préparée à l'aide de solutions étalons couvrant 2,5 à 1000 ng/mL de DHEA-L.

2.4 Isolement des stéroïdes urinaires

Les procédures utilisées pour isoler les stéroïdes urinaires destinés à l'analyse chromatographique sont les suivantes :

- a) Stéroïdes libres et glucuroconjugés : 2,5 µg d'épiétiocholanolone et 250 ng de 17α-méthyl-5α-androstan-3β-17β-diol (standards internes) furent ajoutés à 3,0 mL d'urine auxquels furent ajoutés 3,0 mL de tampon acétate (200 mM, pH 5,2). La préparation fut alors passée sur une cartouche Sep-pak C₁₈[®] (Millipore, Ville St.-Laurent, Qc., Canada) préalablement conditionnée par le passage de 5 mL de méthanol et de 5 mL d'eau. La cartouche fut ensuite lavée avec 5 mL d'eau et 3 mL d'hexane et les stéroïdes furent élués en une seule fraction à l'aide de 5 mL de méthanol (débits : 1-5 mL/min.). Le solvant fut évaporé à sec sous un jet d'azote à 50 °C. Le culot fut ensuite dissous dans 2 mL de tampon phosphate (200mM, pH 6,9) dont 1 mL fut transféré dans un autre tube de 15 mL de manière à obtenir un double de l'échantillon initial permettant d'extraire les stéroïdes libres en une première fraction et les stéroïdes libres + les stéroïdes glucuroconjugés en une deuxième fraction (voir extraction des libres ci-après). L'hydrolyse enzymatique fut effectuée suite à l'ajout de 50 µL d'une solution de β-D-glucuronidase type IX-A (de *E. coli*, 40 000 unités Fishman/mL) fraîchement préparée formant un mélange réactionnel incubé 1 heure à 50 °C. La température fut ensuite abaissée à la température ambiante et le pH du mélange ajusté à 8,5 en ajoutant 100 mg de tampon carbonate/bicarbonate (10:1 p/p). Les stéroïdes furent extraits avec 5 mL d'éther diéthylique en agitant sur Vortex et en centrifugeant 10 min. à 3000 rpm. La phase organique fut évaporée à sec sous azote et le résidu dissout dans 200 µL de méthanol puis transféré dans un Réactivial[®] de 200 µL. Le résidu fut ensuite soumis à la dérivation selon la procédure décrite en b). L'extraction des stéroïdes libres dans une matrice urinaire s'est faite de la même façon en excluant toutefois l'hydrolyse enzymatique tandis que les stéroïdes libres dans une matrice aqueuse tamponnée furent extraits en ajustant le pH de la solution à pH 9 puis en passant immédiatement à l'étape de l'ajout de l'éther diéthylique.

b) Dérivation chimique : la dérivation TMS-éther, TMS-énol fut effectuée par l'addition de 50 µL d'un mélange de MSTFA : TMIS (0,1 M) : éthanethiol 50 : 1 : 1. La solution fut chauffée dans un Réactivial[®] de 200 µL bouché sous atmosphère d'azote à 70 °C pendant 30 minutes. La solution de TMIS fut préparée par l'addition de TMIS : triéthylamine : dichlorométhane 215 : 35 : 1 sous atmosphère d'azote.

Tous les stéroïdes furent identifiés à l'aide de standards stéroïdiens authentiques.

Conditions analytiques du CG/SM

Les analyses CG/SM étaient pratiquées sur un Hewlett Packard 5970 MSD (Hewlett Packard, Mississauga, Ont, Canada) couplé à un chromatographe en phase gazeuse, modèle 5890 (série II) équipé d'échantillonneurs automatiques modèle 7673. L'instrumentation et les données étaient contrôlées par ordinateur Hewlett Packard Vectra VL2 sous Hewlett Packard MS Chemstations (séries DOS) software (version C.02.03). La séparation était obtenue sur une colonne capillaire HP-5 (19091J-102) contenant 5% de polyméthyl phényl siloxane (25 m x 0,25 mm x 0,33 µm d'épaisseur) de Hewlett Packard.

Les analyses de l'androstérone et de l'étiocolonalone étaient effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890 (série II) muni d'un échantillonneur automatique ainsi qu'un détecteur FID opérant sous HP 3365 Series II Chemstations (séries DOS) software (version B.02.04). Une colonne capillaire J&W, DB-1 faite de silice polyméthylée (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm d'épaisseur) (Chromatographic Specialties, Brockville, Ont., Canada).

Les analyses CG/SM étaient effectuées en injectant 1 µL du dérivé TMS-éther, TMS-énol en mode débit non partagé (30 sec) dans un port d'injection débit partagé/non partagé muni d'un conduit interne en verre contenant de la laine de verre, tous deux silanisés. L'hélium était utilisé comme gaz vecteur et la programmation de température du four était la suivante : 100 °C (1 min) à 200 °C à raison de 16 °C/min, à 301 °C à raison de 3,8 °C/min et finalement à 320 °C à raison de 20 °C/min. La température finale était maintenue pendant 5,5 min. La température du port d'injection était maintenue à 270 °C et la ligne de transfert à 315 °C. Le multiplicateur d'électron

était fixé à 200 eV de plus que le voltage obtenu de l'ajustement automatique du détecteur sélectif de masse avec une ionisation par impact électronique à 70 eV durant l'analyse. Les analyses étaient effectuées en mode SIM ou scan. Les spectres de masse étaient obtenus en balayant la région m/z 50 à m/z 660 amu.

Chaque séquence analytique incluait l'analyse d'un mélange standardisé afin de vérifier la performance analytique du CG/SM. Le mélange contenait notamment de la testostérone, de l'épitestostérone (2 ng/μL injecté) et du 17α-méthyl-5α-androstan-3β,17β-diol (standard interne) (5 ng/μL injecté). Un contrôle de qualité était effectué dans le but de vérifier la performance de la procédure entière à l'aide d'un échantillon urinaire contenant de la testostérone et de l'épitestostérone ainsi que de l'androstérone et de l'étiocolanolone glucuroconjuguées.

Tableau 5 Analyse CG/SM (mode SIM) des stéroïdes d'intérêt. RRT par rapport au standard interne : 17α-méthyl-5α-androstan-3β,17β-diol (m/z 435,4)

Stéroïdes	RRT (min)	Ions (m/z)
5(α/β)-androstan-3α,17β-diol	0,865	346,3 ; 331,3 ; 256,2 ; 241,2
5(α/β)-androstan-3β,17β-diol	0,934	346,3 ; 331,3 ; 256,2 ; 241,2
5α-androstan-3,17-dione	0,931	432,4 ; 290,2 ; 275,2
5β-androstan-3,17-dione	0,806	432,4 ; 290,2 ; 275,2
Δ ⁵ -androstèn-3β,17β-diol	0,924	434,4 ; 344,3 ; 239,2 ; 129,1
Δ ⁴ -androstèn-3,17-dione	0,958	430,0 ; 415,0
Déhydroépiandrostérone	0,909	432,0 ; 417,0 ; 327,0
5α-dihydrotestostérone	0,943	434,4 ; 405,4 ; 143,1
5β-dihydrotestostérone	0,811	434,4 ; 405,4 ; 143,1
Épiandrostérone	0,914	434,4 ; 419,4 ; 239,2
Épitestostérone	0,968	432,4 ; 417,4
Testostérone	0,973	432,4 ; 417,4

2.5 Echantillons biologiques

Les échantillons urinaires utilisés provenaient de volontaires sains, hommes et femmes, âgés entre 18 et 40 ans et d'athlètes de diverses origines, recueillis dans le cadre de programmes nationaux et internationaux. Afin de prévenir toute dégradation, les urines furent congelées, passées sur filtres stérilisant Nalgene® 0,2 µm (Nalgene Brand Products, Rochester, NY, É.U.), ou immédiatement utilisées. L'urine témoin fut filtrée et congelée à -20 °C en petits volumes de moins de 100 mL de manière à ne décongeler que la fraction nécessaire à la fois, prévenant ainsi les variations provoquées par un grand nombre de manipulations.

2.6 Stabilité thermique et chimique des stéroïdes

Une solution mère de 1000 µg/mL fut préparée pour chacun des 9 stéroïdes suivants : DHEA-S, A-S, Étio-S, T-S, ÉpiA-S, DHEA-G, T-G, A-G et Étio-G. Les volumes nécessaires de ces solutions furent ajoutés à deux fioles jaugées de 25 mL contenant soit les sulfates soit les glucuronides et 625 µL d'une solution mère des deux standards internes de manière à obtenir des concentrations finales de 2000 ng/mL pour la DHEA, l'A, l'Étio et l'ÉpiA et de 200 ng/mL de T. Des solutions aqueuses tamponnées à l'aide de deux tampons biologiques, CAPS et MES (0,5 M) ont servi à compléter au trait de jauge en ajustant les pH à 5,0 et 9,0 respectivement. Les solutions furent passées sur des filtres stérilisant Nalgene® 0,2 µm et chacune d'elles fut distribuée par volumes de 4 mL dans des tubes stériles de 15 mL. Ces tubes furent ensuite incubés à 20, 37 et 50 °C. Des aliquotes de 0,5 mL furent prélevés de chaque tube après 3 ½, 7 et 14 jours puis congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

De la même manière, trois solutions d'A, d'ÉpiA et d'Aèndiol de concentration égale à 20 µg/mL furent incubées à 37 et 50 °C pendant 14 jours dans les conditions décrites précédemment.

2.7 Isolement et identification de micro-organismes

Préparation des milieux de culture

- Luria Bertani (LB) : un litre de ce milieu de culture fut préparé en solubilisant 10g de tryptone, 5g d'extrait de levure et 10g de NaCl dans un litre d'eau distillée. La solution fut amenée tout près du point d'ébullition afin de bien dissoudre les solides, puis elle fut stérilisée dans un autoclave à l'aide d'un cycle liquide de 20 min., 15 psi et 120 °C.
- Milieu minimal MM30 (MM30) : un litre de milieu minimal stérile fut préparé en ajoutant 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 g de KH_2PO_4 ; 6 g de Na_2HPO_4 ; 3 mL d'une solution de sels minéraux ; 100 mg d'une solution d'hydrolysate de caséine 5% et 50 mg d'une solution d'extraits de levure 5%. Le pH de la solution fut ajusté entre 5,0 et 9,0 par incréments de 0,5 unité en ajoutant du HCl ou du NaOH. La solution de sels minéraux fut préparée en mélangeant 0,5 mL des solutions stériles suivantes : EDTA 5% ; CaCO_3 1% ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5% ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10% ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10% plus 0,5 mL du mélange 44 et 20 mL d'une solution de glucose 50%. Le mélange 44, pour sa part, fut préparé en solubilisant 250 mg d'EDTA, 1095 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 39,2 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,1 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et 17,7 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ dans 100 mL d'eau distillée contenant 5 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Isolement des micro-organismes dans les urines

Afin de recenser les micro-organismes présents dans les urines, chacune d'elles fut incubée à 37 °C dans un agitateur rotatif réglé à 250 rpm. Après 18-24 hres un prélèvement de 5 µL fut étalé sur une gélose nutritive en condition aérobie. Chacune des colonies différentes qui apparurent après 18-48 hres d'incubation à 37 °C fut purifiée par repiquages successifs sur le même type de gélose. Par la suite, la souche purifiée fut inoculée dans 1 mL de milieu LB et incubée de 18-24 hres à 37 °C. La suspension bactérienne fut mélangée à un volume égal de glycérol 20% (v/v) pour être congelée à -80 °C.

