

Analyse et identification par spectrométrie de masse des métabolites phase 1 de stéroïdes anabolisants non approuvés obtenus à la suite d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.

Par

Maxime Philippon

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

Dépôt final : 19 novembre 2021

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Jacques Bernier INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examineur externe	Donald Poirier Département de médecine moléculaire Faculté de médecine, Université Laval, CHUL
Directrice de recherche	Christiane Ayotte INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je tiens à d'abord remercier Pre Christiane Ayotte de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise.

Je remercie Maxime Couture, Karine Lalonde et Alexandre Sylvestre pour leur support tout au long de ce projet. La transmission de vos connaissances, votre expérience, les techniques de résolution de problème apportées et votre compréhension ont participé concrètement à la réussite de ce projet, de près comme de loin. J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire pour leur contribution à une atmosphère de travail plaisant et enrichissant. Je tiens aussi à souligner l'encadrement des équipes lors de mes stages en IRMS et en P4.

Finalement, je tiens surtout à remercier ma famille, ma conjointe et mes proches pour le soutien moral continu dans ce cheminement, me permettant de compléter ce parcours malgré les multiples défis.

RÉSUMÉ

Le marché des substances de performance doit continuellement être sondé pour assurer le maintien à jour des connaissances des laboratoires de contrôle de dopage. Suite à la vérification des produits en circulation sur internet, quatorze produits d'intérêts ont été commandés et onze reçut au laboratoire. L'identification subséquente à l'aide de standards et grâce aux analyses sur chromatographie en phase gazeuse couplée la spectrométrie de masse permet de conclure qu'il s'agit majoritairement de substances stéroïdiennes, dont certains stéroïdes de synthèse. Des onze produits analysés, quatre substances méconnues ont été retenues pour l'incubation en présence de fractions cellulaires S9, surnageant homogène de foie contenant le cytosol et les microsomes, visant à améliorer les connaissances entourant leur métabolisme. L'utilisation du modèle des fractions cellulaires S9 a été préconisée pour assurer une obtention éthique des métabolites en accord avec la vision du contrôle du dopage. Ce modèle *in vitro* permet d'estimer le métabolisme de substances potentiellement délétères lorsqu'administrées aux humains sans recourir aux études d'excrétions. Quatre métabolites sont obtenus suite à l'incubation de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one, deux métabolites pour la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one, trois pour le méthylclostébol et un seul pour la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one. La proposition des structures découle de l'analyse par CG-SM.

L'ensemble des résultats obtenus permet l'évaluation d'un modèle alternatif représentatif en plus de mettre à jour les connaissances entourant le métabolisme de stéroïdes de synthèse.

Dopage sportif; spectrométrie de masse; stéroïdes de synthèse; stéroïdes; métabolisme; incubations.

ABSTRACT

The market of performance enhancing drugs must continuously be assessed to make sure knowledge of doping control laboratory is up to date. Following the appraisal of products in circulation, fourteen products of interest were ordered and eleven received by the laboratory. Identification with standards and gas chromatography-mass spectrometry analysis allows to conclude that most of the products received are steroids or steroid-like substances, some of them being synthetic steroids. Four products were kept from the eleven analyzed for incubation with S9 cellular fractions, the homogenate supernatant containing liver cytosol and microsomes, aimed at improving knowledge regarding their metabolism. The use of S9 cellular fractions has been advocated to ensure ethical procurement of said metabolism, which is more in line with doping control's outlook. This *in vitro* model allows an estimation of human's metabolism of potentially harmful substances without recurring to excretion studies. Four metabolites were obtained following incubation of 3 β -hydroxyandrost-4-en-17-one, two metabolites for 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-en-17-one, three for methylclostebol and one for 2-cyano-17 α -methyl-17 β -hydroxyandrost-3-one. Structures for those metabolites were proposed following GC-MS analysis.

The results obtained enable the evaluation of an alternative model while allowing further understanding of synthetic steroid's metabolism.

Doping; mass spectrometry; synthetic steroids; steroids; metabolism; incubation.

TABLE DES MATIÈRES

1	REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1.1	Bref historique du dopage	5
1.2	Mesures prises en réponse	7
1.3	Amélioration des techniques de contrôle antidopage	10
1.3.1	Analyse des métabolites par CG-SM	11
1.4	Contexte actuel	13
1.5	Découverte de la testostérone et ruée vers le stéroïde anabolisant parfait	15
1.5.1	Utilisation de la testostérone à des fins de dopage	16
1.5.2	Un exemple d'agent anabolisant synthétique populaire, l'oxandrolone	16
1.5.3	Nomenclature usuelle des stéroïdes	18
1.5.4	Structure de base de la testostérone	20
1.6	Détermination du potentiel anabolique-androgénique	21
1.6.1	Groupements associés au potentiel anabolique	23
1.6.2	Mécanisme d'action	25
1.7	Voies de biotransformation des stéroïdes anabolisants	27
1.8	Stéroïdes de synthèse	29
1.9	Effets délétères associés à l'utilisation de stéroïdes anabolisants	30
1.9.1	Effets délétères hépatiques	30
1.9.2	Effets délétères cardiovasculaires	30
1.9.3	Effets délétères endocriniens	31
1.9.4	Effets délétères psychologiques	31
1.9.5	Effets délétères esthétiques	31
1.9.6	Autres effets délétères et potentiels	32
1.10	Portée du mémoire et raisonnement	32
1.10.1	Incubations en présence de fractions hépatiques S9	33
1.11	Substances sélectionnées	34
1.11.1	3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one	35
1.11.2	3 β -hydroxy androst-4-èn-17-one	36
1.11.3	4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one	37
1.11.4	2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one	38
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	39
2.1	Extraction des stéroïdes dans les produits commerciaux	40
2.2	Identification des stéroïdes présents dans les produits commerciaux	40

2.3 Incubation de fractions cellulaires hépatiques S9 en présence des stéroïdes provenant de standard de référence ou de substances purifiées	41
2.4 Extraction des métabolites générés.....	42
3 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	43
3.1 Portrait de la situation	43
3.1.1 Mise en contexte	43
3.2 Proposition de structures et identifications.....	47
3.2.1 HELLADROL	48
3.2.2 NOR-ANDRO MAX.....	59
3.2.3 SuperNorAndro Rx	65
3.2.4 Methdrol	70
3.2.5 HALODROL	76
3.3 Identification des produits retenus pour les incubations	81
3.3.1 Identification du 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one dans le <i>1-Superandro</i> et le <i>1-Andro MaxV2</i>	82
3.3.2 Identification du 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one dans le <i>4-Superandro</i>	85
3.3.3 Identification du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- \AA -3-one dans le <i>Nanobol</i>	89
3.3.4 Identification du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 \AA -androstan-3-one	94
3.4 Obtention des métabolites à l'aide du modèle choisi	101
3.4.1 Utilisation du modèle S9.....	101
3.4.2 Études préalables visant la vérification du modèle <i>in vitro</i>	102
3.5 Obtention éthique des métabolites de stéroïdes de synthèse présents sur le marché à l'aide des fractions cellulaires S9	109
3.5.1 3 β -hydroxy androst-4- \AA -17-one	109
3.5.2 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one.....	122
3.5.3 Méthylclostébol	130
3.5.4 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one.....	143
4 CONCLUSION	149
4.1 Rappel de l'état actuel du marché	149
4.2 Rappel du modèle permettant l'estimation du métabolisme et son utilité.....	149
4.3 Rappel des métabolites obtenus	151
4.4 Sommaire	153
4.5 Ouverture.....	154
5 RÉFÉRENCES	157

LISTE DES FIGURES

Figure 1.0 : Équation de base de la dérivation chimique avec le N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), où R et R' peuvent être des alcanes et/ou alcènes.	11
Figure 1.1 : Nomenclature des stéroïdes selon l'IUPAC (1989).	18
Figure 1.2 : Nomenclature des stéroïdes à 27 atomes de carbone selon l'IUPAC (1989).	18
Figure 1.3 : Base structurale des estranes (gauche), androstanes (centre) et prégnanes (droite).	19
Figure 1.4 : Structure de la testostérone.	20
Figure 1.5 : Sites d'alkylation visant l'amélioration du potentiel anabolique.	23
Figure 1.6 : Modifications structurales visant l'amélioration du potentiel anabolique sur le cycle A. ...	24
Figure 1.7 : Modifications structurales variant les potentiels anaboliques et androgéniques, où X représente les sites pouvant subir les modifications en question.	25
Figure 1.8 : 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one	35
Figure 1.9 : 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one.	36
Figure 1.10 : 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one	37
Figure 1.11 : 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one.	38
Figure 2.1 : Schéma des échantillons et des contrôles lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.	42
Figure 3.1 : Emballage du produit Helladrol d'Innovative labs	48
Figure 3.2 : Chromatogramme résultant de l'analyse CG-SM de l'extrait dérivé TMS obtenu du produit Helladrol. Pic 1A : androst-3,5-diene-7,17-dione (TR 13.05), pics 2A et 3A : 4-androstene-3-ol-17-one (TR 13.525) et son isomère (TR 13.6), pic 4A : épiandrostérone (TR 13.73 minutes) et pic 5A : 1,4-androsten-3-ol,17-one (RT 14.3 minutes).	49
Figure 3.3 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation de l'androstane-3,5-diene-7,17-dione, présente dans le produit Helladrol (1A).	51
Figure 3.4 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du 4-androstene-3-ol,17-one, présent dans le Helladrol (2A).	53
Figure 3.5 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation de l'épiandrostérone, présent dans le Helladrol(4A).	55
Figure 3.6 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation de l'épiandrostérone, présent dans le Helladrol(4A), suivant une injection plus concentrée pour obtenir les ions caractéristiques(saturé).	56
Figure 3.7 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du 1,4-androsten-3-ol,17-one, présent dans le Helladrol(5A).	58
Figure 3.8 : Emballage du supplément NOR-ANDRO MAX de Primeval Labs.	59
Figure 3.9 : Structures de la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one (gauche) et de la nandrolone (droite).	60
Figure 3.10 : Chromatogramme montrant le produit majoritaire dérivé TMS présent dans le NorAndro Max de Primeval Labs suivant l'injection sur CG-SM en mode balayage complet, soit la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one (TR 13.04 minutes).	62
Figure 3.11 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du produit majoritaire retrouvé dans le Nor Andro Max, soit la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one.	63
Figure 3.12 : Spectre de masse dérivé éther-TMS du produit majoritaire retrouvé dans NorAndro Max, la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one.	64

Figure 3.13 : Emballage du supplément SuperNorAndro Rx d'Ironmag Labs.	65
Figure 3.14 : Structure de la 3 β -enanthoxynorandrost-4-en-17-one, ingrédient actif indiqué sur l'emballage du SuperNorAndro.....	66
Figure 3.15 : Chromatogramme des produits présents dans SuperNorAndro d'IronMag Labs suivant la dérivation TMS et l'injection sur CG-SM en mode balayage complet. Le seul produit proposé serait un isomère de la 1-testostérone (RT 13.67 minutes), les autres produits n'ayant pas été identifiés.	68
Figure 3.16 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation d'une substance présente dans le SuperNorAndro d'IronMag Labs, soit la 17-hydroxyandrost-1-en-3-one. ...	69
Figure 3.17 : Emballage du supplément Methdrol de Fusion supplements.....	70
Figure 3.18 : Structure de la 2 α -17 α -dimethyl-5 α -androst-3-one, indiqué comme produit actif dans le Methdrol.	71
Figure 3.19 : Chromatogramme des substances dérivées TMS présentes dans le Methdrol de Fusion supplements et suivant l'injection sur CG-SM en mode balayage complet. Pic 1B : 2 α ,17 β -dimethyl-5 α -androst-17 α -ol-3-one (TR 14.9 minutes), pic 2B : 2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androst-17 β -ol-3-one (TR 15.3 minutes).	72
Figure 3.20 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation pour la 2 α ,17 β -dimethyl-5 α -androst-17 α -ol-3-one (épimère du produit d'intérêt), présent dans le Methdrol(1B).	74
Figure 3.21 : Spectre de masse pour la 2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androst-17 β -ol-3-one, présent dans le Methdrol(2B).	75
Figure 3.22 : Emballage du supplément Halodrol de Fusion supplements.	76
Figure 3.23 : Chromatogramme des substances présentent dans le supplément Halodrol suivant la dérivation chimique et l'injection sur CG-SM en mode balayage complet. Pic 1C : 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrost-4-èn-3-one (TR 16.78 minutes), pic 2C : 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-1,4-dièn-3-one (TR 17.1 minutes), pic 3C : 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one (TR 17.38 minutes).	77
Figure 3.24 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one, substance majoritaire présente dans le Halodrol(3C). ..	80
Figure 3.25 : Emballage du produit 1-SuperAndro d'IronMag Labs et l'étiquette d'informations nutritionnelles du produit.....	82
Figure 3.26 : Emballage du 1-Andro Max V2 de Primeval Labs et les ingrédients affichés en ligne.	82
Figure 3.27 : Chromatogramme des produits retrouvés dans le supplément 1-Superandro d'IronMag Labs, le produit majoritaire étant la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one (TR 13.66 minutes).....	83
Figure 3.28 : Structure du 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one, identifiée dans le 1-Superandro.	83
Figure 3.29 : Spectre de masse du produit majoritaire présent dans le supplément 1-Superandro.	84
Figure 3.30 : Spectre de masse du standard de référence, étant du 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one (plus communément surnommé 1-épiandro).	84
Figure 3.31 : Emballage du produit 4-Superandro d'IronMag Labs et l'étiquette d'informations nutritionnelles du produit.....	85
Figure 3.32 : Chromatogrammes superposés du standard de 3 α -hydroxyandrost-4-èn-17-one (trait rouge) et du 4-Superandro (trait noir), injectés tout deux sur CG-SM non dérivés.	86
Figure 3.33 : Chromatogrammes superposés du standard de 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one (trait bleu) et du 4-Superandro (trait noir), injectés tout deux sur CG-SM non dérivés.....	86

Figure 3.34 : Chromatogramme des produits dans le supplément 4-Superandro de IronMag Labs suite à la dérivation chimique et l'injection sur CG-SM en balayage complet, le produit majoritaire étant la 3 β -hydroxyandrost-4- α -17-one (TR 13.53 minutes).....	87
Figure 3.35 : Spectre de masse du produit majoritaire présent dans le supplément 4-Superandro, identifié comme étant du 3 β -hydroxyandrost-4- α -17-one.....	88
Figure 3.36 : Structure du 3 β -hydroxyandrost-4- α -17-one, identifiée dans le 4-Superandro.	88
Figure 3.37 : Emballage du produit Nanobol de Fusion Supplements et l'étiquette d'informations nutritionnelles présente sur le produit.	89
Figure 3.38 : Chromatogramme du produit Nanobol de FusionSupplements, contenant la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one (majeur; TR 17.4 minutes) et son épimère en C-17 (TR 16.776 minutes).	90
Figure 3.39 : Chromatogramme d'un standard de référence de 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one (majeur; TR 17.4 minutes) et son épimère en C-17 (TR 16.762 minutes). ...	90
Figure 3.40 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrost-4- α -3-one, l'épimère en C-17 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one, présent dans le Nanobol.	91
Figure 3.41 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrost-4- α -3-one présent dans le standard, l'épimère en C-17 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one.	91
Figure 3.42 : Spectre de masse du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one présent en majorité dans le Nanobol.	92
Figure 3.43 : Spectre de masse du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one présent dans le standard de référence.....	92
Figure 3.44 : Structure du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one.	93
Figure 3.45 : Structure du 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrost-4- α -3-one, l'épimère en C-17 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- α -3-one.....	93
Figure 3.46 : Emballage du produit Cynostane d'AI Sports Nutrition et l'étiquette d'informations nutritionnelles présentes sur le produit.	94
Figure 3.47 : Chromatogramme de l'extrait dérivé du supplément Cynostane de AI Sports Nutrition, le produit majoritaire étant la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-one (TR 18.18 minutes).	95
Figure 3.48 : Spectre de masse du produit majoritaire présent dans le supplément Cynostane et le patron de fragmentation permettant la proposition de la structure.....	96
Figure 3.49 : Spectre de masse du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-one dérivé éther TMS.	97
Figure 3.50 : Chromatogramme montrant le résultat de l'incubation de la testostérone en présence de fractions cellulaires S9.	103
Figure 3.51 : Structure du 2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-17 β -ol-3-one, surnommé méthastérone. .	105
Figure 3.52 : Résultat de l'incubation de la méthastérone en présence de fractions cellulaires S9, menant à l'obtention de multiples métabolites potentiels (entre TR 14 et 17 minutes).	107
Figure 3.53 : Spectre de masse du 2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-3 ϵ ,17 β -diol, métabolite obtenu dans le cadre des incubations de la méthastérone en présence de fractions cellulaires S9.	107
Figure 3.54 : Spectre de masse du 2 α ,17 α -diméthyl-16 ϵ ,17 β -dihydroxy-5 α -androstane-3-one, métabolite obtenu dans le cadre des incubations de la méthastérone en présence de fractions cellulaires S9.	108
Figure 3.55 : Structure de la 3 β -hydroxyandrost-4- α -17-one	109

Figure 3.56 : Emballage du produit reçu contenant la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one.....	110
Figure 3.57 : Chromatogramme des métabolites de la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one obtenus à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9, montrant la présence d'androstènedione (TR 14.3 minutes), de testostérone (TR 14.48 minutes) et de leurs 6-hydroxy respectifs (TR 15.38 minutes et TR 15.5 minutes).	111
Figure 3.58 : Structure de l'androstènedione.....	112
Figure 3.59 : Spectre de masse de l'androstènedione, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.	113
Figure 3.60 : Structure de la testostérone.....	114
Figure 3.61 : Spectre de masse de la testostérone, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.	115
Figure 3.62 : Structure du 6-hydroxyandrostènedione	116
Figure 3.63 : Structure de la 6-hydroxytestostérone	117
Figure 3.64 : Spectre de masse de la 6-hydroxyandrostènedione, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.	118
Figure 3.65 : Spectre de masse de la 6-hydroxytestostérone, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.	119
Figure 3.66 : Structure de la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one (gauche) et structure de la DHEA (droite).	120
Figure 3.67 : Schéma du métabolisme proposé pour la 3 β -hydroxyandrost-4- \AA -17-one lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.....	121
Figure 3.68 : Structure de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one.	122
Figure 3.69 : Emballage du produit reçu contenant la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one.	123
Figure 3.70 : Chromatogramme des métabolites de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one obtenus à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 montrant la présence de 1-androstènedione (TR 13.67 minutes) et de 1-testostérone (TR 13.86 minutes).	124
Figure 3.71 : Structures de la 1-androstènedione et de la 1-testostérone, métabolites obtenus suite aux incubations en présence de fractions cellulaires S9.	125
Figure 3.72 : Spectre de masse du 1-androstènedione, obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.	126
Figure 3.73 : Spectre de masse du 1-testostérone obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.	127
Figure 3.74 : Schéma du métabolisme proposé pour la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.....	129
Figure 3.75 : Emballage du produit reçu contenant la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- \AA -3-one.	130
Figure 3.76 : Structure du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4- \AA -3-one.	130
Figure 3.77 : Chromatogramme du résultat obtenu suite à l'incubation en présence de fractions cellulaires S9, montrant plusieurs métabolites soit le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4- \AA -3 α ,17 β -diol (TR 15.7 minutes), le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4- \AA -3 β ,17 β -diol (TR 16.4 minutes), le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4- \AA -3,6,17 β -triol (TR 15.79 minutes), le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4- \AA -3,6,17 β -triol (TR 16.76 minutes) et le produit mère, le méthylclostébol en TR 17.4 minutes.	132

