

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

REVUE DES PROCÉDÉS DE DÉCONJUGAISON DES STÉROÏDES URINAIRES ET OPTIMISATION D'UNE MÉTHODE DE SOLVOLYSE DES SULFATES

Par
Catherine Amireault

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr Charles Gauthier Ph. D
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Pr André Lajeunesse Ph. D
Université du Québec à Trois-Rivières

Directrice de recherche

Pr Christiane Ayotte Ph. D
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Il m'a été possible de réaliser ce mémoire grâce à l'appui et au soutien de nombreuses personnes. Je voudrais donc remercier tous les gens du Laboratoire de contrôle du dopage de l'INRS pour leur aide et leurs conseils tout au long de ma maîtrise. Plus particulièrement, j'aimerais remercier :

Christiane Ayotte, ma directrice de recherche, pour son dynamisme, sa confiance et ses conseils.

Toute l'équipe du laboratoire pour leur aide quotidienne précieuse et pour avoir pris le temps de répondre à certains questionnements.

Je remercie l'Institut national de la recherche scientifique pour m'avoir accordé une bourse de deuxième cycle.

Je tiens aussi à remercier les professeurs Charles Gauthier et André Lajeunesse pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon mémoire.

Finalement, un grand merci à ma famille et mes amis pour leur support, leur écoute et leurs encouragements dans cette grande étape de vie.

RÉSUMÉ

Lors de contrôles antidopage, les stéroïdes anabolisants androgènes et leurs métabolites majoritairement glucuroconjugués sont principalement analysés et détectés par les méthodes de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Grâce aux standards disponibles, ces molécules sont identifiables dans le cas d'un dopage sportif grâce à leur temps de rétention et leur spectre de masse. Cependant, depuis les dix dernières années, un vent de changement souffle sur les méthodes d'identification de composés dopants puisque les chercheurs tentent de trouver de nouveaux métabolites permettant d'augmenter la période de détection. Parmi ceux-ci, les métabolites sulfoconjugués, qui ont longtemps été laissés de côté, seraient une façon prometteuse de détecter des cas de dopage. Selon plusieurs études récentes, ces sulfates sont excrétés plus longtemps par le corps humain et donc, constitueraient de bonnes cibles pour une rétrospection à long terme concernant la détection de la prise de stéroïdes.

Bien que différentes méthodes de déconjugaison soient proposées dans la littérature pour l'extraction de ces composés à partir de l'urine, aucune n'est optimale. Il faudrait une méthode spécifique et sélective qui ne crée pas de produit secondaire. Elle devrait aussi posséder un bon taux de recouvrement des composés désirés tout en étant simple d'usage pour une application de routine dans les laboratoires de contrôle du dopage. Des travaux préliminaires dans notre laboratoire ont montré la présence de réactions secondaires indésirables dans les conditions classiques de solvolysse chimique alors que l'hydrolyse des sulfates de plusieurs stéroïdes urinaires résistait à l'emploi d'arylsulfatases commerciales. Une revue des principales méthodes s'imposait.

Lors de la réalisation des présents travaux de recherche, nous avons évalué la performance de plusieurs méthodes d'hydrolyse, qu'elles soient enzymatiques ou chimiques. Des préparations d'enzymes issues d'*Escherichia coli* ou d'*Helix pomatia* ont été testées selon différentes conditions d'utilisation. Les résultats les plus prometteurs sont obtenus avec les différents types de β -glucuronidases d'*E. coli* comme le type 1X-A, le type K-12 ou celle recombinante. Un autre procédé de déconjugaison encore bien souvent utilisé aujourd'hui, soit la solvolysse chimique avec l'acétate d'éthyle, a aussi été comparé avec l'utilisation du tétrahydrofurane comme solvant alternatif. Les résultats sont clairs : l'utilisation de l'acétate d'éthyle n'est pas recommandée. Une méthode optimisée de solvolysse avec le tétrahydrofurane acidifié est donc proposée.

Une importante mise à jour des méthodes de déconjugaison des métabolites sulfoconjugués de stéroïdes anabolisants a été effectuée. Avec ces travaux, les spécialistes des laboratoires de contrôle du dopage pourront prendre des décisions éclairées lors de la réalisation d'une déconjugaison de métabolites urinaires glucuroconjugués ou sulfoconjugués. Dans un avenir proche, il appartiendra alors aux organismes régulant le dopage sportif de déterminer quelle place ces métabolites sulfoconjugués occuperont lors des tests d'antidopage et s'ils peuvent vraiment permettre un meilleur diagnostic de la prise de stéroïdes anabolisants avec une plus grande rétrospection.

Mots-clés : CG-SM/SM; solvolysse; métabolites sulfoconjugués; tétrahydrofurane; hydrolyse; enzymes.

ABSTRACT

Nowadays, when performing anti-doping tests, anabolic-androgenic steroids are mainly analyzed by their glucuronide metabolites detected by gas chromatography-tandem mass spectrometry. With many standards available, these compounds can be easily identified in sports doping cases thanks to their retention time and their mass spectrum. However, in the last ten years, we've been seeing a lot of changes that happened on the identification of doping compounds since researchers are constantly trying to find new metabolites to increase the detection period. Among these, the sulphoconjugates, which have been left out for a long time, would be a promising way of detecting doping cases. According to several recent studies, these sulphates metabolites are excreted on a longer period by the human body and therefore would be good targets for a long-term retrospection regarding the detection of steroid intake.

Although different methods of deconjugation are proposed in the literature for the extraction of these compounds from urine, none are optimal. Therefore, it would require a specific and selective method that does not allow the creation of secondary products. It should also have a good recovery rate of desired compounds while being easy to use for routine application in doping control laboratories. Preliminary work in our laboratory has shown the presence of undesirable side reactions under standard conditions of chemical solvolysis while hydrolysis of the sulphates of several urinary steroids resisted the use of commercial arylsulphatases. A review of the main methods is needed.

In the present research, the performance of several hydrolysis methods, whether enzymatic or chemical, has been evaluated. Enzymes preparations from *Escherichia coli* or *Helix pomatia* have been tested under different conditions of use. The most promising results were obtained with various types of β -glucuronidases from *E. coli* such as 1X-A and K-12 or from recombinant source. Also, another deconjugation method widely used today, the chemical solvolysis with ethyl acetate, has also been compared with the use of tetrahydrofuran as an alternative solvent. The results are clear: the use of ethyl acetate is not recommended during such experiments. An optimized method of solvolysis with tetrahydrofuran is therefore proposed.

An important update of the deconjugation methods of sulphoconjugates metabolites of anabolic steroids has been carried out. With this work, doping control laboratory specialists will be able to make informed decisions when performing a deconjugation of glucuronides or sulphoconjugates urinary metabolites. Henceforth, it will be up to the regulating sports doping officials to determine which place these sulphoconjugated metabolites will occupy in anti-doping tests and whether they can really allow a better diagnosis of the use of anabolic steroids with greater retrospection then before.

Keywords: GC-MS/MS; solvolysis; sulphate metabolites; tetrahydrofuran; hydrolysis; enzymes.

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT.....	III
TABLES DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
2.1 Historique de l'antidopage.....	4
2.1.1 L'utilisation des stéroïdes androgéniques anabolisants.....	4
2.1.2 L'évolution des méthodes analytiques.....	6
2.2 Les stéroïdes.....	7
2.2.1 Structure et nomenclature.....	7
2.2.2 Endogènes ou exogènes.....	8
2.2.3 L'effet androgène et les risques associés.....	10
2.2.4 L'effet anabolisant recherché.....	10
2.3 Le métabolisme des stéroïdes par le corps humain.....	11
2.3.1 Métabolisme de phase I.....	12
2.3.2 Métabolisme de phase II.....	12
2.4 Utilisation des stéroïdes conjugués lors des analyses.....	14
2.4.1 Profil stéroïdien.....	14
2.4.2 Métabolites de longue durée sulfoconjugués.....	14
2.5 Méthodes d'hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués.....	15
2.5.1 Les sucs d' <i>Helix pomatia</i>	15
2.5.2 β -Glucuronidase d' <i>Escherichia coli</i>	18
2.6 Méthodes d'hydrolyse chimique des stéroïdes sulfoconjugués.....	18
2.7 Mesures analytiques.....	21
2.7.1 Analyse par CG-SM/SM.....	21

2.8 Les stéroïdes exogènes étudiés	23
2.8.1 Méthyltestostérone, méthandriol et mestanolone	23
2.8.2 Méthénolone	25
2.8.3 Stanozolol	26
2.8.4 Déhydrochlorométhyltestostérone	27
2.8.5 Désoxyméthyltestostérone	27
2.8.6 Méthastérone	29
2.9 Objectifs des travaux effectués	30
CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES	31
3.1 Matériel utilisé	31
3.1.1 Les stéroïdes	31
3.1.2 Réactifs et solvants	31
3.2 Description des échantillons analysés	32
3.2.1 Standards de concentration connue	32
3.2.2 Description des échantillons négatifs utilisés	32
3.2.3 Description des échantillons positifs (stéroïdes synthétiques)	33
3.3 Méthodes d'extraction des échantillons	33
3.3.1 Isolement des stéroïdes libres	33
3.3.2 Isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués	34
3.3.3 Isolement des stéroïdes libres et sulfoconjugués	34
3.3.4 Dérivation chimique des échantillons	35
3.3.5 Comparaison des méthodes d'hydrolyse enzymatique	35
3.3.6 Procédure pour le test d'absence de peroxyde pour le THF	36
3.4 Analyses CG-SM/SM	37
CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION	42
4.1 Hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués	42
4.1.1 Comparaison des différentes méthodes d'hydrolyse	42
4.2 Résultats sur les stéroïdes sulfoconjugués	47
4.2.1 Comparaison des différentes méthodes d'hydrolyse	47
4.2.2 Optimisation de la méthode	55

4.3 Phase d'application de la méthode optimisée à des urines positives anonymisées	58
4.3.1 Méthyltestostérone, méthandriol et mestanolone	59
4.3.2 Méthénolone	61
4.3.4 Stanozolol	63
4.3.5 Déhydrochlorométhyltestostérone	64
4.3.6 Désoxyméthyltestostérone	65
4.3.7 Méthastérone	66
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69
ANNEXE I : NOMS ET STRUCTURES DES MOLECULES	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Revue de la littérature des différentes conditions d'hydrolyse avec <i>Helix pomatia</i>	17
Tableau 2.2 : Revue de la littérature des différentes méthodes de solvolysse chimique avec l'acétate d'éthyle	19
Tableau 3.1 : Paramètres de la chromatographie en phase gazeuse.....	37
Tableau 3.2 : Temps de rétention et transitions ioniques pour l'analyse des divers métabolites ciblés	38
Tableau 3.3 : Paramètres pour la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur sélectif de masse.....	40
Tableau 3.4 : Paramètres pour l'analyse en mode SIM pour la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur sélectif de masse.....	41
Tableau 4.1 : Comparaison des résultats obtenus lors de l'hydrolyse avec la β -glucuronidase d' <i>E. coli</i> de type 1X-A et de source recombinante.....	43
Tableau 4.2 : Comparaison entre les valeurs obtenues lors de l'hydrolyse avec la β -glucuronidase 1X-A et K12	44
Tableau 4.3 : Comparaison de la durée de l'incubation entre l'hydrolyse réalisée avec la β -glucuronidase 1X-A et celle de K-12 à 50 °C	45
Tableau 4.4 : Concentrations des différents composés dans les échantillons étalons et les contrôles qualité	47
Tableau 4.5 : Concentrations maximales attendues pour chaque composé libre dans les matrices aqueuse et urinaire.....	48
Tableau 4.6 : Résumé des différents paramètres testés en fonction du solvant utilisé pour la solvolysse chimique.....	50
Tableau 4.7 : Efficacité de la solvolysse avec l'acétate d'éthyle lors des tests en solution aqueuse.....	51
Tableau 4.8 : Efficacité de la solvolysse dans le THF lors des tests en solution aqueuse	54
Tableau 4.9 : Vérification en triplicata de l'efficacité des meilleures conditions de solvolysse à 50 °C dans le THF lors de tests en solution aqueuse.....	55
Tableau 4.10 : Résultats du test sur l'impact de la teneur en eau dans la matrice aqueuse sur l'efficacité de la solvolysse chimique dans le THF	56
Tableau 4.11 : Vérification de l'efficacité en triplicata des meilleures conditions de solvolysse à 50°C dans le THF sur l'échantillon dans la matrice urinaire	57

Tableau 4.12 : Résultats du test sur l'impact de la teneur en eau dans un échantillon urinaire sur l'efficacité de la solvolysé chimique dans le THF.....	58
Tableau 4.13 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de méthyltestostérone ou de mestanolone.....	59
Tableau 4.14 : Comparaison de l'abondance des différentes fractions d'urine selon le métabolite observé lors de la prise de méthyltestostérone ou de mestanolone.....	60
Tableau 4.15 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de méthénolone	61
Tableau 4.16 : Comparaison de l'abondance des différentes fractions d'urine selon le métabolite observé suite à la prise de méthénolone	62
Tableau 4.17 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de stanozolol.....	63
Tableau 4.18 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de DHCMT	64
Tableau 4.19 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de DMT	65
Tableau 4.20 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de méthastérone	66

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Structure chimique de la testostérone et numérotation.....	8
Figure 2.2 : Modifications structurales de la testostérone causant une augmentation de l'activité anabolique	9
Figure 2.3 : Principaux changements de structures sur la testostérone pour faire varier l'expression des effets androgéniques et anabolisants	11
Figure 2.4 : Possibilités de conjugaison du groupement 3-hydroxy d'un stéroïde.....	13
Figure 2.5 : Réaction de solvolysse chimique	20
Figure 2.6 : Schéma de l'appareil d'analyse CG-SM/SM.....	22
Figure 2.7 Conversion de la méthyltestostérone, du méthandriol et de la mestanolone en méthylandrostanediols ($5\alpha/5\beta$) et en métabolites hydroxylés en C-16	24
Figure 2.8 : La méthénolone et ses principaux métabolites	25
Figure 2.9 : Le stanozolol et ses principaux métabolites	26
Figure 2.10 : La DHCMT et son métabolite long-terme	27
Figure 2.11 : La DMT et ses principaux métabolites.....	28
Figure 2.12 : La méthastérone et ses principaux métabolites.....	29
Figure 4.1 : Taux de récupération de l'androstérone- d_4 -glucuronide après hydrolyse avec <i>H. pomatia</i> selon différents paramètres d'incubation.....	46
Figure 4.2 : Courbes de cinétique de la déconjugaison de certains composés glucuronides ou sulfates avec les enzymes de <i>H. pomatia</i>	49
Figure 4.3 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM en mode de balayage complet d'un échantillon de standards après une solvolysse dans l'acétate d'éthyle.....	52
Figure 4.4 : Spectre de masse théorique de l'acétate d'épiandrostérone	52
Figure 4.5 : Mécanisme d'acétylation par transestérification de l'épiandrostérone	53
Figure 4.6 : Comparaison de l'abondance du 1α -méthyl- 5α -androst-1-èn- 16α -ol-3,17-dione dans la fraction L+G vs la fraction S	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMA : Agence mondiale antidopage

CG : Chromatographie en phase gazeuse

CG-C-SMRI: Chromatographie en phase gazeuse – combustion – spectrométrie de masse de rapports isotopiques

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

CIO : Comité international olympique

CL-SM: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

CLUHP : Chromatographie liquide ultra-haute performance

HDL : Lipoprotéine de haute densité

DHEA : Déhydroépiandrostérone

5 α -DHT : Dihydrotestostérone (nom commun : Androstanolone)

DSM : Détecteur sélectif de masse

ESTD : Standard externe

IAAF: *International Association of Athletics Federations*, en français : l' Association internationale des fédérations d'athlétisme

ISTD : Standard interne

LDL : Lipoprotéine de basse densité

L+G : Fraction de l'urine contenant les métabolites libres et glucuroconjugués

MSTFA : N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide

m/z : Rapport de masse sur charge

PAPS : 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate

CQ : Contrôle qualité

S : Fraction de l'urine contenant les métabolites sulfoconjugués

SAA : Stéroïde anabolisant androgène

SAAE: Stéroïde anabolisant androgène endogène

SCAN : Mode de balayage complet

SIM : Mesure d'ions sélectionnés

SM/SM: Spectromètre de masse utilisé en tandem

SPE : Extraction sur phase solide

STD : Standard

THF : Tétrahydrofurane

TMIS : Iodotriméthylsilane

UDPGA : Uridine diphosphate acide glucuronique

UN : Urine négative

UP : Urine positive

UR : Urine de référence

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Les méthodes analytiques actuellement utilisées pour les tests de contrôle du dopage sportif sont variées. D'année en année, elles ne cessent d'être améliorées en sensibilité et en spécificité. Lors de contrôles antidopage, l'urine et le sang sont les deux matrices majoritairement utilisées. L'urine permet un prélèvement simple et non invasif où l'on retrouve de bonnes concentrations des composés recherchés et/ou de leurs métabolites. Le sang, même s'il requiert plus de qualifications pour le prélèvement, est utilisé aux fins de suivi des passeports biologiques des athlètes dans le but de détecter les modifications de paramètres ciblés pouvant être altérés par le dopage sanguin (Brandenberger *et al.*, 1997).

Actuellement, les procédures d'analyse pour l'urine utilisent principalement les méthodes suivantes : la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) ou encore la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone (CO₂) grâce à l'entremise d'une chambre de combustion (CG-C-SMRI). La spectrométrie de masse est de nos jours surtout utilisée en tandem (SM/SM) pour obtenir une meilleure sensibilité et spécificité (Mario Thevis, 2010). Les critères d'identification d'une substance prohibée ou de ses métabolites sont définis par l'Agence mondiale antidopage dans un document technique (TD2016IDCR) et exigent la correspondance exacte des spectres de masse (fragments ou transitions ioniques) ainsi que du temps de rétention avec le standard authentique ou l'urine de référence (AMA, 2016).

La CL-SM/SM est utilisée pour détecter les molécules sans traitement préalable de l'urine. Les méthodes « dilute and shoot » en mode d'ionisation positive ou négative ont été développées pour détecter des stimulants, des narcotiques, des agents masquants, des bêtabloquants, des glucocorticoïdes, des peptides, certains modulateurs hormonaux et métaboliques, quelques cannabimimétiques et plusieurs agents anabolisants (Mario Thevis, 2010). La préparation de l'échantillon est simple, soit une dilution et l'ajout d'un standard interne. Toutefois, cette méthode de dépistage nécessite que les molécules analysées soient facilement ionisables, c'est-à-dire qu'elles possèdent une forte affinité protonique (M. Thevis *et al.*, 2011). Les métabolites conjugués sont donc facilement détectables et la préparation de l'échantillon ne requiert pas d'extraction ou de purification (Rzeppa *et al.*, 2015).

La CG-SM/SM nécessite plusieurs étapes avant d'obtenir un échantillon prêt pour l'analyse. Cette procédure permet de dépister les agents anabolisants qui sont non polaires avec une sensibilité généralement supérieure à celle que pourrait offrir l'analyse CL-SM/SM. Elle permet aussi de quantifier les substances seuils incluant des métabolites urinaires influencés par la prise de testostérone ou de ses précurseurs biologiques (profil stéroïdien). Il est possible de détecter plusieurs autres composés tels des narcotiques, des agents masquants, des inhibiteurs d'aromatase, des anti-estrogènes, des bêta bloquants et le cannabis avec cette méthode analytique. Ce procédé comporte quatre étapes clés : purification de l'urine par extraction sur phase solide (SPE), hydrolyse enzymatique pour libérer les métabolites glucuroconjugés, extraction des métabolites libres avec une extraction liquide-liquide et dérivation chimique (Ayotte *et al.*, 1996, Makin *et al.*, 2010).

Des travaux sont axés sur la détection des substances dopantes, mais avec une rétrospection plus longue ou encore dans le but d'améliorer la sensibilité analytique des méthodes déjà en place (Rzeppa *et al.*, 2015, Mario Thevis, 2010). Depuis plusieurs années, les travaux ont porté sur la recherche de nouveaux métabolites dits « long-terme ». Auparavant, les tests ne permettaient un dépistage que sur quelques jours ou sur une semaine tout au plus (Baumann, 2010).

Les métabolites glucuroconjugés sont amplement utilisés depuis les années 1970 et la β -glucuronidase d'*E. coli* est utilisée dans les procédures routinières pour en effectuer l'hydrolyse. Depuis quelques années, les métabolites sulfates long-terme de plusieurs SAA ont été identifiés (Gómez *et al.*, 2013a, Gómez *et al.*, 2013b, He *et al.*, 2016, Rzeppa *et al.*, 2016). Cependant, leur analyse directe par CL-SM/SM ne permet pas d'atteindre les niveaux de détection requis pour les échantillons de routine. La nécessité d'avoir une méthode de déconjugaison sélective, spécifique, sans réaction secondaire et relativement simple devient alors pertinente en rendant possible leur concentration, dérivation et analyse par CG-SM/SM.

Dans cette étude, les comparaisons entre différentes méthodes de déconjugaison des dérivés glucuroconjugés et sulfoconjugés de stéroïdes urinaires seront abordées. Premièrement, les méthodes d'hydrolyse des glucuroconjugés avec différentes préparations de β -glucuronidase d'*E. coli*, soit de type 1X-A, recombinante et de type K-12 (en solution) ainsi que la β -glucuronidase de *Helix pomatia* de type H-1, seront évaluées. Par la suite, à partir de travaux préliminaires effectués dans notre laboratoire il y a quelques années, des méthodes pour la déconjugaison des sulfates seront comparées, soit avec un extrait d'*H. pomatia* de type H-1

(l'enzyme contient aussi une activité sulfatase), ou avec une solvolysse chimique avec comme solvant l'acétate d'éthyle ou le tétrahydrofurane. Lors de ces comparaisons, plusieurs critères seront étudiés afin de s'assurer que la méthode satisfait toutes les attentes établies, notamment la sélectivité, la spécificité, la simplicité d'utilisation, l'absence de réaction secondaire, l'absence de produit de dégradation et l'absence de résistance à la déconjugaison de certains composés.

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Historique de l'antidopage

2.1.1 L'utilisation des stéroïdes androgéniques anabolisants

Le dopage remonterait à plus de 100 ans. Au début des années 1900, certaines compétitions d'endurance pouvaient avoir lieu sur plusieurs jours sans pause. Les athlètes avaient alors recours à l'utilisation de stimulants pour dissiper leur fatigue. En 1928, les gouvernements reconnaissent les risques de santé associés à la prise de stimulants par les athlètes. Ces substances sont alors bannies par l'Association internationale des fédérations d'athlétisme (IAAF) (Bowers, 2012).

Au début des années 1930, les recherches menées sur des extraits testiculaires sont de plus en plus nombreuses et les effets observés sur des animaux de laboratoire poussent les chercheurs à tenter de caractériser les molécules qui s'y retrouvent (Beckett, 1976, Gosetti *et al.*, 2013). En 1935, David *et al.* découvrent la testostérone. Celle-ci étant une hormone naturelle permettant d'induire dans le corps un stimulus de croissance et certains caractères sexuels masculins, plusieurs scientifiques tentent alors de recréer ce composé. C'est aussi en 1935 que la synthèse de la testostérone à partir du cholestérol est effectuée par Adolf Butenandt et Leopold Ruzicka, ce qui leur vaut le prix Nobel de chimie en 1939 (Dotson *et al.*, 2007, Gosetti *et al.*, 2013, Kanayama *et al.*, 2017, Wilhelm Schänzer, 1996).

Malgré leurs nombreuses recherches sur cette nouvelle hormone, les scientifiques rencontrent certains problèmes dont le métabolisme rapide de la testostérone lors de la prise orale. Plusieurs molécules dérivées de la testostérone sont alors créées pour tenter de ralentir sa métabolisation et sont testées pour en voir les effets (Beckett, 1976). Certains composés analogues ont été synthétisés dès le début des années 1940 pour le traitement de plusieurs conditions physiques particulières, notamment pour les hommes souffrant d'hypogonadisme ou encore pour ceux qui étaient moins sensibles à la testostérone endogène (Gosetti *et al.*, 2013, Kanayama *et al.*, 2017).

Dans le cadre de la recherche sur ces médicaments, les scientifiques tentent de créer des composés dont l'action virilisante serait moindre comparativement à l'action anabolisante (Beckett, 1976). Il s'agit alors d'une occasion parfaite pour les athlètes de s'en procurer facilement sur le marché afin d'expérimenter les effets anabolisants sur la performance et le développement des muscles. En effet, à cette époque, aucune loi ne régit l'usage de ces produits. (Gosetti *et al.*, 2013).

La première discipline touchée par l'abus des substances anabolisantes est le culturisme au début des années 1950. En 1954, durant les championnats d'Europe d'haltérophilie à Vienne, l'utilisation de stéroïdes se répand chez les athlètes de plusieurs pays (Russie, Allemagne, États-Unis). Dans les années qui suivent, l'utilisation de stéroïdes se propage à plusieurs autres disciplines, notamment l'athlétisme, le cyclisme et la natation. Plusieurs athlètes déclarent que s'ils ne prennent pas de stéroïdes anabolisants, ils en seraient désavantagés. En 1970, l'IAAF décide donc d'ajouter les stéroïdes anabolisants à la liste des médicaments interdits malgré l'absence de méthodes de détection efficaces (Beckett, 1976). En 1974, le Comité international olympique (CIO) décrète à son tour que l'utilisation des stéroïdes anabolisants synthétiques, incluant la testostérone et ses dérivés, est prohibée aux Jeux olympiques et les premiers tests seront faits durant les Jeux de Montréal en 1976 (Beckett, 1976, Wilhelm Schänzer, 1996). Au début des années 1990, plusieurs lois sont modifiées, notamment *the Controlled Substance Act*, pour sanctionner l'utilisation, la vente et la possession de stéroïdes anabolisants ou de leurs précurseurs sans prescription, ce qui est alors considéré comme un crime fédéral aux États-Unis (Dotson *et al.*, 2007).