Isolement des micro-organismes pouvant être inclus lors de la réception des échantillons urinaires

Trois mL de milieu LB furent prélevés à l'aide des pipettes utilisées lors de l'échantillonnage au laboratoire. Les volumes furent transférés dans 10 tubes non stériles de 15 mL servant à la procédure d'extraction. Après mesure du pH, les milieux furent ensuite incubés 96 hres à 37 °C dans un agitateur rotatif réglé à 250 rpm.

Identification

Chaque isolat bactérien fut caractérisé sommairement en déterminant sa réponse au test de coloration de Gram, ainsi qu'au test de catalase et par une observation microscopique.

L'identification au niveau du genre et de l'espèce fut réalisée en utilisant les galeries d'identification bactérienne API (BioMérieux, St.-Laurent, Qué., Canada) ou Biolog (Biolog, Hayward, CA, USA) selon le protocole suggéré dans le livret de la compagnie. Les galeries API-20E ont servi à identifier les *Enterobacteriaceae* et les principaux bacilles à Gram (-) non fermenteurs, les galeries API-Staph ont servi à identifier les staphylocoques et les microcoques, et les galeries Biolog (-) et Biolog (+), couvrant des spectres plus larges qu'API, ont servi à identifier les bactéries plus difficilement identifiables avec les autres galeries.

2.8 Dégradation bactérienne urinaire

Suivi de la dégradation urinaire en fonction du temps

Dix urines de pH connus provenant de volontaires sains et recueillies en conditions non stériles furent incubées à 37 °C dans un bain thermostaté à même le pot de plastique de 120 mL servant à recueillir l'urine. Cinq mL furent prélevés stérilement à chaque 24 heures durant 7 jours et les pH furent mesurés avant la congélation des échantillons à -20 °C.

Evaluation des effets de la dégradation sur les stéroïdes urinaires

Trois mL de chaque urine furent pipetés et versés dans un tube éprouvette stérile de 10 mL, lequel fut incubé de 96-120 hres à 37 °C dans un agitateur rotatif réglé à 250 rpm. Un prélèvement de 5 µL était effectué après 18-24 hres dans le but d'isoler les bactéries présentes. À la fin de la période d'incubation, les pH étaient mesurés puis les échantillons étaient analysés ou congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Transfert des facteurs causant la dégradation entre les urines

Un mL d'une urine non stérile dans laquelle la dégradation avait été démontrée au préalable fut transféré dans 19 mL d'une urine stérile contenue dans une fiole Erlenmeyer de 100 mL. L'urine fut incubée à 37 °C pendant 6 jours sur un agitateur rotatif réglé à 250 rpm. Des aliquotes de 3 mL furent prélevés et congelés après 0, 24, 40 hres et 6 jours. Un décompte des unités viables fut effectué au moment de ces prélèvements en utilisant la méthode des dilutions sériales dans la saline 0,85% (p/v) et étalement sur gélose.

Mesure des effets de la dégradation de plusieurs urines causés par une même souche bactérienne

Des suspensions de D.O. $_{600} = 0,5$ (suspensions standards) furent préparées à partir de cellules congelées des souches bactériennes **7*** (*Corynebacterium renale*), **10** (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*) et **106** (*E. coli*) incubées 18 hres dans 1 mL de milieu LB. Après mesure du pH, huit échantillons urinaires furent passés sur filtres stérilisant Nalgene® 0,2 µm. Les inoculums furent préparés en transférant 100 µL de chacune des suspensions bactériennes dans

* Le chiffre indique la souche du micro-organisme

huit tubes éprouvettes de 15 mL contenant 3 mL de chacune des urines stériles. Les suspensions furent aussitôt incubées à 37 °C sur un agitateur rotatif réglé à 250 rpm durant 5 jours. Un aliquote de toutes les urines fut congelé à -20 °C en attendant l'analyse.

2.9 Biotransformation de standards stéroïdiens par une bactérie en milieu minimal

Vérification de la biotransformation

L'inoculum fut préparé en inoculant une éprouvette stérile de 10 mL contenant 2 mL de milieu LB avec des cellules bactériennes congelées. La culture fut incubée à 37 °C de 18-24 hres. Après centrifugation, le culot fut lavé deux fois avec une solution saline 0,85% (p/v). Un volume de 100 µL d'une suspension bactérienne standard fut inoculé dans 2 mL de MM30 contenant 10 000 ng/mL de stéroïde. La culture fut ensuite incubée 48 hres à 37 °C.

Vérification de l'oxydation d'un stéroïde sous la forme libre et glucuroconjuguée

On a ajouté à un tube stérile a de 50 mL, 43 nmoles de 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol-17-glucosiduronate et 9,5 mL de MM30 pH 9,0 préalablement équilibrée à 37 °C. Un autre tube stérile b contenait en plus 4300 nmoles de saccharolactone. Un troisième et dernier tube stérile c contenait 43 nmoles de 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol libre au lieu du stéroïde conjugué et servait de témoin. Un volume de 500 µL d'une suspension bactérienne standard d'*Aeromonas salmonicida* fut ajouté (~10⁹ bact.) à chacun des trois tubes préalablement équilibrés à 37 °C. Un volume de deux fois 200 µL ont été prélevés des tubes a et b et 1 x 200 µL du témoin après 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min. 5 mL d'éther diéthylique et 25 µL de la solution de standards internes furent ajoutés et tous les tubes furent immédiatement agités au vortex puis congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Chacune des deux aliquotes des tubes a et b a servi à mesurer la quantité de stéroïde(s) dans les fractions libre et glucuroconjuguée tandis que seule la fraction libre fut extraite dans le cas du témoin suivant la procédure décrite en 2.4

Patron d'oxydation des précurseurs immédiats de la testostérone : la déhydroépiandrostérone, l'androstèn-3 β ,17 β -diol et le 5 α -adrostan-3 β ,17 β -diol

Des cellules d'*A.salmonicida* furent induites en incubant pendant 18 hres à 37 °C une suspension de ces cellules bactériennes congelées dans une éprouvette stérile contenant 1 mL de MM30 et 1 mL de LB plus 0,05% (p/v) d'un des trois stéroïdes. Un volume de 100 µL d'une suspension bactérienne standard des cellules induites furent ajoutés à 10 mL de MM30 équilibré à 37 °C et

contenant 40 µg de substrat. Les aliquotes furent ensuite incubés à 37 °C et 200 µL furent prélevés après 0, 2, 5, 10, 30, 60, 120 min., 18 hres et 7 jours. Les prélèvements furent transférés dans des tubes contenant 25 µL de la solution de standards internes et 5 mL d'éther diéthylique, puis congelés à -20 °C.

Biotransformation de la déhydroépiandrostérone et de l'androstèn-3β,17β-diol par 27 micro-organismes différents

Vingt six souches bactériennes différentes isolées et identifiées au cours de ce travail (7, 9, 10, 13, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 30, 36, 38, 42, 43, 51, 55, 57, 61, 64, 67, 77, 80, 93, 95 et 106)* ainsi qu'une levure (63)* furent inoculées dans 1 mL de milieu LB. Les cultures furent incubées à 37 °C. Après 18 hres, les cellules furent centrifugées et lavées avec de la saline 0,85% (p/v). La suspension bactérienne fut ajustée à une D.O.₆₀₀ = 0,5-1,0. Un volume de 100 µL de chacune des suspensions furent transférés dans 1,0 mL de MM30 pH 9,0 contenant 2000 ng de DHEA ou 500 ng d'Aèndiol. Les cultures fut incubé 48 hres à 37 °C.

* Chaque souches bactériennes fut numérotée lors de l'identification, voire Tableau 6 section 3.2.

2.10 Biotransformation de standards stéroïdiens par un lysat cellulaire d'*Aeromonas salmonicida*

Préparation du lysat cellulaire

Une culture bactérienne congelée d'*A. salmonicida* a servi à inoculer 500 mL de milieu LB. La nouvelle culture fut incubée de 18 à 24 hres à 37 °C. Après une centrifugation de 10 min. à 8000 rpm et deux lavages à la saline 0,85% (p/v), on a induit les 3 α/β et 17 α/β HSDH ont été induites en ajoutant 0,01% (p/v) d'un mélange de quantités équimolaires d'A, de DHEA, de T et d'ÉpiT au culot bactérien suspendu dans 100 mL de milieu MM30. Après une incubation de 16 hres à 37 °C, la culture a été centrifugé et les cellules lavées à la saline puis le nouveau culot suspendu dans 4 volumes de tampon Hepes 10 mM pH 7,0. La suspension fut soniquée 15 sec et refroidie 45 sec dans un bain de glace. Le cycle fut répété 10 fois. Le lysat fut alors centrifugé 30 min. à 18 000 rpm et congelé à -80 °C par fractions de 1 mL.

Biotransformation des standards stéroïdiens

Un volume de 100 μ L d'un lysat cellulaire a été ajouté à 14 nmoles de substrat et 100 nmoles de co-substrat (NAD⁺/NADP pour l'oxydation et NADH/NADPH pour la réduction) dans un volume final de 300 μ L ajusté à pH 6,0 (réduction) ou 9,0 (oxydation) à l'aide des tampons MES et Bicine 50 mM, respectivement.

2.11 Inhibition de la biotransformation bactérienne des stéroïdes en milieu urinaire

Après lecture du pH, deux urines fraîchement recueillies furent passées sur des filtres stérilisants Nalgene® 0,2 µm. Sept aliquotes de 3,0 mL furent pipetées pour chacune des urines puis versés dans des tubes stériles de 10 mL contenant 100 µL d'une suspension bactérienne standard provenant d'un mélange à part égale (en volume) des souches bactériennes **7** (*C. renale*), **80** (*A. salmonicida*) et **106** (*E. coli*). Un premier aliquote non inoculé servait de blanc tandis qu'un deuxième ayant été inoculé servait de témoin. Une concentration de 1,0 mg/mL de NaN₃ fut ajoutée à deux aliquotes, 1,0 mg/mL de HgCl₂ à deux autres et 1,0 µmole/mL de saccharolactone fut ajouté à la dernière aliquote. Le blanc fut immédiatement congelé à -20 °C tandis que le témoin, la suspension contenant la saccharolactone et une suspension contenant chacun des sels inorganiques furent incubés à 37 °C. Les deux autres suspensions contenant les sels inorganiques sont demeurées pendant 4 hres à 20 °C avant d'être incubées à 37 °C.