Figure 3.78 : Structures du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 α ,17 β -diol et du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol, deux isomères obtenus suite à l'incubation du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one en présence de fractions cellulaires S9.	133
Figure 3.79 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 α ,17 β -diol (3 α -promagnon) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.	134
Figure 3.80 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol (3 β -promagnon) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.	135
Figure 3.81 : Structure du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (gauche) et du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-6,17 β -diol-3-one (droite), métabolites obtenus suite à l'incubation du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one en présence de fractions cellulaires S9.....	136
Figure 3.82 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxypromagnon) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.....	137
Figure 3.83 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxyméthylclobéol) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.....	138
Figure 3.84 : Spectre de masse du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one (méthylclobéol) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.	139
Figure 3.85 : Schéma du métabolisme proposé pour la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.....	142
Figure 3.86 : Structure du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one.	143
Figure 3.87 : Emballage du produit reçu contenant la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one.	143
Figure 3.88 : Structure du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-ol, métabolite réduit obtenu suite à l'incubation du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one en présence de fractions cellulaires S9.	144
Figure 3.89 : Chromatogramme des métabolites obtenus à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 du cynostane, soit le produit mère (TR 18.18 minutes) et le 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-ol (TR 16.96 minutes).	145
Figure 3.90 : Spectre de masse du métabolite réduit du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one, le 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-ol.	146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Liste des produits commandés suite à l'état du marché incluant les ingrédients actifs indiqués dans les informations nutritionnelles, le nom de la compagnie le produisant et le distributeur.	46
Tableau 3.2 : Résumé des produits commandés, leurs contenus comme stipulé par la compagnie, les substances identifiées/proposées et les fabricants/distributeurs.	100
Tableau 4.1 Métabolites obtenus pour les 4 substances d'intérêts suite à l'incubation en présence des fractions cellulaires S9.	152

ABRÉVIATIONS

AMA : Agence mondiale antidopage

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

APO-1: Apolipoprotéine-1

β -NAD: β -Nicotinamide adénine dinucléotide

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

CIO: Comité international olympique

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

DHCMT : Déhydrochlorométhyltestostérone

DMSO : Diméthylsulfoxyde

HCl: Acide chlorhydrique

H₂SO₄: Acide sulfurique

IAAF: Internationale Association of Athletics Federations

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

Me: Méthyle

MgCl₂: Chlorure de magnésium

MSTFA : N-méthyl-N-(triméthylsilyle)trifluoroacetamide

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

NaHCO₃: Bicarbonate de sodium

Na₂HPO₄: Hydrogénophosphate de sodium

NaH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de sodium

RDA: République démocratique allemande

SAA : Stéroïde anabolisant androgène

T/E : Ratio de testostérone sur l'épitestostérone

THF: Tétrahydrofurane

THG: Tétrahydrogestrinone

TMCS: Triméthylchlorosilane

TMIS: Triméthyliodosilane

TMS: Triméthylsilyle

TR : Temps de rétention

UV: Ultraviolet

WADA : World Anti-Doping Agency

INTRODUCTION

Dans une société où le rendement est de plus en plus prisé et attendu, où la compétition est souvent des plus féroces, l'amélioration des performances personnelles peut rapidement s'avérer un chemin emprunté sans prendre en considération les multiples effets délétères potentiels. Bien que plusieurs voies visant l'amélioration des performances soient plutôt banales, que ce soit varier son alimentation pour certains ou modifier son entraînement pour d'autres, certaines alternatives se veulent plus dangereuses pour la santé en plus d'être éthiquement discutables. De plus, il arrive que les enjeux en lien avec la performance soient d'envergure, que ce soit sous forme d'opportunité de carrière, de gains monétaires ou de commandites substantielles. Bien que regrettable, il arrive tout de même parfois que des gens aient recouru à des techniques ou des substances dites dopantes.

Lorsqu'on ajoute le contexte du sport au niveau d'élite et la pression exacerbée en plus d'une accessibilité plus aisée à des produits dopants, les interrogations quant aux motifs amenant un athlète à sombrer dans le dopage sportif se précisent. L'utilisation de substances illicites, en plus d'être éthiquement inacceptable relativement à la justesse de la compétition, mène trop souvent à des complications de santé pouvant parfois même mener à la mort. Prenons l'exemple du cycliste danois Knud Enemark Jensen en 1960 qui s'était effondré lors des Jeux olympiques à Rome. Selon des rapports subséquents, des substances reliées aux amphétamines et du Ronicol (un vasodilatateur) auraient été administrées à son équipe lors de la compétition. Le but était d'éradiquer temporairement les effets de la fatigue reliés à l'effort physique et d'améliorer les performances. Malheureusement, bien que les coéquipiers du cycliste danois se soient remis des problématiques ressenties lors de la compétition, son expérience fut fatale en plus d'être télédiffusée internationalement (Beckett & Cowan, 1978; Ljungqvist, 2017).

Plusieurs considèrent à tort que les sportifs ayant recours au dopage représentent seulement une minorité des athlètes compétitionnant à haut niveau et donc que le problème est d'une importance minime. En plus des raisons économiques et sociales, plusieurs athlètes sont poussés à se doper afin d'atteindre les objectifs sportifs de leur pays. À certaines occasions, le choix entourant l'usage de substances interdites ne relève même plus de l'athlète, mais d'instances plus hautes, niant le tout lors de scandales ou de problématiques subséquentes. De ce fait, des programmes institutionnalisés de dopage ont été dévoilés en République démocratique allemande (RDA) durant les années 1960s (Franke & Berendonk, 1997) et celui de la Russie, peu après leur performance record aux Jeux olympiques de Sotchi en 2014 (Duval, 2017; McLaren, 2016). Une problématique récurrente associée à ce genre de scandale est que la révélation quant

à l'existence de ceux-ci repose souvent sur des lanceurs d'alertes provenant directement ou associés de près aux milieux en question.

Malheureusement, plusieurs athlètes ont recours au dopage sans même se soucier des effets néfastes, que ce soit par pression sociale de leur entourage, ou par une soif insatiable de gagner sans égards des moyens empruntés. Trop souvent, ces mêmes athlètes seront idéalisés par la jeunesse d'aujourd'hui. Voulant imiter leurs idoles, les jeunes seront parfois portés à suivre les mauvais pas de ces athlètes dopés et injustement en payer le prix par manque d'informations. En effet, plusieurs produits dopants se retrouvent en vente libre chez des distributeurs internet et même chez certains magasins de suppléments. Souvent commercialisés sous d'autres noms, visant à duper les autorités sanitaires et le public cible, les produits disponibles ne font pas mention des effets délétères possibles associés à leur utilisation. Il ne faut pas non plus oublier qu'ils sont parfois mélangés entre eux et vendus en tant que formulation exclusive, permettant du coup au commerçant de ne pas mentionner la composition réelle et ainsi aisément falsifier l'information présente sur son produit. Ces différentes techniques permettent à certains distributeurs de mettre en circulation soit des produits dopants interdits et illégaux ou les prodrogues associées à ceux-ci.

Finalement, plusieurs produits se retrouvant sur internet sont parfois des stéroïdes de synthèse communément appelés « designer steroids », c'est-à-dire des stéroïdes abordant certaines modifications spécifiques à leur structure de base permettant la modification de leurs propriétés physicochimiques et l'altération, entre autres, de leur métabolisme (Abushareeda *et al.*, 2014; Cavalcanti Gde *et al.*, 2013; Cawley *et al.*, 2016). L'utilisation de stéroïdes de synthèse permet à plusieurs athlètes d'éviter momentanément les contrôles antidopage puisque le métabolisme de substances jusqu'alors inédites est souvent méconnu des laboratoires (Alquraini & Auchus, 2018). Le contrôle du dopage se base sur l'identification spécifique et la quantification des différents métabolites stéroïdiens connus retrouvés dans différentes matrices urinaires ou sanguines (Ayotte *et al.*, 1996; Cawley *et al.*, 2016). Certains athlètes et entraîneurs misent sur le fait d'utiliser des stéroïdes de synthèse dans l'espoir que le produit mère et les métabolites résultants de l'administration diffèrent grandement de ce qui est déjà répertorié. La prémisse des fautifs serait donc que les résultats découlant des tests de contrôle du dopage ne permettraient pas de prouver hors de tout doute la prise d'un produit dopant, le produit utilisé, et donc ses métabolites, étant inconnus des laboratoires de dopage (Alquraini & Auchus, 2018). Ce raisonnement conduirait à la possibilité d'usage de produits dopants et d'obtention d'un avantage compétitif à court ou moyen terme pour les athlètes en question avant de devoir revoir leur stratégie advenant le dépistage subséquent par

les laboratoires de contrôle du dopage. En d'autres mots, la spécificité des méthodes de dépistage serait alors avantageuse pour les tricheurs.

Le but initial de ce projet est donc de rechercher les agents anabolisants designers disponibles sur internet. Suite à l'obtention desdits produits, ceux-ci seront analysés et les stéroïdes identifiés seront incubés en présence de fractions cellulaires S9 afin de proposer des structures pour les métabolites les plus pertinents. Ultiment, le projet permettra d'atteindre trois objectifs précis. Le premier objectif étant de faire l'état du marché actuel et de la facilité à obtenir des produits dopants. Le deuxième étant d'obtenir éthiquement les métabolites associés à l'utilisation de ceux-ci à la suite d'incubations en présence de fractions cellulaires S9. Le troisième étant d'intégrer de nouveaux métabolites aux méthodes de dépistages existantes, permettant du coup d'améliorer les connaissances actuelles quant à ces molécules en marché.

1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Bref historique du dopage

L'utilisation de substances dans le but d'améliorer des performances sportives ou physiques n'est pas une réalité exclusivement moderne. En effet, l'utilisation de produits spécifiques est rapportée dès l'Antiquité, où un extrait de la plante Éphédra nommée *Ma Huang* était utilisé par le peuple chinois comme stimulant et antihistaminique. Nous savons aujourd'hui que l'extrait en question contenait l'éphédrine comme principe actif principal. Utilisée comme bronchodilatateur en contexte médical, mais récréativement comme stimulant, l'éphédrine est une amine sympathomimétique bannie en contexte sportif (Abourashed *et al.*, 2003; Ljungqvist, 2017).

D'autres exemples de mesures prises visant l'amélioration des performances durant l'Antiquité varient de modifications à l'alimentation usuelle par plusieurs compétiteurs des Jeux olympiques antiques à l'utilisation de différentes substances par les Grecs et les Romains. Les modifications au régime variaient d'une alimentation riche en figes séchées pour un champion à une alimentation presque exclusivement carnivore pour un autre. L'utilisation de substances était aussi diversifiée, les Grecs privilégiaient entre autres les vins et brandys en association avec des champignons hallucinogènes tandis que les Romains favorisaient l'usage de stimulants (Yesalis & Bahrke, 2002).

L'utilisation d'amphétamines par les soldats de la 2^e Guerre mondiale dans le but de prévenir et réduire les effets de la fatigue est bien connue. De plus, des effets bénéfiques non négligeables sur le moral des troupes lors des longues périodes de combat et d'efforts physiques augmentaient grandement l'intérêt des troupes à consommer les « Pep pills ». Une association entre les exploits du Blitzkrieg en 1940 et les capacités jugées surhumaines de certains soldats allemands auraient mené à des rumeurs d'utilisation d'une substance mystère, s'avérant être de la métamphétamine. Les Alliés auraient ensuite emboité le pas quant à l'usage de substances illicites suite à cette découverte pour faciliter l'atteinte des buts susmentionnés et ainsi améliorer leur chance de prévaloir face à l'ennemi (Ljungqvist, 2017; Rasmussen, 2011).

La chute de la République démocratique allemande (RDA) en 1990 révéla plusieurs documents en lien avec un programme institutionnalisé de dopage sportif, incité par le gouvernement en place. En effet, plusieurs milliers d'athlètes, médecins, scientifiques et représentants gouvernementaux travaillaient collectivement pour permettre la mise en place d'un dopage d'état systématique visant la domination des athlètes à

l'international. Le tout était bien sûr maintenu dans le secret. L'administration d'agents anabolisants aux athlètes d'élite était particulièrement centrale dans ce programme, menant à des progrès plus marqués chez les femmes et les enfants. En effet, l'amélioration des performances sportives associée à l'administration d'agents anabolisants chez les femmes et les enfants pouvait correspondre jusqu'au double de celle constatée chez les athlètes masculins suivant le même protocole. L'administration de plusieurs substances interdites aux athlètes prédestinés débute dès 1966 avec la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-1,4-dièn-3-one (déhydrochlorométhyltestostérone; DHCMT, surnommée « l'Oral-Turinabol ») dans le but d'améliorer les performances et la force musculaire, mais aussi d'augmenter l'agressivité, considérée comme désirable dans le contexte de sport d'élite. Cependant, l'utilisation de substances anaboliques par les athlètes compétitionnant dans des spécialités axées sur la force musculaire n'était pas exclusive en RDA. En effet, l'usage était assez répandu, dont aux États-Unis. En revanche, un programme institutionnalisé d'envergure n'était en place qu'en RDA (Franke & Berendonk, 1997). Il faut se rappeler que l'utilisation de stéroïdes anabolisants androgènes en contexte sportif ne sera interdite qu'à partir de 1974 (Ljungqvist, 2017).

Un scandale ébranla le sport américain en 2013 lorsqu'on associa la production et la distribution par le laboratoire BALCO à l'utilisation de la tétrahydrogestrinone (THG) chez les athlètes d'élite. La THG était consommée conjointement à une formulation topique contenant de la testostérone et de l'épitéstostérone surnommée « The Cream ». En effet, en plus de démontrer l'incorporation de produits de synthèse sur le marché noir (dont la THG), l'utilisation d'agent masquant comme l'épitéstostérone dans la formulation « The Cream » démontrait une connaissance des méthodes de dépistages des laboratoires de contrôle du dopage. Heureusement, les autorités américaines avaient été mises au courant grâce à un lanceur d'alerte anonyme qui avait fait parvenir le produit en circulation directement au laboratoire de Don Catlin à UCLA (Ljungqvist, 2017).

Plus récemment, le monde de l'antidopage a été secoué suite à la découverte de « The Disappearing Positive Methodology » et le programme l'entourant. L'effort gouvernemental de la Russie permettait le dopage d'athlètes compétitionnant au niveau international en recourant à des protocoles de dopage sportif faisant usage de substances bannies, en manipulant les échantillons (interchanger les échantillons d'urines positives par des urines négatives) et en falsifiant les données rapportées (Duval, 2017; McLaren, 2016). La domination de la Russie durant les Jeux olympiques de Sotchi en 2014 fut malheureusement en grande partie grâce à ce programme. Le programme aurait été en place plusieurs années avant même les Jeux de Sotchi, l'initiation remontant au-delà de 2011 jusqu'à sa terminaison présumée en 2015. Ce

système permettait donc à des athlètes utilisant des substances dopantes, sous la supervision du ministre du Sport, d'éviter les tests positifs. Plusieurs techniques étaient centrales à la réussite de cette initiative dont la mise en place d'un protocole de dopage plus difficilement détectable (utilisation de substances dopantes à excrétion rapide). Ensuite, la manipulation des échantillons d'urine consistait en l'ouverture des pots A et B des urines positives et échanges pour des urines « propres » de l'athlète récoltées avant l'initiation du protocole, dilution avec de l'eau ou ajout de sel et/ou de Nescafé pour altérer la gravité spécifique et l'apparence des échantillons. Finalement, la falsification des résultats (résultats positifs rapportés comme étant négatifs) au niveau des instances supérieures assurait le succès (McLaren, 2016).

En 2016, 296 athlètes appartenant à l'Association internationale des fédérations athlétiques ne pouvaient compétitionner en lien avec des violations aux règles de l'antidopage (Handelsman & Bermon, 2019). La problématique entourant le dopage nécessite des actions non seulement pour préserver l'intégrité des sports au niveau d'élite, mais aussi dans le but de protéger les athlètes de décisions pouvant mener à des effets néfastes pour leur santé et à leurs carrières.

1.2 Mesures prises en réponse

L'amélioration de la compréhension entourant les différentes substances dopantes et leurs effets délétères mena à la prise de mesures par différentes associations sportives en réponse aux différentes techniques et tentatives de dopage. L'évolution de la vision du public face à ce fléau autrefois plus confiné au monde du sport d'élite serait aussi un effet collatéral de ces initiatives.

L'IAAF (International Association of Athletics Federations) ouvre le bal en introduisant certaines règles entourant l'utilisation de substances stimulantes dans le but de contrer ce type de dopage dès 1928. Bien que la mise en place dès lors de lignes directrices et de réglementation soient particulièrement bénéfiques à la lutte contre le dopage, la mise en application des différentes règles et la qualité des tests laissent vraisemblablement trop à désirer, ne permettant pas d'attraper tous les tricheurs (Holt *et al.*, 2009; Ljungqvist, 2017).

La Commission médicale (CM) est créée par le Comité international olympique (CIO) en 1961 suivant la mort du cycliste Danois Knud Enemark Jensen, mentionnée précédemment. En plus de l'attention médiatique habituellement attendue lors d'un décès prématuré, la télédiffusion mondiale de la compétition sportive révéla, au public, directement la tragique réalité et indirectement la problématique associée au dopage dans le monde sportif. Des rapports subséquents permirent de dévoiler que le chef d'équipe distribuait un cocktail stimulant aux athlètes contenant apparemment un vasodilatateur et un

stimulant structurellement semblable aux amphétamines, une pratique alors considérée comme usuelle dans le domaine. Bien que le contenu réel n'ait pas été confirmé, l'intérêt grandissant de la communauté entourant les circonstances menant au décès du sportif permet de mettre la lumière sur cette réalité (Ljungqvist, 2017).

La première liste de substances prohibées en plus de certaines réglementations entourant les tests aux Jeux olympiques sont proposées par la Commission médicale du Comité international olympique (CM-CIO) en 1967. Le premier cas de dopage recensé aux Jeux olympiques concerne l'utilisation d'alcool par un athlète suédois et se produit lors des Jeux olympiques de Mexico, en 1968 (Ljungqvist, 2017).

Un programme d'antidopage codifié est ensuite introduit lors des Jeux olympiques d'été de Munich en 1972. Plus de 2000 échantillons seront récoltés et seront testés plus spécifiquement pour la présence de stimulants. Un nageur américain gagnant de la médaille d'or pour le 400 m voit celle-ci retirée à la suite d'un test positif à l'éphédrine. Bien que celui-ci demande une exemption pour raison médicale, disant prendre l'éphédrine pour son asthme, celle-ci se voit refusée (DeMeersman *et al.*, 1987; Magkos & Kavouras, 2004).

L'utilisation de stéroïdes anabolisants androgènes est bannie en 1974 par l'IAAF puis par le CIO, précédant les Jeux olympiques de Montréal de 1976 (Fragkaki *et al.*, 2009a; Fragkaki *et al.*, 2009b). L'amélioration de la méthode de dépistage associée aux stéroïdes anabolisants androgènes permet alors d'identifier 8 cas positifs en 1976 contrairement à zéro en 1974 (Ljungqvist, 2017). Les années 1970s seront particulièrement importantes en ce qui a trait au contrôle de dopage. En effet, en plus de l'interdiction d'utilisation des stéroïdes anabolisants androgènes, qui apportera son futur lot substantiel de cas (estimé à 48 % des violations totales par l'AMA en 2014 (Alquraini & Auchus, 2018)), la fin des années 1970 verra l'introduction des tests hors compétition par certains pays scandinaves. Cette initiative ouvrira la voie à l'introduction répandue de cette pratique à la fin de la décennie suivante. En effet, l'opinion associée au dopage change drastiquement à la suite du scandale Ben Johnson en 1988, suivi de près par l'approche du CIO face à la lutte au dopage (Ljungqvist, 2017; Wagner & Pedersen, 2014).