En 1999, le CIO met sur pied l'Agence mondiale antidopage (AMA). L'AMA a plusieurs mandats, dont la publication annuelle d'une liste des substances et des pratiques interdites, autant dans les compétitions que lors des entraînements (Kanayama *et al.*, 2017). Les raisons qui font en sorte qu'un produit se retrouve dans cette liste sont basées sur la possibilité d'améliorer la performance, le danger pour la santé et la sécurité de l'athlète, s'il n'est pas acceptable socialement ou encore s'il permet à l'athlète de contourner les tests antidopage en les rendant insensibles. Aujourd'hui, il n'y a pas que les SAA, les stimulants ou les narcotiques dont l'utilisation est bannie par l'AMA ; au fil des ans, plusieurs catégories de substances ont été rajoutées : les agents masquants, les protéines recombinantes, les diurétiques, etc. (Bowers, 2012, Gosetti *et al.*, 2013).

Depuis une vingtaine d'années, de nouveaux composés dopants sont régulièrement proposés, découverts et doivent être ajoutés aux analyses de dépistage. La collaboration internationale des divers domaines scientifiques, comme la chimie analytique, l'endocrinologie, la pharmacologie et la médecine sportive, est essentielle pour maintenir le contrôle du dopage sportif à jour et pour permettre le développement de nouvelles méthodes analytiques (Bowers, 2012).

2.1.2 L'évolution des méthodes analytiques

Même si l'abus des stéroïdes anabolisants était connu depuis le début des années 1950, l'application de sanctions n'a lieu qu'à partir de 1970. En effet, avant cela, les techniques d'analyse ne remplissaient pas les critères requis pour pouvoir punir les athlètes (C. Shackleton, 2009). Au fil du temps, les méthodes d'analyse ont beaucoup évolué et se sont considérablement améliorées, tant au niveau de la spécificité que de la sensibilité.

Tout d'abord, en 1960, Sweeley et Horning publient un article qui propose l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (CG) pour l'analyse de stéroïdes. Leurs recherches continuent dans les années suivantes, jusqu'à la publication de l'analyse du premier profil stéroïdien en 1968. La méthode est cependant laborieuse et coûteuse, ce qui n'en fait pas une technique d'analyse de choix. Il faudra attendre 1972 pour que la première méthode de chromatographie en phase gazeuse utilisant une colonne capillaire pour que l'analyse des stéroïdes soit publiée (C. Shackleton, 2009).

Au tout début, des méthodes de dosages radio-immunologiques sont utilisées pour mesurer la concentration d'hormones stéroïdiennes dans le sang ou dans l'urine avec une spécificité relative. En 1972, Brooks commence ses travaux sur le développement d'une méthode pour identifier certaines familles de stéroïdes exogènes selon leurs fonctionnalités, par exemple ceux possédant un groupement alkyle en position C-17 α reconnus pour être actifs oralement (C. Shackleton, 2009). En 1974 et 1975, Sumner et Brooks obtiennent finalement des antisérums présentant assez de spécificité pour permettre de détecter des groupes de stéroïdes (Beckett, 1976, C. Shackleton, 2009). Ce titrage radio-immunologique ne permet pas l'identification, mais bien l'observation de la présence de la fonctionnalité, par exemple les composés possédant des groupements 17 α -méthyle ou éthyle et les 19-nor-stéroïdes. Il est toutefois possible de détecter les douze stéroïdes anabolisants issus de l'industrie pharmaceutique disponibles à ce moment (Beckett, 1976).

Ainsi, les SAA sont recherchés pour la première fois en 1974 lors des jeux du Commonwealth par titrage radio-immunologique et par CG-SM pour la confirmation des résultats (C. Shackleton, 2009). Ces tests sont également appliqués lors des Jeux olympiques de 1976 à Montréal (Beckett, 1976, Gosetti *et al.*, 2013).

Au début des années 1980, les avancées technologiques permettent de développer des méthodes basées sur l'utilisation de la CG-SM uniquement avec une limite de détection allant jusqu'à 10 à 20 mg/mL de la molécule mère ou de ses métabolites (Gosetti *et al.*, 2013, Wilhelm Schänzer, 1996). Le spectromètre de masse de type quadripôle ne devient un analyseur incontournable en CG-SM que vers le début des années 1980 avec l'apparition sur le marché d'instruments de table peu dispendieux (Mario Thevis, 2010).

De nos jours, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM), particulièrement la chromatographie liquide à ultra-haute performance (CLUHP), occupe une place importante dans les méthodes analytiques disponibles. Elle sert notamment lors de l'analyse des stimulants qui sont présents en concentration importante dans l'urine. Elle comporte plusieurs avantages, notamment le peu de préparation nécessaire pour l'échantillon et l'utilisation de petits volumes ainsi que de bonnes spécificité et sélectivité en plus d'atteindre les limites de quantification requises (Gosetti *et al.*, 2013, Makin *et al.*, 2010). Malgré tout, la sensibilité et la sélectivité des méthodes reposant sur l'analyse de dérivés triméthylsilylés par CG-SM/SM sont à ce jour inégalées (Gomes *et al.*, 2009b).

2.2 Les stéroïdes

2.2.1 Structure et nomenclature

Les stéroïdes sont des lipides. Chez l'humain, le cholestérol est le bioprécurseur de plusieurs stéroïdes, par exemple les hormones sexuelles. Les stéroïdes auxquels nous nous intéressons sont des androgènes et ont un squelette commun. Il s'agit d'un agencement de quatre cycles et de deux groupements méthyles. Cette structure de base est appelée cyclopentanoperhydrophénanthrène. La figure 2.1 présente la structure d'un androstane bien connu, la testostérone. La structure de base est modifiée avec l'ajout d'une fonction cétone en C-3, d'une insaturation en C4-C5, d'un groupement hydroxyle en C-17 ainsi que l'ajout de deux groupements méthyles, soit un sur le carbone 13 et l'autre sur le carbone 10 (ces derniers définissant les androstanes) (Makin *et al.*, 2010).

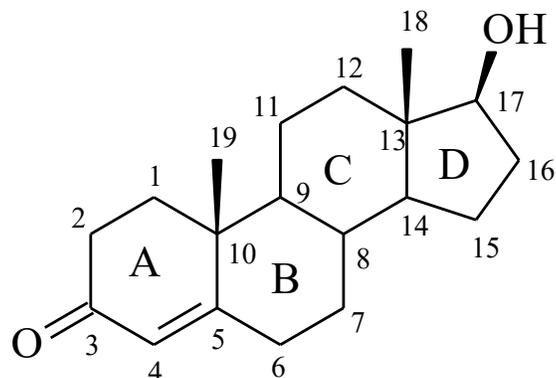


Figure 2.1 : Structure chimique de la testostérone et numérotation

Les groupements fonctionnels et les insaturations modifient la structure chimique de la molécule, mais ont aussi des répercussions sur les propriétés physiques et chimiques de chaque stéroïde. La présence de différentes fonctionnalités sur une molécule est ce qui détermine les interactions de celle-ci avec les différentes cellules du corps humain comme les récepteurs d'hormones et les différents groupes d'enzymes (Reece *et al.*, 2012).

2.2.2 Endogènes ou exogènes

Dans le contexte du contrôle du dopage sportif, les stéroïdes sont classés selon qu'ils puissent être présents dans le corps humain ou non. Les stéroïdes endogènes sont produits par le cortex surrénal ou les glandes sexuelles comme les testicules et les ovaires. Les hormones stéroïdiennes qui y sont produites permettent de déclencher et de contrôler le développement des caractères sexuels secondaires chez les hommes et les femmes. La liste des interdictions de l'AMA classe les androgènes anabolisants en S1a et regroupe notamment la testostérone, mais aussi ses précurseurs potentiels, la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'androstènedione, l'androstènediol et ses métabolites, l'androstérone et l'androstanolone (5 α -DHT). La DHEA et l'androstènedione par exemple, sous l'effet d'enzymes, peuvent mener à la formation d'œstrogènes comme l'estradiol, l'estrone ou l'estriol, qui sont responsables de l'apparition et du maintien des caractères sexuels secondaires féminins. Les androgènes ont tous le même précurseur, soit le cholestérol (Reece *et al.*, 2012). Depuis 1996, certaines de ces molécules dites endogènes ont été synthétisées et mises en marché dans des suppléments alimentaires par certaines compagnies, surtout aux États-Unis. L'utilisation de ces substances est bien sûr prohibée (M. K. Parr *et al.*, 2010b).

D'un autre côté, on retrouve les stéroïdes dits purement exogènes. Tous les stéroïdes peuvent être administrés à l'être humain par différentes voies, soit par prise orale, par injection intramusculaire ou par application topique pour ne nommer que les principales (NIDA, 2006). Les substances les plus souvent retrouvées dans les cas de dopage sportif sont sans aucun doute les stéroïdes androgènes anabolisants, ceux-ci étant également systématiquement recherchés dans tous les échantillons recueillis tant en compétition qu'au repos ou à l'entraînement. Ce sont des molécules qui sont similaires et dérivées de la testostérone, mais sur lesquelles ont été greffées certaines fonctionnalités pour en améliorer les effets bénéfiques.

La figure 2.2 signale certains changements structuraux sur la molécule de testostérone qui ont pour but d'augmenter l'activité anabolique (Kicman *et al.*, 2010). Certaines fonctionnalités permettent aussi de rendre le stéroïde plus efficace lors de la prise orale en diminuant sa vitesse de métabolisation par l'organisme. C'est le cas de la 17 α -méthyltestostérone (Beckett, 1976, Hungerford *et al.*, 2006, Wilhelm Schänzer, 1996). D'autres modifications, comme la modification du noyau A de la testostérone, mènent à une chute drastique des effets virilisants. L'enlèvement du groupement méthyle en C-19 permet de garder l'activité anabolisante et fait diminuer les effets virilisants (Beckett, 1976, Hoffman *et al.*, 2006).

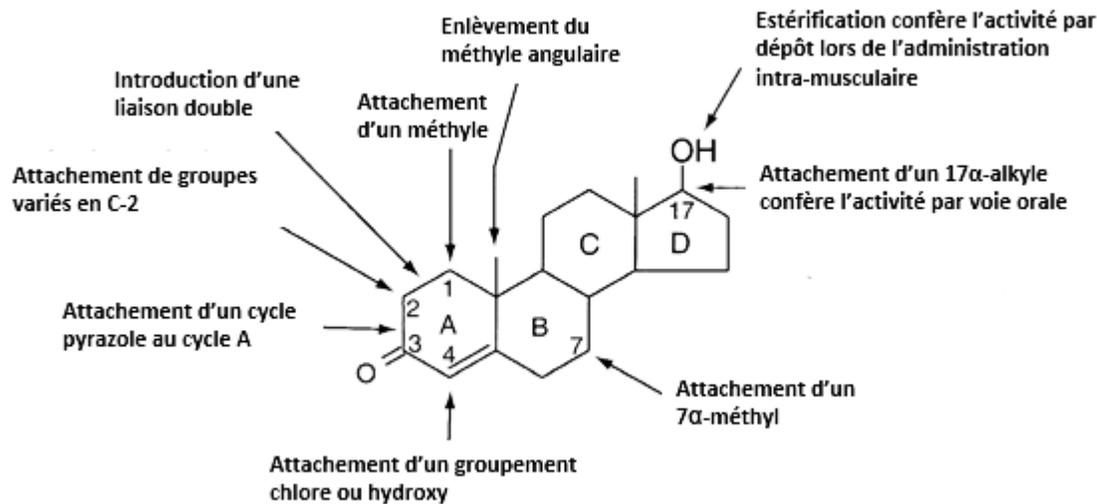


Figure 2.2 : Modifications structurales de la testostérone causant une augmentation de l'activité anabolique

(Figure tirée de Kickman *et al.*, 2010 [traduction libre])

2.2.3 L'effet androgène et les risques associés

Les effets androgéniques sont associés au développement des caractères sexuels secondaires masculins. L'utilisation en grande quantité ou à long terme provoque une augmentation des caractères virilisants, soit la pilosité et l'augmentation de la taille des cordes vocales (Reece *et al.*, 2012). Plusieurs effets néfastes sont aussi présents chez les utilisateurs chroniques : réduction de la taille des testicules et infertilité, perte de cheveux, gynécomastie (apparition de seins plus prononcés) chez l'homme ou encore pilosité excessive, perte de cheveux, aménorrhée et grossissement du clitoris chez la femme. De plus, ces effets ne touchent pas que le système hormonal. La prise de substances androgènes comporterait plusieurs risques potentiels pour la santé en général, allant de l'augmentation du mauvais cholestérol (LDL) et l'abaissement du bon (HDL) en passant par une hausse de la pression sanguine et du risque de crise cardiaque. D'autres parties du corps pourraient aussi être affectées, comme le foie et la peau avec un risque plus élevé de cancers et de tumeurs du foie ainsi qu'une rétention de fluide dans les tissus. Des problèmes de santé mentale comme une augmentation de l'agressivité et des épisodes de délire pourraient aussi être rencontrés (Fragkaki *et al.*, 2009, Maravelias *et al.*, 2005, NIDA, 2006). Les conséquences sur la santé peuvent être encore plus importantes dans certains cas puisque des utilisateurs comme les culturistes emploient une méthode de « stacking » en utilisant plusieurs substances prohibées en même temps, que ce soit oralement ou par injection (Birzniece, 2015, Maravelias *et al.*, 2005).

2.2.4 L'effet anabolisant recherché

Les stéroïdes anabolisants favorisent entre autres la croissance des cellules, l'augmentation de la synthèse des protéines et la croissance et à la stimulation de la moelle osseuse. Certains utilisateurs cherchent à augmenter leur force et leur masse musculaire en stimulant la formation de fibres musculaires tout en diminuant leur adiposité. Il semblerait également qu'en plus faible dose, les stéroïdes anabolisants aident aussi à diminuer le temps de récupération nécessaire après un entraînement intensif et permettent aux athlètes d'être plus résistants à la douleur. De plus, on rapporte que les effets de ces substances seraient souvent dose-dépendants. Il faudrait donc une prise régulière pour le maintien de la performance sportive (Birzniece, 2015, Maravelias *et al.*, 2005). La figure 2.3 présente la molécule de testostérone et les effets de certaines modifications structurales sur le corps humain.

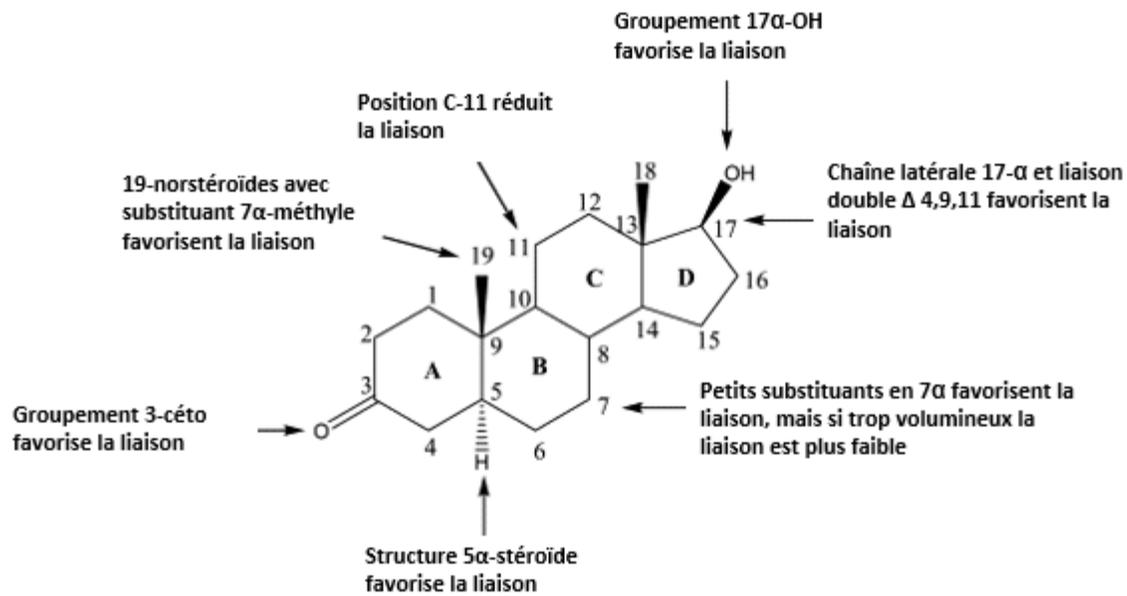


Figure 2.3 : Principaux changements de structures sur la testostérone pour faire varier l'expression des effets androgéniques et anabolisants

(Figure tirée de Fragkaki *et al.*, 2009 [traduction libre])

2.3 Le métabolisme des stéroïdes par le corps humain

Pour être en mesure de dépister les SAA, de nombreuses études ont dû être menées afin d'élucider les voies de métabolisme des stéroïdes par le corps humain. Prenons l'exemple de la testostérone. En étudiant sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamie, les chercheurs se sont rendu compte que la testostérone synthétique était inefficace lors de la prise orale ou par injection. Par voie orale, l'effet de premier passage dans le foie diminue grandement les activités de la molécule et le reste du composé actif est immédiatement métabolisé pour l'inactiver. Dans le cas de l'administration parentérale, les chercheurs se sont aperçus que la testostérone est rapidement métabolisée dans les tissus environnants. Pour rendre la molécule plus efficace, ceux-ci ont donc dû induire des variations dans sa structure chimique pour modifier ses interactions avec les différents organes du corps humain et faire en sorte que le composé puisse exercer ses effets plus longtemps. (Wilhelm Schänzer, 1996). La conversion du groupement alcool en C-17 en un ester à longue chaîne (ex. énanthate) augmente la biodisponibilité en ralentissant la transformation de la testostérone.

Lors de l'administration de stéroïdes, comme ceux-ci sont de nature lipophile, ils seront distribués dans le corps pour ensuite être abondamment métabolisés afin de détoxifier l'organisme et de faciliter leur excrétion via différentes matrices biologiques. Pour le dépistage de stéroïdes, l'important est d'en savoir le plus possible sur leur métabolisme et leur excrétion afin de déterminer les métabolites potentiels à rechercher pour prouver l'utilisation d'un stéroïde par l'athlète. Les biotransformations subies par un xénobiotique dans le corps humain visent généralement à le rendre plus hydrosoluble, ce qui fait en sorte de faciliter son excrétion par les reins *via* l'urine principalement.

2.3.1 Métabolisme de phase I

Le métabolisme de phase I, parfois nommé bioactivation ou inactivation, permet généralement d'inactiver le composé actif ou ses métabolites, de les rendre actifs ou de les rendre moins toxiques pour l'organisme. Les réactions impliquées dans le métabolisme de phase I servent à convertir le stéroïde à l'aide de réactions catalysées par des enzymes. Il s'agit entre autres de réactions d'hydroxylation, d'oxydation ou de réduction de la structure mère.

Pour les stéroïdes, on retrouve fréquemment les enzymes 5 α et 5 β -réductases, les 3 α et 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénases ainsi que la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (Wilhelm Schänzer, 1996, M. Thevis *et al.*, 2007). Les réactions de phase I permettent de faciliter l'excrétion de la molécule ou de la préparer à la phase II du métabolisme et à son excrétion ultérieure en la rendant plus polaire par l'ajout de certains groupements fonctionnels, notamment par diverses hydroxylations en C-6 et C-16.

2.3.2 Métabolisme de phase II

Le métabolisme de phase II, parfois nommé réaction de conjugaison ou bio-inactivation, vise à coupler la molécule avec un nouveau groupement. Il s'agit le plus souvent d'un acide glucuronique, mais il est aussi possible de retrouver des conjugués sulfates, cystéinés ou glutathions. La conjugaison aide donc à favoriser l'élimination du composé de l'organisme en facilitant sa solubilisation dans l'urine en augmentant la polarité de la molécule (Antignac *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2009a, Robles *et al.*, 2017).

Dans l'urine, les stéroïdes et leurs métabolites se retrouvent presque totalement sous la forme conjuguée, majoritairement en glucuroconjugués, mais quelques-uns avec un groupement sulfate. Les concentrations urinaires des composés peuvent varier de $\mu\text{g/mL}$ pour les métabolites finaux des androgènes comme l'androstérone et l'étiocolanolone jusqu'à quelques ng/mL pour la testostérone et les œstrogènes (Robles *et al.*, 2017).

Les réactions de conjugaison sont contrôlées par des enzymes et des cofacteurs puisque la glucuronidation requiert l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase et un substrat UDPGA (acide uridine diphosphate glucuronique). La sulfatation nécessite quant à elle une sulfotransférase et un cofacteur PAPS (3'-5'-phosphoadénosine-phosphosulfate) (Cawley *et al.*, 2005, Wilhelm Schänzer, 1996). Pour la conjugaison des stéroïdes, ceux possédant des fonctions 3α -hydroxy sont majoritairement glucuroconjugués alors que les 3β -hydroxy sont sulfoconjugués tel que présenté à la figure 2.4. Les groupements 17β -hydroxy secondaires et tertiaires seront quant à eux conjugués avec l'un ou l'autre (Wilhelm Schänzer, 1996).

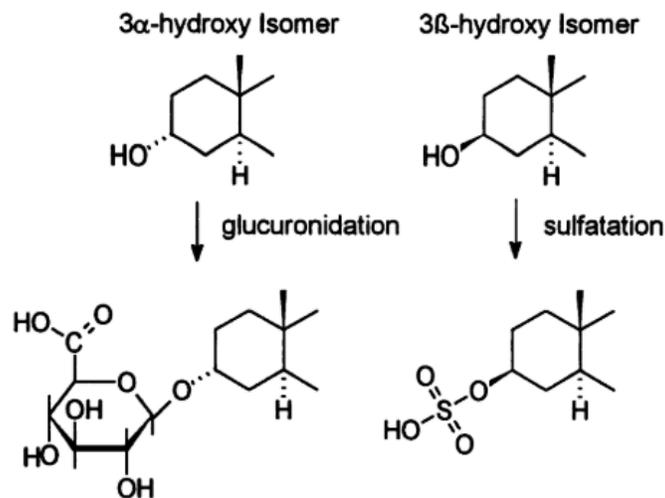


Figure 2.4 : Possibilités de conjugaison du groupement 3-hydroxy d'un stéroïde

(Figure tirée de Schänzer, 1996)

2.4 Utilisation des stéroïdes conjugués lors des analyses

Les métabolites des stéroïdes androgènes anabolisants étant excrétés sous la forme conjuguée, il est nécessaire d'en faire l'analyse soit directement par CL-SM/SM, soit suite à leur hydrolyse par CG-SM/SM.

2.4.1 Profil stéroïdien

La seule présence des métabolites de SAA purement synthétiques recherchés lors des analyses antidopage constitue la preuve de leur administration. Quant aux SAA pouvant être présents normalement dans l'urine humaine, il a fallu développer des sondes ou marqueurs secondaires, la simple mesure de concentrations élevées n'étant pas diagnostique. Ainsi, depuis le début des années 1980, l'évaluation du ratio T/E (testostérone sur épitestostérone) est le principal marqueur de la prise de testostérone. En effet, le ratio naturel de l'athlète entre la testostérone glucuronide et son épimère en C-17 α , l'épitestostérone glucuronide, sera augmenté par l'administration de testostérone (la testostérone n'étant pas convertie en épitestostérone). Les métabolites finaux des androgènes, comme les androstanediols, l'androstérone et l'étiocholanolone font également partie du profil stéroïdien et sont analysés de routine. L'évaluation des modifications du profil stéroïdien de l'athlète entraîne l'analyse de confirmation par CG-C-SMRI afin de déterminer l'origine exogène ou naturelle de la testostérone et de ses métabolites (Ouellet *et al.*, 2013, WADA, 2017).

2.4.2 Métabolites de longue durée sulfoconjugués

Depuis les dix dernières années, plusieurs études ont suggéré le potentiel long-terme des métabolites sulfoconjugués pour illustrer la prise de stéroïdes anabolisants synthétiques malgré le fait qu'ils ne sont pas les métabolites les plus abondants dans l'urine (Baumann, 2010, Gómez *et al.*, 2013a, Rzeppa *et al.*, 2015). Les dérivés sulfates persisteraient beaucoup plus longtemps dans l'urine que les glucuronides, ce qui en ferait de très bons marqueurs long-terme pour le dépistage (Baumann, 2010). En 2013, Gómez *et al.* ont suggéré que la détection du sulfate plutôt que du glucuronide de la 18-nor-17 β -hydroxyméthyl-17 α -méthylandro-1,4,13-triène-3-one, un métabolite de longue durée, accroîtrait la période de détection dans les conditions qu'ils ont utilisées (Gómez *et al.*, 2013a, Wilhelm Schänzer, 1996). La même année, Gómez *et al.* ont proposé l'analyse du sulfate du 17 β -méthyl-5 α -androstan-3 α ,17 α -diol, épimère du métabolite réduit de la méthyltestostérone, le plus communément recherché et excrété principalement sous la forme glucuroconjuguée (Gómez *et al.*, 2013b).

Une autre étude menée par Rzeppa et Viet en 2016 a permis de démontrer la présence de 17 β -hydrolyméthyl-17 α -méthyl-18-nor-2-oxa-5 α -androsta-13-èn-3-one sulfate dans l'urine suite à la prise d'oxandrolone. Selon les auteurs, la détection de l'administration d'oxandrolone pourrait être effectuée jusqu'à 26 jours, comparativement aux 14 jours permis par le métabolite glucuroconjugué précédemment utilisé (Rzeppa *et al.*, 2016).

Cependant, la méthode CL-SM/SM n'est pas assez sensible pour permettre l'analyse directe de ces métabolites long-terme sulfo ou glucuroconjugés. Tel que mentionné précédemment, l'analyse par CG-SM/SM des métabolites urinaires de SAA requiert leur hydrolyse préalable. Il faut donc procéder à une déconjugaison des stéroïdes, soit avec une hydrolyse enzymatique ou à l'aide d'une solvolysse chimique dans le cas des sulfates. La méthode d'hydrolyse choisie doit être spécifique, sans réaction secondaire ni résistante à certains composés.