CHAPITRE III

RÉSULTATS et DISCUSSION

3.1 Stabilité thermique et chimique des stéroïdes sulfo et glucuroconjugés

Des études préliminaires ont montré que l'analyse tardive du profil stéroïdien d'une urine contaminée par un ou plusieurs micro-organismes peut présenter certaines anomalies. Ces différences se résument principalement à une déconjugaison des stéroïdes sulfo et glucuroconjugés se traduisant par l'apparition de stéroïdes dans la fraction libre, la production des Adiones normalement présents à l'état de trace dans l'urine et la disparition de certains stéroïdes [Ayotte et al., 1996], [Hemmersbach, 1996].

Dans le but de distinguer les effets des micro-organismes de ceux causés par certains facteurs tels le pH et la température, nous avons étudié la stabilité de stéroïdes conjugués ciblés. Comme très peu d'études furent réalisées à ce sujet, nous avons vérifié cette stabilité en milieu urinaire et synthétique à des températures variant de -20 à 50 °C à des pH de 5 et 9, de manière à reproduire les conditions extrêmes auxquelles les échantillons urinaires peuvent être soumis.

La stabilité thermique et chimique de quelques stéroïdes endogènes urinaires souvent dégradés en présence de bactéries a été étudiée en les soumettant à diverses conditions. Les stéroïdes choisis, apparaissant au Tableau 6, ont également été sélectionnés en fonction de la présence de groupements hydroxyles et cétoniques, et de leur configuration.

Tableau 6 Stéroïdes utilisés pour l'étude de la stabilité chimique et thermique

Stéroïde	Fonctions d'importance	Conjugué
A	3 α -OH, 5 α -H	(3 α) S et G
DHEA	3 β -OH, 5-ène	(3 β) S et G
ÉpiA	3 β -OH, 5 α -H	(3 β) S
Étio	3 α -OH, 5 β -H	(3 α) S et G
T	17 β -OH, 4-ène	(17 β) S et G

Des neuf stéroïdes incubés, seule la DHEA-S a été déconjugée. Les huit autres stéroïdes, incluant la DHEA-G, sont demeurés stables même aux conditions les plus favorables à la déconjugaison de la DHEA-S, c'est-à-dire après 14 jours à pH 5 et 50 °C. Les résultats sont rapportés au Tableau 7. La déconjugaison était proportionnelle à la température et inversement proportionnelle au pH. En effet, près de la moitié de la DHEA-S s'est retrouvée dans la fraction libre après sept jours à pH 5 et 50 °C, contre 9% à 37 °C et rien à 20 °C. De l'autre côté, l'acidité a favorisé la déconjugaison avec un rapport de 48 : 3 à pH 5 et 9, respectivement.

D'autre part, des études préliminaires ont démontré que les structures de l'A, de l'ÉpiA et de l'Aèndiol n'étaient pas affectées par une incubation de 14 jours à 50 °C dans les conditions de l'expérience précédente.

Tableau 7 Déconjugaison des standards à pH 5 et 9 après 3 ½, 7 et 14 jours à -20 à 50 °C

Stéroïde	Sulfate	Glucuronide	Remarques
A	non	non	
DHEA	oui	non	48% après 7 jours à pH 5 et 50 °C, 9% à 37 °C. Rien à 20 °C.
ÉpiA	non	-	
Étio	non	non	
T	non	non	

L'étude démontre clairement que la forte déconjugaison des stéroïdes d'intérêt dans l'urine n'est pas imputable à la température ou au pH. En effet, huit des neuf stéroïdes étudiés sont demeurés intacts après avoir été incubés 14 jours à pH 5 et 50 °C.

Bien que cette étude n'ait pas été réalisée dans une urine, les résultats sont transposables puisque les stéroïdes sont aussi très stables dans une urine stérile. Nos résultats complètent donc les études d'autres équipes soutenant la stabilité de certains stéroïdes conjugués dans une urine gardée plus d'un an à -20 °C [Robards, K. et Towers, P., 1990]. Par contre, aucune augmentation de testostérone libre n'a été enregistrée ici après plusieurs jours à 37 °C comme l'a observé l'équipe de Kjeld qui n'a pas vérifié la croissance microbienne au cours de l'expérience [Kjeld *et al.*, 1977].

3.2 Isolement des micro-organismes urinaires et identification bactérienne

Le Tableau 3 présenté dans l'introduction recensait les bactéries isolées d'urines contaminées au cours d'expériences menées par trois groupes de chercheurs. Toutefois, ces criblages ont recensé les bactéries présentes en nombre suffisant pour être détectées au moment de leur collecte, soit 5×10^4 bactéries/mL. Afin de recenser toutes les bactéries généralement présentes dans les urines et susceptibles de dégrader les stéroïdes ciblés, 177 urines ont été incubées de 4 à 5 jours à 37 °C de manière à favoriser la croissance bactérienne. Certaines de ces urines ont simultanément été sélectionnées pour analyse bactériologique en fonction des effets observés : la déconjugaison des stéroïdes, leur oxydation menant à l'apparition des Adiones ou de l'Aèndione ou encore l'absence d'effets.

Tableau 8 Bactéries isolées dans des urines non stériles

Gram -	Fréquence (%) / 76 souches	Fréquence (%) / 36 urines	# d'identification des souches bactériennes
<i>E. coli</i>	21,1	44,4	1,4,5,6,8,12,31,35,40,52,60,67,105,106,110,113
<i>Enterobacter spp.</i>	5,3	11,1	27,28,38,
<i>Citrobacter spp.</i>	2,6	5,6	26,30
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,6	5,6	24,64
<i>Alcaligenes faecalis.</i>	1,3	2,8	20
<i>Cedecea spp.</i>	1,3	2,8	18
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	1,3	2,8	9
<i>Klebsiella spp.</i>	1,3	2,8	22
<i>Providencia spp.</i>	1,3	2,8	19
Gram +			
<i>Staphylococci</i>	36,8	77,8	13-16,23,34,37,43,44,46,49,51,55,57,59,61,62,69,70,95,97,99,101-103,107,109,111,114
<i>Enterococci</i>	19,7	41,7	2,11,21,33,36,39,45,48,54,65,68,71,93,98,104,
<i>Corynebacterium spp.</i>	2,6	5,6	7,10
<i>Micrococcus luteus</i>	1,3	2,8	42
Autre microbe			
Levure	1,3	2,8	63

Les souches ont été isolées après 24 hres d'incubation, ce qui a permis de tenir compte des bactéries présentes en nombre restreint, en plus de celles présentes à raison de 50 000 unités viables comme dans la majorité des tests cliniques dont il est fait mention dans la littérature. La fréquence à laquelle les souches ont été isolées ainsi que celle à laquelle elles ont été retrouvées dans les urines sont présentées au Tableau 8.

Les résultats indiquent que plus de deux urines sur trois contenaient au moins une souche bactérienne appartenant au groupe des staphylocoques, tandis que près de la moitié étaient contaminées par au moins une souche d'*E. coli* ou une souche d'entérocoque. Les autres souches étaient moins communes et appartenaient à 11 espèces différentes. Au total près de 95% des urines étaient contaminées.

Les 110 dernières urines ont été incubées après être passées à travers la procédure de réception du laboratoire, incluant notamment l'utilisation de verrerie, la lecture du pH et le pipetage, en conditions non stériles. Nous avons identifié les contaminants bactériens pouvant provenir du laboratoire en incubant dix aliquotes de 3 mL de LB pendant 96 hres à 37 °C. Deux autres souches bactériennes ont été identifiées, soient *Aeromonas salmonicida* et *Pasteurella anatispestifer*, en plus de deux espèces de staphylocoques déjà répertoriées.

Même si notre échantillonnage était beaucoup plus petit que celui des études de référence, les résultats sont comparables. En effet, les trois études révèlent que les bactéries retrouvées le plus fréquemment sont *E. coli* et des espèces appartenant aux groupes des entérocoques et des staphylocoques. L'unique différence concerne le pourcentage d'identification élevé des espèces *Klebsiella*, *Proteus* et *E. coli* des articles de références. Ces bactéries sont souvent la cause d'infections urinaires et les laboratoires cliniques analysent des urines provenant de donneurs ayant de plus fortes chances d'être infectés. Celles de cette études provenaient de donneurs sains.

3.3 Dégradation bactérienne urinaire

Dans cette section, nous avons tenté de démontrer l'implication des bactéries dans la dégradation des stéroïdes androgènes d'urines non stériles ayant été incubées après leur collecte. Nous décrivons les effets généralement observés causés par la dégradation et nous mettons en perspective l'utilisation de la mesure du pH comme indice de dégradation des stéroïdes urinaires.

3.3.1 Effets observés

Une urine dégradée peut montrer certaines caractéristiques visuelles : coloration foncée, odeur prononcée, opacité, dépôts, etc., tandis que d'autres effets ne sont perçus que lors de mesures instrumentales : élévation du pH, formation d'indole, d'acide benzoïque, déconjugaison des stéroïdes et production des androstandiones par oxydation des stéroïdes déconjugés.

Nous décrivons dans cette section les résultats d'une incubation de cinq jours à 37 °C de près de deux cents urines échantillonnées en conditions non stériles. Cette expérience a servi à décrire le patron général de dégradation des stéroïdes ainsi que la variation du pH en fonction de cette dégradation.

a) Fréquence des réactions. Suite à l'incubation des 177 urines près de 95% des urines étaient contaminées. Les résultats apparaissant au tableau 9 démontrent dans un premier temps que les stéroïdes des urines stériles n'ont pas été dégradés. Par contre, nous avons répertorié au moins un des signes de dégradation dans 80% des urines, c'est donc dire que seulement 20% des échantillons sont demeurés intacts.

Tableau 9 Dégradation statistique des stéroïdes de 177 urines

Echantillons	Profil intact (%)	Profil dégradé (%)	Traces d'Adiones (%)*
Urines stériles (n=3)	100	0	0
1 ^{er} criblage (n=19)	21	79	73
2 ^{ième} criblage (n=48)	23	77	60
3 ^{ième} criblage (n=110)	20	80	43

* Pourcentage par rapport aux urines dégradées.

Le bilan de ces trois séries d'analyses nous permet de constater que les résultats sont très semblables. En effet, 20 à 23% des aliquotes étaient intacts après l'incubation tandis que 77 à 80% étaient dégradés. Toutefois, des androstandiones s'étaient accumulées dans 43 à 73% des urines dégradées, démontrant qu'on ne peut se fier uniquement à la présence de cet indicateur pour apprécier la dégradation.

Le chromatogramme présenté à la Figure 11 résume les variations généralement observées. Nous remarquons la diminution des stéroïdes endogènes glucuroconjugués excrétés en grande concentration : A, Étio, Adiols, et la production des Adiones et de l'Aèndione, résultant de l'oxydation des premiers métabolites. L'augmentation de l'ÉpiA ne provient pas uniquement de la déconjugaison de la forme sulfatée mais aussi d'un équilibre ÉpiA ↔ 5α-Adione tel que démontré plus loin.