L'affaire Ben Johnson, souvent considérée comme l'un des plus gros scandales olympiques de dopage, voit Ben Johnson disqualifié et sa médaille d'or pour le sprint de 100 m aux Jeux olympiques de Séoul de 1988 retirée à la suite d'un test antidopage positif au stanozolol (Holt *et al.*, 2009; Ljungqvist, 2017). Il mentionnera plus tard lors de la commission Dubin de 1990 que son utilisation d'hormones de croissance et de stéroïdes a débuté dès 1981, une décision commune prise avec son entraîneur. Suivant ce scandale, les tests hors compétition seront d'abord introduits par une minorité d'associations (dont l'IAAF) dès 1989

puis lentement par d'autres organisations. Aujourd'hui, toutes associations et organisations se doivent de conduire des tests hors compétition, sous peine d'être sanctionnées par l'Agence mondiale antidopage (Ljungqvist, 2017).

Bien que le contrôle de dopage évolue et que sa lutte devienne de plus en plus efficace, plusieurs problèmes proviennent du fait que la mise en place de règles et la compliance aux dites règles varient selon les organisations. Suivant un autre scandale entourant le Tour de France de 1998, durant lequel une importante quantité de substances bannies avait été saisie par les policiers, et dans le but de permettre une conciliation de la réglementation et favoriser la lutte contre le dopage, l'Agence mondiale antidopage est créée en 1999 suivant un accord de plusieurs gouvernements et représentants du monde sportif (Holt *et al.*, 2009; Ljungqvist, 2017).

Le Code mondial antidopage remplace le Code médical du CIO en 2003 suite à son adoption à la Conférence mondiale de Copenhague. Prenant la relève de la commission médicale du CIO, l'AMA produit une liste des substances interdites dès 2003 et des recommandations quant à d'autres aspects du sport. La cour d'arbitrage du sport représente l'ultime autorité pour favoriser une conformité mondiale des règles émises par les différentes associations et fédérations (Thieme & Hemmersbach, 2009). Depuis 2004, l'AMA est également responsable des accréditations des différents laboratoires d'antidopage, veillant à ce que ceux-ci respectent plusieurs critères précis pour pouvoir considérer leurs résultats comme adéquats (Ljungqvist, 2017; Thieme & Hemmersbach, 2009).

1.3 Amélioration des techniques de contrôle antidopage

Durant les années 1970s, les premiers tests permettant la détection de la prise d'un nombre limité de stéroïdes anabolisants se basaient sur des dosages radio-immunologiques. En 1976, les tests de dosages radio-immunologiques étaient employés en parallèle d'une nouvelle méthode basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Durant les années 1980s, les essais immunologiques seront délaissés au profit de la CG-SM suite aux importantes avancées associées à cette dernière (Andrén-Sandberg, 2016; Thieme & Hemmersbach, 2009). Malgré la nécessité d'une extraction préalable de l'urine permettant de récupérer la testostérone et les différents métabolites stéroïdiens pour procéder à l'analyse, les nombreux avantages associés à la CG-SM seront vus plus en détail plus loin et permettront de justifier ce changement.

Un autre point culminant de l'avancement du contrôle de dopage fut l'utilisation du ratio T/E (la concentration de testostérone par rapport à la concentration d'épitestostérone) comme une sonde de détection de la prise exogène d'un agent stéroïdien (Bowers, 2008; Handelsman & Bermon, 2019; Thieme & Hemmersbach, 2009). Le suivi du profil stéroïdien de l'athlète (si disponible) et la spectrométrie de masse à rapport isotopique seront utilisés conjointement lors d'examen entourant les résultats positifs, tant à la testostérone qu'à des substances reliées (Bowers, 2008; Thieme & Hemmersbach, 2009).

1.3.1 Analyse des métabolites par CG-SM

Pour obtenir une identification adéquate des différents stéroïdes et leurs métabolites respectifs, les données permettant l'analyse doivent provenir d'une méthode à la fois spécifique et sensible. Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est depuis longtemps favorisée pour l'analyse des différentes substances et leurs métabolites dans l'urine et le profilage métabolique puisqu'elle combine sensibilité et sélectivité, en plus d'offrir une robustesse adéquate (Bowden *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 1990; Halket *et al.*, 2005; Saudan *et al.*, 2006).

Cependant, les stéroïdes varient grandement au niveau de leur volatilité et sont habituellement peu stables à haute température. Une dérivation chimique (impliquant le triméthylsilyl) est donc nécessaire pour améliorer la volatilité et la stabilité à haute température des substances recherchées, la variation de température étant centrale à la séparation des différents éléments et donc à la méthode. La dérivation chimique des groupements cétones et hydroxyles présents sur les stéroïdes permet respectivement l'obtention des énols-triméthylsilyl et des éthers-triméthylsilyl (Ayotte *et al.*, 1996; Bowden *et al.*, 2009). Le CG-SM utilisant une colonne apolaire, la séparation chromatographique est améliorée lorsque les structures stéroïdiennes sont dérivées puisque leur polarité s'en voit réduite (Halket *et al.*, 2005). La figure 1.0 montre une équation de dérivation chimique avec le N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA). Plusieurs autres réactifs peuvent être utilisés et ceux retenus sont présentés à la page 40 (Orata, 2012).

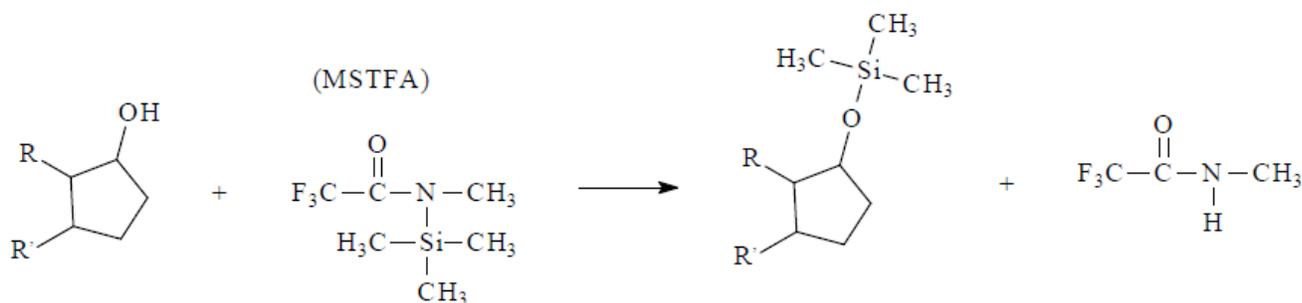


Figure 1.0 : Équation de base de la dérivation chimique avec le N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA), où R et R' peuvent être des alcanes et/ou alcènes.

L'identification de différents stéroïdes est possible en comparant ceux-ci avec des standards connus ou avec des urines d'études d'excrétion de stéroïdes. Il est alors possible de comparer les temps de rétention et les spectres de masse respectifs. Lorsque ceux-ci concordent, la substance inconnue correspond au standard utilisé (Ayotte *et al.*, 1996). De plus, la qualification et la quantification de substances stéroïdiennes sont toutes les deux possibles à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Chung *et al.*, 1990).

D'autres avantages de l'utilisation de CG-SM sont la relative facilité d'utilisation des instruments et logiciels, un coût d'utilisation relativement bas et une analyse automatisée de plusieurs échantillons à la fois (Thieme & Hemmersbach, 2009). En contrepartie, la maintenance, le processus de préparation et le nettoyage des instruments doivent être pris en considération comme éléments lors d'une comparaison envers une autre méthode.

1.4 Contexte actuel

La compétition fait partie intégrante de la nature humaine. Les compétitions sportives sont en premier plan quand on parle de dépassement personnel et de performances élités. Avec le contexte sociétal actuel, la prévalence des réseaux sociaux et la compétition grandissante dans toutes les autres sphères de la vie mondaine, la performance est de plus en plus centrale pour la majorité d'entre nous. Bien qu'une compétition saine apporte son lot d'effets bénéfiques, il arrive aussi que des gens soient portés à recourir à des aides externes pour leur permettre un avantage déraisonnable et non éthique. De nombreuses substances ont fait l'objet de controverse entourant le dopage au cours du temps. En effet, plusieurs d'entre elles ont souvent été développées dans une autre optique visant le traitement d'une condition médicale ou le soulagement de symptômes associés à une pathologie pour être ensuite utilisées à d'autres fins, comme pour l'amélioration de performance lors de compétitions sportives. La liste des substances et méthodes interdites par l'Agence mondiale antidopage est divisée selon les classes suivantes (Agence mondiale antidopage, 2020) :

Interdiction en tout temps :

S0: Substances non approuvées

S1: Agents anabolisants

S2: Hormones peptidiques, facteurs de croissance, substances apparentées et mimétiques

S3: Bêta-2 agonistes

S4: Modulateurs hormonaux et métaboliques

S5: Diurétiques et agents masquants

Interdiction en compétition :

S6: Stimulants

S7: Narcotiques

S8: Cannabinoïdes

S9: Glucocorticoïdes

Interdiction spécifique à certains sports :

P1: Bêtabloquants

Méthodes interdites en permanence :

Manipulation de sang ou de composants sanguins

Manipulation chimique et physique

Dopage génétique et cellulaire

1.5 Découverte de la testostérone et ruée vers le stéroïde anabolisant parfait

Charles Edouard Brown-Sequard, neurologue et physiologiste de profession, détient une place importante dans le type de science qu'est l'endocrinologie grâce à ses recherches. En effet, celui-ci rapporte en 1889 des effets revigorants suivant l'auto-administration d'injections de différents mélanges se rapportant aux testicules d'animaux (sang, sperme et jus). Bien que les effets qu'il ressentit sont ensuite attribués à un effet placebo, ses expérimentations permettront toutefois de forger plusieurs piliers de la compréhension menant à l'endocrinologie d'aujourd'hui (Yesalis & Bahrke, 2002).

Les recherches visant l'isolement de la testostérone sont effrénées suite à plusieurs expérimentations chirurgicales, d'organothérapie et d'une forme élémentaire de thérapie cellulaire par Eugen Steinach et Paul Niehans respectivement (Freeman *et al.*, 2001). Plusieurs équipes tentent parallèlement d'isoler la testostérone. Adolf Butenandt, chimiste et étudiant du professeur Aor Windaus (prix Nobel de 1928 associé au cholestérol), isolera l'œstrone en 1929 puis l'androstérone. La testostérone est isolée en 1935 par l'équipe d'Ernst Laqueur, un pharmacologue et docteur suisse. Butenandt sera le premier à publier une méthode permettant de synthétiser la testostérone à partir du cholestérol, aussi en 1935, suivi de près par Ruzicka. Cette avancée leur vaudra le prix Nobel de chimie de 1939 (Freeman *et al.*, 2001). Ces efforts académiques permettront par la suite d'obtenir une compréhension de base sur l'action anabolique de la testostérone. Cette découverte est embrassée par la communauté médicale et des préparations en vue d'administration orale et parentérale font rapidement leurs apparitions (Yesalis & Bahrke, 2002).

L'usage clinique de la testostérone sera d'abord divers et souvent controversé. En effet, l'administration de testostérone synthétique vise d'abord à traiter les tumeurs mammaires en altérant l'équilibre hormonal des femmes. Le concept de tumeur hormonodépendante n'était alors pas connu. La testostérone sera ensuite utilisée par une minorité dans le but de traiter des conditions liées à la libido (et même l'homosexualité, alors considérée à tort comme une pathologie par certains acteurs du monde médical). Le remplacement hormonal sera éventuellement l'application la plus populaire de la testostérone en contexte clinique (Hoberman & Yesalis, 1995). Par la suite, le potentiel thérapeutique de la testostérone dans plusieurs physiopathologies associées à l'atrophie musculaire et d'autres désordres cataboliques porte les scientifiques à expérimenter avec la synthèse de plusieurs dérivés. Plusieurs modifications à la structure de base de la testostérone visent à altérer ou complètement modifier plusieurs de ses caractéristiques. Certains scientifiques se concentrent sur des modifications visant la possibilité de changer la voie d'administration tandis que d'autres tentent d'augmenter la durée d'action ou la

biodisponibilité. Des efforts porteront sur comment dissocier complètement le potentiel anabolique du potentiel androgénique des différents dérivés dans le but d'obtenir une substance exclusivement anabolique (Evans, 2004; Fragkaki *et al.*, 2009a; Kicman, 2008; Kopera, 1985; Shahidi, 2001).

1.5.1 Utilisation de la testostérone à des fins de dopage

L'utilisation de la testostérone dans des contextes de dopage remonte aux années 1940s-1950s. En effet, plusieurs athlètes russes utilisaient déjà des substances telles que la testostérone dans le but d'améliorer leurs performances sportives, sous la supervision de leur médecin d'équipe. L'équipe américaine emboîtera rapidement le pas quant à l'utilisation d'agents anabolisants suite à la transmission de l'information au médecin de l'équipe (Bowers, 2008). Parallèlement, des amateurs de culturisme et certains athlètes auraient expérimenté certains suppléments reliés à la testostérone. Malheureusement, des pratiques douteuses entourant l'utilisation de stéroïdes émergent. Ainsi, ce qui était autrefois une industrie clandestine est maintenant devenu mondiale (Hoberman & Yesalis, 1995). Poursuivant initialement des buts thérapeutiques, plusieurs études visent à démontrer l'effet anabolique et l'avantage chez les athlètes de l'administration des androgènes. Certains semblent y parvenir en 1941, mais il faudra attendre à 1996 pour obtenir une preuve scientifique qu'une dose supraphysiologique de testostérone améliore les performances (Bowers, 2008; Hoberman & Yesalis, 1995).

L'importante utilisation d'agents anabolisants, particulièrement en contexte de compétition, mène à l'adoption de la *Anabolic Steroids Control Act* de 1990, rendant le trafic de telles substances illégales (Bowers, 2008). Selon l'Agence mondiale antidopage, l'utilisation de la testostérone est actuellement interdite en permanence et appartient à la catégorie des agents anabolisants (S1)(Agence mondiale antidopage, 2020).

1.5.2 Un exemple d'agent anabolisant synthétique populaire, l'oxandrolone

Bien que le projet ne concerne pas directement l'oxandrolone, il s'agit d'un bon exemple d'un stéroïde de synthèse, qui se retrouve en libre circulation sur le marché actuel. L'usage de l'oxandrolone, d'abord synthétisé en 1962 (Pappo & Jung, 1962), est lié à certains avantages notables lorsque comparé à d'autres agents anabolisants tels que la testostérone. En effet, la configuration chimique de l'oxandrolone diverge de la testostérone (remplacement du carbone C-2 par un oxygène, ajout d'un groupement en C-17 et absence de l'insaturation du cycle A en C-4,5), lui permettant d'éviter l'inactivation métabolique et l'aromatisation. Ceci permet à l'oxandrolone d'éviter une majeure partie du métabolisme habituel des

stéroïdes anabolisants, le produit mère étant à 28 % excrété dans l'urine (Shahidi, 2001) et, n'étant pas aromatisé, permet d'éviter plusieurs effets délétères reliés aux œstrogènes (dont le plus connu du public étant la gynécomastie chez l'homme). De plus, l'oxandrolone posséderait un ratio anabolique/androgénique de 10 :1 par rapport à la testostérone. Ainsi, l'usage d'oxandrolone favoriserait grandement les effets anaboliques et délaierait partiellement ceux androgéniques lorsque comparé à celle de la testostérone (Orr & Fiatarone Singh, 2004).

Malheureusement, l'oxandrolone est aussi grandement populaire au sein des différents groupes de culturisme amateur et professionnel. Celui-ci est considéré comme un anabolisant possédant un pouvoir anabolique relativement faible, mais aussi un risque faible quant aux effets délétères subséquents possibles. Il est souvent recommandé, sur les forums et autres articles amateurs, pour de nombreux usages visant autant les athlètes amateurs que les novices (AnaSci.Org, 2004; StrongChap, 2020). Il est évidemment faux de considérer que l'usage de ce stéroïde anabolisant est sans effets secondaires ou sans conséquences. Des altérations touchant les enzymes hépatiques accompagnés d'une toxicité hépatique, certains effets androgéniques, des changements d'humeur et des variations des lipides sanguins sont rapportés lors d'essais, les effets étant plus prépondérants lors d'une administration prolongée de la substance (Orr & Fiatarone Singh, 2004). L'oxandrolone appartient à la catégorie des agents anabolisants comme stipulé par l'Agence mondiale antidopage (Agence mondiale antidopage, 2020).

L'utilisation de l'oxandrolone comme agent anabolique semblerait alors grandement avantageuse comparée à celle de la testostérone. En effet, l'oxandrolone permet une voie d'administration orale donc une facilité d'utilisation, démontre une action anabolique grandement supérieure à son action androgénique (10 :1) en plus d'éviter l'aromatisation subséquente comme discuté plus tôt. Pourtant, la testostérone est isolée en 1935 tandis que l'oxandrolone est synthétisée en 1962, une différence de seulement 27 ans (Freeman *et al.*, 2001; Pappo & Jung, 1962). L'explication derrière ces avancées massives serait attribuée à une ferveur académique semblable à la ruée vers l'or que connut le Klondike entre 1896 et 1899. En effet, suite à la découverte de la testostérone en 1935, le monde scientifique a connu une fascination pour les agents anabolisants menant à une course académique vers le stéroïde anabolique parfait.

1.5.3 Nomenclature usuelle des stéroïdes

La structure de base des stéroïdes et des différents dérivés est le stérane (perhydrocyclopentanophénanthrène).

Ce noyau est considéré comme étant la structure de base des différents stéroïdes et leurs dérivés. Composé par 17 atomes de carbone formant 3 cycles à 6 atomes et un cycle à 5 atomes, les différents cycles sont identifiés par lettre (A à D) de gauche à droite, de bas en haut, comme démontré ci-dessous :

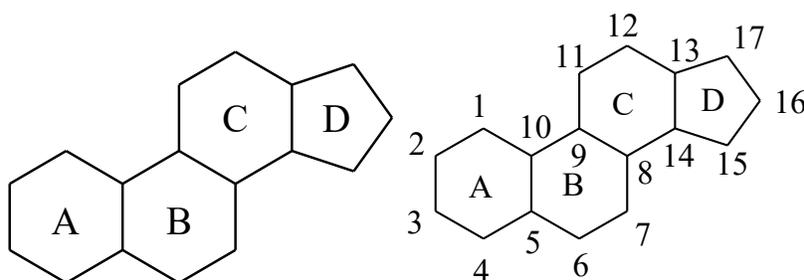


Figure 1.1 : Nomenclature des stéroïdes selon l'IUPAC (1989).