2.5 Méthodes d'hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugés

L'hydrolyse enzymatique est habituellement préférée pour le clivage du groupement glucuronide des stéroïdes conjugués. Plusieurs préparations d'enzymes sont disponibles commercialement. Leur fonctionnement optimal dépend de la température ainsi que du temps d'incubation, du pH et de la quantité d'enzymes utilisée, c'est-à-dire du nombre d'unités (Cawley *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2009a). Aussi, beaucoup d'inhibiteurs naturels des β -glucuronidases ou arylsulfatases sont retrouvés dans l'urine humaine, mais ceux-ci peuvent facilement être éliminés avec une étape de SPE préalable à l'hydrolyse (Vanluchene *et al.*, 1982).

2.5.1 Les sucs d'*Helix pomatia*

Une des méthodes les plus utilisées dans la littérature lorsqu'il est question de déconjuguer les stéroïdes dans l'urine est celle qui utilise les sucs d'*H. pomatia*. Cette préparation provient des sucs d'un mollusque, l'escargot *Helix pomatia*. C'est un mélange d'enzymes, dont notamment une β -glucuronidase ainsi qu'une arylsulfatase. Plusieurs préparations de diverses puretés sont disponibles en solution ou sous forme de poudre qu'il faut dissoudre avant de l'ajouter aux échantillons à hydrolyser. Certaines permettent d'hydrolyser les stéroïdes glucuroconjugés, mais en raison de la présence d'arylsulfatase dans le mélange, cette préparation permet aussi d'hydrolyser certains stéroïdes sulfoconjugés (Burstein *et al.*, 1958a, Gomes *et al.*, 2009a).

L'utilisation d' *H. pomatia* serait efficace pour hydrolyser les sulfates de 3 α -hydroxy-5 β - et les 3 β -hydroxy-5-ène, mais les stéroïdes 3 α -hydroxy-5 α sulfate et les stéroïdes de 19 atomes de carbone sulfatés en C-17 seraient résistants à cette hydrolyse (C. H. L. Shackleton, 1986). Dans de telles préparations mixtes, plusieurs auteurs ont aussi relevé la présence d'autres enzymes, comme la 3 β -hydroxystéroïde oxydoréductase et la 3-oxostéroïde-4,5-ène isomérase. Un des problèmes découverts serait que la déhydroépiandrostérone (DHEA) est progressivement transformée en 4-androstène-3,17-dione en présence des sucs d' *H. pomatia* (V. Ferchaud *et al.*, 2000, Houghton *et al.*, 1992, R Massé *et al.*, 1989, Vanluchene *et al.*, 1982). L'androstènediol et l'androstènedione peuvent aussi être rapidement transformés en testostérone, en fonction de la pureté de la préparation (R Massé *et al.*, 1989, Vanluchene *et al.*, 1982).

La pureté de l'extrait d' *H. pomatia* varie selon le fournisseur et d'autres enzymes comme la 6-hydroxylase, la 6-déhydroxylase et la 6-hydroxystéroïde oxydase auraient aussi été retrouvées dans certaines préparations (V. Ferchaud *et al.*, 2000, Houghton *et al.*, 1992). Selon Vanluchene *et al.*, le taux de conversion des 3 β -hydroxy-5-ène stéroïdes peut être réduit si le temps d'incubation est diminué (Vanluchene *et al.*, 1982).

Le tableau 2.1 présente les différentes conditions d'hydrolyse avec *H. pomatia* retrouvées dans la littérature. Gomes *et al.* rapportent que l'hydrolyse avec *H. pomatia* peut avoir les conséquences suivantes : une hydrolyse incomplète des stéroïdes sulfates ou glucuronides, une conversion de certains stéroïdes ou encore la formation d'artéfacts et de produits de dégradation (Gomes *et al.*, 2009a).

Tableau 2.1 : Revue de la littérature des différentes conditions d'hydrolyse avec *Helix pomatia*

Source(s)	Préparation d'enzymes	Volume de tampon / volume d'urine	pH	Volume d'enzyme par échantillon	Temp. (°C)	Durée
(Vanluchene <i>et al.</i> , 1982)	2000 F.U β -glucuronidase 20,000 R.U sulfatase	6 mL / évaporé à sec	5,2	20 μ L 20 μ L	37 °C 65 °C	48 h 2 h
(Messeri <i>et al.</i> , 1984)	10 ⁵ F.U β -glucuronidase 1,500,000 R.U sulfatase	1 mL / évaporé à sec	5,2	-	37 °C	1 h à 48 h
(Schmidt <i>et al.</i> , 1985)	10 ⁶ F.U β -glucuronidase 10 ⁶ R.U sulfatase	5 mL / reconstitué dans 100 μ L MeOH	-	50 μ L	50 °C	Toute la nuit
(R Massé <i>et al.</i> , 1989)	10 ⁵ F.U β -glucuronidase 1000-5000 F.U sulfatase	1 mL / évaporé à sec	5,2	100 μ L 100 μ L	37 °C 55 °C	16 h, 24 h, 48 h 3 h
(Becchi <i>et al.</i> , 1994)	-	10 mL / évaporé à sec	5,5	25 μ L	55 °C	3 h
(V Ferchaud <i>et al.</i> , 1998)	10 ⁵ F.U β -glucuronidase 10 ⁶ R.U sulfatase	5 mL / 50 mL	5,2	250 μ L	52 °C	20 h
(Kootstra <i>et al.</i> , 2007)	10 ⁵ F.U β -glucuronidase > 10 ⁶ R.U sulfatase	2 mL / 5 mL	5,2	25 μ L	55 °C	2 h
(Hauser <i>et al.</i> , 2008b)	10 ⁵ U/mL de β -glucuronidase et sulfatase type H-5	800 μ L / 200 μ L	4,7	40 μ L	37 °C	22 h
(Robles <i>et al.</i> , 2017)	β -glucuronidase type H-2 Sulfatase type H-1	3 mL / évaporé à sec	4,5	3 μ L β -gluc + 2 mg de sulfatase	55 °C	3 h

2.5.2 β -Glucuronidase d'*Escherichia coli*

À la suite des problèmes rencontrés avec *H. pomatia* et son manque de sélectivité pour l'hydrolyse spécifique des glucuronides, plusieurs groupes se sont tournés vers les différents types de β -glucuronidase d'*Escherichia coli*. Il s'agit d'une bactérie qui est libre de sulfatase (Hauser *et al.*, 2008b).

Les méthodes utilisées dans notre laboratoire impliquent l'utilisation de la β -glucuronidase d'*E. coli* de type 1X-A, vendue sous la forme de poudre lyophilisée (1,000,000-5,000,000 unités/g protéines). La procédure est la suivante : ajout de 1 mL de tampon à pH 6,9 à l'échantillon évaporé à sec, puis ajout de 50 μ L de la préparation d'enzyme pour avoir environ 1200 unités par échantillon et une incubation à 50 °C pendant 60 min (Ayotte *et al.*, 1996). D'autres préparations similaires sont aussi disponibles, notamment l'enzyme recombinante (\geq 10,000,000 unités/g protéines) et celle de type K-12 (nombre d'unités non mentionné) déjà mise en solution. L'enzyme recombinante est obtenue à partir d'une souche surproductrice d'*E. coli* tandis que la préparation K-12 est vendue en solution dans 50 % de glycérol.

Pour les conditions d'utilisation de l'enzyme recombinante, il s'agit des mêmes que pour 1X-A. Pour l'enzyme de type K-12, toutes les méthodes décrites dans la littérature sont équivalentes. Le pH est maintenu entre 5,2 et 7,0, le volume d'enzyme utilisé varie entre 30 et 100 μ L par échantillon et l'hydrolyse dure entre 1 h et 2 h à une température de 55 °C. Le volume initial d'urine diffère ainsi que la préparation de l'échantillon, certains préférant l'hydrolyse directe de l'urine alors d'autres procèdent à une purification préalable par extraction sur phase solide (Gómez *et al.*, 2013b, Kiousi *et al.*, 2015, R Massé *et al.*, 1989, Robles *et al.*, 2017, Sobolevsky *et al.*, 2012a, Sobolevsky *et al.*, 2012b, Torrado *et al.*, 2008)

2.6 Méthodes d'hydrolyse chimique des stéroïdes sulfoconjugués

Les métabolites sulfoconjugués ne sont pas hydrolysés par la β -glucuronidase d'*E. coli*. L'emploi de sucs d'*H. pomatia* est insatisfaisant pour leur déconjugaison et la résistance de certains métabolites ainsi que la présence d'autres enzymes qui causent l'apparition de réactions secondaires ne sont pas souhaitables. Certaines méthodes de clivage du groupement sulfate ont été développées dans les années 1950. Alors que la déconjugaison des glucuroconjugués se fait principalement par hydrolyse enzymatique, les stéroïdes sulfoconjugués peuvent être partiellement déconjugés par une hydrolyse enzymatique, mais beaucoup mieux par une hydrolyse chimique de type méthanolyse ou solvololyse.

La méthanolyse et la solvolysse chimique sont les méthodes les plus fréquemment retrouvées dans la littérature pour la déconjugaison de stéroïdes sulfates. La plupart des méthodes d'hydrolyse chimique publiées sont des adaptations de la méthode décrite par Burstein et Lieberman en 1958 (Burstein *et al.*, 1958a).

Les principes de la méthanolyse reposent sur la réaction de l'échantillon avec un mélange de méthanol anhydre fortement acidifié, le plus souvent avec de l'acide chlorhydrique (HCl). La plupart des méthodes de méthanolyse se basent sur les conditions utilisées par Tang et Crone en 1989, soit l'ajout d'une solution de méthanol anhydre acide (HCl 1M) à l'échantillon et l'incubation à 60 °C pendant 10 minutes (Tang *et al.*, 1989). Cependant, la méthanolyse n'est pas une méthode spécifique au clivage du groupement sulfate et donc, les stéroïdes glucuroconjugés et les stéroïdes sulfoconjugés seront déconjugés (Lévesque, 1998, Tang *et al.*, 1989).

L'acétate d'éthyle est le solvant le plus souvent mentionné pour la solvolysse chimique. Le tableau 2.2 présente les différents paramètres utilisés dans la littérature pour réaliser une solvolysse chimique dans l'acétate d'éthyle.

Tableau 2.2 : Revue de la littérature des différentes méthodes de solvolysse chimique avec l'acétate d'éthyle

Source(s)	Réactifs ajoutés à l'échantillon pour la solvolysse chimique	Température	Durée
(Ayotte <i>et al.</i> , 1996)	1 mL acétate d'éthyle et 2 µL H ₂ SO ₄ ajouté directement dans chaque échantillon	40 °C	1 h
(Hauser <i>et al.</i> , 2008a)	Préparation préalable d'une solution contenant 250 mL acétate d'éthyle et 200 mg H ₂ SO ₄ Ajout de 5 mL par échantillon	55 °C	1 h
(Gómez <i>et al.</i> , 2013a, Kiousi <i>et al.</i> , 2015, Torrado <i>et al.</i> , 2008)	Préparation préalable d'une solution contenant 80 : 20 : 0,06 (acétate d'éthyle / méthanol / H ₂ SO ₄) Ajout de 4 mL par échantillon	55 °C	2 h
(Rzeppa <i>et al.</i> , 2015)	Préparation préalable d'une solution contenant 80 : 20 : 0,6 (acétate d'éthyle / méthanol / H ₂ SO ₄) Ajout de 4 mL par échantillon	55 °C	2 h

Pour obtenir la fraction totale des stéroïdes, Ayotte *et al.* proposent une hydrolyse des glucuroconjugés avec la β -glucuronidase d'*E. coli* suivi d'un clivage des sulfates avec une solvolysse chimique dans l'acétate d'éthyle (Ayotte *et al.*, 1996). Des travaux préliminaires effectués par J.-F. Lévesque (maîtrise, 1998) ont permis d'identifier les conditions optimales pour la solvolysse chimique. Plusieurs solvants ont été testés, notamment l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le chloroforme, l'acétone ainsi que l'acétonitrile. Les trois derniers ne se sont pas révélés spécifiques au clivage du groupement sulfate puisque certains glucuroconjugés, comme celui de la testostérone, ont été hydrolysés. Le chloroforme et l'acétonitrile entraînent une dégradation de certains stéroïdes comme la 17 α -méthyltestostérone alors que l'utilisation d'acétate d'éthyle mène à l'acétylation des composés contenant une fonction alcool en position C-3 β .

Le tétrahydrofurane (THF) serait donc le meilleur solvant pour procéder à une solvolysse chimique spécifique des stéroïdes sulfoconjugés sans produire d'artéfact (Lévesque, 1998). Ces résultats sont en accord avec Burstein et Lieberman, selon lesquels la solvolysse la plus rapide avait lieu dans les éthers. La conformation du groupement sulfate du stéroïde peut aussi avoir un impact sur la vitesse de solvolysse. Par exemple, le sulfate de DHEA est déconjugué beaucoup plus rapidement que le sulfate d'androstérone puisque le groupement O-SO₃H de ce dernier se trouve dans la position axiale la plus encombrée (3 α , 5 α) (Burstein *et al.*, 1958b). La figure 2.5 présente la réaction de solvolysse chimique, proposée par Burstein et Lieberman et adaptée par J.-F. Lévesque. Il s'agit d'une réaction d'ordre 1 avec une attaque nucléophile sur l'atome de soufre.

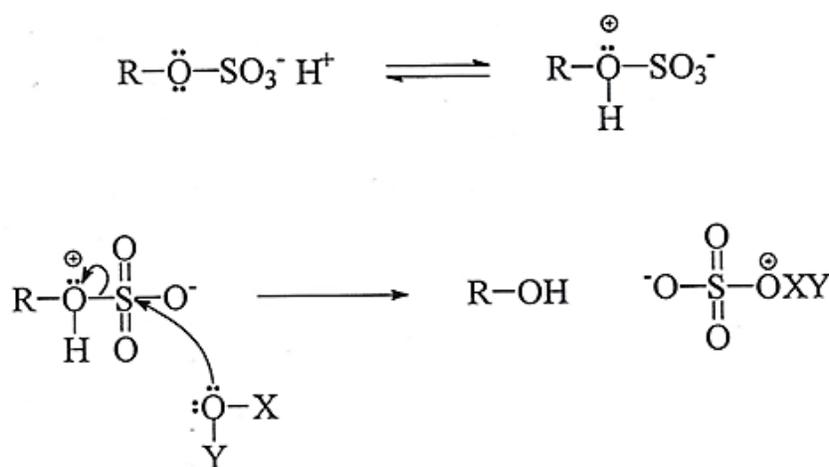


Figure 2.5 : Réaction de solvolysse chimique

(Image tirée du mémoire de J.-F. Lévesque, 1998)

Lors de l'utilisation du THF, certaines précautions sont à prévoir. Comme il s'agit d'un éther, une attention particulière doit être portée sur le rangement du produit pour éviter la formation de peroxydes. Les éthers ont tendance à absorber et à réagir avec l'oxygène environnant pour former des peroxydes instables. Il est aussi recommandé de ranger ce type de produit à l'abri de la lumière directe dans une bouteille ambrée et à basse température. Le produit peut alors être gardé jusqu'à un an sans que la formation de peroxydes atteigne un niveau dangereux. Il est aussi conseillé de noter la date de réception du produit ainsi que la date d'ouverture de la bouteille et de procéder à des tests réguliers pour effectuer un suivi sur l'éventuelle formation de peroxydes. Le THF fait partie d'une catégorie de composés qui peuvent former des peroxydes lors du stockage. Toutefois, ces peroxydes n'exploreront pas, à moins d'être concentrés suite à une distillation ou à une évaporation du réactif peroxydable. Une façon d'évaluer la présence de peroxydes dans la bouteille est d'effectuer un test avec une bandelette spécifique. C'est une méthode semi-quantitative qui permet de mettre en évidence la présence de peroxydes dans les produits organiques ou inorganiques. Lors de la réalisation du test, un oxygène du peroxyde est transféré à un indicateur redox organique se trouvant sur la bandelette qui vire au bleu lors de l'oxydation (Lemarquand *et al.*, 2002).

2.7 Mesures analytiques

2.7.1 Analyse par CG-SM/SM

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un appareil Agilent 7000C Triple Quadrupôle ou un appareil Thermo Scientific Trace 1310 Triple Quadrupôle. La chromatographie en phase gazeuse (CG) permet de séparer les stéroïdes d'intérêts grâce à une colonne capillaire. En contrôlant la température du four, les stéroïdes ayant une température d'ébullition plus basse migreront le long de la colonne plus rapidement que les stéroïdes ayant une masse et une température d'ébullition plus élevées. Il est alors possible de séparer les différents stéroïdes selon leur temps de rétention, ce qui dépend de l'affinité des stéroïdes pour la phase stationnaire de la colonne. Un gaz inerte, l'hélium, est aussi injecté dans la colonne pour induire un certain débit.

Une fois que les stéroïdes ont traversé la colonne, ils atteignent la source du spectromètre de masse. Ils sont alors ionisés par un faisceau d'électrons énergétiques de 70 eV générés par un filament chauffé. Selon le mode d'analyse « mesure d'ions sélectionnés » (SIM), les fragments d'intérêts sont ensuite isolés et acheminés vers le détecteur où ils seront analysés d'après leur rapport masse sur charge (m/z). Chaque composé a un spectre de masse unique ou quasi unique qu'il est possible de comparer avec des bases de données ou avec des standards certifiés pour permettre l'identification.

L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) assure une meilleure sensibilité et spécificité. En effet, à la suite de la fragmentation, un premier filtre quadripolaire permet de choisir certains ions précurseurs qui seront refragmentés dans la chambre de collision se situant entre les deux filtres. Les nouveaux ions obtenus sont ensuite envoyés vers le deuxième filtre quadripolaire où ils seront de nouveau triés selon leur rapport m/z , puis acheminés vers le détecteur. Cette technique permet donc de caractériser davantage l'ion parent en analysant les ions fils qu'il produit.

La figure 2.6 présente un schéma des différentes parties d'un CG-SM/SM. L'appareil se compose d'un injecteur (1), d'un four (2), d'une colonne chromatographique capillaire (3) ainsi que d'un spectromètre de masse (4), lequel comporte une source d'ionisation (5), un premier filtre quadripolaire Q1 (6), une chambre de collision q (7), un second filtre quadripolaire Q3 (8) ainsi qu'un détecteur (9).

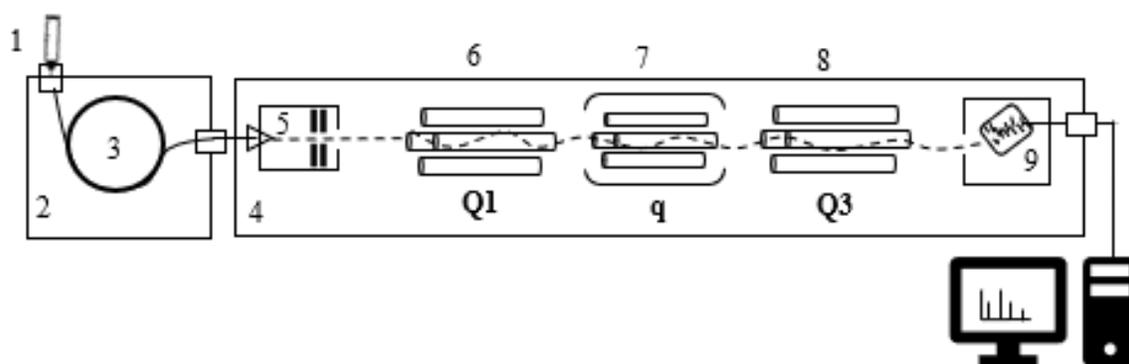


Figure 2.6 : Schéma de l'appareil d'analyse CG-SM/SM

Pour l'analyse de certains échantillons en mode SIM et/ou SCAN, un appareil CG-SM simple de marque Agilent 7890A muni d'un détecteur sélectif de masse (DSM) (HP5973) a été utilisé.

2.8 Les stéroïdes exogènes étudiés

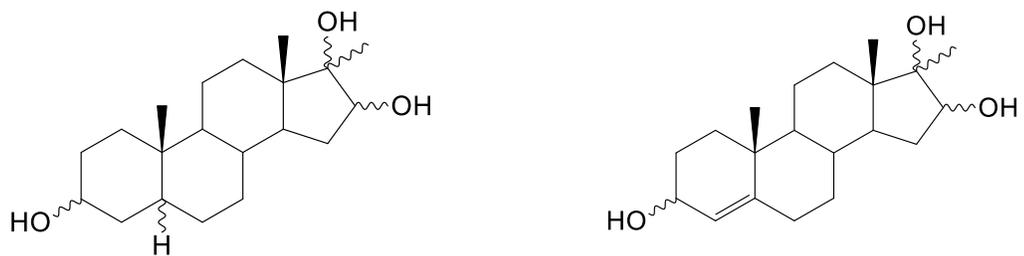
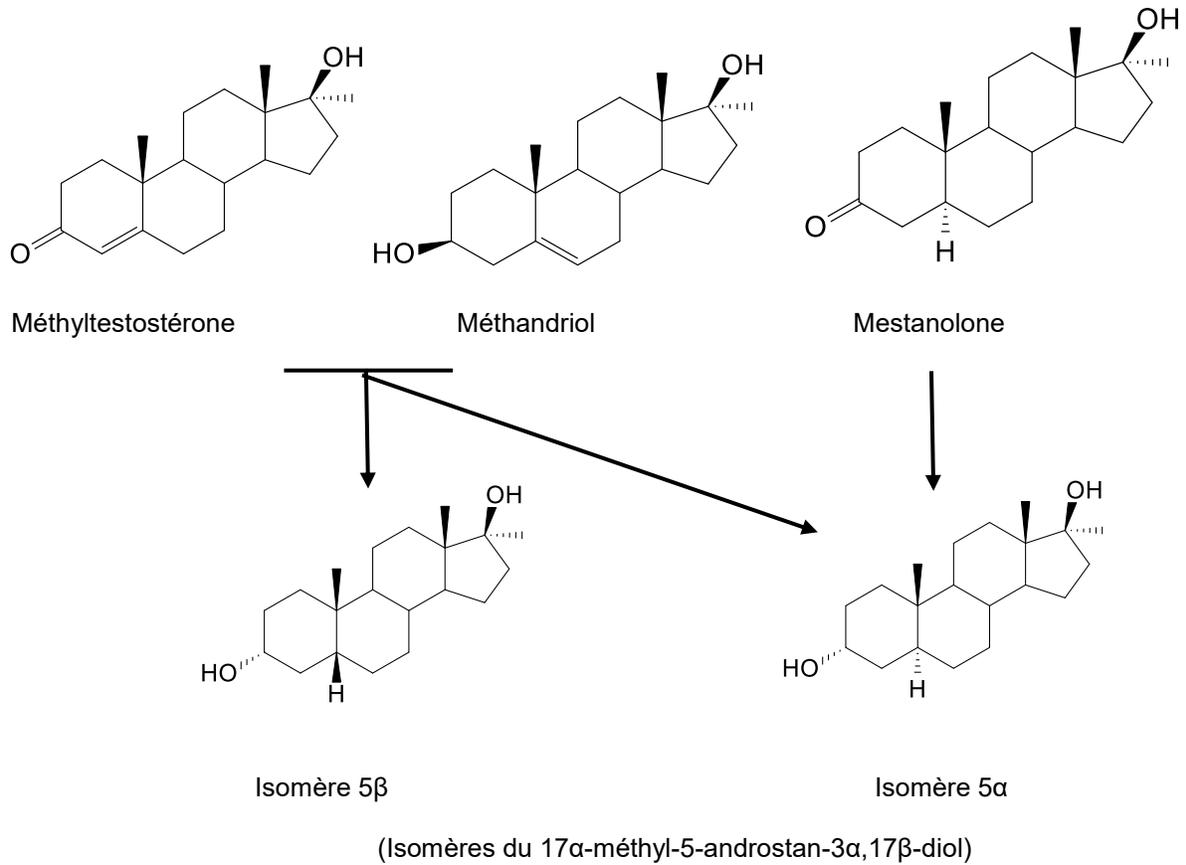
La méthode de solvolysse optimisée sera testée et vérifiée à l'aide d'échantillons anonymisés précédemment trouvés positifs pour un ou plusieurs stéroïdes exogènes. Les métabolites sulfoconjugués de certains de ces stéroïdes sont déjà connus et sont inclus dans les méthodes de confirmation. Toutefois, il y en a quelques-uns pour lesquels de tels métabolites ne sont pas mentionnés dans la littérature.

2.8.1 Méthyltestostérone, méthandriol et mestanolone

Le principal métabolite urinaire de la 17α -méthylandrostan-4-èn- 17β -ol-3-one (méthyltestostérone) et du 17α -méthylandrostan-5-èn- 3β , 17β -diol (méthandriol) est l'isomère 5β du 17α -méthyl- 5β -androstan- 3α , 17β -diol (5β -méthylandrostanediol) tandis que pour la 17α -méthyl- 5α -androstan- 17β -ol-3-one (mestanolone), on retrouve exclusivement l'isomère 5α (5α -méthylandrostanediol) (Rongone *et al.*, 1962). Il est aussi possible d'observer les épimères en C-17 ($5\alpha/5\beta$ épiméthylandrostanediols) qui se trouvent majoritairement dans la fraction urinaire contenant les métabolites glucuronides (L+G).

Les autres métabolites hydroxylés en C-16 comme le 17-méthyl-5-androstan-3,16,17-triol et ses isomères se retrouvent majoritairement dans la fraction d'urine contenant les sulfates (S) (C. Ayotte, non publié) et la littérature (Gómez *et al.*, 2013b, William Schanzer *et al.*, 1993). Deux métabolites exclusifs au méthandriol, qui sont aussi obtenus suite à une hydroxylation en C-16, peuvent être observés dans les fractions L+G et S de l'urine.