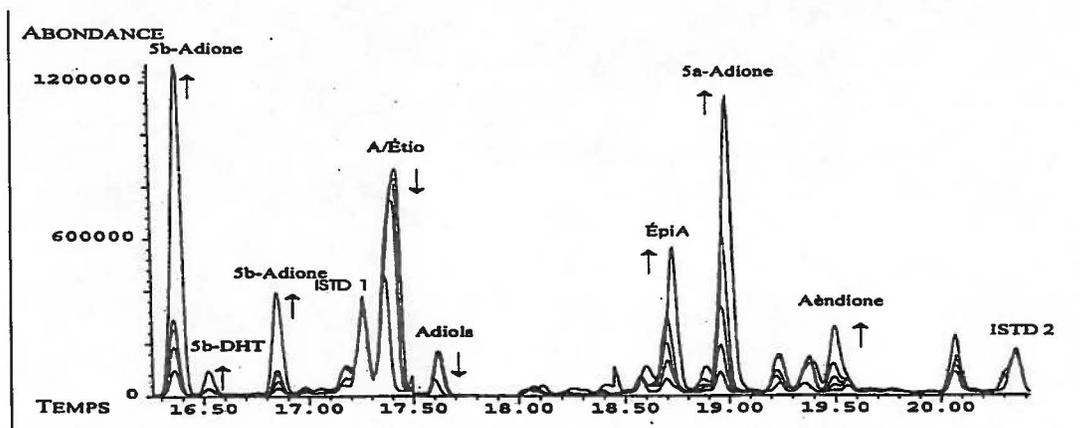


Figure 11 : Chromatogramme TIC des fractions L+G d'une urine montrant le suivi de la dégradation à 37 °C sur une période de 7 jours.

b) pH vs dégradation des stéroïdes. Au cours de la dernière série d'analyses, nous avons pris soin de mesurer le pH des urines avant et après la période d'incubation. Ces données nous ont permis de suivre de plus près les fluctuations de ce paramètre lors de l'incubation des urines.

Tableau 10 Variation du pH des urines lors d'une incubation à 37 °C

Echantillons	pH initial	pH final	Variation du pH
Urine stérile (n=3)	5,8 ; 6,0 ; 6,2	5,9 ; 6,0 ; 6,2	0,0 à 0,1
Urines (n=110)	5,8 ± 0,6	7,3 ± 1,4	1,6 ± 1,2
Profil oxydé (n=11)	-	8,2 ± 1,3	2,2 ± 1,2
Profil intact (n=26)	-	7,9 ± 1,3	2,0 ± 1,4

Il est important de noter que le pH d'une urine stérile demeure stable au cours d'une incubation. Par contre, l'incubation des urines non stériles amène une augmentation du pH. Une analyse du pH des urines dégradées et de celui des urines dont les stéroïdes sont demeurés intacts semble indiquer qu'il n'y a aucune relation entre les deux mesures. En effet, les 11 urines les plus oxydées avaient un pH final moyen statistiquement identique à celui des 26 urines inchangées. D'autre part, l'écart du pH initial par rapport au pH final ne semble pas être un meilleur paramètre discriminatoire puisque ces mêmes 11 urines présentaient un écart moyen très semblable à celui des 26 autres. D'autant plus que dans un cas comme dans l'autre il y a des exemples où le pH des urines est demeuré stable après l'incubation tandis que pour d'autres, le pH a fait un bon de quatre unités.

Les résultats d'une étude quotidienne de la variation du pH lors d'une incubation de sept jours à 37 °C de dix urines échantillonnées dans les mêmes conditions sont présentés au Tableau 11. Les valeurs inscrites en caractères gras indiquent l'observation de la dégradation des stéroïdes.

Tableau 11 pH de 10 urines non stériles incubées 7 jours à 37°C

Urine	pH initial	pH final	variation du pH
1	4.9	8.6	+ 3.7
2	4.9	5.0	+ 0.1
3	6.2	6.5	+ 0.3
4	6.4	7.9	+ 1.5
5	6.7	6.9	+ 0.2
6	6.0	7.9	+ 1.9
7	6.1	7.2	+ 1.1
8	7.6	7.7	+ 0.1
9	5.3	5.3	0.0
10	6.8	7.2	+ 0.4

Il semble à nouveau qu'un pH final élevé n'indique pas une dégradation des stéroïdes. En effet, une seule urine avait un pH final supérieur à 8,0. Deux autres avaient un pH final > 7,0 mais trois urines intactes présentaient aussi de telles valeurs. D'autre part, certaines urines grandement dégradées avaient un écart de pH presque nul.

3.3.2 Suivi de la dégradation urinaire en fonction du temps

L'observation des effets d'une incubation sur des urines non stériles a permis de caractériser de manière générale la dégradation des stéroïdes après l'incubation. L'expérience suivante, résumée au Tableau 12, a permis de suivre cette dégradation en fonction du temps puisqu'une analyse était effectuée toutes les 24 hres.

Des dix urines ayant servies à cette étude, cinq furent dégradées et démontrèrent la présence des signes d'oxydation, c'est-à-dire l'apparition des Adiones et/ou de l'Aèndione. Une étude comparative montre que les effets ne sont pas tous identiques. En effet, nous avons détecté la production de 5 β -Adione dans les urines 1, 6 et 9 tandis que les deux épimères ainsi que l'Aèndione ont été produits dans les échantillons 4 et 5. De plus, il n'a été possible de voir la déconjugaison que dans trois des cinq urines dégradées. En fait, cette étape précède l'étape d'oxydoréduction, comme il fut démontré au cours d'une expérience décrite à la section 3.4.5, mais si cette dernière est très rapide, les stéroïdes ne s'accumulent pas dans la fraction libre.

Tableau 12 Dégradation en fonction du temps

Urines	Types de réaction*		
	Dégradation	Déconjugaison	Oxydation
1	oui	non visible	5 β -Adione
2	non	-	-
3	non	-	-
4	oui	forte	5(α/β)-Adiones et Aèndione
5	oui	non visible	5(α/β)-Adiones et Aèndione
6	oui	visible	5 β -Adione
7	non	-	-
8	non	-	-
9	oui	faible	5 β -Adione
10	non	-	-

* Le type de réaction identifié est basé sur l'analyse spectrale en GC/MS d'extraits d'urines incubées selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes.

Nous pouvons aussi corréler la dégradation des urines très fortement oxydées 4 et 5 à une diminution graduelle de la concentration des androgènes tels l'A, l'Étio, la T, l'ÉpiT, les Adiols, etc., tandis que ces concentrations ne semblent pas diminuer dans l'urine 1, bien qu'il y ait eu une très forte production de 5 β -Adione. Cette observation nous amène à penser qu'il est possible que la production des androstandiones ne soit pas uniquement due à l'oxydation de précurseurs androgènes, mais qu'elle puisse aussi provenir d'oxydations successives d'autres précurseurs tels les corticostéroïdes, les prégnanes ou le cholestérol tel que démontré dans les Figures 6 et 7 de l'Introduction.

3.3.3 Comparaison des effets de la dégradation d'une urine stérile par diverses souches bactériennes

Les expériences précédentes ne nous ont pas permis de déterminer s'il est possible d'associer les divers patrons de dégradation des stéroïdes urinaires à des groupes bactériens précis puisque les urines contenaient souvent plusieurs souches bactériennes. Nous avons donc inoculé individuellement les isolats appartenant aux différents types bactériens dans des aliquotes d'une

même urine stérile. Du fait que plusieurs isolats appartenait à une même espèce, nous avons pu comparer le profil de dégradation engendré par des bactéries d'une même espèce, en plus de pouvoir identifier les souches et les espèces bactériennes capables de dégrader les stéroïdes d'une urine donnée.

Les résultats indiquent une dégradation des stéroïdes dans le tiers des aliquotes après l'incubation tandis que les deux tiers sont demeurées intactes. Il y a eu production d'androstandiones dans 88% des urines dégradées. Les isolats d'une même espèce ont affiché un patron de dégradation semblable. Ainsi, la présence de *E. coli* est le plus souvent associé à une forte déconjugaison combinée à une faible production d'androstandiones. Les souches d'*Enterococcus faecalis*, ont montré un potentiel de dégradation des stéroïdes urinaires pratiquement nul. Seulement 1 cas sur 10 a présenté des signes de dégradation, se traduisant par une déconjugaison partielle des stéroïdes.

Enfin, dans aucun cas nous n'avons relevé la production d'androgène naturel ou de métabolites tels la T, la DHT, l'ÉpiT, l'A ou l'Étio, même si la voie la plus probable conduisant à l'oxydation des androstandiols en androstandiones ou des androstèndiols en androstèndiones devrait comprendre ces intermédiaires (voir Fig. 12). Il faut conclure que le jeu des équilibres enzymatiques favorise grandement leur dégradation en diones.

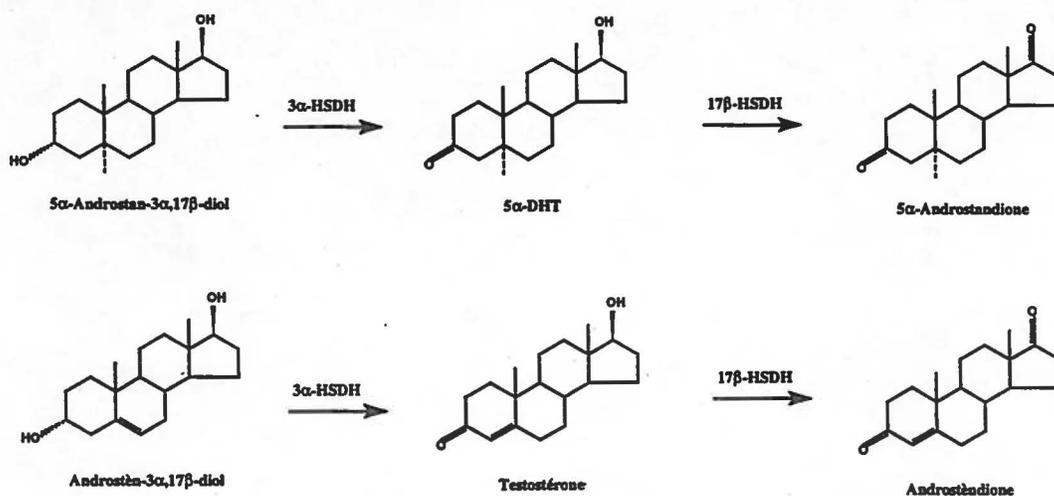


Figure 12 : Résumé des principales biotransformations des stéroïdes urinaires.

3.3.4 Comparaison du profil de dégradation de plusieurs urines inoculées par une même souche bactérienne

Nous avons voulu étudier au cours de cette expérience la dégradation des stéroïdes de plusieurs urines inoculées avec une même souche bactérienne. Des aliquotes de huit urines stérilisées par filtration ont été incubées 5 jours à 37 °C après avoir été inoculées avec l'une des trois souches bactériennes sélectionnées pour leurs capacités à dégrader les stéroïdes. Il s'agit des souches 7 (*C. renale*), 10 (*C. pseudodiphtheriticum*) et 106 (*E. coli*). Cette expérience résumée au Tableau 13 visait à vérifier si une bactérie donnée pouvait causer les mêmes effets sur toutes les urines ou si chacune des urines représentait un milieu particulier capable d'induire ou d'inhiber différentes réactions chez la bactérie. Les résultats sont décrits de manière plus explicite afin de comparer plus facilement les données.