Les différents atomes de carbone sont numérotés suivant la nomenclature IUPAC, telle que proposée en 1989 (Venetianer *et al.*). Cette numérotation permet, entre autres, d'inclure jusqu'à 27 atomes de carbone selon la configuration suivante :

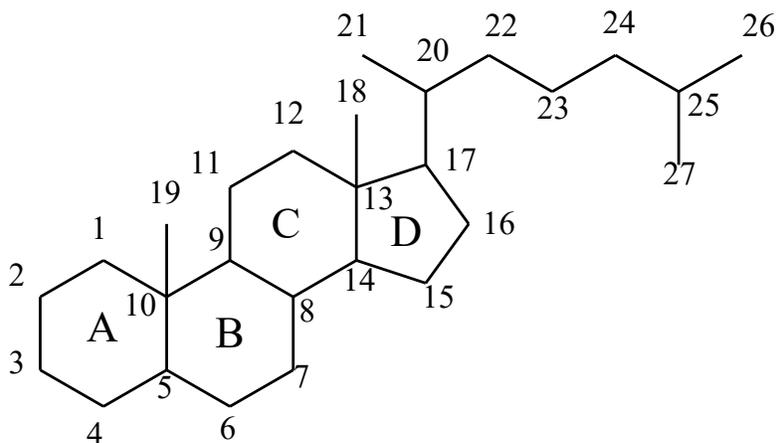


Figure 1.2 : Nomenclature des stéroïdes à 27 atomes de carbone selon l'IUPAC (1989).

Chaque atome de carbone peut être référé selon sa position. Par exemple, on peut se rapporter à l'atome de carbone en position 3 comme étant C-3.

Les différents groupements présents sur les dérivés suivent la règle selon laquelle les groupements en dessous du plan sont considérés orientés en α (alpha) tandis que ceux au-dessus du plan sont considérés orientés en β (bêta).

Plusieurs altérations à la structure se regroupent selon certains noms spécifiques. Ainsi, les structures stéroïdiennes dénuées d'un groupement méthyle en C-10 (nommé C-19), d'un groupe méthyle en C-13 (nommé C-18) et d'une chaîne aliphatique en C-17 sont regroupées sous la classe des dérivés des gonanes. Les structures stéroïdiennes dénuées d'un groupement méthyle en C-19 et d'une chaîne aliphatique en C-17, mais possédant le groupement méthyle en C-18 sont regroupées sous le nom estrane. Lorsque la chaîne aliphatique en C-17 est aussi absente, mais que les groupements méthyles C-19 et C-18 sont présents, on parle alors d'androstane. Finalement, les structures stéroïdiennes possédant 21 atomes de carbone se nomment prégnanes.

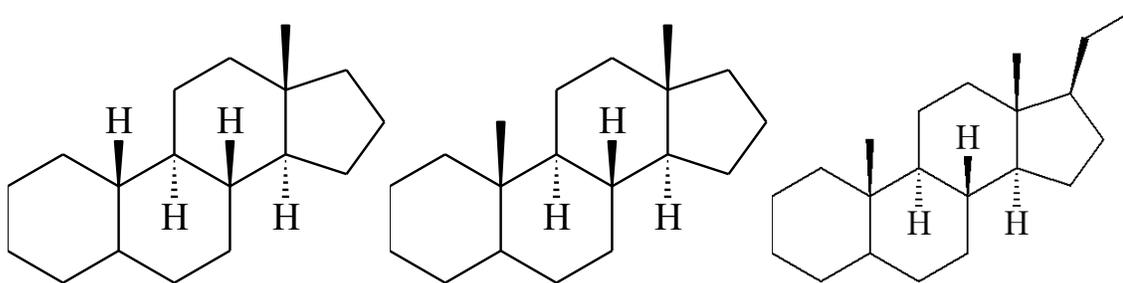


Figure 1.3 : Base structurale des estranes (gauche), androstanes (centre) et prégnanes (droite).

Lors d'insaturation, la nomenclature est altérée pour indiquer la présence et le nombre d'insaturation sur la structure (ex : -ène et le préfixe numérique approprié). Si une insaturation se retrouve sur le cycle A entre C-1 et C-2, on parle alors d'un (...) -1-ène (...).

La conversion d'un atome de carbone sur un des cycles par un hétéroatome sera reflétée adéquatement par la nomenclature de remplacement précédé du chiffre associé à la position initiale du carbone (4-(...) pour le C-4 par exemple).

Lors de l'élimination d'un groupement sur la structure de base, plus souvent observé lors de l'élimination d'un groupement méthyle, le préfixe « nor » précédé de la position de la délétion sera utilisé.

1.5.4 Structure de base de la testostérone

La testostérone représente un point de référence majeur lors de discussions sur les stéroïdes anabolisants androgènes. En effet, celle-ci possède plusieurs groupements clés aux potentiels androgéniques, anaboliques, en plus d'être essentiels ou favorables pour la liaison avec le récepteur des androgènes.

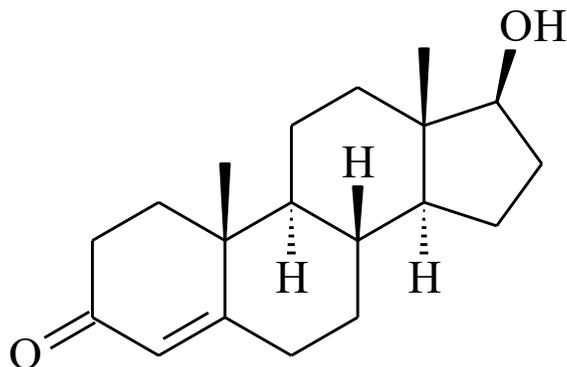


Figure 1.4 : Structure de la testostérone.

Tout d'abord, une fonction cétone en C-3 favorise la liaison du ligand avec le récepteur des androgènes (Pereira de Jesus-Tran *et al.*, 2006). En effet, une réduction de la cétone en alcool réduit considérablement l'affinité. La cétone représenterait un meilleur candidat qu'un alcool pour interagir avec les acides aminés présents au niveau de la pochette de liaison du ligand du récepteur vu le positionnement de ses électrons libres (Fang *et al.*, 2003).

Ensuite, un groupement alcool en C-17(β) favorise l'affinité du ligand pour le récepteur. En effet, celui-ci, ou plutôt l'atome d'hydrogène présent, favorise par sa charge partielle positive, l'interaction (pont hydrogène) avec des atomes électronégatifs présents sur l'acide aminé asparagine et thréonine de la pochette de liaison du ligand du récepteur des androgènes. L'altération de l'orientation du groupement alcool ($\beta \rightarrow \alpha$) et des modifications sur le groupement 17 β -hydroxy comme l'estérification réduiraient considérablement l'affinité (Fang *et al.*, 2003; Pereira de Jesus-Tran *et al.*, 2006).

Les groupements hydroxyles en C-17(β) et C-3 sont nécessaires à l'activité androgénique. L'oxydation ou la réduction par les enzymes 3-hydroxystéroïde déshydrogénase et 17-hydroxystéroïde déshydrogénase produit des métabolites inactifs (Kicman, 2008).

Un squelette stéroïdien hydrophobe contribue à l'affinité d'un ligand pour le récepteur. La conformation du squelette stérane est aussi très importante. Le nombre d'interaction hydrophobes entre le ligand et la pochette de liaison du ligand du récepteur des androgènes contribue à l'affinité mais un changement de

conformation, comme la présence d'une insaturation en C-4,5 dans le cas de la testostérone, altère l'orientation du groupement cétone en C-3. L'altération de cette conformation déplaçant la cétone en C-3 s'avère favorable sur l'affinité et l'androgénicité dans le cas de la dihydrotestostérone (le métabolite actif de la testostérone) en réduisant la distance entre la cétone et les acides aminés clés de la pochette de liaison du récepteur (Fragkaki *et al.*, 2009a; Liao *et al.*, 1973; Pereira de Jesus-Tran *et al.*, 2006).

1.6 Détermination du potentiel anabolique-androgénique

L'usage de différents stéroïdes anabolisants est associé à plusieurs effets anaboliques et androgéniques. Les effets anaboliques sont associés à la croissance des muscles squelettiques, la promotion de la synthèse protéique et la rétention d'azote. Les effets androgéniques interviennent dans le développement des caractéristiques sexuelles primaires et secondaires. Ainsi, des effets tels que l'augmentation de la pilosité, l'aggravation de la voix, l'augmentation de la libido et une augmentation de l'activité des glandes sébacées (résultant souvent en acné) sont considérés comme androgéniques (Evans, 2004; Kicman, 2008; Orr & Fiatarone Singh, 2004). Les effets androgéniques et anaboliques sont indissociables. Bien que beaucoup d'efforts de recherche se soient concentrés sur cette problématique, aucune substance stéroïdienne possédant exclusivement un type d'activité n'a été synthétisée (Fragkaki *et al.*, 2009a; Kopera, 1985; Shahidi, 2001).

Un des premiers modèles proposés pour mesurer l'index myotrophique/androgénique des stéroïdes anabolisants androgènes a été proposé en 1953 par Hershberger et son équipe, lui-même dérivé de celui de Eisenberg et Gordan (1950). Ce dernier propose d'utiliser le muscle *levator ani* du rat pour mesurer le potentiel myotrophique des substances d'intérêts en mesurant la croissance (différence du poids) du muscle en question. En d'autres mots, le potentiel myotrophique représente le potentiel anabolique protéique sur la croissance musculaire. Les vésicules séminales permettaient d'obtenir le potentiel androgénique en mesurant aussi la croissance suivant l'administration des substances. Le modèle modifié proposé par Hershberger en 1953 préfère l'utilisation de la partie ventrale de la prostate à celle des vésicules séminales pour l'obtention du potentiel androgénique. Le poids du *levator ani* suite à l'administration de la substance est donc comparé à son poids initial et permet d'obtenir le potentiel myotrophique. La variation du poids de la partie ventrale de la prostate permet l'obtention du potentiel androgénique. Le rapport du potentiel myotrophique sur le potentiel androgénique d'une substance constitue l'index myotrophique-androgénique. Ce modèle, bien qu'imparfait, peut encore être utilisé aujourd'hui à titre d'essai biologique pour évaluer les effets d'une substance. De plus, l'index en question

peut être utilisé pour rapidement évaluer le bienfondé derrière l'utilisation d'une substance pour certaines physiopathologies ou dans des populations particulières telles que les enfants et les femmes afin d'éviter des effets indésirables (Kicman, 2008; Kopera, 1985).

Une autre méthode permettant d'estimer le potentiel anabolique d'une substance était d'évaluer la balance en azote. En 1935, Kochakian avait remarqué lors de ses études sur des chiens castrés que l'administration d'un extrait androgénique d'urine d'homme menait à une réduction marquée du métabolisme protéique, démontrée par une diminution importante de l'azote dans l'urine des chiens traités. De plus, la réduction du métabolisme protéique des chiens était accompagnée d'une augmentation de la masse des sujets. En 1937, Kochakian calcula que l'azote retenu correspondait à l'augmentation de la masse des sujets. Il s'agissait alors du premier exemple d'un effet anabolique des androgènes sur la masse corporelle, l'augmentation de la masse des organes génitaux ne pouvant expliquer la totalité de la prise de masse. Plus tard, la prise de masse rénale fut considérée comme représentative du potentiel anabolique par Kochakian. Bien que la balance en azote permît d'obtenir une bonne estimation du potentiel anabolique sur le métabolisme protéique, la méthode n'était pas convenable en contexte de recherche sur de nouvelles substances (Kopera, 1985).

En 1997, Gaido et son équipe proposaient un essai biologique chez les levures permettant d'évaluer les interactions entre plusieurs substances et le récepteur aux androgènes, les récepteurs des œstrogènes et le récepteur de la progestérone. Ce test abordable permet d'évaluer les propriétés hormonales de différentes substances (Gaido *et al.*, 1997).

Plus récemment, le profil hormonal de plusieurs stéroïdes de synthèse a été mesuré à l'aide de tests impliquant un gène rapporteur dans des cellules de mammifères. En parallèle avec d'autres stéroïdes aux propriétés connues, le potentiel androgénique a été mesuré à l'aide d'une lignée cellulaire CAMA-1 (cancer du sein) transfecté avec un plasmide, permettant l'activation de la luciférase à l'aide d'un promoteur viral de tumeur mammaire de souris répondant aux androgènes. Le potentiel œstrogénique a été estimé à l'aide de la lignée cellulaire MCF-7 (cancer du sein) et le potentiel progestatique à l'aide de cellules T47D du cancer du sein (Ayotte *et al.*, 2006).

1.6.1 Groupements associés au potentiel anabolique

Le potentiel anabolique des stéroïdes anabolisants androgènes est particulièrement important et les substances possédant le plus élevé seront souvent convoitées dans le but de dopage. Plusieurs modifications ont été testées dans le but d'améliorer ce potentiel.

Alkylation :

Plusieurs sites clés de la testostérone peuvent être alkylés dans le but d'en augmenter le potentiel anabolique tel qu'en position C-1, C-2, C-7(α) et C-17(α). Cependant, l'ajout d'un groupement méthyle en C-7(α) entraînerait pour des dérivés d'estranes possédant un groupement méthyle en C-17(α) une augmentation du potentiel androgénique. L'addition de chaînes alkyle en position C-7(α) mène à une diminution des activités androgénique et anabolique, proportionnelle à la longueur de la chaîne, possiblement en lien avec l'encombrement stérique associé à la pochette du récepteur. Ainsi, seulement l'addition d'un groupement de petite taille en position C-7(α) tel qu'un groupement méthyle favoriserait la liaison (Fang *et al.*, 2003; Fragkaki *et al.*, 2009a). La substitution d'un groupement alkyle en C-17(α) contribue au potentiel anabolique en augmentant la stabilité de la molécule permettant l'inhibition de l'oxydation de l'alcool en position C-17(β) vers sa forme moins active de 17-cétone. L'aromatation en œstrogène est aussi évitée par la présence de groupements alkyles en C-17(α) et C-2(α) en réduisant l'affinité pour l'enzyme aromatasase. De plus, le groupement méthyle en C-17(α) permet d'obtenir une biodisponibilité orale de la substance en évitant l'inactivation résultant du premier passage hépatique. La méthylation en position C-1, comme pour la méténolone, permet d'obtenir une substance oralement active en combinaison avec la formation d'un ester en position C-17 (Fragkaki *et al.*, 2009a; Kicman, 2008; Schanzer, 1996).

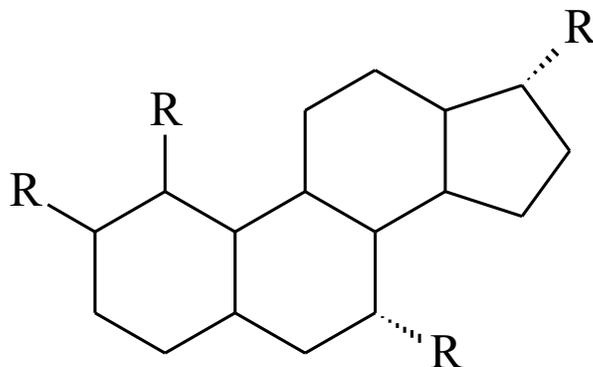


Figure 1.5 : Sites d'alkylation visant l'amélioration du potentiel anabolique.

Modifications sur le cycle A :

Par ailleurs, les modifications sur le cycle A telles que l'introduction d'une seconde double liaison en C-1 favorise le potentiel anabolique en entraînant l'adoption de la conformation plane du cycle. La formation d'une lactone par l'introduction d'un oxygène sur le cycle A en position C-2 augmente aussi celui-ci. L'addition d'un groupement pyrazole se joignant en C-2 et C-3 contribue aussi au potentiel anabolique, tel qu'observé pour le stanozolol (Fragkaki *et al.*, 2009a; Kicman, 2008).

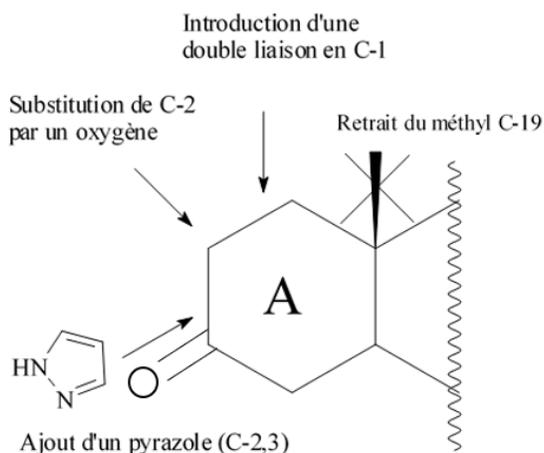


Figure 1.6 : Modifications structurales visant l'amélioration du potentiel anabolique sur le cycle A.

Finalement, l'absence du groupement méthyle en C-19 chez les estranes et estrènes réduit l'affinité du métabolite réduit en position C-5(α) pour le récepteur aux androgènes à l'inverse de la 5 α -dihydrotestostérone dont l'activité est augmentée par rapport à la testostérone (Fragkaki *et al.*, 2009a; Kicman, 2008).

Autres modifications :

L'estérification de la fonction hydroxyle en C-17(β) favorise l'anabolisme en permettant le dépôt de vésicules contenant la substance au niveau intramusculaire, ralentissant ainsi la relâche dans la circulation sanguine. De plus, la durée d'action de la substance mère est aussi prolongée, les groupements esters devant être hydrolysés avant que la substance subisse l'inactivation métabolique (Gao *et al.*, 2005; Saudan *et al.*, 2006).

Divers effets peuvent être observés en substituant plusieurs groupements clés en C-1, C-2, C-4, C-7 et C-17, variant les potentiels anaboliques et androgéniques. Par exemple, l'addition d'un groupement cétone en C-11 réduirait l'affinité du ligand (Fang *et al.*, 2003; Fragkaki *et al.*, 2009a).

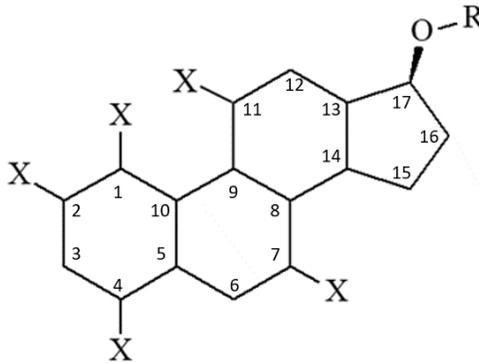


Figure 1.7 : Modifications structurelles variant les potentiels anaboliques et androgéniques, où X représente les sites pouvant subir les modifications en question.

1.6.2 Mécanisme d'action

Les stéroïdes anabolisants androgènes exercent leurs effets par leur liaison avec le récepteur des androgènes (NR3C4) de la famille des récepteurs nucléaires (Pereira de Jesus-Tran *et al.*, 2006). Des effets génomiques et non génomiques s'en suivent.

En ce qui a trait à l'expression génomique, la transcription de gène représente le mécanisme clé résultant de l'action des stéroïdes anabolisants sur leur récepteur. Suite à la liaison du ligand, dans ce cas un stéroïde anabolisant androgène (SAA), avec son récepteur, un changement de conformation du complexe ligand-récepteur se produit. Une translocation au noyau du complexe s'en suit, accompagnée d'une phosphorylation et la formation d'homodimère (deux sous-récepteurs identiques), pour permettre une interaction avec les éléments de réponse aux androgènes et ainsi initier la transcription de gènes clés. Suivant l'activation des gènes en question, plusieurs effets sont observés visant la prolifération cellulaire, la différenciation myogénique et le métabolisme des protéines (Dubois *et al.*, 2012; Falkenstein *et al.*, 2000; Li & Al-Azzawi, 2009; Shahidi, 2001).