La figure 2.7 présente les trois molécules mères ainsi que leur conversion en métabolites communs, les isomères $5\alpha/5\beta$ du 17α -méthylandrostan- 3α , 17β -diol. Ceux-ci peuvent également être observés dans l'urine à faible concentration suite à la prise de méthandiène (5β et autres), d'oxymétholone (5α et autres) et de méthyl-1-testostérone (5α et autres). Pour la mestanolone, la molécule mère est complètement métabolisée dans le corps humain par des réactions de réduction et d'hydroxylation. Plusieurs des métabolites caractéristiques de la mestanolone sont sulfoconjugués et sont communs avec ceux de la méthyltestostérone ou du méthandriol mentionnés précédemment. L'hydroxymestanolone peut être retrouvée dans la fraction d'urine comportant les sulfates (R. Massé *et al.*, 1991, William Schanzer *et al.*, 1993).



Quelques isomères de métabolites tri-hydroxylés

Figure 2.7 Conversion de la méthyltestostérone, du méthandriol et de la mestanolone en méthylandrostanediols (5 α /5 β) et en métabolites hydroxylés en C-16

(Selon Rogone *et al.*, 1962 et Schanzer *et al.*, 1993)

2.8.2 Méthénolone

La méthénolone (17 β -hydroxy-1-méthyl-5 α -androst-1-èn-3-one) et ses métabolites sont majoritairement excrétés dans la fraction glucuronide de l'urine. La 1-méthylène-5 α -androst-3 α -ol-17-one serait le métabolite principal (Goudreault *et al.*, 1990, R. Massé *et al.*, 1992). Fragkaki *et al.* ont récemment suggéré que plusieurs métabolites de la méthénolone pourraient également être retrouvés dans la fraction de l'urine comportant les métabolites sulfoconjugués (Fragkaki *et al.*, 2015). La figure 2.8 présente la molécule de méthénolone ainsi que certains de ses métabolites sous leur forme libre.

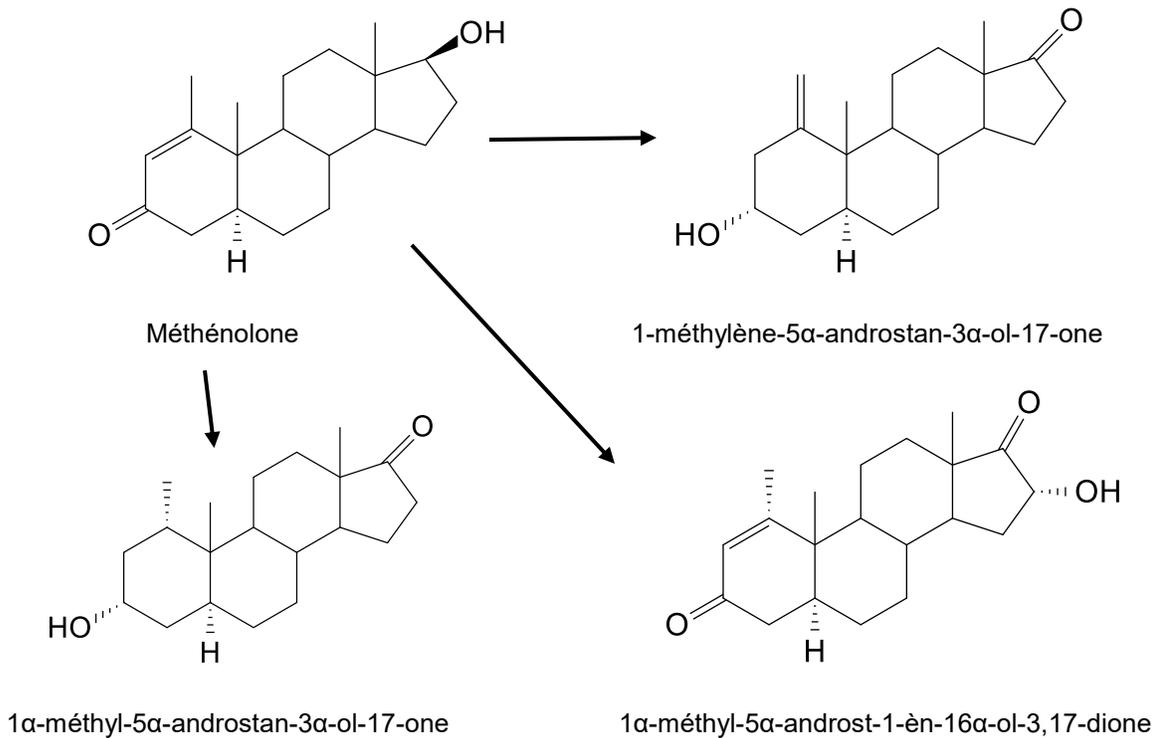


Figure 2.8 : La méthénolone et ses principaux métabolites

(Selon Goudreault *et al.*, 1990 et Massé *et al.*, 1992)

2.8.3 Stanozolol

Les métabolites observés pour le stanozolol (17 α -méthyl-2'H-5 α -androst-2-eno (3,2-c) pyrazol-17 β -ol) sont majoritairement présents dans la fraction d'urine qui contient les métabolites libres et glucuronides. Les métabolites du stanozolol peuvent être hydroxylés soit en 3', en 4 β ou en 16 α ou dihydroxylés en 3',16 α ou en 4 β ,16 α (Masse *et al.*, 1989). La molécule mère peut aussi être observée dans l'urine. Les métabolites long-terme sembleraient être le glucuronide du 3'-hydroxystanozolol ainsi que l'épistanozolol-N-glucuronide (Pozo *et al.*, 2009a, W. Schanzer *et al.*, 2013). La figure 2.9 présente la molécule de stanozolol et certains de ses métabolites fréquemment retrouvés.

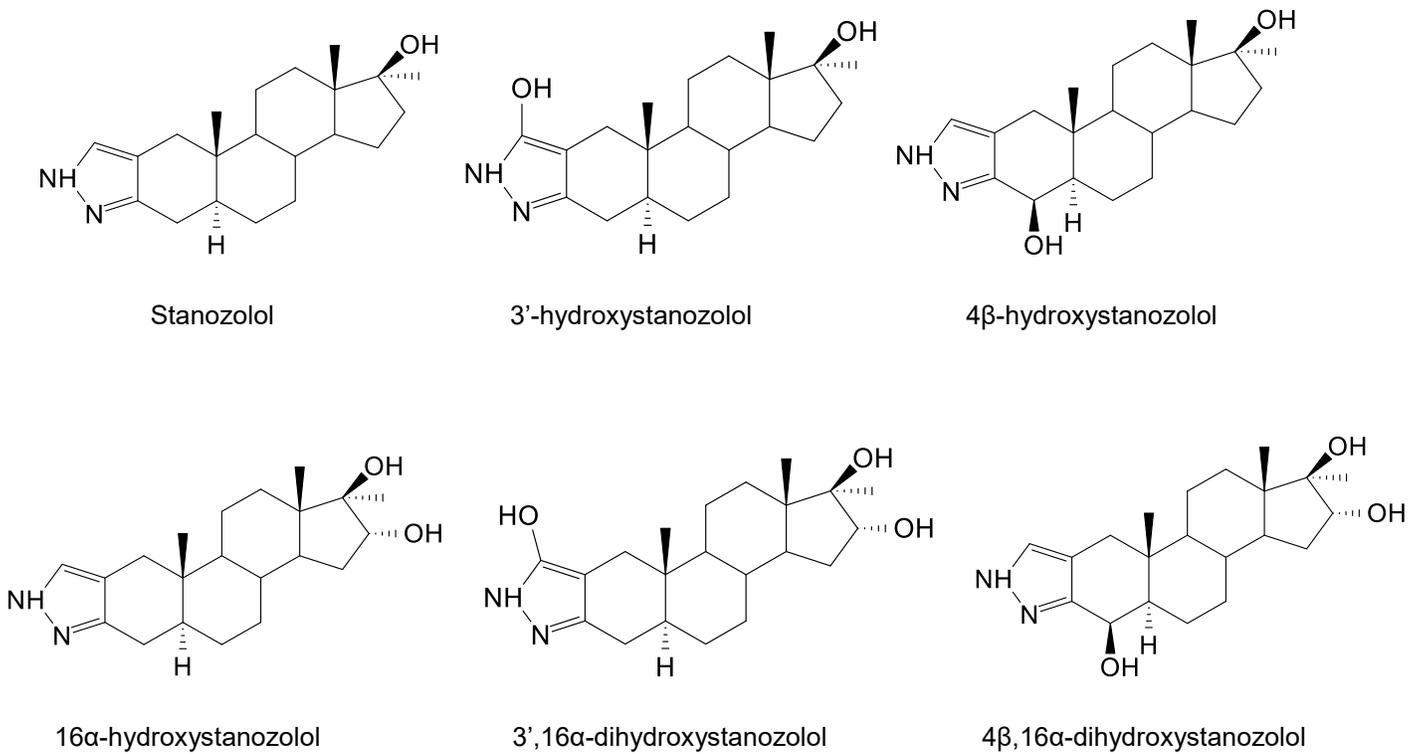


Figure 2.9 : Le stanozolol et ses principaux métabolites

(Selon Massé *et al.*, 1989 et Schänzer *et al.*, 1996)

2.8.4 Déhydrochlorométhyltestostérone

La molécule mère de déhydrochlorométhyltestostérone (DHCMT) (4-chloro-17 α -méthylandro-1,4-dien-17 β -ol-3-one) peut être observée dans la fraction d'urine contenant les métabolites libres (Dürbeck *et al.*, 1983) ainsi qu'un de ses métabolites, le 6 β -hydroxy-DHCMT (W. Schänzer *et al.*, 1996). Depuis 2010, plusieurs chercheurs ont proposé des structures pour les métabolites long-terme de la DHCMT (M.K. Parr *et al.*, 2010a, Sobolevsky *et al.*, 2012a). C'est toutefois le métabolite proposé par Sobolevsky *et al.* qui s'est avéré être retrouvé le plus fréquemment dans les cas de dopage. Il s'agit du 4 α -chloro-18-nor-17 β -hydroxyméthyl,17 α -méthyl-5 α -androsta-13-èn-3 α -ol dont la structure vient d'être caractérisée par Forsdahl *et al.* (Forsdahl *et al.*, 2018). La figure 2.10 présente la molécule mère ainsi que le métabolite long-terme.

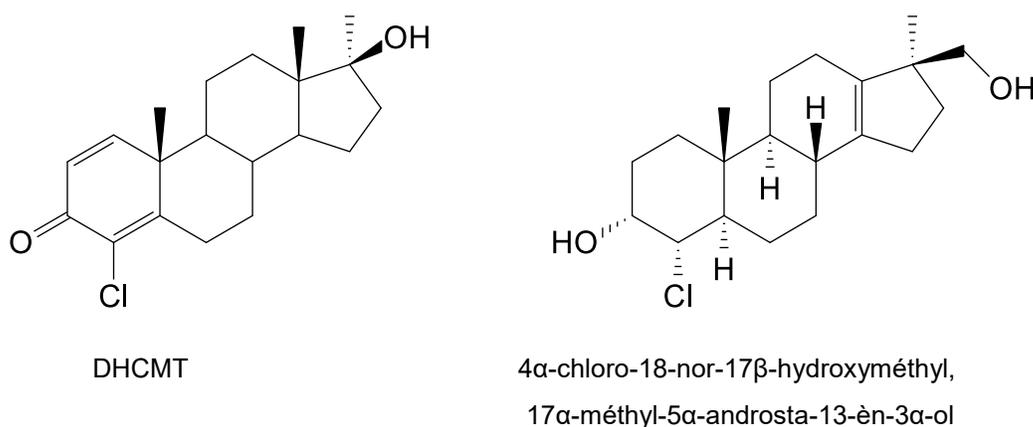


Figure 2.10 : La DHCMT et son métabolite long-terme

(Selon Forsdahl *et al.* 2018)

2.8.5 Désoxyméthyltestostérone

Selon Gauthier *et al.*, la désoxyméthyltestostérone (DMT) (17 α -méthyl-5 α -andro-2-èn-17 β -ol) est un mélange composé principalement de l'isomère 2-ène alors que la proportion de l'isomère 3-ène varie selon la source du produit de départ. Les principaux métabolites sont produits par hydroxylation : le plus abondant serait sous la forme glucuroconjuguée et proviendrait majoritairement de l'isomère 2-ène, soit le 17 α -méthyl-5 α -androstan-2 β ,3 α ,17 β -triol. Il est aussi possible de retrouver son isomère (mineur), soit le 17 α -méthyl-5 α -androstan-2 β ,3 β ,17 β -triol (Gauthier *et al.*, 2012). En 2006, Rodchenkov *et al.* avaient aussi proposé

certaines voies de métabolisation comme l'hydroxylation et la réduction de la double liaison pouvant mener à 8 métabolites différents, mais les structures n'avaient pas été confirmées (Rodchenkov *et al.*, 2006). En 2012, Sobolevsky *et al.* proposent cette fois un nouveau métabolite long terme de la DMT, soit le 18-nor-17,17-diméthyl-5 α -androst-13-èn-2 ξ ,3 α -diol (Sobolevsky *et al.*, 2012b). Comme les articles ne mentionnent pas la recherche de métabolites sulfoconjugués, il sera intéressant de voir si ces métabolites peuvent être observés dans la fraction sulfate de l'urine et s'ils pourraient être pertinents pour les tests de dépistage. La figure 2.11 présente la molécule de DMT (isomère 2-ène) ainsi que certains de ses métabolites.

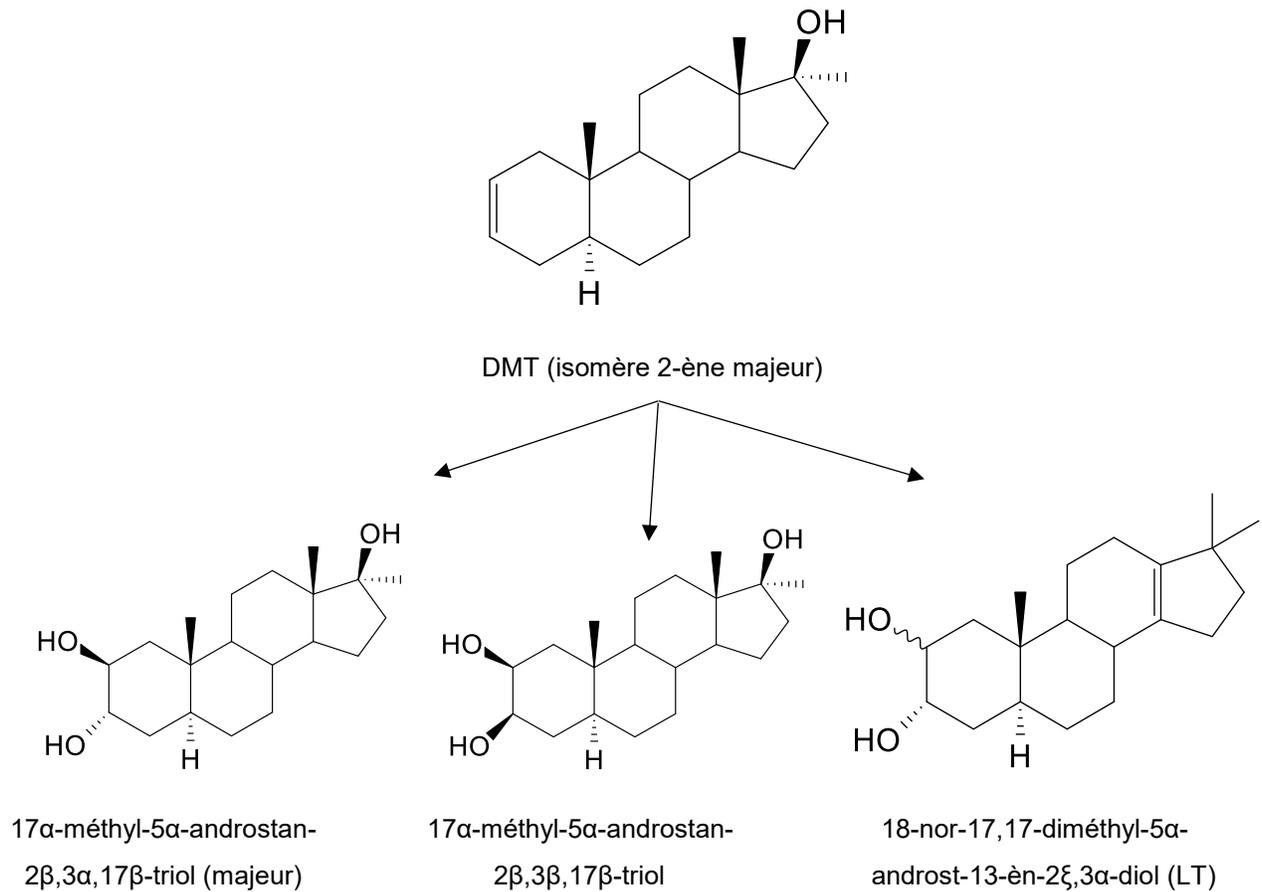


Figure 2.11 : La DMT et ses principaux métabolites

(Selon Gauthier *et al.*, 2012 et Sobolevsky *et al.*, 2012b (structure proposée pour le LT))

2.8.6 Méthastérone

Les métabolites de la méthastérone (2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one) sont produits par réduction de la cétone (2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol), ou par hydroxylation en C-16 (2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-16,17 β -diol-3-one). Le produit mère est excrété dans l'urine et tous les métabolites de la méthastérone peuvent être observés dans la fraction d'urine comportant les métabolites libres et glucuronides (Gauthier *et al.*, 2009, Rodchenkov *et al.*, 2006). Un autre métabolite, la 18-nor-17 β -hydroxyméthyl-2 ξ -méthyl-5 α -androst-13-èn-3-one serait aussi un métabolite long-terme de la méthastérone (Sobolevsky *et al.*, 2012b). En 2016, Zhang *et al.* ont aussi observé la présence de deux métabolites sulfoconjugués dans l'urine (Zhang *et al.*, 2016). La figure 2.12 présente la molécule de méthastérone ainsi que ses principaux métabolites sous leur forme déconjuguée.

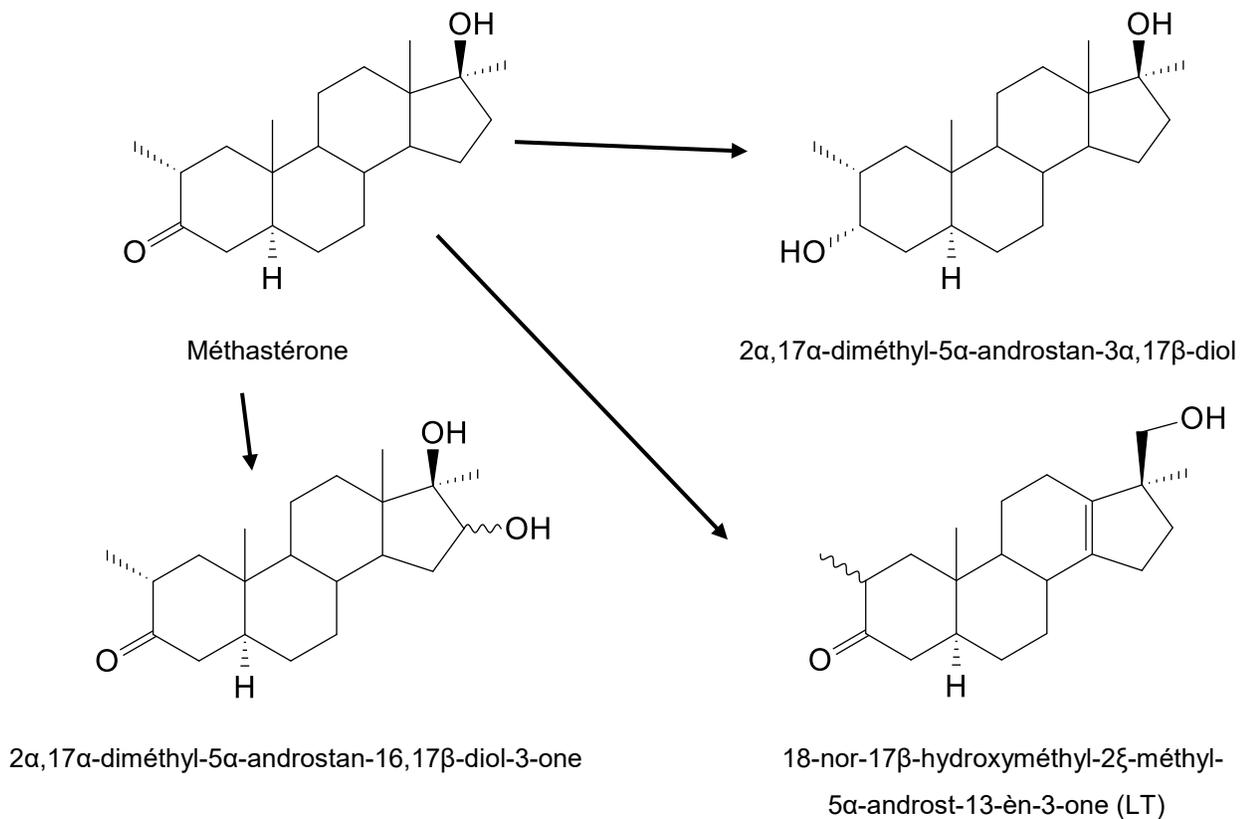


Figure 2.12 : La méthastérone et ses principaux métabolites

(Selon Sobolevsky *et al.*, 2012, Gauthier *et al.*, 2009 et Rodchenkov *et al.*, 2006)

2.9 Objectifs des travaux effectués

Cette étude comporte plusieurs buts bien distincts. Tout d'abord, il est question d'effectuer une revue des méthodes d'hydrolyse enzymatique pour la déconjugaison des stéroïdes glucuroconjugés. Plusieurs types d'enzyme sont disponibles sur le marché, mais chacun possède ses avantages et ses inconvénients. Il est alors important, dans le cas du dopage sportif et de l'analyse des stéroïdes, d'évaluer la pertinence du choix d'enzymes pour la déconjugaison des stéroïdes glucuroconjugés en observant la résistance de certains composés à l'hydrolyse, la possible formation de produits secondaires ou de dégradation ainsi que les conditions d'utilisation.

Un second objectif de cette étude repose sur la revue des méthodes de déconjugaison des stéroïdes sulfoconjugés. Ceux-ci peuvent être déconjugés de deux façons, soit par hydrolyse enzymatique ou par hydrolyse chimique. Si le but est d'obtenir seulement les stéroïdes sulfoconjugés et non ceux glucuroconjugés, il est alors primordial d'établir une méthode de déconjugaison qui demeure spécifique aux stéroïdes sulfoconjugés. Dans la recherche d'une telle méthode, il faut aussi prendre en considération d'autres paramètres comme la température d'incubation et le temps de réaction, le choix des réactifs ainsi que le pH. L'absence de diverses réactions secondaires ou de dégradation, de produits résistants à la déconjugaison et surtout l'obtention d'un rendement satisfaisant de déconjugaison sont également étudiés.

Pour conclure cette étude, nous avons débuté la validation de la méthode proposée par Lévesque *et al.* en 1998 et utilisée au laboratoire, soit la solvolysse chimique avec du tétrahydrofurane acidifié. La validation porte sur la quantité d'acide utilisée, le temps d'incubation, la température et l'impact de la présence d'eau sur la réaction. La méthode sera préalablement testée sur des standards de concentrations connues puis sur des urines positives anonymisées comportant les stéroïdes exogènes mentionnés précédemment. Des métabolites sulfates sont déjà connus pour certains de ces stéroïdes exogènes, alors il s'agit de voir s'il est possible de les retrouver à la suite de la réalisation du procédé de solvolysse optimisée. Pour les autres, il est plutôt question d'évaluer si des métabolites sulfates sont présents et s'ils pourraient représenter un avantage à être utilisés lors de contrôles antidopage.

CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Matériel utilisé

3.1.1 Les stéroïdes

Les stéroïdes suivants ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON) : 17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one (testostérone, 98.9%), 3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one (androstérone, 100%), 3 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one (épiandrostérone) ainsi que 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one glucuronide (étiocholanolone glucuronide). Les stéroïdes suivants ont été achetés chez Steraloids (Newport, RI) : androst-4,9(11)-diène-3,17-dione, 3 β -hydroxy-5 β -androstan-17-one (épiétiocholanolone, 98%), 5 α -androstan-17-one, 3 β -hydroxyandrost-5-èn-17-one (déhydroépiandrostérone, 100%), 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one (étiocholanolone), 3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one glucuronide (androstérone glucuronide), 3 β -hydroxyandrost-5-èn-17-one glucuronide (déhydroépiandrostérone glucuronide), 3 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one sulfate (épiandrostérone sulfate), 17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one sulfate (testostérone sulfate) ainsi que 3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one sulfate (androstérone acétate). Finalement, le Dr. Templeton de l'Université du Manitoba (2005) a fourni les acétates des composés suivants : 3 β -hydroxyandrost-5-èn-17-one (déhydroépiandrostérone acétate), 3 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one (épiandrostérone acétate) ainsi que 17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one (testostérone acétate).