Tableau 13 Dégradation de huit urines produite par l'inoculation individuelle de trois souches bactériennes

Urine	Type de réaction*					
	Oxydation			Déconjugaison		
	<u>7</u>	<u>10</u>	<u>106</u>	<u>7</u>	<u>10</u>	<u>106</u>
A	5β-Adione		5α et 5β-Adiones + Aèndione	faible		faible
B	5α et 5β-Adiones + ÉpiA		5α et 5β-Adiones + Aèndione	faible		faible
C	5α et 5β-Adiones + Aèndione + ÉpiA	Aèndione	5α et 5β-Adiones + Aèndione	faible	DHEA	faible
D	β-Adione	5β-Adione	5α et 5β-Adiones + Aèndione	N.D.		faible
E		5β-Adione + Aèndione		faible	faible	moyenne
F	5α et 5β-Adiones	5β-Adione + Aèndione		moyenne	moyenne	forte
G	5β-Adione		5α et 5β-Adiones	faible		
H	5β-Adione + Aèndione	5β-Adione + Aèndione				forte

* Le type de réaction identifié est basé sur l'analyse spectrale en GC/MS d'extraits d'urines incubées selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes.

Ces résultats suggèrent qu'une souche bactérienne donnée peut produire des changements différents sur les stéroïdes d'une urine à l'autre. Par exemple, nous remarquons que la souche **10** n'a aucunement altéré les stéroïdes des urines **A, B, et G** tandis qu'elle a grandement dégradé ceux des urines **E, F et H**. Ce n'est pourtant pas parce qu'il était impossible pour une bactérie de dégrader les stéroïdes des trois premières urines puisque la souche **106** l'a fait. Nous pouvons aussi remarquer que l'oxydation des stéroïdes ne mène pas obligatoirement à la production des deux épimères de l'androstandione et à l'Aèndione. Nous notons en effet la production unique d'un de ces stéroïdes ou d'un mélange de ceux-ci dans plusieurs aliquotes. Enfin, les résultats de la dernière colonne nous indiquent une fois de plus que la déconjugaison n'est pas toujours apparente lors de l'analyse. Cependant, il faut retenir que l'oxydoréduction est toujours précédée de la déconjugaison.

Nous pouvons donc conclure que les effets provoqués par une souche bactérienne donnée sont susceptibles de varier d'une urine à l'autre. Cette variation est sans doute attribuable au fait que chaque urine possède ses propres caractéristiques : un pH particulier, sa propre composition chimique, des substrats de croissance potentiels variables, en des concentrations très variées, ainsi que ses propres inducteurs et inhibiteurs. Cette composition dépend de plusieurs facteurs tels l'alimentation, le métabolisme, la digestion, l'exercice physique, etc.

3.4 Biotransformation des stéroïdes en milieu minimal

Après avoir observé au cours des expériences de la section 3.3 que, de façon générale, la dégradation des stéroïdes androgènes en milieu urinaire semble toujours tendre vers une déconjugaison suivie d'une oxydation des groupements hydroxyles en C_3 et C_{17} , produisant les deux épimères 5α et 5β -Adiones et l'Aèndione, nous avons voulu observer la biotransformation de certains standards stéroïdiens authentiques de manière à mieux évaluer les produits finaux et les intermédiaires impliqués. Nous avons donc choisi de travailler en milieu minimal MM30. Celui-ci présente de nombreux avantages par rapport à l'urine. En effet, il est de pH et de force ionique donnés et il ne contient aucun substrat, inducteur ou inhibiteur des enzymes 3,17(α/β)-HSDH.

3.4.1 Biotransformation de stéroïdes par les cellules d'*A. salmonicida* en milieu minimal

Le milieu minimal choisi ne contenait ni stéroïdes, ni inducteurs, ni inhibiteurs des principales enzymes impliquées dans la biotransformation des stéroïdes. De plus, le pH neutre du milieu était représentatif du pH d'une urine normale. Ainsi, nous avons pu étudier la dégradation de certains stéroïdes par des cellules viables de la souche **80** (*A. salmonicida*). Quoiqu'elle ne devrait pas se retrouver dans les urines, cette souche a été choisie car elle a démontré une excellente capacité à dégrader les stéroïdes de manière très reproductible lors d'expériences préliminaires. Les résultats de cette expérience qualitative apparaissent au Tableau 14. Les milieux réactionnels ont été extraits et analysés par CG/SM. La variation de la concentration des stéroïdes a été estimée en se basant sur l'abondance en comparaison avec le témoin.

Tableau 14 Biotransformation de stéroïdes par *A. salmonicida* en milieu minimal

Substrats	Produits
3 α -Adiol	5 α -Adione, ÉpiA
3 β -Adiol	5 α -Adione, ÉpiA, 3 α -Adiol, A
5 α -Adione	ÉpiA
5 β -Adione	NIL
A	5 α -Adione, ÉpiA
5 α -DHT	5 α -Adione, ÉpiA
DHEA	Aèndione, T, 5 α -Adione, ÉpiA
ÉpiA	5 α -Adione
ÉpiT	Aèndione, T, ÉpiA
T	Aèndione, 5 α -Adione, ÉpiA

La majorité des transformations montre que sous ces conditions la souche **80** a préféré oxyder les stéroïdes aux positions C₃ et C₁₇ de manière à produire la 5 α -Adione à partir des molécules saturées et l'Aèndione à partir des molécules insaturées en C₄ ou en C₅ (Fig. 13). La transformation de l'ÉpiT et de la DHEA en T sont autant d'exemples qui semblent indiquer une certaine préférence pour la réduction du groupement 17-céto en 17 β -OH. Nous pouvons remarquer une fois de plus l'accompagnement d'ÉpiA lors de la production de 5 α -Adione. L'équilibre entre ces deux molécules apparaît clairement lors de l'utilisation de l'une d'elle en tant que substrat.

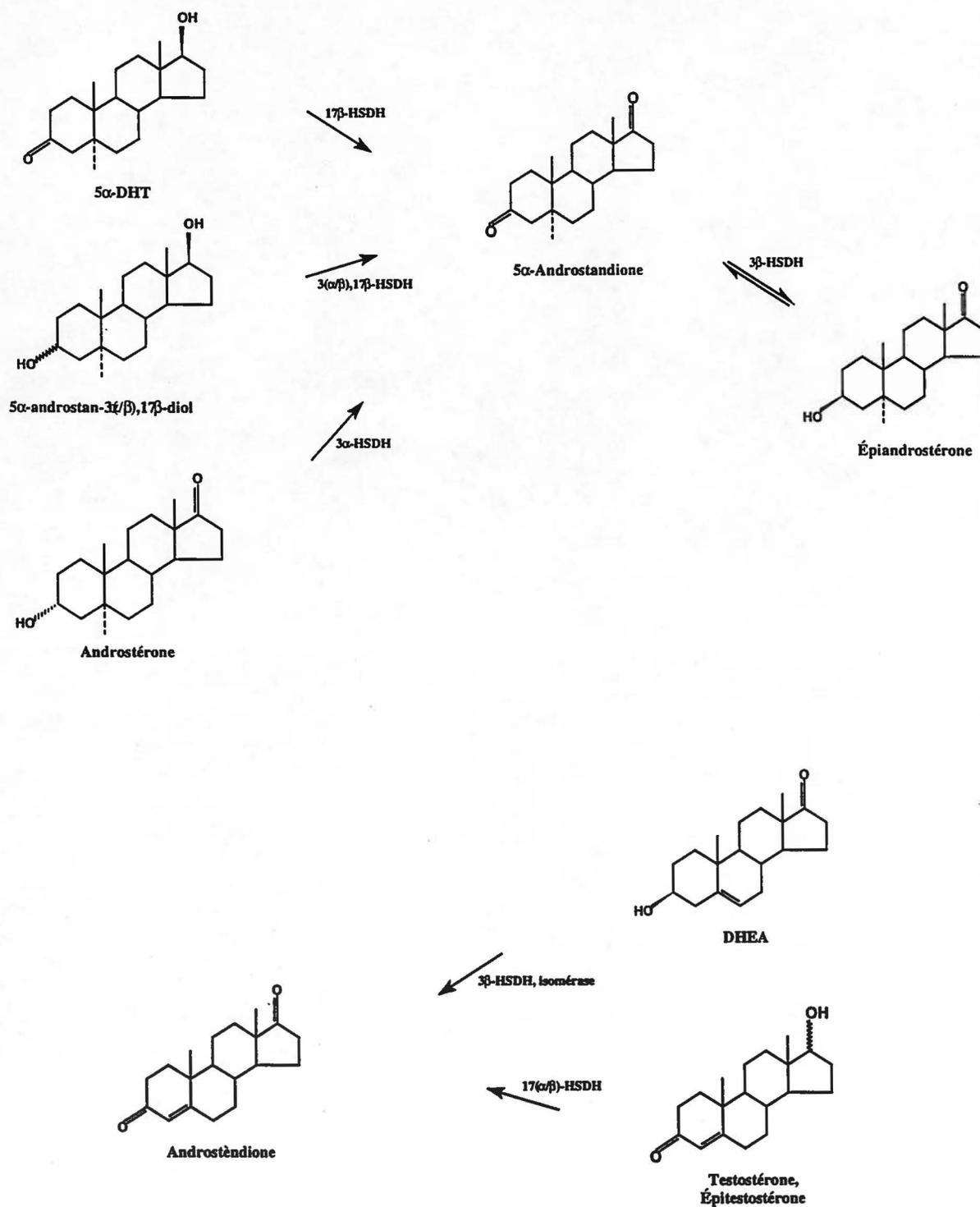


Figure 13 : Présentation des principales biotransformations observées.

3.4.2 Dégradation de stéroïdes par un lysat cellulaire de la souche 80

Dans cette deuxième expérience, nous avons observé de manière qualitative les effets du pH sur la biotransformation des stéroïdes. Il semble en effet, selon la littérature que les réductions et les oxydations catalysées par les 3,17-HSDH sont favorisées à pH ~6 et ~9, respectivement. La dépendance des cofacteurs NAD(H) et NADP(H) en est la raison principale. Pour réaliser cela, il a été nécessaire de travailler à partir d'un lysat cellulaire de la souche 80 puisque la viabilité des cellules dépend grandement du pH. Ainsi, la biotransformation d'un stéroïde par une enzyme pourrait ne pas avoir lieu à cause de la faible concentration cellulaire et non pas à cause de l'incapacité de cette souche de faire cette transformation.

Les standards authentiques ont été incubés à pH 6,0 et 9,0 pour une période de 90 à 180 minutes à 37 °C en présence de l'extrait cellulaire. Les résultats figurant au Tableau 15 ont été obtenus de la même manière que dans l'expérience précédente.