La transcription peut être influencée par des corégulateurs (coactivateurs et des corépresseurs), des protéines pouvant se lier et interagir avec le récepteur aux androgènes, lorsque présents dans le noyau (Li

& Al-Azzawi, 2009). Ceux-ci sont classés selon leurs propriétés et leurs mécanismes d'action. Les corégulateurs permettant la régulation directe de la transcription par les interactions physiques du complexe (comprenant ce type de corégulateur lié au complexe ligand-récepteur) avec des facteurs de transcription et l'ARN polymérase 2 constituent la première catégorie. La deuxième catégorie regroupe ceux agissant par la modification de façon covalente des queues d'histones. Finalement, la troisième et dernière catégorie réunit les corégulateurs pouvant remodeler la chromatine, un mécanisme dépendant de l'ATP (Matsumoto *et al.*, 2008).

Les effets anaboliques découlent de la liaison des SAA avec le récepteur des androgènes présent au niveau des muscles squelettiques, menant aux effets favorisant la synthèse protéique et la rétention d'azote, soutenant ultimement la croissance musculaire (Evans, 2004). Les effets androgéniques seraient plutôt associés à la liaison des différents ligands au même récepteur au niveau d'autres tissus où l'expression d'enzymes, telle la 5 α -réductase, est différente de celle observée au niveau des muscles squelettiques. Ceci permet d'expliquer la variation des effets obtenus dans les différents tissus comme les tissus d'organes sexuels, vu l'altération de l'affinité des substances subissant la 5 α -réduction pour NR3C4 par exemple (Kopera, 1985).

Les effets non génomiques des androgènes découlent d'interactions avec plusieurs protéines cytosoliques et des actions cellulaires n'impliquant pas la transcription de gènes. En réalité, ils impliquent plutôt de seconds messagers par l'activation de protéines kinases (A et C, MAPK) et une altération du transport d'ions menant à l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Ce type d'effets se produit rapidement et implique plusieurs cascades signalétiques intracellulaires. Plusieurs effets tels que la transmission signalétique neuromusculaire et intercellulaire par les jonctions, la relaxation des muscles lisses et la plasticité neuronale peuvent être reliés aux actions non génomiques. Le mécanisme exact n'est cependant pas encore élucidé et accepté par la communauté scientifique. Un des mécanismes proposés implique la globuline se liant aux hormones sexuelles (en anglais SHBG : *sex hormone-binding globulin*) qui pourrait lier la testostérone et produire l'activation d'une cascade signalétique impliquant la protéine G tout en restant à la membrane (contrairement au récepteur des androgènes, qui doit transloquer au noyau pour pouvoir initier la transcription de gènes). S'en suit une génération rapide d'AMPc résultant de l'activation de l'adénylyl cyclase par la protéine G. Certains effets non génomiques semblent varier en fonction des substances utilisées, du type cellulaire, du type de tissus et de l'espèce, permettant l'obtention d'une certaine spécificité. Cependant, les effets observés sont somme toute généralement

similaires, impliquant la plupart du temps de seconds messagers connu (Falkenstein *et al.*, 2000; Li & Al-Azzawi, 2009; Rosner *et al.*, 1999).

1.7 Voies de biotransformation des stéroïdes anabolisants

Le métabolisme des stéroïdes anabolisants androgènes est divisé en deux phases qui ont pour but d'inactiver les stéroïdes et d'augmenter la polarité pour favoriser, entre autres, l'élimination de ceux-ci. Les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydroxylation sont majoritairement catalysées par plusieurs enzymes spécifiques à certains tissus. Le métabolisme de la testostérone représente l'ensemble des voies métaboliques attendues pour la majorité des stéroïdes anabolisants androgènes. Les réactions associées au métabolisme de phase 1, soit l'oxydation, la réduction et l'hydroxylation, peuvent se produire à plusieurs endroits sur le noyau androstane (Schanzer, 1996).

Les premiers exemples se rapportent au cycle A. En effet, à moins d'être altéré ou protégé par l'ajout d'un cycle (par exemple le cycle pyrazole sur le stanozolol), le cycle A possède des fonctions chimiques susceptibles aux réactions d'oxydoréduction. Tout d'abord, le double lien C-4,5 doit être réduit pour initier le métabolisme des stéroïdes possédant une fonction cétone en C-3 et une double liaison en C-4,5. L'action des enzymes 5 α -réductase et 5 β -réductase, se retrouvant respectivement majoritairement au niveau du cerveau/appareil génital et au niveau du foie, est irréversible et dépendante des groupements sur le cycle D. La réduction du groupement cétone en C-3 sera rapidement accomplie par la suite. En effet, suite à la réduction du lien double C-4,5 menant aux isomères 5 α et 5 β , les enzymes 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase et 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase réduiront la cétone présente en C-3 en alcool. Les isomères 3 α et 3 β associés au groupement alcool en C-3 sont obtenus. À noter que l'isomère 3 β n'est que très peu abondant lorsque l'isomère 5 β est réduit par la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. Des réactions de réduction du cycle A sont rapportées pour les stéroïdes possédant des groupements cétones en C-3 et des insaturations en C-1,2 et C-4,5. Des réactions de déshydrogénation en C-1,2 peuvent aussi être observées chez les stéroïdes possédant un groupement cétone en C-3 et une insaturation en C-4,5. Deux réactions particulières peuvent être observées sur le cycle B, plus spécifiquement en position C-6. Tout d'abord, l'hydroxylation de C-6 est une voie métabolique particulièrement empruntée par les stéroïdes possédant des groupements 17 β -hydroxy-17 α -méthyle et une insaturation du cycle A en C-1,2. Une voie métabolique mineure est la déshydrogénation du lien entre C-6 et C-7 menant à l'introduction d'une insaturation en C-6,7 suivant l'élimination de la fonction hydroxyle introduite en C-6. Seulement la

12-hydroxylation est répertoriée en ce qui a trait au métabolisme usuel sur le cycle C des stéroïdes possédant des groupements alkyles en C-17 (Schanzer, 1996; Shahidi, 2001).

Certaines enzymes de la famille des 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases permettent l'oxydation de l'alcool en C-17(β) en cétone, étant une voie métabolique majeure observée chez plusieurs stéroïdes. De plus, la réaction inverse, soit l'hydroxylation du groupement cétone en C-17 en alcool (orientation β) par certaines 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases, est aussi observée. Une réaction de 17 α -hydroxylation de la cétone en C-17 est aussi possible, bien qu'observée surtout au niveau du métabolisme de l'estra-4,9,11-trien-17 β -ol-3-one (soit la trenbolone). L'hydroxylation en position C-16 est aussi observée chez plusieurs stéroïdes et chez les œstrogènes, menant à l'obtention de 2 épimères (α et β). L'oxydation de l'alcool en cétones en position C-16 est aussi possible, étant observée chez le 4-chloro-1,2-dehydro-17 α -methyltestostérone, les œstrogènes et lors du métabolisme équin pour le stanozolol. L'épimérisation des groupements en C-17 peut être observée, étant obtenue suite à la réaction de sulfoconjugaison lors du métabolisme de phase II (décrit plus bas). Finalement, l'hydroxylation en C-18 ou C-19 peut être observée (Schanzer, 1996). Des réactions d'hydrolyse peuvent se produire lors du métabolisme de phase 1 (Magalhães *et al.*, 2019).

Les réactions associées au métabolisme de phase II visent à coupler les différents composés, métabolisés ou non, à l'acide glucuronique ou à un groupement sulfate, augmentant la polarité pour favoriser l'élimination des conjugués résultants. Lorsque non conjugués, les substances sont alors identifiées comme « libre » ou comme étant présents dans la « fraction libre ». Les réactions impliquant l'acide glucuronique sont médiées par les UDP-glucuronosyltransférases tandis que les réactions impliquant le groupement sulfate sont médiées par les enzymes sulfotransférases. L'orientation des groupements présents sur les composés déterminera le type de conjugaison subi (Schanzer, 1996). Les métabolites de phase I seulement étaient visés dans le cadre de ce projet donc le métabolisme de phase II ne sera pas revu en totalité.

1.8 Stéroïdes de synthèse

Les stéroïdes de synthèse (souvent nommés stéroïdes « designer ») représentent un problème important au niveau de la réglementation et de la santé publique. En effet, ceux-ci peuvent être obtenus sur le marché clandestin ou illégalement par internet. Plusieurs techniques visent à duper les autorités et la réglementation : l'utilisation de nomenclatures différentes, une identification erronée des substances contenues dans le supplément, la vente de substances dont l'utilisation avait été abandonnée depuis longtemps ou la vente de substances dites de type prohormones (devant subir un métabolisme initial avant d'être sous la forme désirée). Plusieurs stéroïdes « designer » visent une biodisponibilité orale, d'où l'ajout d'un groupement méthyle en C-17(α) sur des substances déjà connues ou sur certains intermédiaires métaboliques de profils métaboliques répertoriés (Ljungqvist, 2017; Rahnema *et al.*, 2015).

En utilisant d'autres nomenclatures désuètes ou inhabituelles, en identifiant incorrectement ou en omettant d'identifier les substances en question, les producteurs/distributeurs ont l'occasion de mettre en vente le produit directement sur le marché jusqu'à ce que les autorités de la santé publique fassent le lien avec leurs homologues bannis. En utilisant des substances de type prodrogues, les producteurs/distributeurs peuvent mettre en marché une substance qui sera par la suite métabolisée en substance bannie. Puisque la substance mise sur le marché n'est pas interdite directement, les producteurs/distributeurs n'enfreignent techniquement pas la loi (Ljungqvist, 2017; Lootens *et al.*, 2011; Rahnema *et al.*, 2015).

Pour éviter la détection lors des contrôles de dopage, les substances seront souvent basées sur une substance connue puis altérées dans le but de modifier la voie d'administration ou les propriétés physicochimiques et donc le métabolisme. Puisque le dépistage des laboratoires de contrôle du dopage se base sur des métabolites connus, le fait d'introduire de nouvelles substances permet de contourner les méthodes en place, du moins jusqu'à la découverte du produit et la caractérisation de ses métabolites (Abushareeda *et al.*, 2014; Cawley *et al.*, 2016; Fragkaki *et al.*, 2009a; Kicman, 2008; Lootens *et al.*, 2011; Rahnema *et al.*, 2015).

Plusieurs actions ont été prises en réponse à l'utilisation des stéroïdes de synthèse. Tout d'abord, la possibilité pour les laboratoires accrédités d'entreposer des urines suspectes et de les analyser rétrospectivement (en accord avec le code de l'AMA). Ceci permet aux laboratoires, suivant les directives des autorités sportives, de réanalyser les urines suspectes avec de meilleures méthodes, souvent plus précises et englobant une plus grande variété de substances dans des buts de recherche. Ensuite, les

actions gouvernementales telles que « Anabolic Steroid Control Act » de 2004 et le « Designer Steroid Control Act » de 2014 ont permis de freiner la propagation de plusieurs produits sur le marché (Abushareeda *et al.*, 2014; Ayotte *et al.*, 2016). Les laboratoires de contrôle du dopage doivent constamment se tenir à jour quant aux produits en circulation et aux substances populaires pour éviter de prendre un retard sur la production/distribution et l'utilisation de nouvelles substances respectivement par des laboratoires clandestins et par les athlètes. Les laboratoires de contrôle du dopage doivent donc rester particulièrement à l'affût d'urines suspectes, ce qui inclut les urines dont le profil des stéroïdes endogènes semble très bas (laissant présager une suppression endogène), et des informations pouvant être reçues d'autres laboratoires ou anonymement (Thieme & Hemmersbach, 2009). De plus, le développement continu de techniques d'analyse et le maintien à jour des renseignements relatifs au marché actuel permettent aux laboratoires accrédités de s'adapter et de se moderniser advenant l'utilisation de nouvelles substances inconnues.

1.9 Effets délétères associés à l'utilisation de stéroïdes anabolisants

Les effets délétères associés à l'utilisation de stéroïdes anabolisants sont multiples et non négligeables. De plus, ceux-ci touchent plusieurs systèmes du corps humain, causant des effets physiopathologiques, des altérations esthétiques et des effets psychologiques.

1.9.1 Effets délétères hépatiques

Les effets hépatiques sont souvent les effets physiopathologiques les plus connus. Lors de l'utilisation de stéroïdes anabolisants, particulièrement lors d'utilisation de formes alkylées en C-17(α), l'hépatotoxicité est assez fréquente et peut se manifester sous différentes formes. L'hépatotoxicité peut se présenter sous forme d'une cholestase hépatique (réduction ou même parfois l'arrêt complet du flux biliaire) et/ou sous forme de péliose hépatique (présence de cavités sanguines dans le foie). Une accentuation des risques de développer un cancer hépatique associée à l'administration d'agents anabolisants est aussi envisagée par la communauté scientifique (Kicman, 2008; Shahidi, 2001).

1.9.2 Effets délétères cardiovasculaires

Les effets cardiovasculaires associés à l'utilisation de stéroïdes anabolisants androgènes peuvent être manifestés sous plusieurs formes bien que la causalité ne soit pas confirmée. Tout d'abord, les risques d'affectations cardiovasculaires peuvent être grandement augmentés par l'hypertrophie ventriculaire gauche et l'altération des lipides sanguins, tous deux associés à l'utilisation de SAA. L'altération des lipides sanguins englobe l'augmentation des lipoprotéines à basse densité et la diminution des lipoprotéines à

haute densité et de l'APO-1. Une légère augmentation de la pression sanguine est aussi observée. Finalement, la fibrose cardiaque et des arrêts cardiaques associés à l'utilisation de SAA sont rapportés. L'augmentation du risque d'arythmie cardiaque lors d'utilisation prolongée de stéroïdes anabolisants androgènes est considérée bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas encore élucidé (Evans, 2004; Kicman, 2008; Thieme & Hemmersbach, 2009).

1.9.3 Effets délétères endocriniens

Les effets délétères endocriniens affectent tous les utilisateurs, indépendamment du groupe d'âge ou du sexe. Cependant, la gravité des effets délétères est parfois plus importante chez les femmes et les enfants. La suppression des gonades est un effet délétère observé chez l'homme et plus particulièrement lors d'une administration prolongée d'agents anabolisants. Cette suppression inhibe la stéroïdogénèse normale au niveau des gonades puisque le corps se retrouve en présence d'un apport exogène d'androgènes, parfois en dose supra-physiologique. Une atrophie testiculaire peut se produire, la gravité variant selon le type d'agent utilisé, la durée et la dose. Une importante croissance de la prostate est rapportée. Chez la femme, les effets endocriniens sont aussi multiples. L'aménorrhée et l'hypertrophie clitoridienne irréversible sont deux effets plus fréquemment rapportés (Kicman, 2008). Une diminution de la fertilité est possible (Thieme & Hemmersbach, 2009). Chez les enfants, une puberté accélérée peut être observée, sans compter de multiples dérèglements endocriniens possibles lors de la croissance et/ou la puberté (Hatton *et al.*, 2014).

1.9.4 Effets délétères psychologiques

L'irritabilité, l'agressivité, l'augmentation ou l'apparition d'impulsions autodestructrices et destructrices représentent les effets délétères psychologiques généralement mieux connus et répertoriés. En addition, des épisodes de manie/hypomanie lors de l'utilisation et des symptômes de sevrage, dont une dépression sévère à l'arrêt, peuvent se produire (Evans, 2004; Kicman, 2008; Shahidi, 2001).

1.9.5 Effets délétères esthétiques

L'esthétisme étant souvent la raison principale derrière l'utilisation d'agents anabolisants par les adeptes de culture physique, il est intéressant de voir la gravité de certains effets délétères esthétiques associés à l'utilisation de stéroïdes anabolisants androgènes. La gynécomastie et la calvitie représentent deux types d'effets indésirables esthétiques chez l'homme. Chez la femme, une atrophie mammaire, de l'hirsutisme, dans le meilleur des cas partiellement réversible, et de la calvitie peuvent se produire. L'acné kystique est

observée chez les deux sexes. L'aggravation de la voix chez la femme et d'autres types de masculinisation pourraient aussi être considérés comme des effets indésirables esthétiques des SAA (Evans, 2004; Kicman, 2008; Shahidi, 2001; Thieme & Hemmersbach, 2009).

1.9.6 Autres effets délétères et potentiels

L'arrêt de la croissance osseuse causée par la soudure épiphysaire prématurée chez les enfants est possible lors de l'utilisation de SAA. Une augmentation marquée de la libido est aussi rapportée tant chez l'homme que chez la femme. La masculinisation du fœtus femelle lors de l'utilisation d'agents anabolisants par la mère lorsqu'enceinte est possible (Kicman, 2008; Shahidi, 2001). Des infections aux sites d'injections sont relativement fréquentes et d'autres maladies peuvent être transmises par l'utilisation de seringues contaminées. Des blessures musculosquelettiques particulièrement au niveau des tendons sont rapportées (Evans, 2004; Thieme & Hemmersbach, 2009). De plus, la distribution sur internet de stéroïdes de synthèse peut provenir de compagnies douteuses, offrant une pureté inconnue d'un produit et ne respectant aucune bonne pratique de laboratoire. Les substances distribuées peuvent représenter des risques potentiellement énormes de santé pour les utilisateurs.

1.10 Portée du mémoire et raisonnement

Le mémoire vise trois objectifs pour améliorer ultimement la portée des méthodes de détection des stéroïdes anabolisants. Le premier étant de faire état du marché actuel et de la facilité à obtenir des produits dopants et/ou des stéroïdes synthétisés via internet. Ceci permettra de mettre à jour les connaissances des produits en circulation, mais aussi mettre en lumière la facilité d'obtention de produits potentiellement dangereux. Le deuxième étant d'obtenir éthiquement les métabolites associés à l'utilisation de ceux-ci à la suite d'incubations en présence de fractions cellulaires S9. Les métabolites pourraient être obtenus plus facilement et rapidement, mais surtout d'une façon éthique plus en accord avec la vision de la lutte contre le dopage. Le troisième objectif sera d'analyser par CG-SM les métabolites obtenus et de proposer les structures potentielles. Les nouveaux métabolites pourront être ajoutés aux méthodes actuelles, permettant l'avancement des connaissances et des capacités de dépistage. De plus, des urines entreposées à des fins de recherche, en accord avec les protocoles en place, pourraient ensuite être sondées pour vérifier si les nouveaux produits étaient déjà en circulation ou utilisés par certains athlètes.