3.1.2 Réactifs et solvants

Les solvants qui suivent proviennent de chez Caledon (Georgetown, ON) : méthanol, dichlorométhane et acétate d'éthyle, tous de grade CLHP, éther diéthylique distillé sous verre et n-hexane 95% distillé sous vide. Le tétrahydrofurane anhydre (99,9%) provient de Sigma-Aldrich. Le bicarbonate de sodium provient de EMD (Mississauga, ON). La solution de N-méthyl-N(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (MSTFA) (97%) et celle d'iodotriméthylsilane (TMIS) (97%) proviennent de Chemfabrik (Waldstetten, GER), l'éthanethiol (97%) de Acros Organic (Geel, BEL) et la triéthylamine de grade réactif de Sigma-Aldrich. Différentes solutions ou tampons sont préparés avec les produits suivants : Na₂CO₃ et NaHCO₃ de EMD, H₂SO₄ (95 à 98%) et HCl (98%) de Caledon, NaCl de VWR (Mississauga, ON), NaH₂PO₄*H₂O de Fisher Scientific (Ottawa, ON) et Na₂HPO₄ de Sigma-Aldrich. L'eau Milli-Q provient d'un système Milli-Q® Advantage A10® de Millipore (SAS, France). Les enzymes de type β -glucuronidase 1X-A d'*E. coli*, recombinante d'*E. coli* et H-1 d'*H. pomatia* proviennent de chez Sigma-Aldrich alors que l'enzyme de type β -glucuronidase K-12 d'*E. coli* provient de chez Roche (Mississauga, ON).

3.2 Description des échantillons analysés

3.2.1 Standards de concentration connue

Des échantillons tests dont les concentrations en stéroïdes glucuroconjugués (androstérone et étiocolanolone) et sulfoconjugués (déhydrochlorométhyltestostérone, épiandrostérone et testostérone) sont connues ont été créés afin d'évaluer le pourcentage de rendement des différentes méthodes d'hydrolyse/solvolyse étudiées. Il est important de spécifier que la pureté des standards conjugués utilisés n'est pas connue (pureté TLC). Les concentrations estimées sont donc semi-quantitatives puisqu'en calculant les concentrations initiales des solutions, on suppose que le standard est pur à 100 %. Un standard interne a été ajouté précisément de manière à permettre une quantification suffisante pour les fins de ce travail. Les standards ont été ajoutés à une matrice aqueuse (eau Milli-Q) ainsi qu'à une matrice urinaire. Les échantillons tests sont conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse.

3.2.2 Description des échantillons négatifs utilisés

Des blancs d'urine ont été recueillis selon les recommandations du comité d'éthique institutionnel. Ces urines proviennent de donneurs ne faisant usage d'aucun stéroïde ni de médicament qui pourraient affecter les résultats.

Une urine négative (# UN_1) a été utilisée lors des tests préliminaires avec *H. pomatia*. L'urine a été préalablement filtrée et possède une gravité spécifique de 1,009. Le volume d'urine utilisé pour chaque échantillon est de 4 mL.

Une autre urine négative (# UN_2) a été utilisée lors de tous les tests de comparaison pour les méthodes d'hydrolyse des composés glucuroconjugués. L'urine a été filtrée et possède une gravité spécifique de 1,019. Le volume utilisé pour chaque échantillon est de 1,5 mL.

Finalement, pour les tests sur la déconjugaison des composés sulfoconjugués, une troisième urine négative (# UN_3) a été utilisée. Elle a été filtrée et diluée pour obtenir une gravité spécifique de 1,010. Un volume de 1 mL est utilisé par échantillon.

3.2.3 Description des échantillons positifs (stéroïdes synthétiques)

Lors de la phase d'application de la solvolysé optimisée à des échantillons positifs, plusieurs urines de référence (UR) ont été utilisées pour servir de standard de comparaison avec les urines positives. Ces urines de référence, qui font partie de la collection du laboratoire, ont été recueillies suite à l'administration d'un des stéroïdes étudiés (traçable). Pour les tests, un volume de 0,5 mL de chaque référence a été utilisé.

Pour les urines positives provenant des athlètes, celles-ci sont rendues anonymes pour la recherche par le retrait du code de l'athlète et sont numérotées de la façon suivante : UP_#, où les # vont de 1 à 17). Les échantillons positifs choisis pour cette partie le sont pour un seul stéroïde synthétique, soit la méthyltestostérone, la mestanolone, la DHCMT ou le stanozolol. Les seules exceptions : l'échantillon UP_13 a été trouvé positif à la fois pour la DHCMT et le stanozolol alors que les échantillons UP_14 à UP_17 sont à la fois positifs pour la DHCMT, la DMT et possiblement la méthastérone.

3.3 Méthodes d'extraction des échantillons

3.3.1 Isolement des stéroïdes libres

Tel que décrit dans la littérature (Ayotte *et al.*, 1996) et selon les procédures du laboratoire, un volume d'urine compris entre 1 mL et 10 mL est prélevé en fonction de la gravité spécifique de l'urine et mis dans un tube en verre de 15 mL. Dans les échantillons dont le volume est inférieur à 4 mL, 2,5 mL de tampon acétate 0,1 M (pH 5,2) sont ajoutés. Dans chaque échantillon, 25 µL d'une solution méthanolique de standard interne (ISTD) contenant 40 ng/µL d'androst-4,9(11)-diène-3,17-dione sont aussi ajoutés avant de vortexer pendant quelques secondes. L'échantillon est ensuite purifié en procédant à une extraction sur phase solide. Les cartouches Sep-pak Plus C-18 ® (Waters) sont préalablement conditionnées avec 5 mL d'hexane, 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau Milli-Q. L'échantillon est ensuite passé dans la cartouche avec une légère pression manuelle et est rincé avec 5 mL d'eau Milli-Q, asséché avec un jet d'azote et élué avec 5 mL de méthanol dans un nouveau tube en verre de 15 mL. Le méthanol est ensuite évaporé à sec sous un jet d'azote à 50 °C.

Chaque culot est ensuite solubilisé dans 1 mL de tampon carbonate 1,0 M (pH 9) et une double extraction liquide-liquide est effectuée. 5 mL d'éther diéthylique sont ajoutés dans les tubes, puis ceux-ci sont bouchés hermétiquement et agités sur vortex 30 secondes et centrifugés à 2500 rpm pendant 5 minutes pour séparer la phase aqueuse et la phase organique. Les tubes

sont ensuite placés dans un bain de méthanol préalablement refroidi par glace sèche à -80 °C. La phase organique est transférée dans un tube en verre de 10 mL puis l'opération est répétée de nouveau. Les phases organiques sont combinées et l'éther est évaporé à sec sous un jet d'azote à 50 °C. Le résidu est solubilisé dans 200 µL de méthanol, vortexé et transféré dans un vial conique en verre de 250 µL. Dans chaque vial, 25 µL d'une solution méthanolique de standards externes (ESTD) contenant 10 ng/µL de 5α-androstan-17-one et 20 ng/µL d'épiétiocholanolone sont aussi ajoutés. Le méthanol est de nouveau évaporé à sec sous un jet d'azote à 50 °C et les vials sont ensuite bouchés sous jet d'azote. Les échantillons sont alors prêts pour la dérivation (voir 3.3.4)

3.3.2 Isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugés

La même procédure que 3.3.1 est utilisée, mais une étape d'hydrolyse enzymatique est ajoutée avant la double extraction liquide-liquide. Concrètement, suite à l'évaporation du méthanol suivant l'extraction sur phase solide, 1 mL de tampon phosphate 1,0 M (pH 6,9) est ajouté dans chaque tube suivi de 50 µL d'une préparation d'enzymes de β-glucuronidase d'*E. coli* de type IX-A pour obtenir environ 1200 unités par échantillon. Les tubes sont bouchés, puis l'incubation se fait dans un bain chauffé à 50 °C pendant 60 min. Le mélange refroidi est extrait deux fois à l'éther diéthylique en milieu basique suite à l'ajout de 400 µL de tampon carbonate 1,0 M (pH 9).

3.3.3 Isolement des stéroïdes libres et sulfoconjugés

Il s'agit de la même procédure que 3.3.2, mais l'hydrolyse enzymatique est remplacée par une solvolysse chimique avec comme solvant du tétrahydrofurane acidifié. Une fois le méthanol évaporé à sec à la suite de l'extraction sur phase solide, 1 mL de THF ainsi que 2 µL de H₂SO₄ 4 M sont ajoutés à chaque échantillon. Le THF est préalablement testé grâce à un test colorimétrique pour vérifier l'absence de peroxyde dans la bouteille utilisée. La solvolysse s'effectue par incubation dans un bain à 50 °C pendant 20 min. Après refroidissement à température ambiante, une double extraction liquide-liquide est effectuée avec de l'éther diéthylique en milieu basique suite à l'ajout de 1 mL de NaHCO₃ 5 % (p/v).

Alternativement, les stéroïdes sulfoconjugués peuvent être obtenus après l'extraction des glucuronides. Ainsi, tel que décrit par Ayotte et al., le pH de la phase aqueuse résiduelle est amené entre 5 et 7 avec l'ajout de 100 µL d'une solution 5 N de HCl. Par la suite, l'ISTD ainsi que le tampon acétate sont ajoutés aux échantillons comme mentionné à la section 3.3.1. Les étapes d'extraction sur phase solide et l'évaporation du méthanol sont les mêmes. L'hydrolyse des stéroïdes sulfoconjugués est ensuite réalisée comme mentionné dans la section 3.3.3 avec le THF acidifié. Les échantillons sont par la suite traités tel que décrit aux sections 3.3.1 et 3.3.4 (Ayotte *et al.*, 1996).

3.3.4 Dérivation chimique des échantillons

La solution de dérivation est préparée juste avant utilisation de la façon suivante : une solution de TMIS 1 M est préparée sous atmosphère d'azote par l'ajout de 80 µL d'iodotriméthylsilane 97% et 2,4 µL de triéthylamine à 500 µL de dichlorométhane. Cette solution est préparée dans un vial ambré. Le mélange de dérivatif est préparé par l'ajout de 3 mL de MSTFA 97 % dans un vial ambré suivi de 60 µL d'éthanol et 60 µL de la solution de TMIS 1 M.

L'obtention de dérivés TMS-éther / TMS-énol est effectuée selon la méthode décrite par Ayotte et al. en 1996. Brièvement, 50 µL du mélange de dérivation sont ajoutés à chaque vial bouché sous jet d'azote, la solution est vortexée et chauffée à 70 °C pendant 30 min. Les échantillons sont analysés sans autre traitement (Ayotte *et al.*, 1996).

3.3.5 Comparaison des méthodes d'hydrolyse enzymatique

H. pomatia type H-1 (β-glucuronidase et arylsulfatase)

Selon le fabricant, la bouteille d'enzyme contient 300,000 U/g de β-glucuronidase, mais également ≥ 10,000 U/g de sulfatase. Au culot obtenu en 3.3.1 est ajouté 1 mL d'enzymes dissoutes dans le tampon acétate 0,1 M (pH 5,2) pour obtenir environ 5000 unités par millilitre. Les échantillons sont ensuite vortexés quelques secondes puis bouchés avant d'être placés au bain-marie à 37 °C durant 1 à 16 h. Une fois l'hydrolyse complétée, les échantillons sont retirés du bain et l'extraction est effectuée par ajout de 250 mg de NaCl dans chaque tube. On ajoute ensuite 400 µL de tampon carbonate 1,0 M (pH 9) et 5 mL d'éther diéthylique. La phase organique est transférée dans un tube en verre de 10 mL et l'éther est évaporé sous un jet d'azote à 50 °C. Le transfert du culot dans un vial conique avec du méthanol se fait de la même façon que mentionné en 3.3.1, ainsi que les étapes qui suivent pour l'évaporation et la dérivation chimique.

β -glucuronidase de *E. coli* type K-12

La procédure est la même que mentionnée en 3.3.2. En bref, 30 μ L ou 50 μ L d'enzyme K-12 (déjà en solution dans 50 % de glycérol) sont ajoutés dans chaque tube ainsi que 1 mL de tampon phosphate 1,0 M (pH 6,9) pour en solubiliser le culot. Les tubes sont ensuite bouchés et l'incubation a lieu dans un bain chauffé à 50 °C ou 55 °C pendant 30 min à 1 h. Les étapes qui suivent l'hydrolyse sont les mêmes qu'en 3.3.2.

Puisque le fabricant ne mentionne pas la quantité d'unités par μ L pour cette enzyme, les deux volumes les plus fréquemment utilisés dans la littérature pour effectuer une hydrolyse sur des urines d'athlètes, une fois l'évaporation du méthanol terminée suite à l'extraction sur phase solide, ont été testés (Gómez *et al.*, 2013b, Sobolevsky *et al.*, 2012a, Sobolevsky *et al.*, 2012b, Torrado *et al.*, 2008).

β -glucuronidase de *E. coli* de source recombinante

La procédure est la même que mentionnée en 3.3.2. En bref, 50 μ L d'une solution d'enzyme recombinante ($\geq 10,000,000$ U/g) sont ajoutés dans chaque tube avec 1 mL de tampon phosphate 1,0 M (pH 6,9) pour avoir l'équivalent de 1200 unités par échantillon. Les tubes sont ensuite bouchés et l'incubation se fait dans un bain chauffé à 50 °C pendant 1 h. Les étapes qui suivent l'hydrolyse sont les mêmes qu'en 3.3.2.

3.3.6 Procédure pour le test d'absence de peroxyde pour le THF

La procédure pour le test colorimétrique est la suivante (selon Millipore Sigma) :

1. Rincer la seringue au méthanol, puis ensuite à l'hexane (3 fois chaque).
2. Rincer la seringue avec un peu de THF.
3. Prélever environ 1 mL de THF et le mettre dans un petit tube en verre.
4. Tremper la bandelette (Peroxide Test # 1.10011.0001 de Millipore Sigma) pendant 1 seconde (immersion rapide).
5. Laisser sécher 30 secondes.
6. Déposer une goutte d'eau au bout de la bandelette et égoutter sur un essuie-tout.
7. Attendre 15 secondes, puis observer la couleur.
8. Comparer avec la charte de couleurs sur la bouteille pour avoir la concentration en mg/L de H₂O₂

Certaines compagnies commercialisent le produit en ajoutant des stabilisants comme l'hydroquinone ou le 2,6-di-tert-butyl-p-crésol pour diminuer et retarder la peroxydation du produit. Le produit que nous utilisons contient de l'hydroxytoluène butylé (BHT) qui sert de stabilisant.

3.4 Analyses CG-SM/SM

Plusieurs méthodes analytiques ont été utilisées en fonction des métabolites des stéroïdes étudiés. Les paramètres de la chromatographie en phase gazeuse (CG) sont toujours les mêmes et sont présentés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Paramètres de la chromatographie en phase gazeuse

Température de l'injecteur	270 °C
Injection	1 µL (débit non partagé, 270 °C)
Colonne	DB-5MS (Agilent Technologies) 25 m x 200 µm x 0,33 µm
Gaz vecteur	He à 1,2 mL/min (Débit ajusté pour TR épitestostérone à 14 min)
Débit de la colonne	1,09 mL/min (pour l'appareil Thermo*) 1,133 mL/min (pour l'appareil Agilent*)
Programmation de température du four (Décrit par Ayotte <i>et al.</i> , 1996)	100 °C pendant 0,5 min Augmente de 20 °C/min jusqu'à 240 °C Augmente de 6 °C/min jusqu'à 278 °C Augmente de 10 °C/min jusqu'à 320 °C Fin : 320 °C pendant 5 min
Temps de l'analyse	23,033 min

* Voir la section 2.7.1 pour le détail des instruments utilisés

Pour chaque stéroïde exogène étudié, un tableau résumé (tableau 3.2) des temps de rétention (TR) ainsi que des transitions ioniques utilisées pour identifier les métabolites est présenté dans les pages qui suivent.

Tableau 3.2 : Temps de rétention et transitions ioniques pour l'analyse des divers métabolites ciblés

Molécule mère	Molécule mère / métabolites	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Énergie de collision (V)	
Méthyltestostérone	Épiméthylandrostanediols (17β)	12,30 (5α) 12,35 (5β)	435,3	345,3	10	
				255,1		
				199,1		
	Méthylandrostanediols (17α)	13,95 (5α) 14,00 (5β)	435,3	345,3		
				255,1		
				199,1		
	Méthandriol	Isomère du 17-méthyl-5-androstan-3,16,17-triol (M1) ¹	15,70	538,3	231,2	15
					143,1	
	Mestanolone	Isomère du 17-méthyl-5-androstan-3,16,17-triol (réduit) (M3) ¹	15,60	536,3	521,3	
					258,2	
244,2						
Isomère du 17-méthyl-5-androstan-3,16,17-triol (M4) ¹		16,50	538,3	231,2		
				143,1		
Métabolite 16-OH du méthandriol (Mét 1)		13,65	536,3	266,2		
	231,2					
	143,1					
Métabolite 16-OH du méthandriol (Mét 2)	16,40	536,3	431,3	10		
			356,3			
			231,2			
Méthénolone	Méthénolone	14,73	446,3		220,2	10
					208,2	
					195,1	
	1-méthylène-5α-androstan-3α-ol-17-one	13,62	446,3	431,3	5	
				341,3		
				251,2		
	1α-méthyl-5α-androstan-3α-ol-17-one	13,74	448,3	433,3	10	
				343,3		
				253,2		
	1α-méthyl-5α-androst-1-èn-16α-ol-3,17-dione	16,41	532,3	517,3	5	
517,3				207,1	15	

¹Comme la stéréochimie des métabolites 16-OH n'est pas connue, ceux-ci ont été numérotés de M1 à M4 ; le M3 étant le seul sous la forme réduite (voir figure 2.7).

Tableau 3.2 Temps de rétention et transitions ioniques pour l'analyse des divers métabolites ciblés (suite)

Molécule mère	Molécule mère / métabolites	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Énergie de collision (V)
Stanozolol	Stanozolol	18,20	472,3	457,3	5
				168,1	
				143,1	
	3'-hydroxystanozolol	18,75	560,3	545,4	10
				254,3	
				143,1	
	4β-hydroxystanozolol	18,80	560,3	517,3	15
				471,3	
				381,3	
	16α-hydroxystanozolol	20,05	560,3	231,2	20
168,1					
143,1					
3',16α-dihydroxystanozolol	20,40	648,3	231,2	20	
	4β,16α-dihydroxystanozolol				20,65
DHCMT	DHCMT	17,00	478,2	373,2	10
				240,1	
				143,1	
	6β-OH DHCMT	16,75	568,3	533,4	10
				517,2	
				478,2	
	4α-chloro-18-nor-17β-hydroxyméthyl-17α-méthyl-5α-androsta-13-èn-3α-ol (LT)	15,30	381,2	343,2	10
				253,2	
				379,2	
	4-chloro-18-nor-17β-hydroxyméthyl, 17α-méthylandrosta-4,13-dièn-3α-ol (DHCMT M1)	13,40	377,2	343,2	10
253,2					
287,2					
4-chloro-18-nor-17α-hydroxyméthyl, 17β-méthylandrosta-4,13-dièn-3α-ol (DHCMT M2)	15,15	377,2	251,2	10	
			185,1		
			287,2		
DMT	17α-méthyl-5α-androst-2-èn-17β-ol (majeur)	12,10	345,3	255,2	10
				201,2	
				161,1	
	17α-méthyl-5α-androst-3-èn-17β-ol (mineur)	12,15	523,3	105,1	15
				81,1	
				343,3	
	17α-méthyl-5α-androstan-2β,3α,17β-triol (majeur)	15,00	523,3	253,2	10
				213,1	
				17α-méthyl-5α-androstan-2β,3β,17β-triol (mineur)	
	18-nor-17,17-diméthyl-5α-androst-13-èn-2ξ,3α-diol (LT)	11,80	433,3	343,2	5
253,1				10	
147,1				5	
343,2				10	

Tableau 3.2 Temps de rétention et transitions ioniques pour l'analyse des divers métabolites ciblés (suite)

Molécule mère	Molécule mère / métabolites	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Énergie de collision (V)
Méthastérone	Méthastérone	15,30	462,3	419,3	15
				156,2	
				143,1	
				141,1	
	2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol	14,25	449,3	359,3	10
				269,2	
				213,1	
	2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-16,17 β -diol-3-one	17,20	550,3	231,2	15
				218,2	
				143,1	
	18-nor-17 β -hydroxyméthyl-2 ξ -méthyl-5 α -androst-13-èn-3-one (LT)	14,40	357,3	207,1	
				195,1	
193,1					
161,1					
				95,1	

En ce qui concerne les paramètres utilisés pour la chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur sélectif de masse, le tableau 3.3 présente les paramètres utilisés pour la partie chromatographie.

Tableau 3.3 : Paramètres pour la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur sélectif de masse

Gaz vecteur	He à 0,9 mL/min
Paramètres du four	Départ : 150 °C pendant 0,5 min Augmente de 25° C/min jusqu'à 240 °C Augmente de 6° C/min jusqu'à 278 °C Augmente de 20° C/min jusqu'à 320 °C Fin : 320 °C pendant 5 min
Temps de l'analyse	16,60 min

En mode de balayage complet, les masses vont de 50 à 650 m/z tandis que pour le mode en mesure d'ions sélectionnés, les segments de temps ainsi que les masses sélectionnées sont présentés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Paramètres pour l'analyse en mode SIM pour la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur sélectif de masse

Segment de temps	Temps de début (min)	Composé	Temps de rétention (min)	Masses sélectionnées
1	6,50	5 α -androstan-17-one (ESTD)	7,94	346,3 331,3
		Épiétiocholanolone (ESTD)	9,51	434,3 419,3 329,3 239,3
		Androstérone	9,64	434,3 419,3 329,3 239,3
		Étiocholanolone	9,69	434,3 419,3 329,3 239,3
2	9,80	Déhydroépiandrostérone	10,19	432,3 417,3 327,3 303,3
		Épiandrostérone	10,25	434,3 419,3
		Androst-4,9(11)-dien-3,17-dione (ISTD)	10,42	428,3 413,3
		Testostérone	10,71	432,3 417,3

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont présentés en trois parties. La première porte sur la comparaison des différentes méthodes d'hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués, la seconde sur les méthodes d'hydrolyse enzymatique et de solvolysse chimique des stéroïdes sulfoconjugués. La dernière présente les résultats obtenus suite à l'application de la méthode retenue de solvolysse chimique dans le THF acidifié sur les principaux métabolites de stéroïdes synthétiques.

4.1 Hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués

Les différentes méthodes d'hydrolyse ont été comparées avec une urine humaine (section 3.2.2). Les stéroïdes normalement présents majoritairement sous forme glucuroconjuguée, soit l'androstérone, l'étiocolanone, etc., ont été analysés dans chaque condition.

4.1.1 Comparaison des différentes méthodes d'hydrolyse

Nous avons retenu pour les fins de ce projet la β -glucuronidase d'*E. coli* de type 1X-A (purifiée et lyophilisée), de source recombinante et de type K-12 (en solution dans 50 % de glycérol) ainsi que la β -glucuronidase d'*H. pomatia* de type H-1. Les tests visaient à déterminer si l'hydrolyse était complétée en totalité ou seulement en partie, si des composés étaient résistants à certains types d'enzymes et si des réactions secondaires étaient observées.

Le premier test a été effectué avec la β -glucuronidase d'*E. coli* de type 1X-A. L'incubation des standards et des urines a été réalisée à une température de 50 °C à divers temps d'incubation, soit 0, 15, 30 et 60 min avec 1200 ou 2400 unités de β -glucuronidase dans chaque échantillon. Une urine négative (UN_2) a été utilisée pour les tests (section 3.2.2).

Le deuxième test a été effectué avec l'enzyme β -glucuronidase recombinante d'*E. coli*. Il s'agit aussi d'une enzyme vendue en poudre lyophilisée, mais dont la pureté est plus grande. La concentration en unités de β -glucuronidase par bouteille est donc beaucoup plus élevée. L'incubation a été réalisée à une température de 50 °C avec plusieurs temps d'incubation, soit 0, 15, 30, 60 et 90 minutes. Pour comparer les résultats avec l'enzyme de type 1X-A mentionnée précédemment, les mêmes nombres d'unités ont été conservés. L'urine utilisée pour ces tests est la même (UN_2). Les résultats sont présentés au tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Comparaison des résultats obtenus lors de l'hydrolyse avec la β -glucuronidase d'*E. coli* de type 1X-A et de source recombinante

	Composé hydrolysé	Androstérone glucuronide		5 α -Adiol glucuronide		Testostérone glucuronide		Andro-d ₄ -glucuronide	
		1200	2400	1200	2400	1200	2400	1200	2400
	Nombre d'unités d'enzyme (U)								
	Valeurs du Temps d'hydrolyse	Concentration du composé (ng/mL)						% d'hydrolyse du STD interne	
<i>E. coli</i> 1X-A	0 min	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 min	5099	5024	156	159	42	40	102	97
	30 min	5007	4933	156	149	41	40	96	100
	60 min	5033	5007	160	152	41	41	96	98
<i>E. coli</i> recombinante	0 min	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 min	4883	4870	149	147	42	41	94	99
	30 min	4964	5033	152	152	40	41	98	98
	60 min	4940	4937	150	146	41	41	98	99
	90 min	4919	4772	134	143	41	41	97	96

Ces tests ont été réalisés une fois et la même urine a été utilisée lors des 18 variations de conditions. Le taux d'hydrolyse est similaire avec les deux nombres d'unités d'enzyme (1200 U ou 2400 U). Nous concluons qu'une incubation de 15 min à 50 °C avec 1200 unités d'enzyme est suffisante pour effectuer l'hydrolyse enzymatique. Il est à noter que vu l'obtention de résultats similaires, l'enzyme de type 1X-A semble le meilleur choix : elle est moins dispendieuse et sa préparation est plus simple.

Le troisième test a été réalisé avec la β -glucuronidase K-12 d'*E. coli* qui est la seule à être vendue directement en solution dans 50 % de glycérol. Des recherches dans la littérature ont permis de trouver que l'incubation était généralement exécutée à 55 °C entre 1 h et 2 h et les différentes études suggèrent d'ajouter 30 μ L ou bien 100 μ L de la solution à chaque échantillon en gardant un pH autour de 7. Nous avons donc utilisé ces conditions.