Tableau 15 Biotransformation des stéroïdes authentiques par *A. salmonicida* en milieu minimal

Substrat	Métabolites produits*	
	En conditions d'oxydation	En conditions de réduction
A	5 α -Adione	5 α -Adione
5 α -Adione	ÉpiA	A, Aèndione
5 β -Adione	NIL	Étio, Aèndione
3 β -diol	5 α -Adione	NIL
DHEA	Aèndione	Aèndione
ÉpiT	Aèndione	NIL
T	Aèndione	Aèndiol

* Le type de réaction identifié est basé sur l'analyse spectrale en GC/MS d'extraits d'urines incubées selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes.

Nous remarquons encore une fois la préférence de la souche 80 à oxyder les stéroïdes en prenant comme exemple les biotransformations de la DHEA, de l'A et du 3 β -Adiol, qui n'ont pas été réduits même en conditions réductrices. D'autre part, soulignons une fois de plus la transformation de la 5 α -Adione en ÉpiA par l'action de la 3 β -HSDH en conditions oxydantes.

Les cofacteurs NAD⁺/NADH ont été ajoutés systématiquement dans les milieux réactionnels comprenant un lysat cellulaire. En effet, les enzymes responsables des réactions oxydoréductrices des groupements cétones et hydroxyles des stéroïdes, les HSDH, ont besoin de ces cofacteurs comme donneur ou accepteur d'hydrogène. Certaines enzymes impliquées dans la transformation des stéroïdes (Payne *et al.*, 1997) ont une préférence envers le NADP(H) plutôt que le NAD(H). Pour cette raison, nous avons aussi remplacé le NAD⁺ par du NADP dans les réactions d'oxydation et le NADH par le NADPH dans les réactions réductrices. Les résultats indiquent dans un premier temps que le lysat de la souche **80** ne se sert que des cofacteurs non phosphatés, et dans un deuxième temps que l'inversion des cofacteurs en fonction du pH n'a pas donné de résultats positifs. Nous en concluons que les enzymes HSDH de la souche en question ne se servent que du NAD⁺ pour oxyder les groupements hydroxyles des stéroïdes et que du NADH pour réduire les groupements cétoniques. De plus, le NAD⁺ ne peut servir qu'aux réactions d'oxydation et le NADH qu'aux réactions de réduction.

3.4.3 Biotransformation de la déhydroépiandrostérone et de l'androst-5-èn-3β,17β-diol

Dans une publication, Mahato et Garai en 1997 ont cité quelques exemples de biotransformations bactériennes menant à la formation de stéroïdes d'intérêts pour les laboratoires d'analyses cliniques et antidopages. Inutile de répéter que cette éventualité est une problématique de taille. L'analyse de faux positifs est certes l'erreur que les laboratoires appréhendent le plus. Sachant que les enzymes effectuant ces biotransformations sont très répandues à travers les espèces bactériennes qui elles mêmes se retrouvent souvent dans les urines, nous avons voulu tester les différentes souches isolées.

L'androst-5-èn-3β,17β-diol est un précurseur immédiat de la testostérone en condition oxydante par l'action de la 3β-HSDH/isomérase. La transformation de la DHEA en T nécessite quant à elle une étape supplémentaire, soit celle de la réduction du groupement C₁₇=O en C₁₇-OH. La DHEA et l'Aèndiol étant des précurseurs potentiels de la T (Fig. 13), nous avons évalué la capacité de 27 isolats à effectuer cette conversion en milieu minimal MM30 ajusté à pH 9. Dans ce cas, chaque souche fut inoculée individuellement dans le milieu contenant l'un des substrats de départ puis incubée 48 hres à 37 °C. Les souches provenant d'espèces bactériennes différentes ont été testées : **7, 9, 10, 13, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 30, 36, 38, 42, 43, 51, 55, 57, 61, 63, 64, 67,**

77, 80, 93, 95 et **106** (Tableau 8, p. 41). Nous retrouvons parmi ces souches l'espèce bactérienne la plus réputée à travers la littérature pour produire de la T à partir de la DHEA, soit *P. aeruginosa* (Fig. 14).

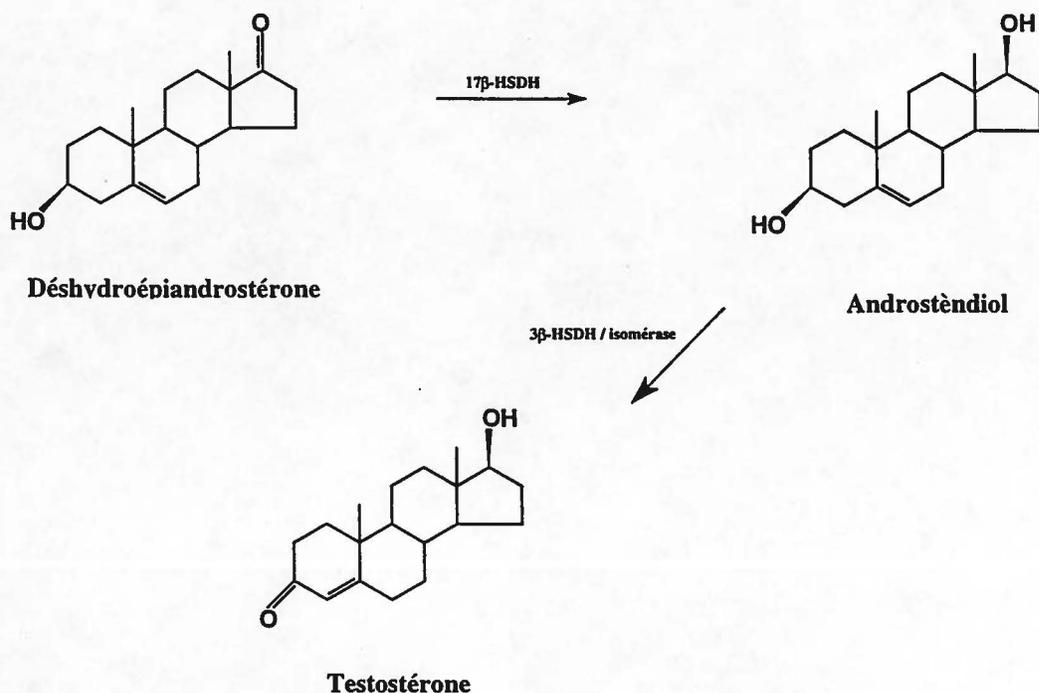


Figure 14 : Patron suggéré de la transformation de la DHEA et de l'Aèndiol en testostérone.

Les résultats obtenus ont révélé que seule la souche **64** (*Pseudomonas aeruginosa*) pouvait produire une quantité détectable de T après 48 hres. Toutefois, le produit d'intérêt ne représentait que 3% de la concentration initiale du substrat au moment de l'analyse. Comme la DHEA était disparue du milieu, il se peut que l'intermédiaire ait atteint une concentration plus élevée avant d'être transformé à son tour. Huit micro-organismes ont modifié la structure de la DHEA. Les souches **30, 42, 51** et **63** l'ont très faiblement réduite en Aèndiol par l'action de la 17β-HSDH, tandis que les souches **7, 14, 80** et **106** l'ont complètement transformée en d'autres métabolites non identifiés. Les 18 autres micro-organismes n'ont d'aucune façon dégradé le substrat.

En ce qui concerne l'Aèndiol, tous les micro-organismes en ont plus ou moins modifié la structure. La modification la plus courante ayant été l'oxydation en C₁₇ menant à la DHEA par

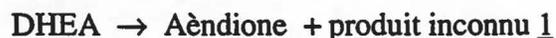
l'action de la 3 β -HSDH au cours de la réaction inverse. Ce substrat (Aèndiol) a disparu dans sept des 27 cultures sans que d'autres pics apparaissent, suggérant une minéralisation.

3.4.4 Patron de biotransformation en conditions oxydantes de la déhydroépiandrosterone, de l'andros-4-èn-3 β ,17 β -diol et du 5 α -androstan-3 β -17 β -diol

Jusqu'à présent, nos travaux viennent appuyer les observations du groupe de Ayotte et al., 1996, à savoir que la production de testostérone ou de 5 α -DHT n'a jamais été notée au cours d'une dégradation bactérienne urinaire. Une seule fois nous avons enregistré une production d'un intermédiaire d'intérêt, c'était lors de la biotransformation de la DHEA en T par *P. aeruginosa*, **64**, tel que décrit à la section précédente. Sachant que la T et la 5 α -DHT peuvent être deux intermédiaires du processus d'oxydation de certains précurseurs androgéniques tels la DHEA, l'Aèndiol et la 5 α -Adiol, mais que nous n'en voyons jamais l'accumulation dans le milieu réactionnel, nous devons conclure que la production bactérienne des androstandiones en milieu urinaire est très favorisée. Cette expérience est donc une tentative d'isolement de ces intermédiaires en milieu minimal.

La souche **80** a servi à cette série d'expériences car elle comptait parmi les quatre souches ayant dégradé la DHEA au cours de l'expérience décrite à la section précédente. Nous n'avons pas utilisé la souche **64** car il était très difficile de la faire pousser de manière reproductible. Les résultats suggèrent les séquences de réactions présentées à la figure 15 :

Dégradation de la DHEA :



Dégradation de l'Aèndiol :



Dégradation de la 5 α -Adiol :



Figure 15 : Dégradation de la DHEA, de l'Aèndiol et de la 5 α -Adiol par *A. salmonicida*.

Dans tous les cas le substrat a rapidement été oxydé en un ou plusieurs intermédiaire(s), puis en produits finaux. Ainsi, la DHEA a été transformée en androstèndione, probablement par une 3β -HSDH et en un produit non identifié.

L'Àèndiol pouvait être oxydé à deux positions, soit en C_3 par une 3β -HSDH/isomérase pour générer la T, soit en C_{17} par une 17β -HSDH pour produire la DHEA. Les deux réactions ont eu lieu. Les intermédiaires ont par la suite été transformés en Àèndione par les deux mêmes enzymes.

Enfin, la voie d'oxydation de la 5α -Adiol devait être différente puisque le substrat était un stéroïde saturé. La production de 5α -DHT et d'ÉpiA sous l'action des 3β et 17β -HSDH, puis la conversion en 5α -Adione sous l'action des deux mêmes enzymes sont les résultats de cette transformation. Mais dans ce cas-ci, nous avons retrouvé la 5α -Adione et l'ÉpiA comme produits finaux.

C'est après environ dix minutes que les intermédiaires ciblés, soient la T et la 5α -DHT, ont atteint des concentrations approximatives maximales respectives de 5,5% et 24% de la concentration initiale du substrat. La rareté des intermédiaires de dégradation dans nos analyses suggère que ces réactions génèrent presque exclusivement les produits finaux, en l'occurrence les androstandiones et les androstèndiones.