1.10.1 Incubations en présence de fractions hépatiques S9

Les fractions cellulaires S9 humaines représentent un modèle d'étude *in vitro* intéressant. Celles-ci contiennent les fractions microsomale et cytosolique des cellules de foie humain, ce qui implique que le modèle regroupe les enzymes de phase 1 se retrouvant majoritairement au niveau du micrososome et les enzymes de phase II se retrouvant au niveau du cytosol. Leur utilisation permet donc d'obtenir une représentation adéquate du métabolisme hépatique pouvant être subi par différentes substances en présence des cofacteurs nécessaires. L'utilisation du modèle des fractions cellulaires S9 au laboratoire avait d'ailleurs permis la production de métabolites pertinents pour le 5 α -androst-2- β -17-one (Ayotte *et al.*, 2016) et la production de quantité importante de métabolites d'intérêts pour permettre des tests subséquents puis la caractérisation (Gauthier *et al.*, 2012). Cependant, le protocole alors utilisé divergeait en plusieurs points à celui utilisé dans le projet actuel. L'utilisation de fractions cellulaires S9 provenant de rats avait aussi permis la production de métabolites lors d'une étude sur le métabolisme de la norandrostènedione (Levesque *et al.*, 2005). En ce qui concerne le métabolisme de phase 1, une solution régénératrice de NADPH est nécessaire pour permettre l'obtention d'un métabolisme représentatif. Les enzymes de phase 1 permettent l'obtention de métabolites oxydés et réduits à partir du produit mère choisi. Pour le métabolisme de phase II, l'ajout d'autres cofacteurs est nécessaire. Par exemple, l'addition préalable d'acide uridine diphosphoglucuronique et d'alaméthicine est nécessaire pour obtenir les métabolites glucuroconjugés tandis que pour obtenir les métabolites sulfoconjugés, l'ajout d'adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate est suffisante. Quelques avantages associés à l'utilisation des fractions cellulaires S9 sont une obtention éthique, rapide et à un coût relativement faible de métabolites *in vitro* contrairement à l'utilisation de souris chimérique ou aux études d'excrétion. De plus, les métabolites obtenus sont assez représentatifs du métabolisme *in vivo* puisque les fractions S9 contiennent la majorité des enzymes clés. D'ailleurs, les fractions cellulaires S9 ont une bonne capacité d'entreposage en plus de produire des résultats reproductibles. Cependant, ce modèle possède aussi certains désavantages dont l'obtention partielle du métabolisme, advenant l'omission de certains cofacteurs, des limitations associées à une quantité insuffisante de cofacteurs et une activité enzymatique généralement plus faible que si chaque fraction était utilisée séparément. Ainsi, certains métabolites pourraient être générés qu'en quantité insuffisante pour la détection, rendant ainsi subséquemment la qualification impossible. D'autres métabolites pourraient simplement ne pas être produits. Il est donc recommandé de contre-vérifier auprès d'études d'excrétions ou d'utiliser une substance au métabolisme connue pour confirmer le modèle (Brandon *et al.*, 2003; Ekins *et al.*, 2000; Plant, 2004).

1.11 Substances sélectionnées

Dans le cadre de ce projet, quatre stéroïdes ont été sélectionnés pour les incubations en présence de fractions cellulaires S9 :

- La 1-androstérone (3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one)
- La 4-androstérone (3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one)
- Le cynostane (2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one)
- Le méthylclostébol (4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one)

1.11.1 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one

La 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one, parfois surnommé à tort 1-androstérone, est vendue comme pro-hormone et est facilement disponible sur internet (Granados *et al.*, 2014).

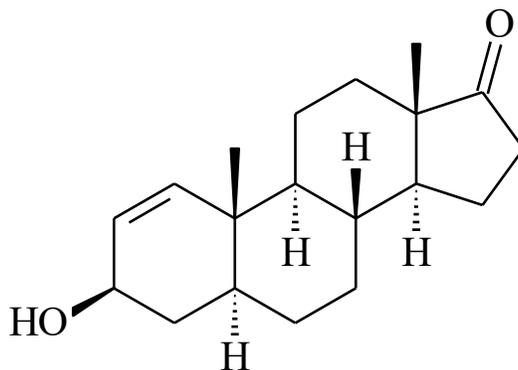


Figure 1.8 : 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one

Ce stéroïde a été identifié en 2011 et son métabolisme proposé lors d'une étude d'excrétion chez l'humain (Parr *et al.*, 2011). Deux métabolites principaux ont été caractérisés, soit la 1-testostérone et 1-androstènedione, en plus de divers autres métabolites.

Une étude contrôlée de 2014 comparait une cohorte de 9 sujets recevant le produit contre 8 sujets placebo dans le but de vérifier les effets désirés et indésirables associés à l'utilisation de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one. La prise orale du médicament, tel qu'indiqué sur le produit, menait à l'amélioration de la composition corporelle et de la force musculaire. Cependant, des effets délétères cardiovasculaires et hépatiques accompagnaient l'utilisation de la prohormone (Granados *et al.*, 2014).

Ainsi, les métabolites phase 1 d'intérêts obtenus par Parr en 2011, soit la 1-testostérone et 1-androstènedione seraient attendus suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 (Schanzer, 1996; Shahidi, 2001). La vérification de la représentabilité métabolique du modèle auprès de la littérature permettra d'en juger le bienfondé.

1.11.2 3 β -hydroxy androst-4-èn-17-one

La 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one est aussi référée comme le delta-4-DHEA (Δ -4-DHEA). Ce stéroïde proviendrait du métabolisme de l'androstènedione par des microglies BV2, découlant de l'action d'une enzyme vraisemblablement exclusive à ce type cellulaire (Jellinck *et al.*, 2006). La 3 β -hydroxy-4-androstèn-17-one avait aussi été obtenue comme métabolite de la testostérone (Lisboa & Gustafsson, 1970).

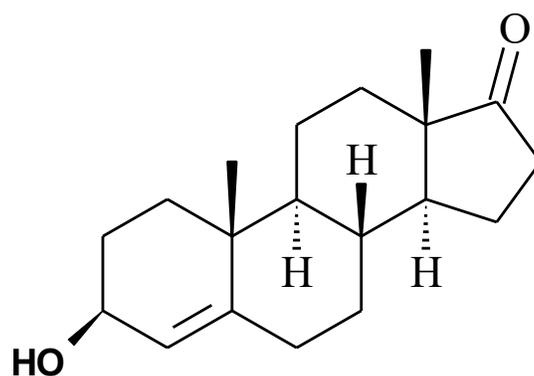


Figure 1.9 : 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one

Des réactions d'oxydoréduction sur les groupements en C-3 et C-17 sont attendues lors de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 ce qui peut résulter en l'obtention de testostérone et d'androstènedione comme métabolites de phase 1 (Schanzer, 1996; Shahidi, 2001).

1.11.3 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one

La 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one ou méthylclostébol provient de l'addition d'un groupement méthyle en position C-17 α du clostébol, lui-même un dérivé chloré en position C-4 de la testostérone. Il s'agit d'une substance connue et contrôlée. L'utilisation du méthylclostébol sous le nom STS 482 par les athlètes allemands durant les années 1960 est répertoriée (Franke & Berendonk, 1997; Lootens *et al.*, 2011; Rahnema *et al.*, 2015).

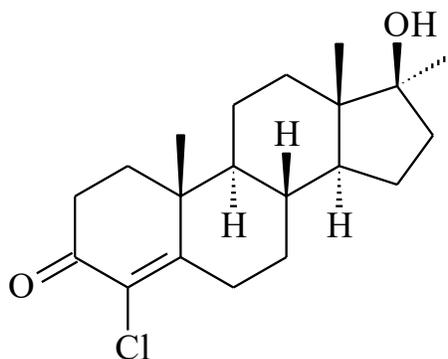


Figure 1.10 : 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one

Un important avantage associé à l'utilisation du méthylclostébol serait sa biodisponibilité orale, associée à la présence d'un groupement méthyle en position C-17 α . De plus, l'inhibition de l'aromatase et de l'action par la 5 α -réductase au niveau de la double liaison C-4,5 est conférée par l'atome de chlore en C-4 (Kicman, 2008; Rahnema *et al.*, 2015).

Plusieurs métabolites de phase 1 sont possibles suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9. Tout d'abord, le produit mère pourrait être retrouvé intact puisqu'il est résistant au métabolisme hépatique grâce au groupement méthyle en C-17 ainsi que les métabolites provenant de la réduction de la cétone en position C-3. Finalement, des métabolites hydroxylés en C-6 et C-16 sont attendus pour le méthylclostébol, cette voie métabolique étant connue pour les substances exhibant un groupement méthyle orienté en α en C-17 (Lootens *et al.*, 2011; Schanzer, 1996; Shahidi, 2001).

1.11.4 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one

La 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one est un produit disponible aisément sur le web et ce au moins depuis 2011 par différents distributeurs (Abbate *et al.*, 2015; Magdziak *et al.*, 2011).

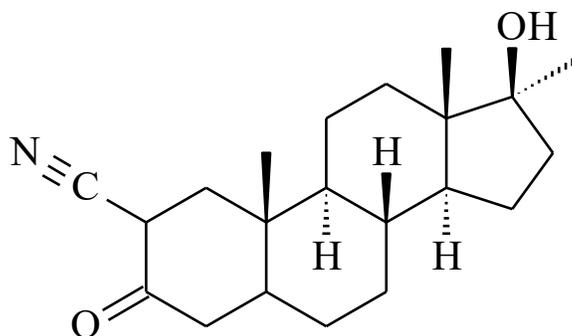


Figure 1.11 : 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one

Plusieurs cyanostéroïdes ont été synthétisés lors des années 1940 et 1950, durant la période de grand intérêt entourant les stéroïdes anabolisants androgènes. Les cyanostéroïdes sembleraient posséder majoritairement des effets cytotoxiques qui pourraient s'avérer recherchés dans d'autres domaines tels le traitement de pathologie, dont le cancer (Levitsky *et al.*, 2017). Cette substance a été étudiée et une tentative de caractérisation fut effectuée en 2015. Ces derniers proposent une structure du cynostane ayant un groupement isoxazole sur le cycle A en se basant sur le patron de fragmentation du spectre de masse (Abbate *et al.*, 2015). Aucun métabolisme n'a été proposé par ceux-ci, d'où l'intérêt de poursuivre les recherches avec ce produit.

En présence de fractions cellulaires S9, des métabolites de phase 1 comme le métabolite réduit en C-3 et des métabolites hydroxylés en C-6 seraient attendus, en plus d'obtenir le produit mère intact considérant la présence d'un groupement méthyle orienté en α en position C-17 (Schanzer, 1996; Shahidi, 2001).

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

Différents produits ont été commandés de sites internet : 1-Superandro Rx(3 β -enanthoxyandrost-1-en-17-one) et 4-Superandro Rx (3 β -enanthoxyandrost-4-en-17-one) constituaient avec le SuperNorAndro Rx et Super-epiandro Rx le *Superandro stack d'Ironmag labs* et ont été obtenu par l'entremise du site *Bestpricenutrition* (<https://www.bestpricenutrition.com/> ; consulté 18/05/2021). Le Nanobol (4-chloro-17 α -methyl-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one) de *Fusion supplements* et le Cynostane (2-cyano-17 α -methyl-17 β -hydroxy-androst-3-one) d'*AI Sports Nutrition* ont été obtenus auprès de *predatornutrition* (<https://www.predatornutrition.com/> ; consulté 18/05/2021). Les nomenclatures et noms communs des produits mentionnés ici représentent les informations présentes sur l'étiquetage des produits. Les différents stéroïdes d'intérêts contenus dans les produits achetés à partir des sites internet ont été identifiés à l'aide de standard par CG-SM suivant une extraction au méthanol des différentes poudres et suspensions. Les standards stéroïdiens d'intérêts proviennent de plusieurs sources. La 3 β -hydroxy-androst-4-èn-17-one (4-androstérone) provient de Steraloids (Newport, États-Unis) tandis que la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one (1-épiandrostérone), 3 α -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one (1-androstérone), la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthyl-androst-4-èn-3-one (méthylclostébol) et 4-chloro-17 α -méthyl-androst-4-èn-3 β ,17 β -diol (promagnon) proviennent de Toronto Research Chemicals Inc (North York, Canada).

Réactifs et tampons :

Le Na₂CO₃ et NaHCO₃ proviennent de EMD (Gobbsstown, États-Unis). Le HCl (98 %) et H₂SO₄ (95 à 98 %) proviennent de Caledon (Georgetown, Canada). Le NaH₂PO₄*H₂O provient de Fisher Scientific (Ottawa, Canada) et Na₂HPO₄ provient de Sigma Aldrich (Oakville, Canada). L'eau Milli-Q provient d'un système Milli-Q Advantage A10 (Millipore) et est utilisée fraîchement lors de chaque journée d'extraction. Le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, l'hexane (95 % n-Hexane; distillé dans le verre) et le dichlorométhane (distillé dans le verre) proviennent de Caledon (Georgetown, Canada). L'hélium et l'azote ont été obtenus chez Praxair (Mississauga, Canada).

Les incubations en présence de fractions cellulaires S9 :

Les fractions S9 ont été achetées chez Thermo Fisher Scientific (Life Technologies ; Burlington, Canada). Le β -NAD, le MgCl₂, le glucose-6-phosphate et la glucose-6-phosphate déshydrogénase ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada).

Réactifs pour la dérivation chimique :

Le triméthylchlorosilane (TMCS), la pyridine, le tétrahydrofurane (THF), l'éthanethiol et la triéthylamine proviennent de Sigma Aldrich (Oakville, Canada). Le N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) et le triméthyliodosilane (TMIS) proviennent de Chemische Fabrik Karl Bucher GmbH (Waldstetten, Allemagne).

2.1 Extraction des stéroïdes dans les produits commerciaux

Les différents produits sont extraits pour permettre l'identification à l'aide de standard sur CG-SM. Plusieurs capsules sont ouvertes et la poudre contenue est mise en commun dans différents tubes en plastique préalablement identifiés. Selon une procédure validée au laboratoire, 1 g de cette poudre est extrait dans un tube en verre de 15 mL à l'aide de 5 mL de méthanol. Le tube est ensuite agité sur vortex et centrifugé. Un volume de 10 µL du surnageant est transféré dans un vial de verre puis évaporé à 50 °C sous un jet d'azote. Pour le « Nanobol », celui-ci étant une suspension blanchâtre, 50 µL de la solution blanchâtre sont ajoutés à 5 mL d'éther éthylique dans un tube de verre de 15 mL. La suite de l'extraction est telle que décrite ci-dessus.

Pour le cynostane, une purification plus poussée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) est nécessaire vu l'absence de standard de référence. La méthode de purification a été réalisée sur un système CLHP Agilent technologies 1260 Infinity muni d'une pompe et d'un collecteur de fractions sur colonne Sunfire Prep C18 5 µm 10x250 mm. La température et le débit sont respectivement constants à 40 °C et 3 mL/min. Les solvants utilisés sont : eau milli-Q (64 %), acétonitrile (30 %) et méthanol (6 %). Les longueurs d'onde $\lambda = 192$ nm, $\lambda = 210$ nm et $\lambda = 245$ nm étaient mesurées par un détecteur UV à barrette de diodes de Agilent Infinity Diode Array and Multiple Wavelength Detector G1315C. L'éluat contenant la substance d'intérêt est ensuite récolté et concentré, permettant l'obtention d'une solution pure du produit.

2.2 Identification des stéroïdes présents dans les produits commerciaux

Les stéroïdes purifiés ont été identifiés par comparaison avec les standards de référence, lorsque disponibles. Suivant l'extraction, la dérivation TMS-énol TMS-éther est réalisée par l'ajout de 50 µL d'une solution de dérivation préparée le jour même au laboratoire (MSTFA, TMSI et éthanethiol) puis le vial est chauffé à 70 °C pendant 30 minutes. Le produit dérivé TMS est ensuite analysé par CG-SM. Pour obtenir les dérivés exclusivement TMS-éther, le mélange réactionnel est composé de 90 µL de pyridine, 10 µL de MSTFA et 2 µL de TMCS, ajoutés selon l'ordre d'énumération puis chauffé à 70 °C pendant 30 minutes. Le

tout est évaporé sous un jet d'azote, 50 μL d'hexane sont ajoutés puis la solution est transférée dans un vial propre (Ayotte *et al.*, 1996). Le produit dérivé est ensuite injecté sur CG-SM pour l'analyse à raison de 1 μL à l'aide d'une seringue de 10 μL .

L'identification a été conduite sur CG-SM (Agilent 6890 series GC system Plus+ ; Agilent 5973 Mass Selective Detector) équipé d'un injecteur SSL (divisé/non-divisé; injecteur Agilent 7683), d'une colonne capillaire DB-5MS (25 m x 0.2 mm ; Film 0.33 μm) et d'une source d'ionisation à impact électronique.

Le mode d'injection en débit non divisé et en mode d'analyse par balayage complet visait l'intervalle de masse entre 50 uma et 650 uma selon la chronologie suivante : 50 à 550 uma entre 0 et 7 minutes, 50 à 600 uma entre 7 et 10 minutes puis 50 à 650 uma entre 10 et 14 minutes. La programmation de température du chromatographe en phase gazeuse est la suivante : 100 °C maintenus 30 secs à 240 °C à raison de 20 °C par min puis 278 °C à raison de 6 °C par min et finalement à 320 °C (10 °C/min). La température finale est maintenue 5 minutes. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium en maintenant un flux constant d'environ 1.5 mL par minute et une pression initiale constante, prédéterminée quotidiennement selon les conditions de l'appareil.

2.3 Incubation de fractions cellulaires hépatiques S9 en présence des stéroïdes provenant de standard de référence ou de substances purifiées

Le protocole d'incubation des différents stéroïdes en présence de fractions S9 est largement basé sur le protocole comme décrit par Cawley (Cawley *et al.*, 2016) avec de légères modifications. Lorsque l'identification était concluante, le standard de référence était utilisé pour les incubations. Dans le cas du cynostane, le produit purifié par CLHP a été utilisé vu l'absence d'un standard de référence.

Ainsi, chaque tube en verre de 10 mL contient 1,5 mM de β -NAD, 4,5 mM de MgCl_2 , 7,5 mM de glucose-6-phosphate, 1 unité de glucose-6-phosphate déshydrogénase, 1 mg de protéines de fractions cellulaires S9, 4 μL de la solution méthanolique de stéroïde à 10 mM permettant une concentration finale de 40 μM dans le milieu d'incubation plutôt que de mettre 250 μg comme stipulé par (Cawley *et al.*, 2016). Le volume différentiel est complété à 1 mL avec du tampon phosphate 50 mM, pH 7.4.

Le mélange réactionnel est incubé à 37 °C dans des bains avec agitation pendant 3 heures. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 mL d'acétonitrile.

Cinq contrôles étaient conduits en parallèle des stéroïdes d'intérêts (1 et 2) tels que présentés dans le schéma ci-dessous : Sans enzyme (A), stéroïde d'intérêt seulement (B), blanc de tampon phosphate (C), fractions cellulaires S9 avec tampon phosphate (D) et le milieu d'incubation avec un stéroïde contrôle, la testostérone ou la 4-androstérone (3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one) (T).

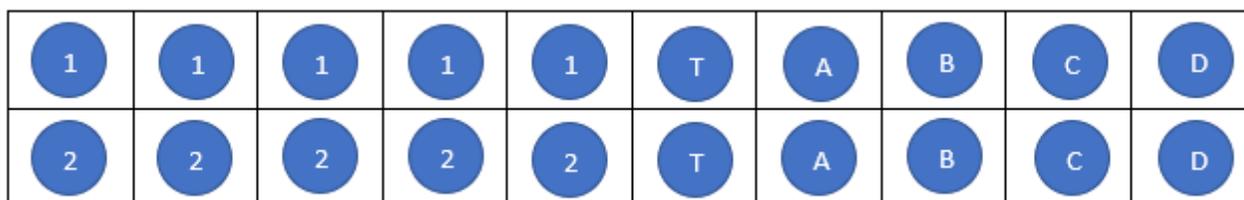


Figure 2.1 : Schéma des échantillons et des contrôles lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.

2.4 Extraction des métabolites générés

Suivant l'arrêt de la réaction par l'ajout d'acétonitrile, les tubes de verre contenant les mélanges réactionnels sont centrifugés à 2000 tours par minute pour cinq minutes. Le surnageant est transféré dans une nouvelle série de tubes et évaporé à 50 °C sous un jet d'azote. Un volume de 1 mL de tampon carbonate 1 M pH 9 est ajouté pour ensuite permettre l'extraction à l'acétate d'éthyle (2 x 1 mL). La phase organique est évaporée sous un jet d'azote à 50 °C, puis le résidu est reconstitué dans des vials avec 150 μ L de méthanol puis évaporé de nouveau à 50 °C sous un jet d'azote. L'analyse a été effectuée par CG-SM des dérivés per TMS, comme décrit plus haut.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Portrait de la situation

3.1.1 Mise en contexte

Le premier objectif du projet était de déterminer s'il était possible actuellement de se procurer aisément des stéroïdes anabolisants de synthèse dans le marché. Celui-ci a été évalué en recherchant les produits populaires disponibles sur internet pour ensuite les commander et ainsi démontrer la facilité d'obtention de différents produits dopants.