Aussi, puisque l'enzyme est vendue en solution dans 50 % de glycérol, quelques tests ont été réalisés pour voir si la présence de glycérol dans les échantillons pouvait nuire au rendement de récupération ou encore affecter l'hydrolyse. Ainsi, des incubations sans enzyme ont été effectuées avec 30 μL ou 100 μL d'une solution de glycérol/eau (50/50) avec les mêmes échantillons urinaires. Les résultats sont comparés avec les données obtenues avec les meilleures conditions des deux premiers tests, soit une hydrolyse de 15 min à 50 °C avec 1200 unités d'enzyme de type 1X-A dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Comparaison entre les valeurs obtenues lors de l'hydrolyse avec la β -glucuronidase 1X-A et K12

	Composé hydrolysé	Androstérone glucuronide		5 α -Adiol glucuronide		Testostérone glucuronide		Andro-d ₄ -glucuronide	
		30	100	30	100	30	100	30	100
	Valeur du tableau	% par rapport à résultats avec enzyme 1X-A, 15 min, 1200 unités, 50 °C							
55 °C	K-12	96	98	83	81	98	98	99	98
	Glycérol/Eau (50/50)	0	0	0	0	0	0	0	0

Ces tests ont été réalisés une fois et la même urine a été utilisée lors des 4 variations de conditions. Premièrement, il est possible de constater qu'en l'absence d'enzyme, aucune dégradation ou différence de récupération n'est notée. Aussi, il n'y a pas de différence significative entre l'utilisation de 30 μL ou de 100 μL de l'enzyme K-12. L'utilisation de 30 μL par échantillon est donc suffisante. Également, la comparaison entre les concentrations obtenues avec l'échantillon traité avec 1X-A pendant 15 min à 50 °C avec l'échantillon traité avec 30 μL de K-12 pendant 60 min à 55 °C montre qu'il n'y a pas de différence importante entre les résultats obtenus pour les trois composés observés ni pour le taux d'hydrolyse.

Après avoir établi que les résultats étaient similaires lors de l'utilisation d'un volume de 30 ou de 100 μL de la solution enzymatique K-12 pour chaque échantillon, le volume de 30 μL a été choisi pour tester une température d'incubation inférieure, soit 50 °C, comme lors des tests avec les autres types d'enzymes vus précédemment. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Comparaison de la durée de l'incubation entre l'hydrolyse réalisée avec la β -glucuronidase 1X-A et celle de K-12 à 50 °C

Composé hydrolysé		Androstérone glucuronide	5 α -Adiol glucuronide	Testostérone glucuronide	Andro-d ₄ -glucuronide
Valeurs du tableau		% par rapport à résultats avec enzyme 1X-A, 15 min, 1200 unités, 50 °C			
Temps d'incubation					
50 °C	30 min	96	90	92	93
	60 min	95	86	92	91
	90 min	95	83	92	89

Selon le fabricant, l'activité de la solution enzymatique K-12 est dépendante de la température. Toutefois, il ne semble pas y avoir de différence significative pour les concentrations obtenues comparativement au test précédent avec une incubation à 55 °C. Il est donc possible de réduire la température d'incubation à 50 °C pour faire l'hydrolyse avec l'enzyme K-12. Pour ce qui est du temps d'incubation, il semble y avoir une baisse du recouvrement pour le 5 α -Adiol glucuronide lorsque l'incubation est plus longue. Un temps d'incubation de 30 minutes semble donc suffisant pour avoir une hydrolyse complète sans perdre de produit .

Pour le dernier essai d'enzymes servant à déconjuguer les composés glucuronides, l'enzyme *H. pomatia* de type H-1 a été testée. Il faut noter que cette préparation contient $\geq 300,000$ U/g de β -glucuronidase, mais également $\geq 10,000$ U/g de sulfatase (hydrolyse possible de stéroïdes sulfoconjugués). Les conditions d'hydrolyse utilisées pour ce test sont les suivantes : 5000 unités de β -glucuronidase par échantillon à pH 5,2. L'urine utilisée est la même que lors des tests précédents pour pouvoir comparer les valeurs entre elles (UN_2). Les résultats sont présentés à la figure 4.1. Pour ce type d'enzyme, plusieurs variations dans les paramètres d'incubation ont été essayées, soit : 50 °C pendant 60 min, 55 °C pendant 30 min et 60 min ainsi que 37 °C pendant 16 h 30.

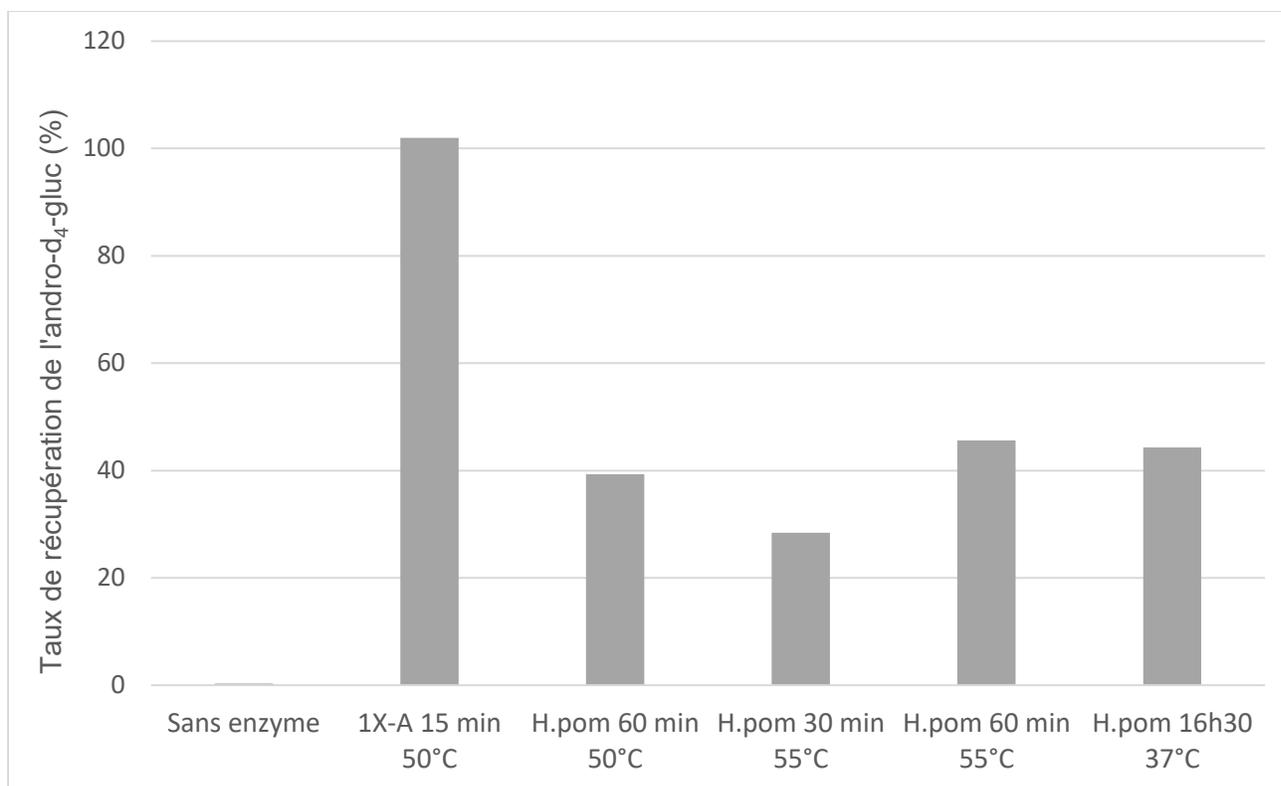


Figure 4.1 : Taux de récupération de l'androsténone-d₄-glucuronide après hydrolyse avec *H. pomatia* selon différents paramètres d'incubation

Il est possible d'observer que le taux de recouvrement maximal est atteint après 60 minutes à 55 °C et est d'environ 45 %, ce qui indique que l'hydrolyse des glucuronides est incomplète dans toutes les conditions essayées avec cette enzyme.

Par ailleurs, il fut possible d'observer que des composés excrétés majoritairement sous la forme sulfoconjuguée ont subi une déconjugaison partielle (~15%). La DHEA-S qui était présente dans l'urine a été déconjuguée par l'enzyme *H. pomatia*, ce qui n'était pas le cas lors de l'utilisation de la β -glucuronidase 1X-A d'*E. coli*. Ceci indique une déconjugaison des composés sulfoconjugués due à la présence de sulfatase dans l'enzyme d'*H. pomatia*.

Aussi, lors des travaux préliminaires effectués par J.-F. Lévesque, il avait été démontré que cette enzyme a peu ou pas du tout d'activité pour les stéroïdes sulfoconjugués en C-17 β comme la testostérone sulfatée (Lévesque, 1998).

En conclusion, l'hydrolyse avec toutes les sources de β -glucuronidases d'*E. coli* permet d'obtenir la concentration cumulative des fractions L+G d'un composé alors que l'hydrolyse avec *H. pomatia* permet d'obtenir une concentration cumulative, mais partielle, des fractions L+G+S, en raison de la présence d'activité sulfatase dans la préparation d'enzymes. La DHEA, qui est présente à environ 75 % dans l'urine sous forme sulfoconjuguée, démontre bien la présence d'activité sulfatase alors qu'une très petite concentration est recueillie lors de l'utilisation de l'enzyme d'*E. coli*, qui elle est sélective aux composés glucuronides. Somme toute, si le but est d'avoir une hydrolyse complète et sélective des composés glucuronides, il est déconseillé d'utiliser *H. pomatia* de type H-1 comme source enzymatique.

4.2 Résultats sur les stéroïdes sulfoconjugués

4.2.1 Comparaison des différentes méthodes d'hydrolyse

Tout d'abord, des étalons en matrices aqueuse et urinaire ont été préparés avec des standards libres pour pouvoir mesurer quantitativement le recouvrement des stéroïdes libérés lors du processus de déconjugaison. Le tableau 4.4 identifie les concentrations des différents composés présents dans les standards (STD) 1 à 4 ainsi que dans les deux contrôles qualité utilisés (CQ A et CQ B). Il y est aussi mentionné le coefficient de corrélation linéaire (R^2) de chacune des pentes pour démontrer qu'elles ont une bonne linéarité.

Tableau 4.4 : Concentrations des différents composés dans les échantillons étalons et les contrôles qualité

Composé	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	CQ A	CQ B	R ² eau	R ² urine
	Concentration en ng/mL						-	-
Androstérone	97,4	3000	6036	9305	1071	7545	0,996	0,983
Étiocholanolone	205	3069	6138	9463	1534	7672	0,999	0,991
DHEA	30,5	3048	6096	9144	1524	7518	0,999	0,998
Épiandrostérone	19,6	152	326	500	59,8	402	0,998	0,999
Testostérone	20,7	176	362	548	85,7	455	0,998	0,995

Ensuite, deux solutions, une nommée « matrice aqueuse » et l'autre nommée « matrice urinaire », ont été préparées à partir de composés glucuroconjugués et sulfoconjugués. Ces solutions, aliquotées en échantillons de 1 mL, ont permis d'évaluer le recouvrement des différents composés selon leur groupement conjugué lors des différents tests de déconjugaison. Le tableau 4.5 présente les concentrations maximales attendues de chaque composé sous sa forme libre, c'est-à-dire si la déconjugaison de l'échantillon était totale.

Tableau 4.5 : Concentrations maximales attendues pour chaque composé libre dans les matrices aqueuse et urinaire

Composé de départ (forme conjuguée)	<u>Matrice aqueuse</u>	<u>Matrice urinaire</u>
	Concentration maximale (ng/mL)	
Androstérone glucuronide	6686	4011
Étiocholanolone glucuronide	6915	2939
Déhydroépiandrostérone sulfate	4549	5004
Épiandrostérone sulfate	245	295
Testostérone sulfate	350	245

Avec l'aide des courbes d'étalonnage, des contrôles qualité et des échantillons tests, plusieurs méthodes de déconjugaison ont été testées pour établir le pourcentage de recouvrement maximal selon le type de groupement conjugué observé, soit : hydrolyse avec *H. pomatia*, solvolysse chimique dans l'acétate d'éthyle ou dans le THF.

La figure 4.2 qui suit présente les courbes cinétiques de la déconjugaison des composés conjugués dans le temps.

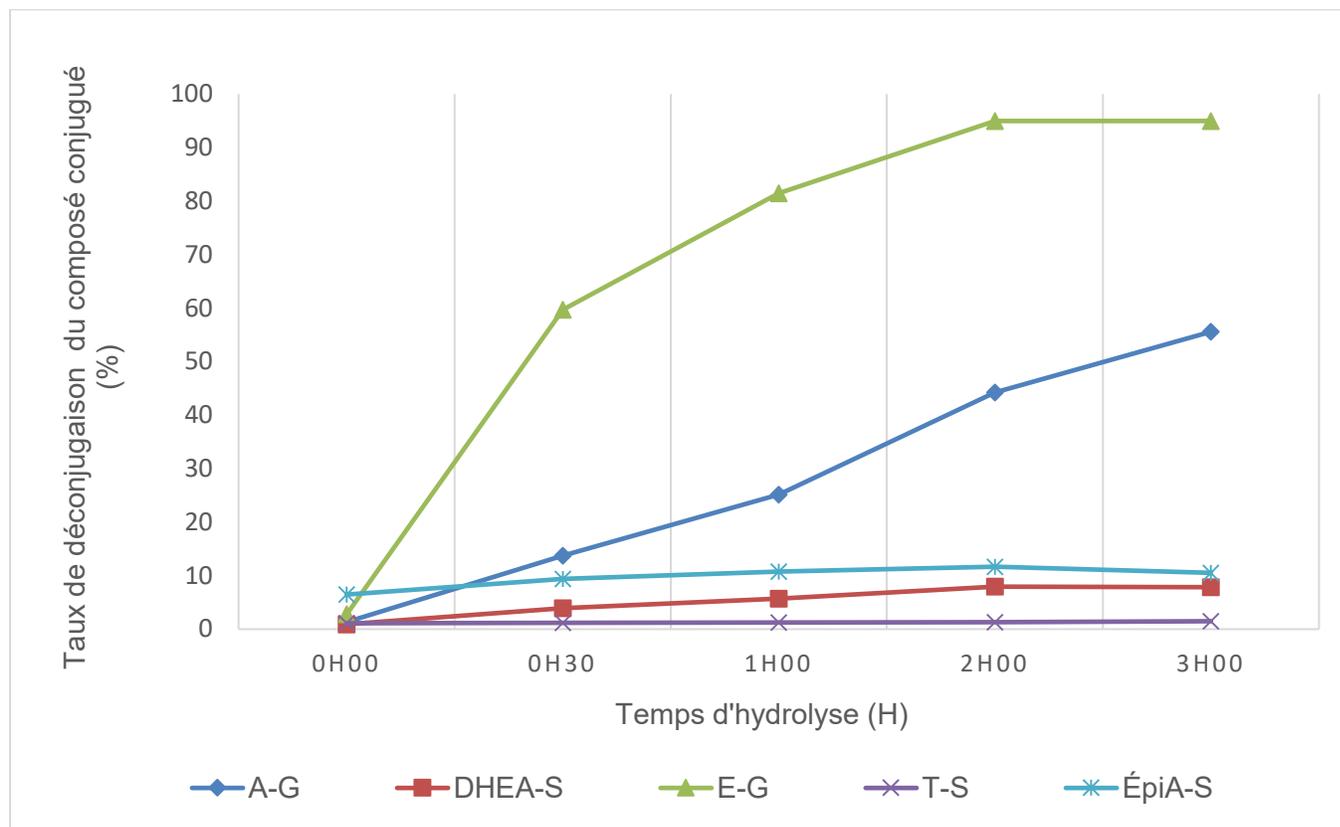


Figure 4.2 : Courbes de cinétique de la déconjugaison de certains composés glucuronides ou sulfates avec les enzymes de *H. pomatia*

D'après la figure 4.2, il est possible de remarquer que l'hydrolyse avec *H. pomatia* ne permet pas de déconjuguer complètement les composés glucuronides et sulfates en 3 h. La déconjugaison des composés glucuroconjugués (androstérone et étiocolanolone) semble plus rapide et plus efficace que celle des composés sulfoconjugués (épiandrostérone et DHEA). Quant au sulfate de testostérone, celui-ci n'est pas déconjugué par cette enzyme. L'enzyme posséderait donc une plus grande activité de la β -glucuronidase comparativement à l'arylsulfatase, qui est insuffisante pour amener à une déconjugaison appréciable des sulfoconjugués.

Somme toute, il est difficile d'établir un temps d'hydrolyse optimal puisque l'hydrolyse est incomplète après 3 h à 37 °C, mais si l'on se fie aux données de la figure 4.2, il serait possible d'établir qu'après 2 h d'hydrolyse, les composés observés (sauf l'androstérone) semblent atteindre un plateau de déconjugaison avec cette enzyme. L'hydrolyse n'est pas sélective aux sulfoconjugués, même que ceux-ci sont faiblement ou pas du tout déconjugés dans de telles conditions. L'hydrolyse n'est pas non plus optimale pour les composés glucuroconjugués.

Pour les tests de solvolysse chimique dans l'acétate d'éthyle ou dans le THF, les deux méthodes ont été comparées selon : le temps d'incubation, la quantité d'acide ajoutée, la température d'incubation ainsi que l'effet de la présence d'eau sur les échantillons. Ceux-ci ont subi une solvolysse chimique avec l'un des deux solvants choisis sans hydrolyse préalable des glucuroconjugués pour voir la sélectivité de la méthode aux molécules conjuguées. Le tableau 4.6 ci-dessous présente les différentes conditions qui ont été testées pour chaque solvant.

Tableau 4.6 : Résumé des différents paramètres testés en fonction du solvant utilisé pour la solvolysse chimique

Paramètres	Solvant choisi pour la solvolysse	
	<u>Acétate d'éthyle</u>	<u>Tétrahydrofurane</u>
Volume de solvant	1 mL	1 mL
H ₂ SO ₄ 4M ajouté	2 µL, 5 µL, 10 µL	2 µL, 5 µL, 10 µL
Temps d'incubation	20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 180 min	20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 180 min, 24 h
Température d'incubation	40 °C, 50 °C	40 °C, 50 °C

Les différents paramètres ont tout d'abord été testés sur les échantillons en solution aqueuse afin d'éviter l'effet de la matrice urinaire. Les prochains tableaux (4.7 à 4.10) présentent les résultats obtenus. Les cases ombragées représentent un recouvrement d'un produit glucuroconjugué, ce qui est indésirable puisqu'on recherche un procédé sélectif. Les noms des composés ont été abrégés de la manière suivante : androstérone glucuronide (A-G), étiocholanolone glucuronide (E-G), déhydroépiandrostérone sulfate (DHEA-S), épiandrostérone sulfate (ÉpiA-S) et testostérone sulfate (T-S).

Tableau 4.7 : Efficacité de la solvolysse avec l'acétate d'éthyle lors des tests en solution aqueuse

Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄															Température d'incubation
	2 µL					5 µL					10 µL					
	A-G	E-G	DHEA-S*	ÉpiA-S	T-S	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	A-G	
20	0	0	75	65	56	0	0	97	85	70	0	0	95	83	73	40 °C
40	0	0	100	87	73	0	0	94	81	72	1	1	97	79	71	
60	0	0	100	78	73	0	0	92	68	68	1	1	95	82	71	
120	0	0	96	84	72	0	0	81	69	61	3	2	85	71	66	
180	0	0	88	76	68	1	1	83	70	64	4	3	74	60	58	
Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄															Température d'incubation
	2 µL					5 µL					10 µL					
	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	A-G	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	A-G	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	A-G	
20	0	0	89	78	66	0	1	85	70	61	1	1	104	85	72	50 °C
40	0	1	105	88	73	0	1	103	84	75	2	2	101	82	72	
60	0	1	111	94	76	1	1	101	84	74	3	2	93	75	66	
120	0	1	102	85	69	1	1	85	69	64	6	4	79	61	59	
180	0	1	91	81	62	2	2	80	62	61	10	7	69	54	53	

* Les valeurs exprimées sont en % de recouvrement du composé libre par rapport à la concentration maximale attendue de chaque composé présent dans la matrice aqueuse (voir tableau 4.5).

Ces tests ont été réalisés une fois et la même solution aqueuse de contrôle a été utilisée lors des 30 variations de conditions. On note que la solvolysse en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant à 40 °C ou à 50 °C n'est pas sélective, surtout lorsqu'on augmente la température et la quantité d'acide. En plus du manque de sélectivité, l'apparition de composés issus de réactions secondaires se produit lorsque la réaction est effectuée sur une longue période de temps et/ou si la quantité d'acide est plus importante, tel qu'illustré par le chromatogramme présenté à la figure 4.3 montrant la présence de dérivés acétylés.

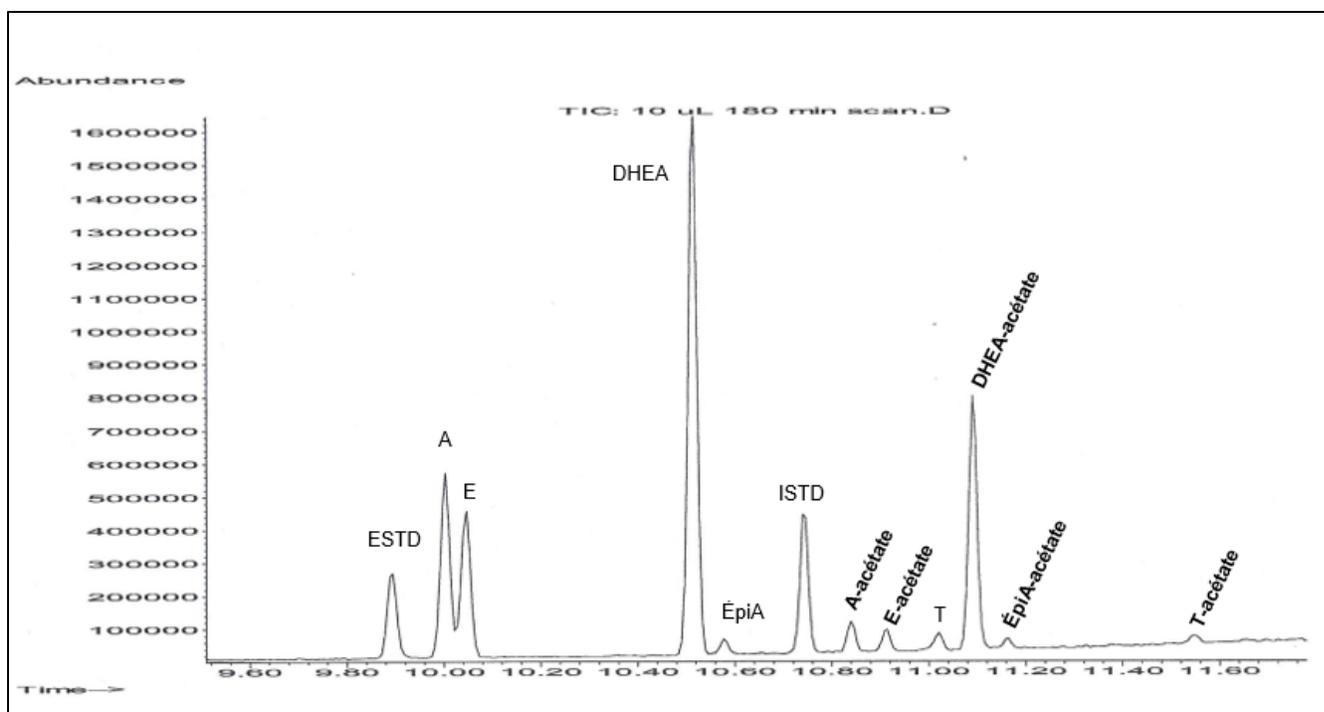


Figure 4.3 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM en mode de balayage complet d'un échantillon de standards après une solvolysé dans l'acétate d'éthyle

La figure 4.3 présente le chromatogramme des ions totaux résultant de l'analyse d'un échantillon de standards hydrolysé dans l'acétate d'éthyle à 50 °C avec 10 µL d'acide sulfurique 4 M pendant 180 min. La figure 4.4 présente le spectre de masse de l'acétate d'épiandrostérone qui a été identifié par comparaison avec le spectre du standard authentique.

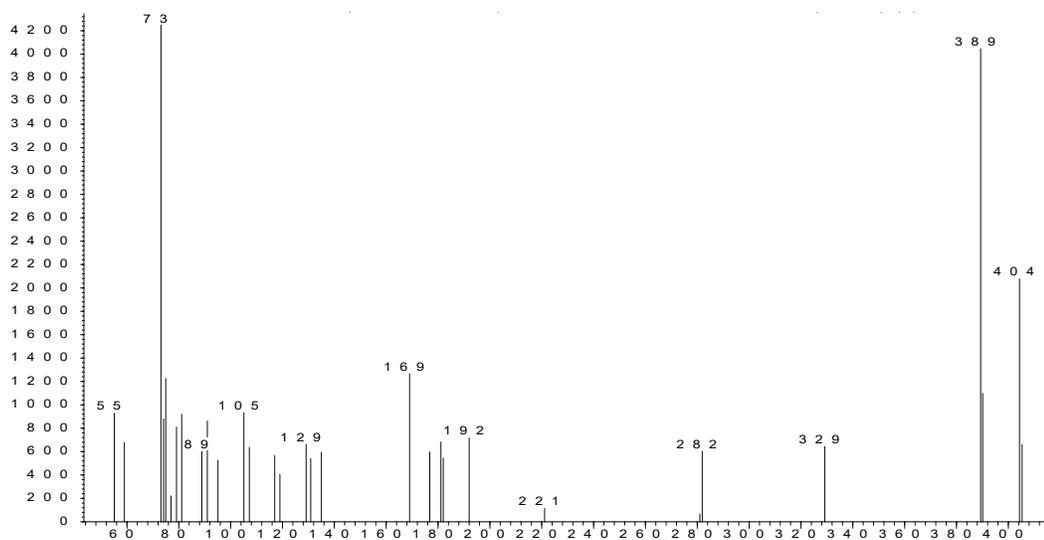


Figure 4.4 : Spectre de masse théorique de l'acétate d'épiandrostérone (standard authentique)

La figure 4.5 présente le mécanisme de la réaction d'acétylation de l'épiandrosterone par transestérification en milieu acide en présence d'acétate d'éthyle.