3.4.5 Biotransformation en conditions oxydantes d'un stéroïde glucuroconjugué

Nous avons voulu vérifier par cette expérience si un substrat glucuroconjugué pouvait être oxydé directement ou si seuls les stéroïdes libres l'étaient. Une telle transformation pourrait évidemment être problématique dans le cas où la biodégradation d'une urine n'aurait pas produit les marqueurs de la dégradation bactérienne connus jusqu'à ce jour, soient les Adiones, l'Àèndione ou la déconjugaison de certains stéroïdes, apparaissant tous dans la fraction libre de l'extraction. Cette éventualité pourrait entre autre mener à un faux positif suite à la formation de 5α -DHT à partir d'un diol monoglucuroconjugué.

Un stéroïde synthétique, le 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol 17-glucuroconjugué (diol 17-G) a servi à réaliser cette expérience. Cette molécule porteuse d'un groupement OH à ses deux extrémités,

mais dont l'un d'eux est conjugué à une molécule d'acide glucuronique, laissait la possibilité d'une oxydation du groupement en C₃ de manière à obtenir la 5 α -DHT glucuroconjuguée. Un ajout de l'inhibiteur de la β -D-glucuronidase dans un des tubes a servi à prévenir une éventuelle déconjugaison. Enfin, on a suivi la réaction habituelle à l'aide d'une troisième suspension contenant le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol libre. Les incubations de 0-20 hres à 37 °C ont été réalisées à pH 9,0 de manière à favoriser l'oxydation.

La Figure 15 représente le chromatogramme du courant ionique total de l'analyse CG/SM. C'est une superposition des spectres d'extraits de culture de la souche 80 mise en présence du substrat libre après 30 min., 120 min. et 20 hres d'incubation à 37 °C, pH 9. Nous remarquons la transformation complète de l'Adiol en 5 α -Adione, en ÉpiA et en A montrant que cette souche est capable de transformer le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol libre. Par contre, il n'y a eu aucune modification dans la structure du substrat glucuroconjugué, ni déconjugaison, ni oxydoréduction (résultats non présentés). Le stéroïde conjugué s'est retrouvé entièrement inchangé dans la fraction conjuguée après les 20 hres d'incubation. D'autre part, la saccharolactone s'est révélée inutile puisque la bactérie n'a pas déconjugué le stéroïde glucuroconjugué.

Ces résultats indiquent qu'*A. salmonicida*, 80 doit absolument déconjuguer un stéroïde 17-glucuroconjugué avant de pouvoir l'oxyder. Si cette observation pouvait être généralisée à d'autres bactéries, ceci impliquerait que la dégradation des stéroïdes d'une urine pourrait être dépistée par l'unique analyse de la fraction libre de l'extraction, en supposant bien sûr que les produits de dégradation font partie de la famille des androgènes, sans quoi il faudrait s'assurer de les analyser.

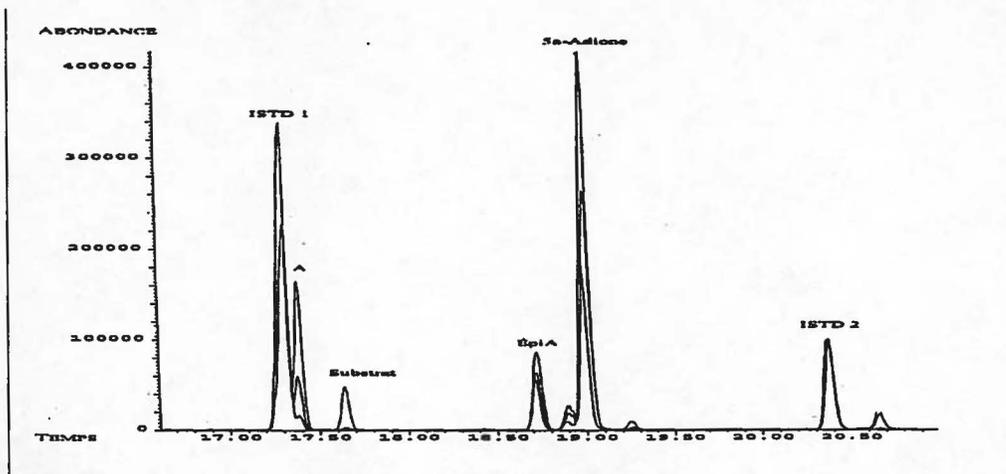


Figure 16 : Chromatogramme TIC de l'oxydation du diol libre par *A. salmonicida* après 30, 120 min. et 20 hres à 37 °C.

3.5 Inhibition de la dégradation des stéroïdes

La congélation à -20 °C d'une urine contaminée semble être un bon moyen pour contrer les effets d'une possible dégradation bactérienne et thermique. Lors de ces travaux, nous avons observé que la congélation immédiate des urines n'a jamais donné suite à une dégradation quelconque de leurs stéroïdes même si les échantillons étaient contaminés. Mais il existe d'autres moyens de prévenir ce problème. L'utilisation d'agents bactéricides est un de ces moyens que nous avons étudié dans le cadre de cette recherche. Les expériences de dégradation urinaire ont toutes été réalisées dans des conditions propices tel que la présence de bactéries et une température d'incubation de 37 °C.

Deux agents bactéricides ont été utilisés, soient : le HgCl_2 et le NaN_3 . Pour réaliser cette expérience, nous avons ajouté un mélange des suspensions bactériennes des souches **7**, **80** et **106** à deux urines fraîches et stériles. Ces trois souches ont démontré au cours d'expériences précédentes un fort potentiel à dégrader les urines (voir les expériences de la section 3.3).

Les résultats démontrent clairement que l'ajout des agents bactéricides a éliminé l'éventuelle dégradation de l'urine et de ses stéroïdes. La présence d'une grande quantité d'androstandiones et d'androstèndione dans les témoins ne contenant pas de bactéricide a servi à démontrer que les bactéries avaient la capacité de dégrader les stéroïdes. De l'autre côté, la congélation de ces témoins a une fois de plus démontré l'efficacité de la congélation dans la prévention de la dégradation bactérienne et thermique.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

La contamination bactérienne des urines peut entraîner la dégradation des stéroïdes urinaires, faussant ainsi les résultats. En effet, un grand nombre de micro-organismes possèdent des enzymes capables de dégrader les stéroïdes et les molécules semblables. Malheureusement, la collecte des urines est effectuée en conditions non stériles entraînant presque assurément la contamination de l'échantillon. Il serait effectivement possible de travailler en conditions un peu plus aseptiques mais une stérilité complète est impossible puisque certaines bactéries sont entraînées lors du passage de l'urine sur la peau. Il est donc de première importance d'étudier plus en profondeur les effets de la contamination microbienne sur la stabilité des stéroïdes.

Des recherches effectuées au cours des dernières années ont permis d'observer une déconjugaison des stéroïdes sulfo et glucuroconjugés suivie d'une oxydation des stéroïdes libres et production de 5(α/β)-androstandiones et d'androstèndione. Certains chercheurs ont aussi rapporté la production de stéroïdes d'intérêt tel que la testostérone [Mahato et Garai, 1997].

Nous devons nous assurer dans un premier temps que la dégradation observées jusqu'alors étaient véritablement due à l'activité bactérienne. Cela a été clairement démontré par l'étude portant sur l'inhibition de la dégradation à l'aide de l'ajout de sels minéraux et de la congélation

des échantillons suite à leur collecte. Aucune des urines auxquelles il fut ajouté un des agents bactéricides ou encore celles conservées à -20 °C n'a été dégradées, même si elles étaient fortement contaminées. De plus, ce n'est que dans les urines contaminées et ne contenant pas d'agent bactéricide que des traces de dégradation ont été enregistrées après l'incubation. Les stéroïdes des échantillons stériles n'ayant jamais subi d'altération.

Une fois rassuré sur ce fait, nous devons étudier la stabilité des stéroïdes conjugués en fonction de certains paramètres susceptibles de favoriser l'activité bactérienne. En effet, la présence de stéroïdes dans la fraction libre d'une analyse est l'un des principaux critères conduisant à la déclaration de dégradation bactérienne. Les résultats nous ont permis de conclure que l'observation de stéroïdes dans la fraction libre d'une analyse est principalement, voire uniquement, due à la déconjugaison bactérienne et non à l'effet de la température ou du pH. Une attention particulière doit toutefois être portée à la DHEA-sulfate qui a été le seul stéroïde étudié à démontrer une certaine instabilité thermique et/ou chimique en fonction du temps. Comme certains chercheurs l'avaient observé, les principaux effets de la dégradation bactérienne sur les stéroïdes sont : la déconjugaison suivie d'une oxydoréduction menant principalement à la formation des 5 α et 5 β -androstandiones et de l'androstèndione. Nous avons noté que plus de 95% des urines reçues au laboratoire étaient contaminées après 24 heures d'incubation. Les stéroïdes de seulement 20% des urines étaient inchangés après l'incubation tandis que ceux de 80% des échantillons avaient été soit déconjugés, soit déconjugés puis oxydés.

Les micro-organismes ont été isolés puis identifiés, permettant de dresser une liste des bactéries susceptibles de se retrouver dans les urines de volontaires sains. Nous avons remarqué que les bactéries les plus communes sont *E. coli*, ainsi que plusieurs types de staphylocoques et d'entérocoques. Les chiffres sont difficilement comparables avec ceux de la littérature puisque les analyses cliniques ne tiennent compte que des espèces présentes à raison de 10⁵ bactéries/mL. Dans notre cas, l'incubation de l'urine pendant 24 heures à 37 °C a permis aux bactéries présentes en petit nombre de coloniser davantage. Des tests ont permis de vérifier qu'une même espèce bactérienne produit généralement les mêmes effets sur les stéroïdes d'une même urine. Ainsi, *E. coli* déconjugue très fortement tout en produisant une faible concentration d'androstandiones, tandis que *E. faecalis* n'altère pas les stéroïdes.

Nous avons noté qu'une bactérie donnée ne produira pas les mêmes effets sur les stéroïdes d'une urine à l'autre. De la même manière, les résultats d'une incubation d'une même urine inoculée avec différentes sortes de bactéries ne seront pas nécessairement identiques. Il n'est donc pas possible de prédire les effets d'une contamination en fonction des bactéries se trouvant dans l'urine. Ainsi, une production ou une diminution de stéroïdes peut avoir lieu par réduction, mais nos études ont révélé que le milieu urinaire favorise largement l'oxydation. Par ailleurs, nous avons observé la formation d'une faible concentration de testostérone à partir de la DHEA en milieu minimal en conditions oxydantes dans une seule des inoculations réalisées avec 27 bactéries. Au cours d'une autre expérience réalisée en fonction du temps à l'aide d'une souche d'*A. salmonicida* et de trois précurseurs immédiats de la testostérone et de la 5α -DHT, la formation des intermédiaires ciblés a été notée. La production des 3,17-diones après l'observation d'une concentration maximale des intermédiaires ciblés après dix minutes a démontré que l'accumulation d'intermédiaires n'était pas favorisée.