Malheureusement, le fait de pouvoir aisément obtenir des substances anabolisantes démontre un manquement important au niveau législatif, la distribution de stéroïdes anabolisants étant illégale au Canada. Il s'agit aussi d'un risque appréciable au niveau de la santé publique. Rappelons-nous les multiples effets secondaires associés à la consommation de tels produits (Evans, 2004; Hatton *et al.*, 2014; Kicman, 2008; Shahidi, 2001; Thieme & Hemmersbach, 2009). De plus, l'internet ne discrimine pas le type d'acheteur. Plusieurs populations sont plus à risque, dont les adolescents, jeunes adultes et certains athlètes amateurs en quête d'alternatives naturelles. Ceux-ci sont parfois mal informés et en partie la proie des techniques de marketing prédatrices puisqu'ils peuvent facilement se procurer et consommer des substances anabolisantes sans connaître l'étendue des répercussions possibles. Cette situation se produit parfois même à leur insu. Rappelons-nous que la jeune population est généralement plus crédule, influençable et a tendance à faire des choix impulsifs non éclairés, représentant donc une cible idéale pour ces compagnies sans scrupules (Abbate *et al.*, 2015).

De plus, les produits se retrouvant sur le marché noir peuvent souvent être synthétisés par des chimistes amateurs autoproclamés utilisant des installations de fortune sans se soucier des réglementations en vigueur entourant la production de suppléments alimentaires. Ceci augmente considérablement la probabilité de trouver de nombreuses impuretés en plus d'intermédiaires réactionnels dans ce type de produit. Dans certains cas, les substances sont tout simplement remplacées par d'autres molécules populaires aux propriétés connues dans le but de berner les consommateurs et les autorités sanitaires (Abbate *et al.*, 2015).

Certains produits identifiés comme suppléments alimentaires disponibles dans les boutiques spécialisées et sur internet pouvaient auparavant renfermer des stéroïdes et des prohormones (Baume *et al.*, 2006). En fait, ce type de produits est disponible depuis 1996 sur le marché américain, bien qu'interdit par le

Comité international olympique, et ce dès leur apparition. Il arrive même parfois que des suppléments de vitamines et d'acides aminés contiennent des traces de stéroïdes et prohormones (Ljungqvist, 2017; Parr *et al.*, 2004). Suivant la mise en place de certaines régulations, la quantité de ce type de produits déguisés diminua grandement sur ce marché sans toutefois être complètement éliminés puisque toujours disponible via internet (Ayotte *et al.*, 2016; Rahnema *et al.*, 2015).

Recherches permettant l'obtention d'un état du marché

La recherche des différents produits commença sur différents sites de culturisme en parallèle avec des forums de discussions et autres sites populaires tels que Reddit. Certaines discussions présentes sur des forums étaient plus facilement accessibles tandis que d'autres nécessitaient la création préalable de comptes et l'approbation des divers modérateurs pour accéder au contenu. Lorsqu'une substance était recommandée de façon redondante sur ces forums par différents experts autoproclamés ou lorsque son efficacité était réitérée et mise en valeur sur leurs différents sites d'appartenance, la substance était alors considérée comme prometteuse. Souvent, des nomenclatures non conventionnelles ou désuètes étaient utilisées pour référer ces produits. Ainsi, les différentes appellations utilisées étaient d'abord révisées pour en ressortir le nom commun et la nomenclature conventionnelle. La littérature entourant ces substances plus prometteuses était ensuite consultée pour évaluer la pertinence quant à leurs utilisations pour des tests subséquents.

Certains de ces produits ont été endossés par des personnalités publiques et des influenceurs par le passé, louangeant ceux-ci comme étant des alternatives légales aux stéroïdes, sans risques pour la santé ni effets secondaires notables (Abbate *et al.*, 2015). Bien que plusieurs vidéos et articles de forums aient été retirés depuis, particulièrement suivant la réception par les différents laboratoires d'avertissements des autorités sanitaires, certains de ces produits restèrent ancrés dans la mémoire populaire et resurgissent périodiquement sous différents noms. De plus, la production de ces substances se rapporte souvent à différentes compagnies, possiblement dans le but de faire un profit rapide sur la notoriété du produit. Deux exemples se retrouvent au sein des produits commandés, provenant de 2 compagnies différentes (1-andro Max V2 et NorAndro Max de *Primevals labs* ; 1-Andro et Epiandro de *Ironmag labs*).

Ensuite, quelques tentatives directement à partir de moteurs de recherches utilisant des combinaisons de mots clés tels que *steroids, alternatives, natural, legal, prohormones, Test based, Androgen based, steroid-like* et d'autres synonymes permettaient de ressortir certains produits populaires au sein de la communauté amateur. À noter que des termes français ont aussi été utilisés, mais les recherches étaient plus fructueuses lorsque produites en anglais.

Il suffisait ensuite de trouver ce type de produit sur différents sites de vente. Des sites basés à l'international étaient aussi consultés, ceux-ci devant se conformer à différents types de législation. Les techniques entourant l'exportation de certains étaient particulièrement efficaces, permettant parfois l'obtention de produits techniquement interdits sans la moindre problématique.

Finalement, des sites de suppléments alimentaires populaires ont été consultés directement pour vérifier la présence et la mise en valeur de produits interdits tels que des prohormones et des stéroïdes de synthèse. Les sites de suppléments alimentaires comprenaient bodybuilding.com, supplementsource.ca, gasparinutrition.com, 1upnutrition.com, a1supplements.com et d'autres. Bien que ces sites aient possiblement déjà été centraux à la vente des produits de types prohormones et semblables aux stéroïdes, il semblerait que ce genre de produits ne soient plus en vente sur les sites plus reconnus (Baume *et al.*, 2006).

Suite à ces recherches et au rejet de certaines substances (déjà connues répertoriées, ingrédients non pertinents, efficacité minime ou absence d'informations permettant de motiver l'utilité d'une commande), les 14 produits présentés dans le tableau 3.1 ont été commandés.

Tableau 3.1 Liste des produits commandés suite à l'état du marché incluant les ingrédients actifs indiqués dans les informations nutritionnelles, le nom de la compagnie le produisant et le distributeur.

Substances commandées	Ingrédient(s)/produits actifs indiqués	Compagnie
Nanobol	4-chloro-17a-methyl-17B-hydroxy-androst-4-en-3-one	Fusionsupplements
1-Superandro Rx	3B-enantoxyandrost-1-en-17-one	Ironmag labs
4-Superandro Rx	3B-enantoxyandrost-4-en-17-one	Ironmag labs
SuperNorAndro Rx	3B-enantoxynorandrost-4-en-17-one	Ironmag labs
Super-epiandro Rx	3B-undecyloxy-5a-androstan-17-one	Ironmag labs
Cynostane	2-cyano-17a-methyl-17b-hydroxy-androst-3-one	AI Sports Nutrition
Helladrol	4-androstene-3B-ol,17-one 3-hydroxy-17-oxo-5-androstane / 17B-(1-ketoethyl)-delta-1,4-androstadiene/ 1,4-androstène-3B-ol,17-one / Androstan-3,5-diene-7,17-dione	Innovative lab
Methdrol	2a-17a-dimethyl-5a-androst-3-one	Fusionsupplements
Halodrol	4-chloro-17 α -methyl-andros-1,4-diene-3 β ,17 β -diol	Fusionsupplements
NOR-ANDRO MAX	19-NorAndro	Primeval Labs
1-andro Max V2	1-Androstérone	Primeval Labs
Epistane	Jamais reçu	Bodyconsciousuk
6-keto diosgenin	Jamais reçu	Supplementcentral
Dymethazine	Jamais reçu	Iconsupplement

De cette liste, trois produits n'ont jamais été reçus sans justification du vendeur (epistane, 6-keto diosgenin et dymethazine). Une possibilité est que certains d'entre eux aient été retenus aux douanes, bien qu'aucune communication de leur part n'ait été reçue par le laboratoire. La majorité des sites mentionnés sont toujours actifs et les produits mentionnés sont, pour la plupart, toujours accessibles (en date du 10/04/20). En plus de démontrer le fait que plusieurs substances interdites se trouvent toujours en circulation actuellement, et ce en dépit de la mise en place de réglementations (Ayotte *et al.*, 2016; Rahnema *et al.*, 2015), cette démonstration permet de dévoiler la facilité d'obtention de produits stéroïdiens pour la population générale, les produits ayant été obtenus directement de sites internet. Ceci prouve aussi qu'aucune restriction ne semble en place tant au niveau des différents distributeurs qu'au niveau des autorités sanitaires gouvernementales.

3.2 Proposition de structures et identifications

Analyses sur CG-SM et propositions de structure grâce à la spectrométrie de masse

Les différents produits sont extraits au méthanol suivant la procédure interne du laboratoire pour ensuite être injectés sur CG-SM sous forme libre ou suivant la dérivation triméthylsilyle, tel qu'indiqué précédemment. L'analyse découlant des chromatogrammes et spectres de masse obtenus permet de proposer différentes structures pour les substances présentes dans les produits commandés. L'identification est aussi possible en comparant les spectres de masse obtenus auprès des banques de spectres de références (intégrées au logiciel ChemStation du CG-SM). L'identification à l'aide de standard de référence était effectuée lorsque ceux-ci étaient disponibles et seulement pour les substances retenues pour incubations subséquentes.

3.2.1 HELLADROL

Le produit *Helladrol* d'*Innovative labs* est vendu comme un mélange exclusif contenant plusieurs prohormones et leurs esters « légaux », visant l'augmentation des niveaux de testostérone et l'amélioration des performances athlétiques. Ces prétentions proviennent directement du site internet du distributeur (<https://hitechpharma.com/collections/innovative-labs/products/helladrol> ; consulté 18/05/2021), ajoutant même des notions scientifiques douteuses couplées à des techniques de vente visant la désinformation du consommateur. Les informations nutritionnelles mettent en valeur la présence de cinq substances : la 4-androstène-3 β -ol,17-one (4-androstérone), le 3-hydroxy-17-oxo-5-androstane (épiandrostérone), la 17 β -(1-ketoethyl)-delta-1,4-androstadiène (possible précurseur de la boldénone), la 1,4-androstène-3 β -ol,17-one et l'androstane-3,5-diène-7,17-dione (arimistane).



Figure 3.1 : Emballage du produit Helladrol d'Innovative labs

Suite à l'analyse du chromatogramme et des spectres de masses, les substances suivantes composeraient le supplément : la 4-androstérone (et son isomère), l'épiandrostérone, la 1,4-androstène-3 β -ol,17-one (proposée) et l'androstane-3,5-diène-7,17-dione (proposée). Plusieurs des substances indiquées par la compagnie semblent bel et bien présentes dans le produit. Le chromatogramme et les spectres de masse (incluant les structures proposées à l'aide du patron de fragmentation) sont présentés ci-dessous.

Abundance

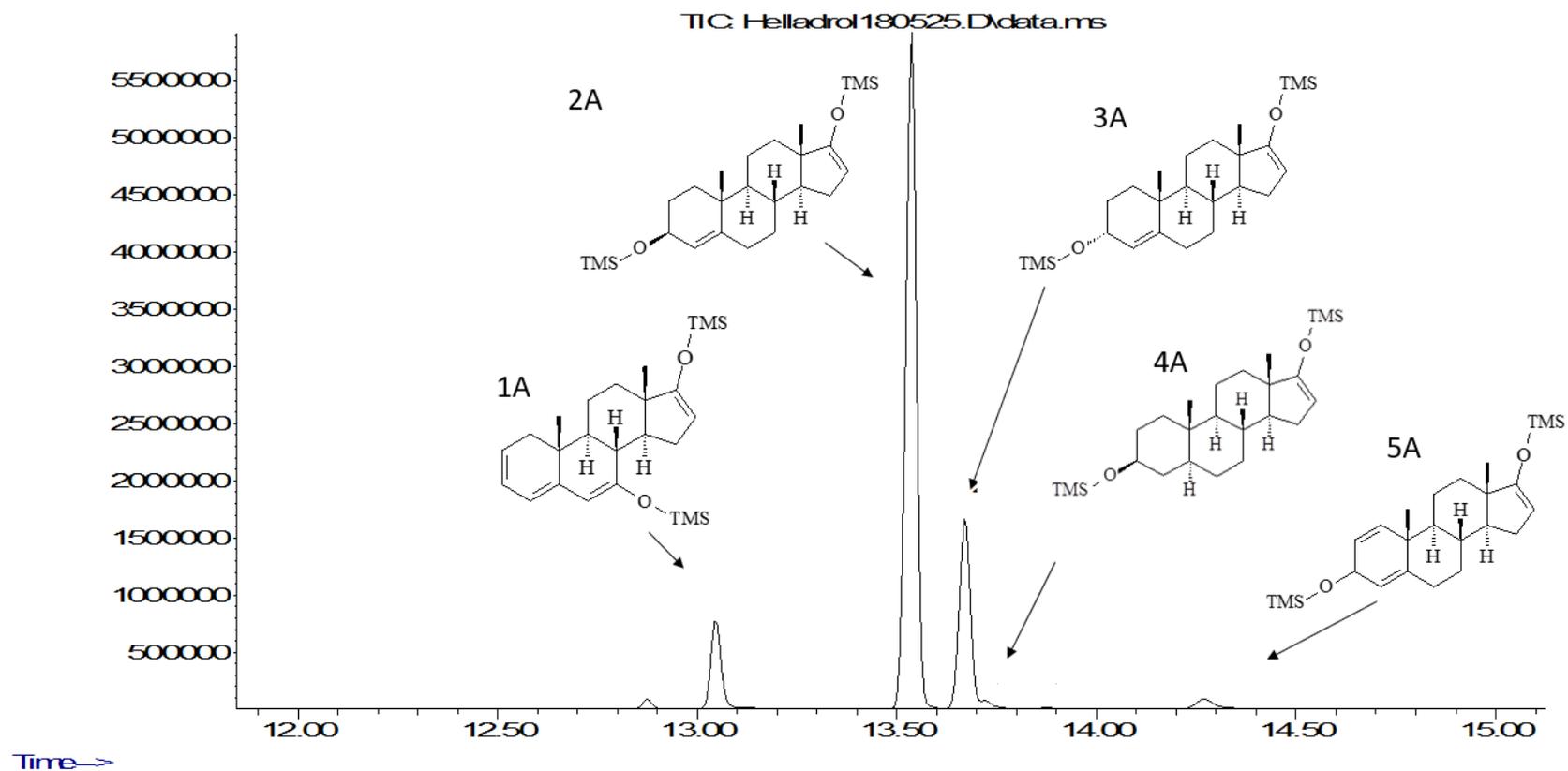


Figure 3.2 : Chromatogramme résultant de l'analyse CG-SM de l'extrait dérivé TMS obtenu du produit Helladrol. Pic 1A : androst-3,5-diene-7,17-dione (TR 13.05), pics 2A et 3A : 4-androstene-3-ol-17-one (TR 13.525) et son isomère (TR 13.6), pic 4A : épiandrostérone (TR 13.73 minutes) et pic 5A : 1,4-androsten-3-ol,17-one (RT 14.3 minutes).

Comme montré à la figure 3.2 ci-dessus, la présence de 5 pics d'intérêts est observée.

Suivant la dérivation chimique triméthylsilyle, le pic 1A (13.05 minutes) possède un ion moléculaire à m/z 428 alors que le produit non dérivé a une masse de 284 uma ce qui suggère la présence de deux fonctions hydroxyle ou cétone et d'insaturations sur les cycles. Le spectre de masse correspond à celui répertorié au laboratoire pour l'androst-3,5-diene-7,17-dione. Ce composé est bien connu sous le nom d'arimistane, un inhibiteur d'aromatase figurant sur la liste d'interdiction de l'Agence mondiale antidopage. Le spectre de masse correspond à celui disponible de la banque du laboratoire ainsi qu'à ceux décrits dans la littérature. Le spectre de masse (figure 3.3) est caractérisé par la présence de l'ion moléculaire intense et de fragments de faible abondance correspondant à la perte d'un groupement méthyle (-15 uma; m/z 413), la perte d'un groupement triméthylsilanol (HOTMS; -90 uma menant à l'ion à m/z 338) et la perte subséquente de ces deux groupements (-105 uma; m/z 323). La fragmentation du cycle C entre C-12,13 et C-8,14 mène aux ions m/z 259 (associé au fragment incluant les cycles A et B) et m/z 169 (fragment du cycle D). En 2015, Kazlauskas a décrit l'identification de ce produit dans des compléments dits alimentaires et ses principaux métabolites alors que plus récemment, Martinez Brito et al ont décrit les métabolites produits suite à son administration chez un volontaire (Kazlauskas & Goebel, 2015; Martinez Brito *et al.*, 2019).

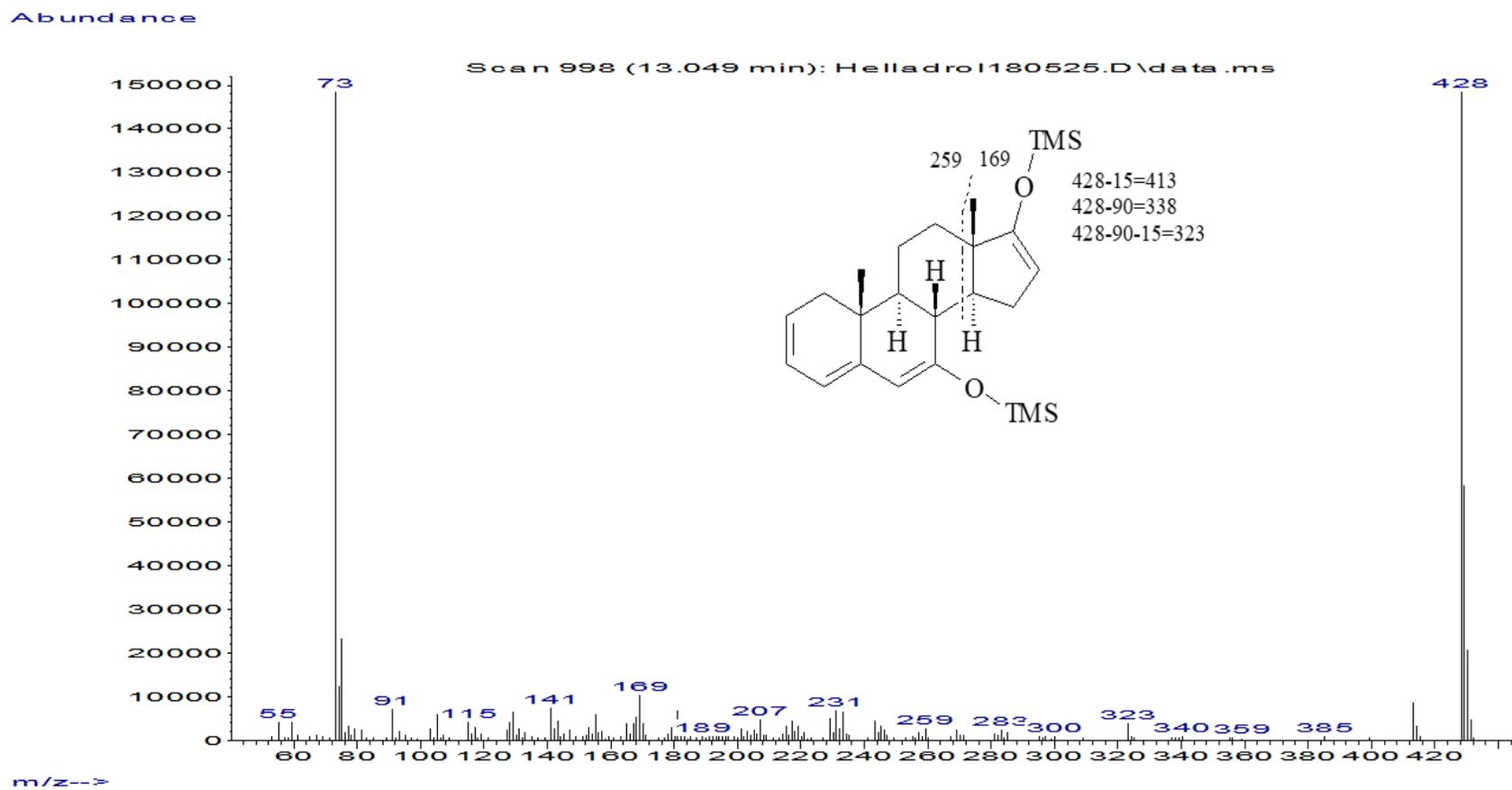


Figure 3.3 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation de l'androstan-3,5-diene-7,17-dione, présente dans le produit Helladrol (1A).