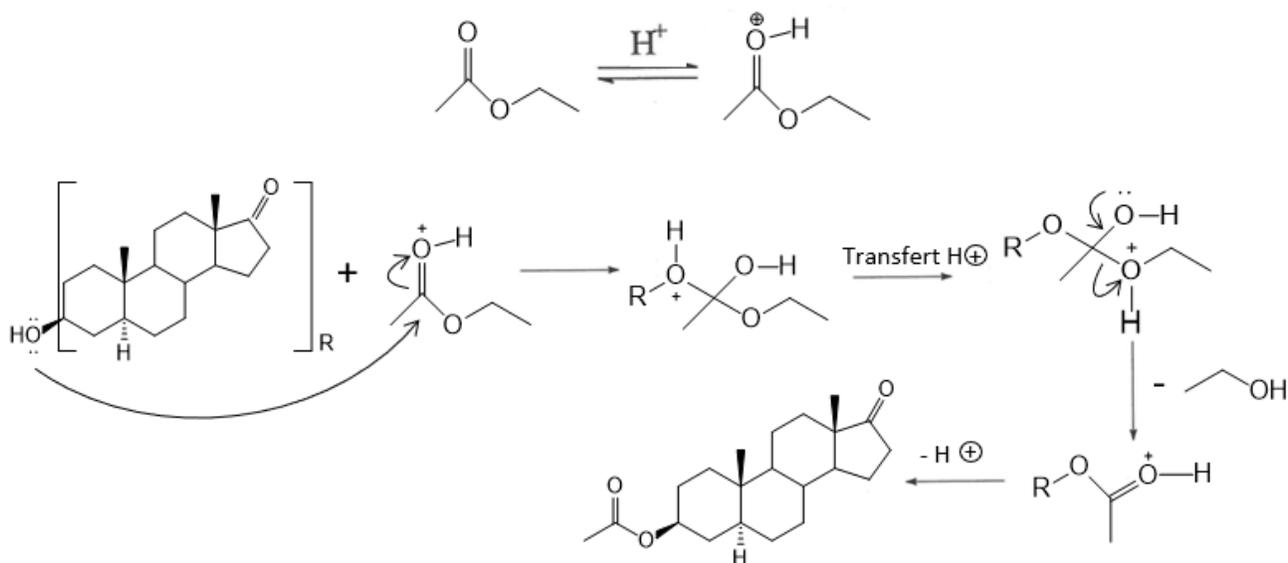


Figure 4.5 : Mécanisme d'acétylation par transestérification de l'épiandrosterone

En conclusion, des réactions secondaires suite à la solvolysé chimique dans l'acétate d'éthyle rendent ces conditions non favorables pour la déconjugaison de stéroïdes sulfates. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par J.-F. Lévesque lors de travaux préliminaires (Lévesque, 1998). Les tests se sont donc terminés là et n'ont pas été poursuivis avec la matrice urinaire.

Pour la réalisation de la solvolysé chimique dans le THF, un volume de 1 mL de solvant est ajouté dans chaque échantillon. Pour s'assurer de l'absence de peroxyde dans la bouteille de THF, une méthode colorimétrique utilisant une bandelette pour détecter des concentrations de 0,5 – 2 – 5 – 10 ou 25 mg/L de H_2O_2 a été utilisée. Les bouteilles étaient remises au réfrigérateur à 4 °C en attendant la prochaine utilisation. Lors d'un résultat positif, le solvant n'a pas été utilisé. En effet, les peroxydes du THF sont instables et peuvent se décomposer, ce qui n'est pas souhaitable dans notre situation puisqu'on ne veut pas créer de produit secondaire lors de la réaction de solvolysé. Selon le choix du fabricant et l'étanchéité du sceau de la bouteille, il arrive parfois qu'elle contienne déjà des peroxydes lors de la première utilisation ou que des peroxydes s'y forment rapidement. Les résultats obtenus pour la solvolysé chimique dans le THF sont présentés au tableau 4.8 qui suit. Un seul essai a été réalisé pour ces résultats.

Tableau 4.8 : Efficacité de la solvolysé dans le THF lors des tests en solution aqueuse

Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄															Température d'incubation
	2 µL					5 µL					10 µL					
	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	A-G	
20	0	0	85	81	75	0	0	84	76	73	0	0	85	81	76	40 °C
40	0	0	89	85	79	0	0	97	93	85	0	0	82	75	72	
60	0	0	96	89	82	0	0	84	79	75	0	0	81	77	75	
120	0	0	88	84	79	0	0	85	82	76	0	0	85	79	75	
180	0	0	111	98	86	0	0	96	88	81	0	0	108	97	86	
1440	0	0	91	83	79	0	0	87	82	80	1	1	90	87	83	
Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄															Température d'incubation
	2 µL					5 µL					10 µL					
	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	A-G	
20	0	0	113	102	93	0	0	92	88	82	0	0	86	84	76	50 °C
40	0	0	96	93	86	0	0	99	97	88	0	0	100	97	88	
60	0	0	90	86	83	0	0	92	90	83	0	0	103	98	91	
120	0	0	92	88	84	0	0	93	89	86	0	0	92	90	83	
180	0	0	96	91	85	0	0	89	84	80	0	0	90	85	82	

Les valeurs exprimées sont en % de recouvrement du composé libre par rapport à la concentration maximale attendue de chaque composé présent dans la matrice aqueuse (voir tableau 4.5).

Ces tests ont été réalisés une fois et la même solution aqueuse de contrôle a été utilisée lors des 33 variations de conditions. Aucun standard glucuroconjugué n'a été hydrolysé dans ces conditions. À 40 °C, les meilleurs paramètres sont 180 min avec 2 µL d'acide, mais ces résultats sont équivalents lors d'une incubation pendant 20 min avec 2 µL d'acide à 50 °C, ce qui est plus réaliste pour le temps d'incubation. Bref, la solvolysé apporte de meilleurs recouvrements lorsqu'elle est effectuée à 50 °C et requiert une plus petite quantité d'acide pour arriver à des recouvrements similaires pour les métabolites sulfoconjugués, ce qui est souhaité.

4.2.2 Optimisation de la méthode

Validation des meilleures conditions de solvolysse :

Pour améliorer les conditions de la méthode de solvolysse chimique dans le THF, les meilleures conditions ont été testées en triplicata pour voir la variabilité des résultats. Les deux séries de conditions les plus prometteuses à 50 °C sont 2 µL pendant 20 min et 5 µL pendant 40 min. Pour comparer avec les conditions actuelles de notre laboratoire, la série de conditions de 2 µL pendant 60 min a aussi été sélectionnée. Le tableau 4.9 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.9 : Vérification en triplicata de l'efficacité des meilleures conditions de solvolysse à 50 °C dans le THF lors de tests en solution aqueuse

Échant.	Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄					Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄					Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄				
		2 µL						5 µL						2 µL				
		A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S		A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S		A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S
#1	20	0	0	123	105	83	40	0	0	128	112	84	60	0	0	119	104	82
#2	20	0	0	126	111	86	40	0	0	119	101	80	60	0	0	121	104	83
#3	20	0	0	125	110	85	40	0	0	123	106	85	60	0	0	126	115	86
	Moyenne	0	0	125	109	85	Moyenne	0	0	123	106	83	Moyenne	0	0	122	108	83
	Écart-type	0	0	1	3	1	Écart-type	0	0	5	5	3	Écart-type	0	0	4	6	2

Les valeurs exprimées sont en % de recouvrement du composé libre par rapport à la concentration maximale attendue de chaque composé présent dans la matrice aqueuse (voir tableau 4.5).

Les recouvrements obtenus lors des tests en triplicata sont similaires, mais il semble y avoir moins d'intervariabilité lors de l'utilisation de 2 µL d'acide avec une incubation de 20 minutes seulement.

Vérification de l'impact de la présence d'eau :

La vérification est effectuée par l'ajout de 1 mL de THF à l'échantillon ainsi que 2 μ L d'acide sulfurique 4 M et une certaine quantité d'eau (0, 10, 20, 50 ou 100 μ L) tout en procédant à l'incubation à 50 °C durant 20 minutes. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.10.

Tableau 4.10 : Résultats du test sur l'impact de la teneur en eau dans la matrice aqueuse sur l'efficacité de la solvolysse chimique dans le THF

Volume d'eau ajouté (μ L)	Volume H ₂ SO ₄				
	2 μ L				
	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S
0	0	0	125	109	85
10	0	0	113	96	83
20	0	0	111	97	83
50	0	0	117	106	82
100	0	0	108	94	74

Les valeurs exprimées sont en % de recouvrement du composé libre par rapport à la concentration maximale attendue de chaque composé présent dans la matrice aqueuse (voir tableau 4.5).

La quantité d'eau dans l'échantillon lors de la solvolysse chimique avec le THF n'affecte pas la sélectivité du procédé pour les composés sulfoconjugués puisque les glucuroconjugués ne sont toujours pas déconjugués. Cependant, il est possible d'observer que la teneur en eau semble avoir un léger impact sur le recouvrement des composés sulfatés. Le pourcentage de recouvrement du sulfate de testostérone semble le plus affecté selon la quantité d'eau ajoutée à l'échantillon.

La deuxième phase de tests pour l'optimisation des paramètres de solvolysse consistait à utiliser un échantillon test préparé avec une matrice urinaire dont les concentrations en composés glucuronides et sulfates sont connues comme précédemment pour déterminer l'effet de matrice sur le taux de recouvrement. Les trois séries de paramètres qui semblaient donner des résultats similaires lors des tests avec la solution aqueuse ont été testées en utilisant les standards dans l'urine pour voir si d'autres composés présents dans cette matrice peuvent affecter le processus de déconjugaison. Le tableau 4.11 présente les résultats en triplicata qui ont été obtenus pour les trois séries de conditions.

Tableau 4.11 : Vérification de l'efficacité en triplicata des meilleures conditions de solvolysé à 50°C dans le THF sur l'échantillon dans la matrice urinaire

Échant.	Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄					Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄					Temps (min)	Volume H ₂ SO ₄				
		2 µL						5 µL						2 µL				
		A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S		A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S		A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S
# 1	20	0	0	77	73	82	40	0	0	75	71	83	60	0	0	75	71	82
# 2	20	0	0	77	72	83	40	0	0	76	72	82	60	0	0	74	70	80
# 3	20	0	0	75	71	82	40	0	0	75	70	81	60	0	0	77	72	82
	Moyenne			77	72	82	Moyenne			75	71	82	Moyenne			75	71	82
	Écart-type			1	1	1	Écart-type			1	1	1	Écart-type			1	1	1

Les valeurs exprimées sont en % de recouvrement du composé libre par rapport à la concentration maximale attendue de chaque composé présent dans la matrice urinaire (voir tableau 4.5).

Les taux de recouvrement des composés sulfoconjugués sont similaires pour les trois séries de conditions. Il y a moins de variation entre les échantillons dans la matrice urinaire que dans la matrice aqueuse, mais le recouvrement est moins élevé, possiblement à cause des autres composés présents dans l'urine. Les taux de recouvrement sont acceptables (> 70 %). Pour l'optimisation de la méthode, nous garderons donc les conditions qui requièrent le moins d'acide et le plus court temps d'incubation, soit 2 µL et 20 min. D'autres étapes d'optimisation auraient pu être effectuées, comme de nouveaux tests avec différentes matrices urinaires, pour voir si le recouvrement varie d'une urine à une autre.

L'impact de la teneur en eau a aussi été vérifié de nouveau pour voir si la quantité d'eau avait le même effet avec la matrice urinaire. Les conditions suivantes ont été utilisées : 2 µL d'acide sulfurique et 20 min d'incubation à 50 °C. Le tableau 4.12 montre les résultats obtenus lors de ce test.

Tableau 4.12 : Résultats du test sur l'impact de la teneur en eau dans un échantillon urinaire sur l'efficacité de la solvolys chimique dans le THF

Volume d'eau ajouté (μL)	Volume H_2SO_4				
	2 μL				
	A-G	E-G	DHEA-S	ÉpiA-S	T-S
0	0	0	77	72	82
10	0	0	80	75	72
20	0	0	77	73	72
50	0	0	81	75	66
100	0	0	65	55	42

Les valeurs du tableau sont en % de recouvrement du composé libre par rapport à la concentration maximale attendue dans la matrice urinaire (voir tableau 4.5).

La récupération des composés déconjugés est similaire lorsqu'il y a très peu d'eau, mais à partir de l'ajout de 5 μL , on remarque une baisse du taux de recouvrement pour la testostérone. Lors de l'ajout de 10 μL d'eau, on constate une baisse générale du recouvrement pour les tous les composés sulfates. Il est donc important de s'assurer que l'échantillon est bien sec lors du séchage sous jet d'azote et qu'il n'y a pas d'eau résiduelle provenant de l'extraction sur phase solide.

4.3 Phase d'application de la méthode optimisée à des urines positives anonymisées

Pour cette dernière partie de tests, plusieurs urines déjà analysées et trouvées positives à des stéroïdes anabolisants exogènes ont été choisies pour vérifier la présence de métabolites sulfoconjugués à la suite d'une solvolys chimique avec la méthode optimisée au THF. Il est important de noter que les différences de résultats entre les collections d'urine de référence du laboratoire et les urines d'athlètes sont normales, puisqu'il y a des variations au niveau des doses administrées, de la fréquence et bien d'autres facteurs. Les urines de référence proviennent de volontaires qui ont reçu des doses minimales uniques par voie orale et alors que ce n'est pas le cas pour les athlètes qui se dopent. Les différences entre les individus sont aussi à prendre en considération.

Dans les tableaux qui suivent (4.13 à 4.20), la présence d'un X dans une case indique l'observation de la présence du métabolite dans une urine positive (UP_#) ou dans l'urine de référence. Les résultats ont été obtenus en effectuant une comparaison entre les transitions et les ratios d'ions (abondances) de l'urine de référence (L+G ou S) versus l'échantillon positif (L+G ou S).

4.3.1 Méthyltestostérone, méthandriol et mestanolone

Pour la vérification de la méthode de solvolysse avec la méthyltestostérone, deux échantillons positifs ont été retenus, soit UP_1 et UP_2. Ils ont été analysés en même temps qu'une urine de référence (UR) de méthyltestostérone et de méthandriol. Un échantillon positif à la mestanolone (UP_3) a aussi été analysé simultanément avec une urine de référence de mestanolone puisque ses métabolites sont très similaires à ceux des deux autres molécules mères. Le tableau 4.13 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.13 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de méthyltestostérone ou de mestanolone

		UP_1		UP_2		UP_3		UR_méthyltestostérone		UR_méthandriol		UR_mestanolone	
		L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S
Métabolites observés	Épiméthylandrostanediols	X	X	X	X		X	X (5β)	X (5β)	X (5β)	X (5β)	X (5α)	X (5α)
	Méthylandrostanediols							X (5β)				X (5α)	
	17-méthyl-5-androstan-3,16,17 triol (Isomère M1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	17-méthyl-5-androstan-3,16,17 triol (Isomère M2)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	17-méthyl-5-androstan-3,16,17 triol (Isomère M3 (forme réduite))		X				X		X		X		X
	17-méthyl-5-androstan-3,16,17 triol (Isomère M4)		X		X		X		X		X		X

D'après les résultats, les méthylandrostanediols ($5\alpha/5\beta$) ne sont présents que dans la fraction d'urine comportant les métabolites libres et glucuronides. Au contraire, les métabolites isomères M3 et M4 ne seraient retrouvés que dans la fraction d'urine comportant les métabolites sulfoconjugués. Même si les arrangements exacts de ces isomères ne sont pas connus, il est probable que ces deux métabolites possèdent une de leurs fonctions alcools (-OH) en C-3 β ce qui, comme nous l'avons vu à la figure 2.4, donne un stéroïde conjugué avec un groupement sulfate. Comme ces deux métabolites ont été observés pour tous les échantillons positifs (sauf le M3 pour UP_2), il est donc important d'évaluer la fraction d'urine comportant les métabolites sulfates pour démontrer la prise de méthyltestostérone ou de mestanolone. Si on compare ces résultats avec ceux obtenus par Pozo *et al.*, il est possible de constater que des métabolites sulfates n'ont pas à être analysés directement par CL-SM/SM (Pozo *et al.*, 2009b). On peut obtenir une bonne sensibilité pour ceux-ci lors de leur déconjugaison par solvolysé chimique dans le THF, ce qui permet de concentrer l'échantillon lors de son analyse par CG-SM/SM. Le tableau 4.14 démontre la pertinence de l'extraction de la fraction S par rapport à la fraction L+G dans le cas de certains métabolites pour le diagnostic plus fin de la prise de méthyltestostérone ou de mestanolone.

Tableau 4.14 : Comparaison de l'abondance des différentes fractions d'urine (L+G ou S) selon le métabolite observé lors de la prise de méthyltestostérone (MT) ou de mestanolone (Mes)

Métabolite	L+G	S
Épiméthylandrostanediols	4 x (MT)	1,5 x (Mes)
Méthylandrostanediols	100%	N/A
Isomère M1		120 x (MT) 7 x (Mes)
Isomère M2	2,5 x (MT) 6 x (Mes)	
Isomère M3 (réduit)	N/A	100%
Isomère M4	N/A	100%

Les comparaisons d'abondance présentées dans le tableau ci-dessus sont obtenues lors de la comparaison de l'urine de référence pour la fraction L+G et la fraction S en normalisant les valeurs avec le standard interne présent dans chaque échantillon. Ainsi, pour le M1, même si le métabolite peut être observé dans les deux fractions d'urine, l'abondance est plus grande dans la fraction contenant les métabolites sulfates. Pour le M2, l'observation inverse peut être faite. Les isomères de méthylandrostanediol (5α et 5β) ne sont présents que sous la forme glucuronide. Les isomères d'épiméthylandrostanediol sont majoritairement présents dans la fraction L+G

lorsqu'ils proviennent de la méthyltestostérone. S'ils découlent de la prise de mestanolone, ils sont majoritairement sulfoconjugués. Ce constat pourrait cependant différer avec l'utilisation d'une autre urine.

4.3.2 Méthénolone

Pour la vérification de la méthode de solvolysse avec la méthénolone, trois échantillons positifs ont été retenus, soit UP_4, UP_5 et UP_6. L'analyse de ces échantillons a été réalisée en parallèle avec l'analyse d'une urine de référence de méthénolone. Le tableau 4.15 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.15 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de méthénolone

		UP_4		UP_5		UP_6		UR_méthénolone	
		L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S
Métabolites observés	Méthénolone	X		X	X	X	X	X	X
	1-méthylène-5 α -androstane-3 α -ol-17-one	X		X	X	X	X	X	X
	1 α -méthyl-5 α -androstane-3 α -ol-17-one	X		X		X		X	X
	1 α -méthyl-5 α -androst-1-èn-16 α -ol-3,17-dione	X	X	X	X	X	X	X	X

Tous les métabolites ont été observés à la fois dans la fraction L+G ainsi que dans la fraction S de l'urine tout comme la molécule mère en ce qui concerne l'urine de référence. Une étude de D. Goudreault et R. Massé publiée en 1990 sur le métabolisme de la méthénolone acétate (Primobolan®) démontrait pourtant que seul le 1 α -méthyl-5 α -androst-1-èn-16 α -ol-3,17-dione était excrété à la fois dans la fraction G ainsi qu'en plus petite concentration dans la fraction S de l'urine humaine. Les autres métabolites abordés ici ainsi que la molécule mère se retrouvaient seulement dans la fraction des glucuronides. Ces auteurs observaient toutefois deux autres métabolites sulfates hydroxylés en 16 β lors de l'excrétion dans l'urine, soit le 1-méthyl-5 α -androst-1-èn-16 β -ol-3,17-dione et le 3 α ,16 β -dihydroxy-1-méthyl-5 α -androst-1-èn-17-one (Goudreault *et al.*, 1990). Il aurait pu être intéressant d'ajouter ces deux métabolites à notre étude. Pour ce qui est des métabolites sulfates de notre étude, ceux-ci avaient aussi été observés par Fragkaki *et al.*, et mentionnés comme étant des métabolites pertinents et possiblement long-terme

à considérer pour établir la prise de méthénolone (Fragkaki *et al.*, 2015). Ces auteurs utilisaient la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem haute résolution pour observer ces métabolites conjugués alors qu'il nous a été possible de les obtenir sous leur forme déconjuguée pour les analyser par CG-SM/SM. Le tableau 4.16 démontre la pertinence de l'extraction de la fraction S par rapport à la fraction L+G dans le cas de certains métabolites pour le diagnostic de la prise de méthénolone.

Tableau 4.16 : Comparaison de l'abondance des différentes fractions d'urine (L+G ou S) selon le métabolite observé suite à la prise de méthénolone

Métabolite	L+G	S
Méthénolone	3 x	
1-méthylène-5 α -androstan-3 α -ol-17-one	2 x	
1 α -méthyl-5 α -androstan-3 α -ol-17-one	3 x	
1 α -méthyl-5 α -androst-1-èn-16 α -ol-3,17-dione		7 x

D'après les résultats obtenus, même si tous les métabolites peuvent être observés dans la fraction d'urine contenant les sulfoconjugués, seul celui possédant deux groupements cétone serait plus abondant dans cette fraction. La figure 4.6 présente les chromatogrammes superposés du pic du 1 α -méthyl-5 α -androst-1-èn-16 α -ol-3,17-dione dans la fraction L+G et la fraction S pour comparer leur abondance.

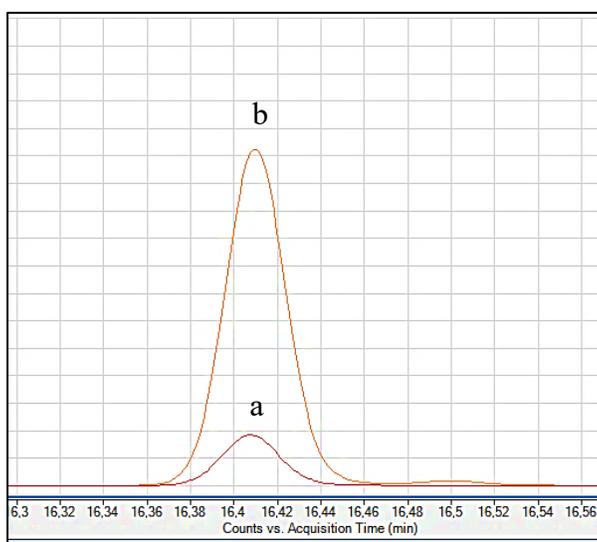


Figure 4.6 : Comparaison de l'abondance du 1 α -méthyl-5 α -androst-1-èn-16 α -ol-3,17-dione dans la fraction L+G (a) vs la fraction S (b)

Goudreault et Massé (1990) affirmaient toutefois que ce métabolite était excrété majoritairement sous la forme glucuronide et que seulement 8 % étaient excrétés sous la forme sulfatée (Goudreault *et al.*, 1990). Ces résultats peuvent être dus à la variation individuelle et selon la dose administrée par rapport à l'utilisateur. Malgré cela, selon nos résultats, il serait judicieux d'extraire la fraction d'urine contenant les sulfoconjugués pour ce métabolite dans le but d'obtenir un meilleur diagnostic de la prise de méthénolone puisqu'il s'agit du seul métabolite sulfate qui a été retrouvé dans les trois échantillons positifs testés. Il serait intéressant d'analyser sa persistance dans le temps pour savoir s'il peut être un bon métabolite long-terme et vérifier avec un plus grand nombre d'urines ($n > 3$) si ce métabolite est effectivement plus important dans la fraction S que dans la fraction L+G.

4.3.4 Stanozolol

Quatre échantillons positifs ont été analysés, soit UP_7, UP_8, UP_9 et UP_13 avec l'urine de référence de stanozolol. Le tableau 4.17 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.17 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de stanozolol

	Fraction d'urine	UP_7		UP_8		UP_9		UP_13		UR_stanozolol	
		L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S
Métabolites observés	Stanozolol									X	X
	3'OH-stanozolol					X		X		X	
	4β-OH-stanozolol					X		X		X	
	16α-OH-stanozolol	X		X		X		X		X	
	3',16α-diOH stanozolol	X		X		X	X	X	X	X	X
	4β,16α-diOH stanozolol	X		X		X		X		X	

La majorité des métabolites observés se trouvent dans la fraction L+G de l'urine, sauf la molécule mère et le métabolite 3',16α-dihydroxystanozolol présents aussi dans la fraction sulfate, mais en quantité plus faible. Il ne serait donc pas approprié de mettre trop d'efforts à l'extraction de la fraction S puisqu'elle n'apporte pas vraiment d'éléments nouveaux.

4.3.5 Déhydrochlorométhyltestostérone

Six échantillons ont été analysés (UP_10, UP_11, UP_12, UP_13, UP_14 et UP_16) en même temps qu'une urine de référence de DHCMT. Les échantillons ont été extraits avec de l'hexane plutôt que de l'éther diéthylique pour obtenir un meilleur recouvrement des composés. Le tableau 4.18 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.18 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de DHCMT

		UP_10		UP_11		UP_12		UP_13		UP_14		UP_16		UR_DHCMT	
Fraction d'urine		L+G	S	L+G	S										
Métabolites observés	DHCMT													X	X
	6 β -OH-DHCMT													X	
	4 α -chloro-18-nor-17 β -hydroxyméthyl, 17 α -méthyl-5 α -androsta-13-èn-3 α -ol (LT)	X		X		X		X		X		X		X	
	4-chloro-18-nor-17 β -hydroxyméthyl, 17 α -méthylandrosta-4, 13-dièn-3 α -ol (DHCMT M1)													X	X
	4-chloro-18-nor-17 α -hydroxyméthyl, 17 β -méthylandrosta-4, 13-dièn-3 α -ol (DHCMT 2)													X	X

Les métabolites de la DHCMT sont majoritairement retrouvés dans la fraction L+G de l'urine. Les seuls métabolites sulfoconjugués ont été observés dans l'urine de référence, soit la molécule mère ainsi que deux autres métabolites, surnommés ici DHCMT 1 et DHCMT 2 (Sobolevsky *et al.*, 2012a). Toutefois, en raison de la faible abondance de ces deux métabolites dans la fraction sulfate, il n'apparaît pas pertinent d'extraire la fraction d'urine contenant les métabolites sulfoconjugués. En effet, dans notre cas, aucun échantillon d'urine n'aurait été trouvé positif en observant les sulfates.