Enfin, les résultats d'une dernière expérience servant à observer la formation possible d'un intermédiaire conjugué ont démontré que la souche d'*A. salmonicida* utilisée n'avait pas la capacité d'oxyder le 5α -androstane-3,17-diol glucuroconjugué en C_{17} sans l'avoir déconjugué au préalable.

En conclusion, nous avons délimité au cours de cette recherche les causes et les effets de la dégradation bactérienne sur les stéroïdes androgènes en milieu urinaire. Nous nous sommes assuré que la détection de stéroïdes dans la fraction libre d'une analyse n'était pas due à une instabilité thermique ou chimique. Ce moyen de détection de la dégradation des stéroïdes dans une urine demeurant certes le meilleur avec l'observation de la production de $5(\alpha/\beta)$ -androstandiones. Nous avons démontré d'autre part que la lecture d'un pH élevé n'est pas un indicateur de dégradation. En effet, la seule mesure d'un pH élevé n'indique pas qu'il y a eu dégradation des stéroïdes urinaires même si elle sous-entend la présence d'une activité bactérienne. De la même manière, la hausse du pH entre le moment de l'échantillonnage et de l'analyse n'indique pas que les micro-organismes ont transformé les stéroïdes même s'il y a des traces évidentes d'activité bactérienne. Or, peu importe le pH d'une urine, il est impératif

d'effectuer l'analyse et de porter une attention particulière à la présence d'androstandiones et de stéroïdes libres avant de porter un jugement.

La prévention de la dégradation microbienne semble être simple à première vue puisque nous n'aurions qu'à conserver les urines à moins de 4 °C jusqu'à l'analyse ou encore à ajouter un agent bactéricide puissant avant l'échantillonnage. Or, ce n'est pas aussi simple en pratique. Car toutes les installations ne sont pas toujours présentes et le transport des échantillons n'est pas disponibles partout. Des efforts sont aussi nécessaires pour réduire les délais de transport là où ils peuvent parfois se compter par semaines. D'autre part, l'ajout d'une substance quelconque à l'intérieur du contenant dans le but de prévenir une éventuelle dégradation microbienne pourrait servir à contester une déclaration positive de dopage. Il faut donc être rapide et trouver un moyen de prévention sûre et à l'abri des attaques judiciaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Ayotte, C., Charlebois, A. et Goudreault, D. 1996. « Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine ». J. Chromatogr. B, Vol. 687, pp. 3-25.
- Ayotte, C., Charlebois, A., Lapointe, S., Barriault, D. et Sylvestre, M. 1996. « Validity of urine samples : microbial degradation ». 14th Köln Workshop on Dope Analysis. Köln : Institut für Biochemie.
- Bilton, R.F. 1995. « Microbial production of testosterone ». The Lancet, Vol. 345, p. 1186. (Lettre).
- Bu'lock, J. et Kristiansen, B. 1987. Basic Biotechnology. London : Academic Press.
- Castagnetta, L., d'Aquino, S., Labrie, F. et Bradlow, H.L. 1990. Steroid Formation, Degradation, and Action in Peripheral Tissues. New York : The N. Y. Academy of Sciences.
- Charney, W. et Herzog, H.L. 1967. Microbial Transformation of Steroids. New York : Academic Press.
- Dehennin, L. 1994. « On the origin of physiologically high ratios of urinary testosterone to epitestosterone : consequences for reliable detection of testosterone administration by male athletes ». J. Endocrinology, Vol. 142, pp. 353-360.
- Deslypere, J.P., Wiers, P.W., Sayed, A. et Vermeulen, A. 1981. « Urinary excretion of androgen metabolites comparison with excretion of radioactive metabolites after injection of [4-¹⁴C]testosterone. Influence of age ». Acta Endocrinologica, 96, p. 265-272.
- Dhar, A. et Samanta, T.B. 1993. « Novel oxidative cleavage of C₁₇-C₂₀ bond in pregnane by a Pseudomonas sp. ». J. Steroid Biochem., Vol. 44, No 1, pp. 101-104.
- Geyer, H. et al. 1995. « Factors influencing the steroid profile ». 13th Köln Workshop on Dope Analysis. Köln : Institut für Biochemie.
- Gillenwater, J.Y. et Clark, M.M. 1996. « Tentative direct antimicrobial susceptibility testing in urine ». The Journal of Urology, Vol. 156, pp. 149-153.
- Goodman and Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8^e éd. 1990. USA : Pergamon Press.
- Goudreault, D. 1990. « Étude du métabolisme de l'acétate de méthénolone et de l'acétate de sténbolone chez l'homme par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ». Mémoire de maîtrise, Québec, INRS-santé (UQ), 201, page 108.

- Gowers, D.B. 1979. Steroid Hormones. Great Britain : Croom Helm Ltd Publishers, 115 p.
- Hanson, J.R. 1968. Introduction to Steroids Chemistry. Oxford : Pergamon Press, pp. 1-19.
- Hemmersbach, P. 1996. « Urine storage conditions and steroid profile analysis ». 14th Köln Workshop on Dope Analysis. Köln : Institut für Biochemie.
- Harper, H.A. 1977. Précis de Biochimie. Québec : Les Presses de l'Université Laval.
- Hirayama, K., Itoh, K., Takahashi, E. et Mitsuoka, T. 1995. « Comparison of composition of faecal microbiota and metabolism of faecal bacteria among 'human-flora-associated' mice inoculated with faeces from six different human donors ». Microbial Ecology in Health and Disease, Vol. 8, pp. 199-211.
- Kjeld, J.M. et al. 1977. Clin. Chim. Acta, Vol. 80, p. 285.
- Klyne, W. 1965. The Chemistry of the Steroids. London : Methuen, pp. 1-45.
- Lauvetz, R.W., Monda, J.M., Kramer, S.A. et Husmann, D.A. 1995. « Urinary pH and urea concentration correlate to the bacterial colonization rate in gastric, colonic, ileal and myoperitoneal bladder augmentation ». The Journal of Urology, Vol. 154, pp. 899-902.
- Leunissen, W.J.J. 1979. « Quantitative aspects of the determination of steroid profiles from urine by capillary gas chromatography ». Thèse de doctorat, The Netherlands, College van Dekanen, 161p.
- Mahato, S.B. et Garai, S. 1997. « Advances in microbial steroid biotransformation ». Steroids, Vol. 62, pp. 332-345.
- Mamoli, L. et Vercellone, A. 1937. Ber., 70, 470.
- Mamoli, L. et Vercellone, A. 1937. Ber., 70, 2079.
- McDonald, I.A., Hutchison D.M., Forrest, T.P., Bokkenheuser, V.D., Winter, J. et Holdeman, L.V. 1983. « Metabolism of primary bile acids by *Clostridium perfringens* ». J. Steroid Biochem., Vol. 18, pp. 97-104.
- Martin, C., Orenge, S., Doleans, F. et Denis, F. 1995. « Intérêt des milieux contenant des substrats chromogènes pour l'identification et la numération des bactéries urinaires ». Path Biol, 43, No 9, pp. 749-753.
- Meers, P.D. et Chow, C.K. 1990. « Bacteriostatic and bactericidal actions of boric acid against bacteria and fungi commonly found in urine ». J Clin Pathol, 43, pp. 484-487.

- Nixon, A., Mallet, A.I., Jackman, J.H. et Gower, D.B. 1986. « Testosterone metabolism by isolated human axillary *Corynebacterium spp.* : a gas-chromatographic mass-spectrometric study ». J. Steroid Biochem., Vol. 24, No 4, pp. 887-892.
- Opperman, U.C.T., Filling, C., Berndt, K.D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, et Jornvall, H. 1997. « Active site directed mutagenesis of 3 β /17 β -HSDH establishes differential on short-chain dehydrogenase/reductase reactions ». Biochemistry, Vol. 36, Iss. 1, pp. 34-40.
- Owen, R.W., Mason, A.N. et Bilton, R.F. 1985. « The degradation of β -sitosterol by *Pseudomonas sp.* NCIB 10590 under aerobic conditions ». J. Steroid Biochem., Vol. 23, No 3, pp. 327-332.
- Payne, A.H., Abbaszade, I.G., Clarke, T.R., Bain, P.A., et Park, C.H.J. 1997. « The multiple murine 3 β -HSDH isoforms : Structure, function, and tissue- and developmentally specific expression ». Steroids, Vol. 62, Iss. 1, pp. 169-175.
- Penning, T.M., Bennett, M.J., SmithHoog, S., Schlegel, B.P., Jez, J.M. et Lewis, M. 1997. « Structure and function of 3 α -HSDH ». Steroids, Vol. 62, Iss. 1, pp. 101-111.
- Robards, K. et al. 1990. Biomed. Chromatogr., Vol. 1, p. 1.
- Rogozkin, V.A. 1991. Metabolism of Anabolic Androgenic Steroids. Florida : CRC Press, p. 167.
- Shashi, B.M. et Subhadra, G. 1997. « Advances in microbial steroid biotransformation ». Steroids, 62, pp. 332-345. (Revue).
- Talalay, P. 1957. Physiol. Rev. : 37, 362. (Revue).
- Vallery-Radot, L.P. 1957. Pasteur fermentation centennial. Chas. Pfizer and Co., Inc., New York, p. 4.
- Williams, R.A.D., Lambert, P.A. et Singleton, P. 1996. Antimicrobiol Drug Action. Oxford : BIOS Scientific Publisher.

Liste des abréviations

Nom usuel ou de nomenclature	Nom abrégé
Stéroïde glucuronique	Stéroïde-G
Stéroïde sulfate	Stéroïde-S
Stéroïde libre	Stéroïde-L
Densité Optique à 600 nm	D.O. 600
Déshydrogénase d'hydroxystéroïdes	HSDH
rpm	Rotation par minute
ISTD	Standard interne
SIM	Analyse d'un ion unique
TIC	Courant ionique total
GC/SM	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse

Liste des analytes

Nom usuel ou de nomenclature	Abréviation	#
β -sitostérol	Sito	<u>1</u>
5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	3 α -Adiol	<u>2</u>
5 α -androstan-3 β ,17 β -diol	3 β -Adiol	<u>3</u>
5 β -androstan-3 α ,17 α -diol	5 β -Adiol	<u>4</u>
5 α -androstandione	5 α -Adione	<u>5</u>
5 β -androstandione	5 β -Adione	<u>6</u>
5 α -dihydrotestostérone	5 α -DHT	<u>7</u>
5 β -dihydrotestostérone	5 β -DHT	<u>8</u>
Androstèn-3 β ,17 β -diol	Aèndiol	<u>9</u>
Androstèndione	Aèndione	<u>10</u>
Androstérone	A	<u>11</u>
Cholestérol	Chol	<u>12</u>
Déhydroépiandrosterone	DHEA	<u>13</u>
Épiandrosterone	ÉpiA	<u>14</u>
Épiétiocholanolone	ÉpiÉ	<u>15</u>
Épitéstostérone	ÉpiT	<u>16</u>
Étiocholanolone	Étio	<u>17</u>
Progesterone	Prog	<u>18</u>
Testostérone	T	<u>19</u>