4.3.6 Désoxyméthyltestostérone

Quatre échantillons positifs ont été analysés (UP_14, UP_15, UP_16 et UP_17) ainsi qu'une urine de référence de DMT. Les échantillons ont été extraits avec de l'hexane alors que l'urine de référence a été extraite deux fois, soit à l'hexane et à l'éther, pour voir s'il y avait un changement dans la récupération des différents métabolites. Le tableau 4.19 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.19 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de DMT

Fraction d'urine		UP_14		UP_15		UP_16		UP_17		UR_DMT (hexane)		UR_DMT (éther)	
		L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S	L+G	S
Métabolites observés	DMT (2-ène)			X		X				X		X	
	17 α -méthyl-5 α -androstane-2 β ,3 α ,17 β -triol	X	X	X	X		X			X	X	X	X
	17 α -méthyl-5 α -androstane-2 β ,3 β ,17 β -triol	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
	18-nor-17,17-diméthyl-5 α -androstane-13-ène-2 ξ ,3 α -diol (LT)	X		X		X		X		X		X	

La molécule mère ainsi que le 18-nor-17,17-diméthyl-5 α -androst-13-èn-2 ξ ,3 α -diol, qui est considéré comme le métabolite long-terme, sont observables seulement dans la fraction contenant les métabolites libres et les glucuronides. L'abondance des pics était bien supérieure pour l'urine de référence extraite à l'éther, mais tous les composés étaient observables, peu importe le solvant d'extraction. Les deux métabolites "triols" ont pu être observés dans la fraction d'urine contenant les sulfoconjugués, mais leur abondance demeure plus importante dans la fraction L+G, soit 10 fois plus pour le 2 β ,3 α ,17 β -triol et 5 fois plus pour le 2 β ,3 β ,17 β -triol lors de l'analyse de la référence extraite à l'éther.

4.3.7 Méthastérone

Deux échantillons positifs ont été analysés (UP_15 et UP_16) ainsi qu'une urine de référence de méthastérone. Ceux-ci ont été extraits à l'hexane plutôt qu'à l'éther pour obtenir un meilleur recouvrement des métabolites. Le tableau 4.20 présente les résultats obtenus.

Tableau 4.20 : Métabolites présents dans les différentes fractions de l'urine pour les échantillons de méthastérone

Fraction d'urine		UP_15		UP_16		UR_méthastérone (hexane)	
		L+G	S	L+G	S	L+G	S
Métabolites observés	Méthastérone			X		X	X
	2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol					X	X
	2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-16,17 β -diol-3-one			X		X	
	18-nor-17-hydroxyméthyl-2 ξ -méthyl-5 α -androst-13-èn-3-one (LT)	X		X		X	

La molécule mère ainsi que le métabolite 2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol peuvent être observés dans la fraction d'urine comportant les sulfoconjugués. Toutefois, ceux-ci sont vraiment plus abondants (presque 100 fois plus) dans la fraction d'urine comportant les métabolites libres et glucuronides.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Lors de ce projet, différentes méthodes de déconjugaison des stéroïdes glucuroconjugés ou sulfoconjugés ont été testées. Il a été démontré que tous les types de β -glucuronidases d'*E. coli* sont équivalents pour réaliser une hydrolyse sélective des métabolites glucuroconjugés, mais au niveau des coûts et de la simplicité de la préparation, celle de type 1X-A est un meilleur choix. Pour les métabolites sulfoconjugés, l'enzyme *H. pomatia* s'est révélée peu efficace et non spécifique en comparaison avec la solvolysse chimique. Nous avons confirmé les observations de J.-F. Lévesque pour certaines conditions de solvolysse chimique. L'acétate d'éthyle, dont l'utilisation est encore répandue aujourd'hui, est non spécifique aux métabolites sulfatés. De plus, lorsqu'utilisé en milieu acide, il est possible d'observer des produits de réactions secondaires indésirables d'acétylation par transestérification (formation d'acétates).

L'utilisation du THF comme solvant pour la solvolysse chimique s'est avérée la meilleure option. Elle permet d'effectuer une déconjugaison spécifique des composés sulfatés en obtenant de bons rendements. Il s'agit aussi d'un protocole relativement simple d'utilisation qui requiert peu de temps d'incubation. Lors de l'optimisation de cette méthode, les paramètres suivants ont été retenus : l'ajout de 1 mL de THF et 2 μ L d' H_2SO_4 à chaque échantillon et l'incubation à 50 °C pendant 20 minutes.

La méthode optimisée de solvolysse chimique dans le THF acidifié a également été testée sur plusieurs urines positives anonymisées comportant un ou plusieurs stéroïdes anabolisants exogènes. Certains métabolites des divers stéroïdes ont ainsi pu être observés dans la fraction d'urine contenant les stéroïdes sulfoconjugés. En majorité, ils demeurent plus abondants dans la fraction d'urine qui contient les métabolites libres et glucuronides, mais certains métabolites étudiés se sont toutefois révélés plus abondants sous leur forme sulfoconjugée dans certains cas.

Les métabolites sulfoconjugés des stéroïdes présentent un intérêt en raison de leur spécificité qui permet un meilleur diagnostic de la prise de stéroïdes prohibés, mais aussi en raison de leur possible rétropection long-terme. En adoptant une méthode de déconjugaison spécifique à ceux-ci, il sera possible de les analyser plus facilement en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour atteindre les seuils de détection qui n'étaient pas toujours rencontrés lors de leur analyse directe par chromatographie liquide.

En ce qui concerne les perspectives d'avenir, il faudrait bien sûr valider les résultats obtenus lors de ces travaux de recherche en appliquant la méthode de solvolysé optimisée à plusieurs autres urines pour voir si les mêmes constatations peuvent être observées. Aussi, il serait intéressant de procéder à l'évaluation des métabolites sulfoconjugués d'autres stéroïdes anabolisants exogènes, par exemple l'oxandrolone ou la méthandiène. Il faudrait finalement évaluer l'intérêt d'incorporer ces métabolites sulfates aux méthodes analytiques de dépistage et de confirmation qui sont en place dans les laboratoires de contrôle du dopage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMA (2016) Document technique (TD2016IDCR.).
- Antignac JP, Brosseaud A, Gaudin-Hirret I, Andre F & Bizec BL (2005) Analytical strategies for the direct mass spectrometric analysis of steroid and corticosteroid phase II metabolites. *Steroids* 70(3):205-216.
- Ayotte C, Goudreault D & Charlebois A (1996) Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 687(1):3-25.
- Baumann S (2010) *Longterm Detection of Anabolic Steroid Metabolites in Urine.* (Agilent Technologies, USA).
- Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament M-M, Cassablanca H & James P (1994) Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8(4):304-308.
- Beckett AH (1976) Problèmes posés par les stéroïdes anabolisants dans le domaine des sports. *Revue Olympique* 109-110:591-598.
- Birzniece V (2015) Doping in sport: effects, harm and misconceptions. *Intern. Med. J.* 45(3):239-248.
- Bowers LD (2012) Anti-dope testing in sport: the history and the science. *FASEB J.* 26(10):3933-3936.
- Brandenberger H & Maes RAA (1997) *Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists.* Walter de Gruyter New York. 762 p
- Burstein S & Lieberman S (1958a) Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures. *J. Biol. Chem.* 233(2):331-335.
- Burstein S & Lieberman S (1958b) Kinetics and mechanism of solvolysis of steroid hydrogen sulfates. *J. Am. Chem. Soc* 80(19):5235-5239.
- Cawley AT, Kazlauskas R, Trout GJ, Rogerson JH & George AV (2005) Isotopic fractionation of endogenous anabolic androgenic steroids and its relationship to doping control in sports. *J. Chromatogr. Sci.* 43(1):32-38.
- Dotson JL & Brown RT (2007) The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatr. Clin. North Am.* 54(4):761-769.

- Dürbeck HW, Büker I, Scheulen B & Telin B (1983) GC and capillary column GC/MS determination of synthetic anabolic steroids II. 4-chloro-methandienone (oral turinabol) and its metabolites. *J. Chromatogr. Sci.* 21(9):405-410.
- Ferchaud V, Bizec BL, Monteau F & André F (1998) Determination of the exogenous character of testosterone in bovine urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *The Analyst* 123(12):2617-2620.
- Ferchaud V, Le Bizec B, Monteau F, André F & Courcoux P (2000) Enzymatic hydrolysis of conjugated steroid metabolites: search for optimum conditions using response surface methodology. *The Analyst* 125(12):2255-2259.
- Forsdahl G, Geisendorfer T, Göschl L, Pfeffer S, Gärtner P, Thevis M & Gmeiner G (2018) Unambiguous identification and characterization of a long-term human metabolite of dehydrochloromethyltestosterone. *Drug Test Anal* 10(8):1-7.
- Fragkaki AG, Angelis YS, Kiouisi P, Georgakopoulos CG & Lyris E (2015) Comparison of sulfo-conjugated and gluco-conjugated urinary metabolites for detection of methenolone misuse in doping control by LC-HRMS, GC-MS and GC-HRMS. *J. Mass Spectrom.* 50(5):740-748.
- Fragkaki AG, Angelis YS, Koupparis M, Tsantili-Kakoulidou A, Kokotos G & Georgakopoulos C (2009) Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids* 74(2):172-197.
- Gauthier J, Goudreault D, Poirier D & Ayotte C (2009) Identification of drostanolone and 17-methyltestosterone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes. *Steroids* 74(3):306-314.
- Gauthier J, Poirier D & Ayotte C (2012) Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes. *Steroids* 77(6):635-643.
- Gomes RL, Meredith W, Snape CE & Sephton MA (2009a) Analysis of conjugated steroid androgens: deconjugation, derivatisation and associated issues. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49(5):1133-1140.
- Gomes RL, Meredith W, Snape CE & Sephton MA (2009b) Conjugated steroids: analytical approaches and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 393(2):453-458.

- Gómez C, Pozo OJ, Garrostas L, Segura J & Ventura R (2013a) A new sulphate metabolite as a long-term marker of metandienone misuse. *Steroids* 78(12-13):1245-1253.
- Gómez C, Pozo OJ, Marcos J, Segura J & Ventura R (2013b) Alternative long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. *Steroids* 78(1):44-52.
- Gosetti F, Mazzucco E, Gennaro MC & Marengo E (2013) Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *J. Chromatogr. B* 927:22-36.
- Goudreault D & Massé R (1990) Studies on anabolic steroids - 4. Identification of new urinary metabolites of methenolone acetate (Primobolan) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Steroid Biochem. Mole. Biol.* 37(1):137-154.
- Hauser B, Deschner T & Boesch C (2008a) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine. *J. Chromatogr. B* 862(1-2):100-112.
- Hauser B, Schulz D, Boesch C & Deschner T (2008b) Measuring urinary testosterone levels of the great apes-problems with enzymatic hydrolysis using *Helix pomatia* juice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158(1):77-86.
- He G, Yang S, Lu J & Xu Y (2016) New long term metabolite in human urine for metenolone misuse by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Steroids* 105:1-11.
- Hoffman JR & Ratamess NA (2006) Medical issues associated with anabolic steroid use : Are they exaggerated ? *J. Sports Sci Med.* 5(2):182-193.
- Houghton E, Graiger L, Dumasia MC & Teale P (1992) Application of gas chromatography/mass spectrometry to steroid analysis in equine sports: Problems with enzyme hydrolysis. *Org. Mass Spectrom.* 27(10):1061-1070.
- Hungerford NL, McKinney AR, Stenhouse AM & McLeod MD (2006) Selective manipulation of steroid hydroxyl groups with boronate esters: Efficient access to antigenic C-3 linked steroid-protein conjugates and steroid sulfate standards for drug detection. *Org. Biomol. Chem.* 4(21):3951-3959.
- Kanayama G & Pope HG, Jr. (2017) History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-athletes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 464:4-13

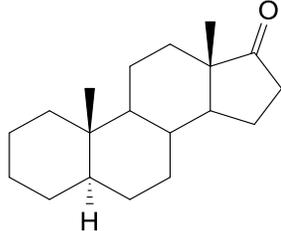
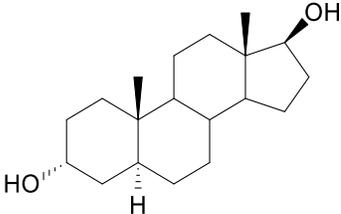
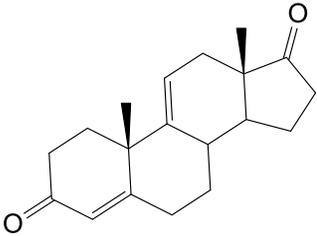
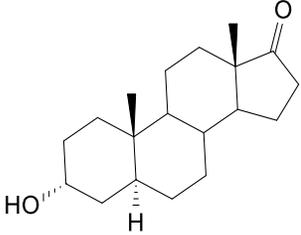
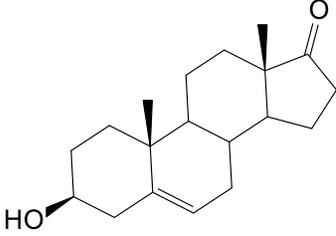
- Kicman AT, Houghton E & Gower DB (2010) Chapter 9 - Anabolic Steroids: Metabolism, Doping and Detection in Human and Equestrian Sports. *Steroid Analysis*, Makin HLJ & Gower DB (Édit.) Springer. p 743-836.
- Kioui P, Angelis YS, Fragkaki AG, Abushareeda W, Alsayrafi M, Georgakopoulos C & Lyris E (2015) Markers of mesterolone abuse in sulfate fraction for doping control in human urine. *J. Mass Spectrom.* 50(12):1409-1419.
- Kootstra PR, Zoontjes PW, van Tricht EF & Sterk SS (2007) Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC-MS. *Anal. Chim. Acta* 586(1-2):82-92.
- Lemarquand J & Triolet J (2002) *Identification et manipulation des composés peroxydables*. (INRS, Paris), p 17-27.
- Lévesque J-F (1998) *L'importance clinique de l'excrétion urinaire des stéroïdes sulfoconjugués lors de contrôles antidopage*. Maîtrise en Sciences expérimentales de la santé (Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier). 136 p
- Makin HLJ & Gower DB (2010) *Steroid Analysis*. Springer, Second Edition. 1224 p
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M & Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol. Lett.* 158(3):167-175.
- Masse R, Ayotte C & Dugal R (1989) Studies on anabolic steroids. I. Integrated methodological approach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 489(1):23-50.
- Massé R, Bi H, Ayotte C, P.Du, Gélinas H & Dugal R (1991) Studies on anabolic steroids. V. Sequential reduction of methandienone and structurally related steroid A-ring substituents in humans: gas chromatographic-mass spectrometric study of the corresponding urinary metabolites. *J. Chromatogr. B* 562(1-2):323-340.
- Massé R & Goudreault D (1992) Studies on anabolic steroids - 11. 18-hydroxylated metabolites of mesterolone, methenolone and stenbolone : new steroids isolated from human urine. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42(3-4):399-410.
- Messori G, Cugnetto G, Moneti G & Serio M (1984) Helix pomatia induced conversion of some 3 β -hydroxysteroids. *J. Steroid Biochem.* 20(3):793-796.
- NIDA (2006) Anabolic Steroid Abuse. in *National Institute on Drug Abuse*, Édit: Health and human services, p 8.

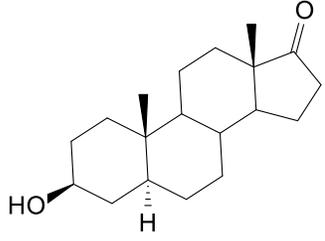
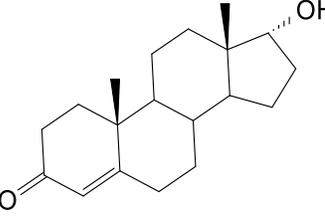
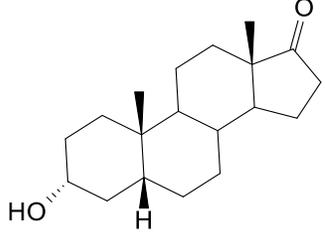
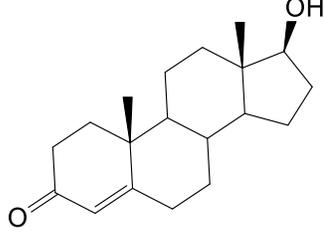
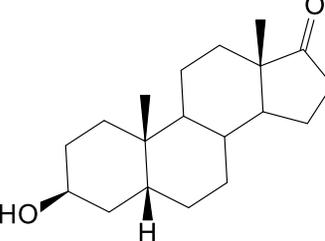
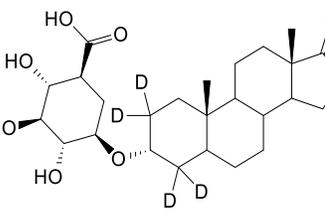
- Ouellet A, LeBerge N & Ayotte C (2013) A simplified and accurate method for the analysis of urinary metabolites of testosterone-related steroids using gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27(15):1739-1750.
- Parr MK, Fußhöller G, Gütschow M, Hess C & Schänzer W (2010a) GC-MS(/MS) investigations on long-term metabolites of 17-methyl steroids in *Recent advances in doping analysis (18)*, Édité Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A & Mareck U (Sportverlag Stauß), p 64-73.
- Parr MK & Schanzer W (2010b) Detection of the misuse of steroids in doping control. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121(3-5):528-537.
- Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Lootens L, Grimalt S, Sancho JV, Hernandez F, Meuleman P, Leroux-Roels G & Delbeke FT (2009a) Detection and structural investigation of metabolites of stanozolol in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Steroids* 74(10-11):837-852.
- Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Lootens L, Van Thuyne W, Parr MK, Schanzer W, Sancho JV, Hernandez F, Meuleman P, Leroux-Roels G & Delbeke FT (2009b) Detection and characterization of a new metabolite of 17alpha-methyltestosterone. *Drug Metab. Dispos.* 37(11):2153-2162.
- Reece, Urry, Cain, Wasserman, Minorsky & Jackson (2012) *CAMPBELL Biologie*. Pearson Education, Canada. 1458 p
- Robles J, Marcos J, Renau N, Garrostas L, Segura J, Ventura R, Barcelo B, Barcelo A & Pozo OJ (2017) Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 169:20-29.
- Rodchenkov G, Sobolevsky T & Sizoi V (2006) New designer anabolic steroids from Internet. in *Recent advances in doping analysis (14)*, Édité Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A & Mareck U (Sportverlag Strauß), p 141-150.
- Rongone EL & Segaloff A (1962) Isolation of urinary metabolites of 17a-methyltestosterone. *J. Bio. Chem.* 237(4):1066-1067.
- Rzeppa S, Heinrich G & Hemmersbach P (2015) Analysis of anabolic androgenic steroids as sulfate conjugates using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 7(11-12):1030-1039.

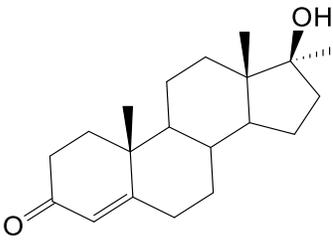
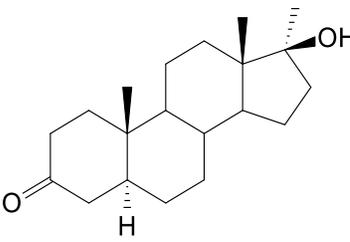
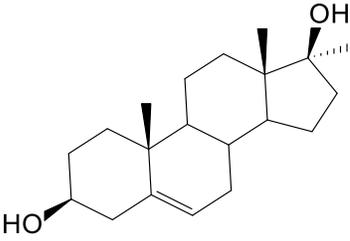
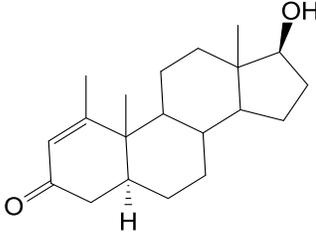
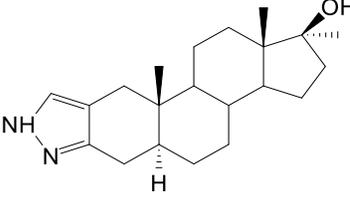
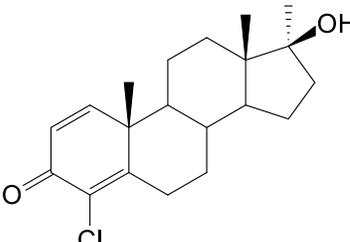
- Rzeppa S & Viet L (2016) Analysis of sulfate metabolites of the doping agents oxandrolone and danazol using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1029-1030:1-9.
- Schänzer W (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.* 42(7):1001-1020.
- Schanzer W & Donike M (1993) Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal. Chim. Acta* 275(1-2):23-48.
- Schanzer W, Guddat S, Thomas A, Opfermann G, Geyer H & Thevis M (2013) Expanding analytical possibilities concerning the detection of stanozolol misuse by means of high resolution/high accuracy mass spectrometric detection of stanozolol glucuronides in human sports drug testing. *Drug Test Anal* 5(11-12):810-818.
- Schänzer W, Horning S, Opfermann G & Donike M (1996) Gas chromatography/mass spectrometry identification of long-term excreted metabolites of the anabolic steroid 4-chloro-1,2-dehydro-17 α -methyltestosterone in humans. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57(5-6):363-376.
- Schmidt NA, Borburgh HJ, Penders TJ & Weykamp CW (1985) Steroid Profiling-An Update. *Clin. Chem.* 31(4):637-639.
- Shackleton C (2009) Steroid analysis and doping control 1960-1980: scientific developments and personal anecdotes. *Steroids* 74(3):288-295.
- Shackleton CHL (1986) Profiling steroid hormones and urinary steroids. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 379:91-156.
- Sobolevsky T & Rodchenkov G (2012a) Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 128(3-5):121-127.
- Sobolevsky T & Rodchenkov G (2012b) Mass spectrometric description of novel oxymetholone and desoxymethyltestosterone metabolites identified in human urine and their importance for doping control. *Drug Test Anal* 4(9):682-691.
- Tang PW & Crone DL (1989) A new method for hydrolyzing sulfate and glucuronyl conjugates of steroids. *Anal. Biochem.* 182(2):289-294.
- Thevis M (2010) *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing*. Wiley. 360 p

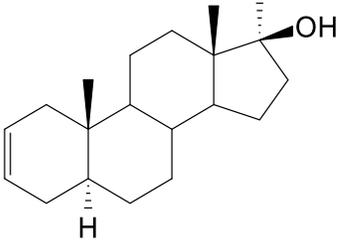
- Thevis M & Schanzer W (2007) Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrom. Rev.* 26(1):79-107.
- Thevis M, Thomas A & Schanzer W (2011) Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 401(2):405-420.
- Torrado S, Roig M, Farre M, Segura J & Ventura R (2008) Urinary metabolic profile of 19-norsteroids in humans: glucuronide and sulphate conjugates after oral administration of 19-nor-4-androstenediol. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22(19):3035-3042.
- Vanluchene E, Eechaute W & D.Vandekerckhove (1982) Conversion of free 3 β -hydroxy-5-ene steroids by incubation with *Helix pomatia*. *J. Steroid Biochem.* 16(5):701-703.
- WADA (2017) *Athletes Biological Passport Operating Guidelines*, p 68.
- Zhang J, Lu J, Wu Y, Wang X, Xu Y, Zhang Y & Wang Y (2016) New potential biomarker for methasterone misuse in human urine by liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* 17(10) :1628.

ANNEXE I : NOMS ET STRUCTURES DES MOLÉCULES

<u>Nom systématique</u>	<u>Nom commun</u>	<u>Abréviation</u>	<u>Structure chimique</u>
5 α -androstan-17-one	Androstan-17-one	ESTD1	
3 α ,17 β -dihydroxy-5 α -androstan-3-one	5 α -androstanediol	5 α -Adiol	
Androst-4,9(11)-diène-3,17-dione	Androst-4,9(11)-diène-3,17-dione	ISTD	
3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one	Androstérone	A	
3 β -hydroxyandrost-5-èn-17-one	Déhydroépiandrostérone	DHEA	

3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one	Épiandrosterone	ÉpiA	
17 α -hydroxyandrost-4-èn-3-one	Épitestostérone	ÉpiT	
3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one	Étiocholanolone	E	
17 β -hydroxyandrost-4-èn-3-one	Testostérone	T	
3 β -hydroxy-5 β -androstan-17-one	Épiétiocholanolone	ESTD2	
Androstan-3 α -ol-17-one-d ₄ -3-glucuronide	Androstérone-d ₄ glucuronide	A-d ₄ gluc	

17 α -méthylandrost-4- èn-17 β -ol-3-one	Méthyltestostérone	MT	
17 α -méthyl-5 α - androst-17 β -ol-3- one	Mestanolone	Mes	
17 α -méthylandrost-5- ène-3 β ,17 β -diol	Méthandriol	Mét	
17 β -hydroxy-1- méthyl-5 α -androst-1- èn-3-one	Méthénolone	-	
17 α -méthyl-2'H-5 α - androst-2-eno (3,2-c) pyrazol-17 β -ol	Stanozolol	Stano	
4-chloro-17 α - méthylandrost-1,4- dien-17 β -ol-3-one	Déhydrochlorométhyl- testostérone	DHCMT	

<p>17α-méthyl-5α-androst-2-èn-17β-ol</p>	<p>Désoxyméthyl-testostérone</p>	<p>DMT</p>	
<p>2α, 17α-diméthyl-5α-androstan-17β-ol-3-one</p>	<p>Méthastérone</p>	<p>-</p>	