Le pic 2A (13.525 minutes) représente le pic le plus abondant sur le chromatogramme tandis que le 3A le second plus abondant. L'ion moléculaire pour ces deux pics est de m/z 432 suivant la dérivation triméthylsilyle, évoquant la possibilité de la présence de deux isomères de la même substance. De plus, l'ion moléculaire suggère encore la présence de deux fonctions hydroxyle ou cétone et la possibilité d'une insaturation sur un cycle dans le cas d'une seule cétone. Les ions m/z 417, m/z 342 et m/z 327 sont issus de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un HOTMS (-90 uma) et des deux groupements en question (-105 uma). La fragmentation sur le cycle B résulte aux ions m/z 221 (C-7,8 et C-9,10), m/z 195 (C-6,7 et C-9,10) puis m/z 183 (C-5,6 et C-9,10). Finalement, l'ion à m/z 169 provient de la fragmentation au niveau du cycle C entre C-12,13 et C-8,14. Ces patrons de fragmentation (figure 3.4) sont en accord avec ce qui est observé pour les stéroïdes ayant une fonction cétone en C-17 et se baseraient sur des fragmentations connues de stéroïdes à caractéristiques semblables (Fragkaki *et al.*, 2009c). Suite à l'analyse du spectre de masse associé au produit 2A, la structure du 4-androsten-3-ol-17-one était proposée. La comparaison des spectres de masse permet de confirmer que cette substance est en fait la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one, aussi retrouvée dans un autre produit sur le marché, soit le *4-SuperAndro Rx*, identifié à l'aide d'un standard de 3β -hydroxy-androst-4-èn-17-one (4-androstérone) provenant de Steraloids (Newport, États-Unis). Cette substance est connue dans la littérature comme $\Delta 4$ -DHEA et avait autrefois été testée comme inhibiteur d'aromatase (Amaral *et al.*, 2013; Jellinck *et al.*, 2006). L'utilisation d'inhibiteur d'aromatase n'est pas permise selon l'Agence mondiale antidopage, bien que la substance ne soit pas spécifiquement mentionnée dans la liste d'interdiction.

Un isomère très probable serait donc vraisemblablement la 3α -hydroxyandrost-4-èn-17-one(3A). Les mêmes mécanismes de fragmentation expliqueraient les pics observés sur le spectre de masse.

Abundance

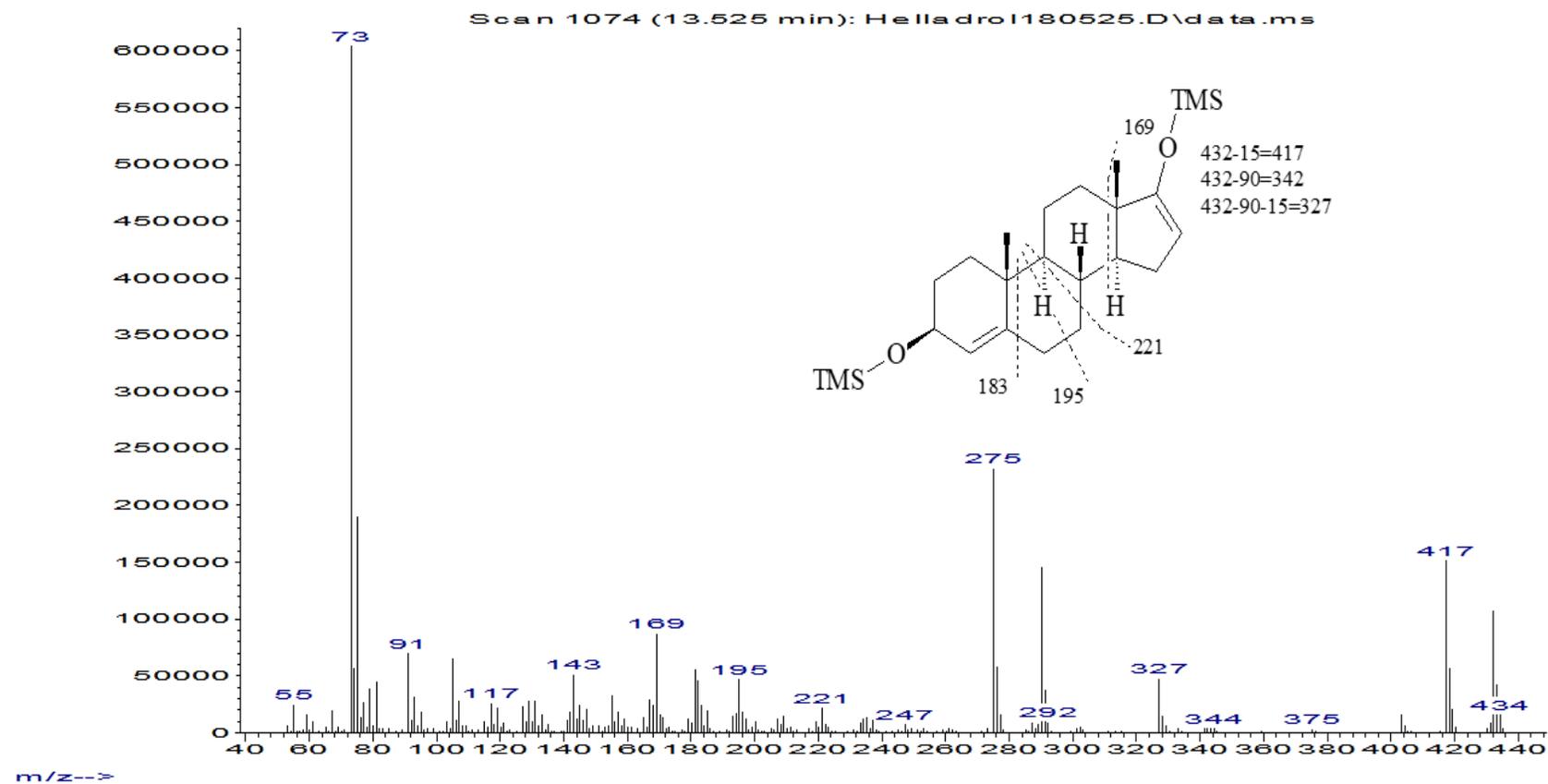


Figure 3.4 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du 4-androstene-3-ol,17-one, présent dans le Helladrol (2A).

Pic 4A : L'ion moléculaire est à m/z 290 non dérivé et à m/z 434 suivant la dérivation triméthylsilyle. Cette masse pourrait indiquer la présence d'une seule fonction cétone et une fonction hydroxyle ou deux fonctions hydroxyles accompagnées d'une insaturation sur un cycle. Il s'agit du produit le moins abondant des 5 produits identifiés dans le *Helladrol*. À partir de l'ion moléculaire m/z 434, la perte d'un groupement méthyle mène à l'ion à m/z 419 tandis que la perte d'un groupement triméthylsilanol mène à l'ion à m/z 344 (figure 3.5). L'ion à m/z 329 provient de la perte d'un autre groupement méthyle et celui à m/z 239 de la perte subséquente d'un groupement triméthylsilanol, considérant l'ion à m/z 344 comme point de départ. La fragmentation sur le cycle A entre C-1,10 et C-3,4 se traduit en l'obtention de l'ion à m/z 129, usuel aux stéroïdes ayant un alcool en C-3 et un cycle A saturé. La fragmentation prenant place sur le cycle C entre C-12,13 et C-8,14 abouti à l'obtention de l'ion à m/z 169, un mécanisme habituellement observé pour les stéroïdes possédant une cétone en C-17 (Fragkaki *et al.*, 2009c). L'analyse du spectre de masse permet de proposer la structure de l'épiandrostérone (3 β -hydroxy-5 α -androstane-17-one), contre-vérifiée par la suite avec la banque du laboratoire. Initialement, le spectre de masse associé au pic très peu abondant (figure 3.5) ne laissait pas croire en la présence d'épiandrostérone. Par contre, le spectre de masse associé au pic lorsque l'échantillon est très concentré (figure 3.6) permet de ressortir les ions caractéristiques et de confirmer la présence d'épiandrostérone. Par contre, puisque l'échantillon est très concentré et sature la colonne chromatographique, le temps de rétention est altéré. L'épiandrostérone est un stéroïde endogène possédant une faible activité androgène connue provenant du métabolisme de la déhydroépiandrostérone (Gupte *et al.*, 2002). Son usage est interdit par l'AMA (Agence mondiale antidopage, 2020). Le métabolisme de l'épiandrostérone est répertorié en présence de fractions cellulaires S9 (Chalbot & Morfin, 2005), dans d'autres tissus (El Kihel, 2012) et dans le cadre d'une étude d'excrétion (Piper *et al.*, 2017). Le conjugué sulfate de l'épiandrostérone serait un marqueur de choix quant à l'utilisation d'épiandrostérone et d'autres substances interdites (De Wilde *et al.*, 2020; Nair *et al.*, 2020; Piper *et al.*, 2017).

Abundance

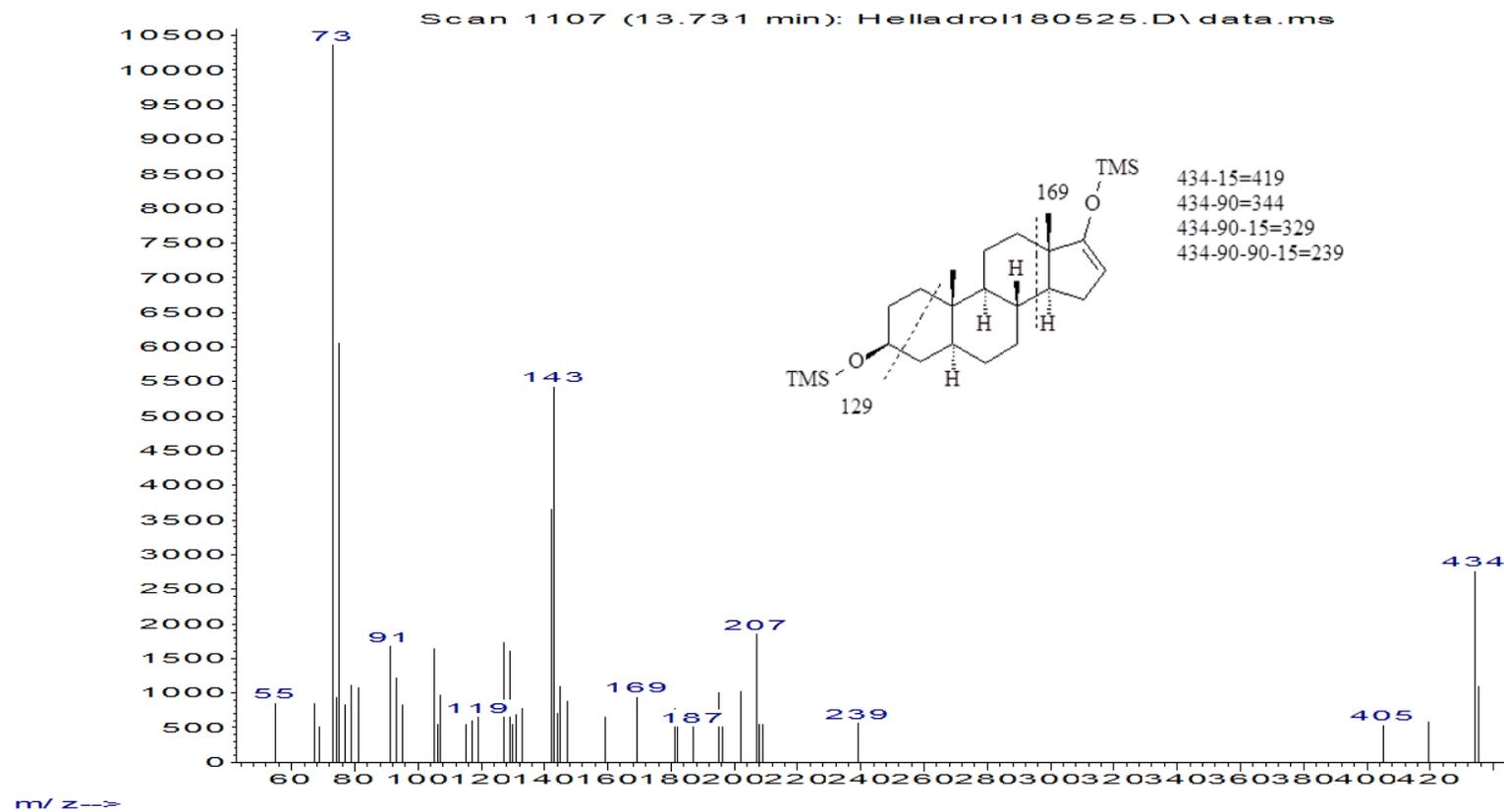


Figure 3.5 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation de l'épiandrostérone, présent dans le Helladrol(4A).

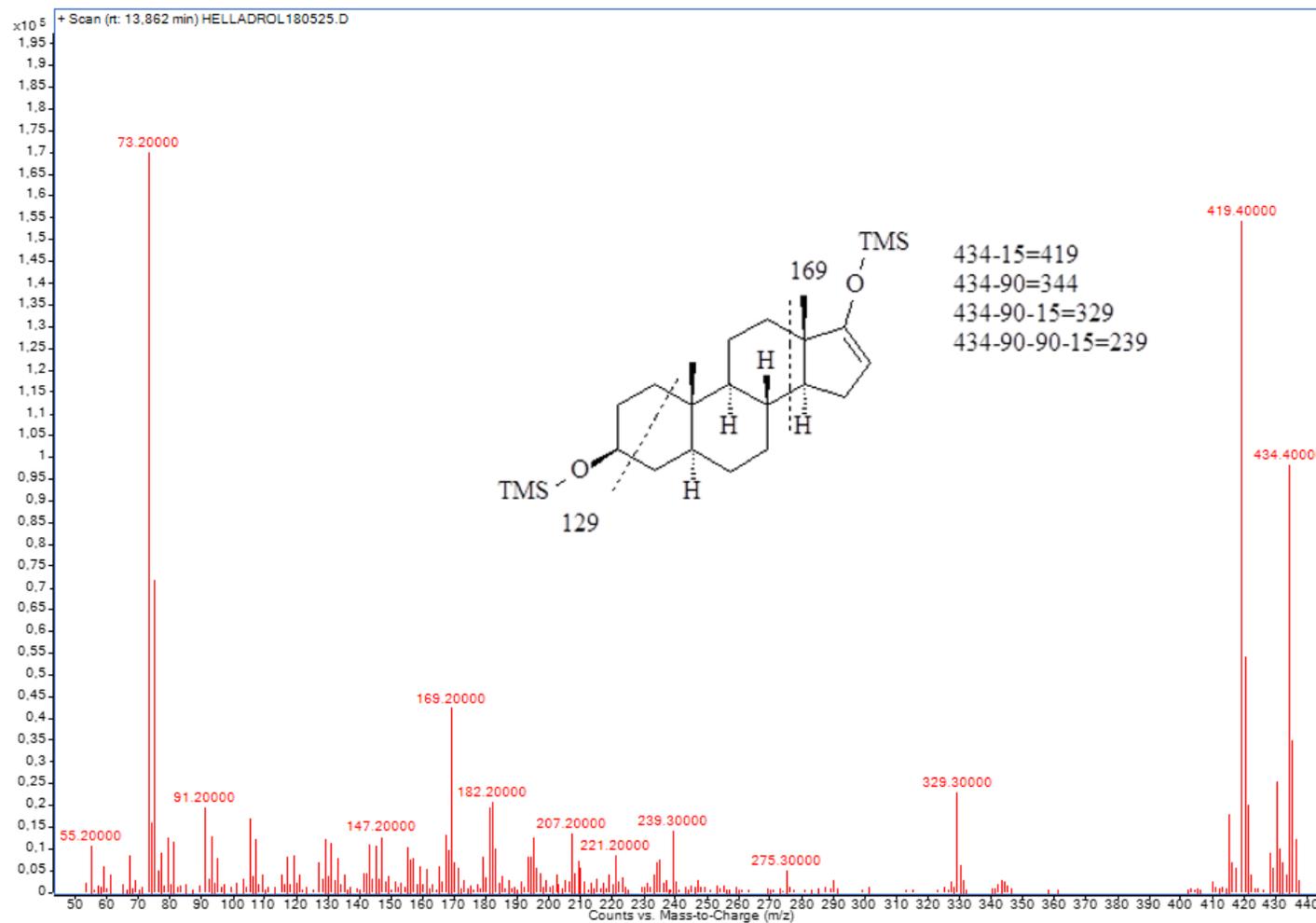


Figure 3.6 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation de l'épiandrosterone, présent dans le Helladrol(4A), suivant une injection plus concentrée pour obtenir les ions caractéristiques(saturé).

Pic 5A : L'ion moléculaire lorsque dérivé est de m/z 430 et m/z 286 lorsque non dérivé. Cette masse indiquerait la présence de plusieurs insaturations sur les cycles et la possibilité d'une fonction cétone. Il s'agit du second produit moins abondant de ceux présents dans l'*Helladrol*.

Les ions à m/z 415 et m/z 340 proviennent respectivement de la perte d'un groupement méthyle et d'un groupement triméthylsilanol (figure 3.7). La fragmentation proposée sur le cycle B est probable puisque semblable à celle observée pour des stéroïdes ayant des propriétés rapprochées (1,4-diène et cétone en C-3), à l'exception de celle menant à m/z 250/251, prenant place entre C-5,6 et C-9,10. Les ions à m/z 235 (C-6,7 et C-9,10) et m/z 207 (C-7,8 et C-9,10) se conforment aux mécanismes communs. La fragmentation sur le cycle C, entre C-12,13 et C-8,14, explique l'ion à m/z 169, typique lorsqu'une cétone se trouve en C-17 (Fragkaki *et al.*, 2009c). L'analyse du spectre de masse mène à la structure proposée du 1,4-androsten-3-ol,17-one, semblable à la boldénone (cétone en 17 plutôt qu'en 3). Cette variation de la boldénone ne semble pas répertoriée dans la littérature et représente un bon exemple de substance provenant de la modification d'une substance interdite dans le but de contrecarrer les législations.

Abundance

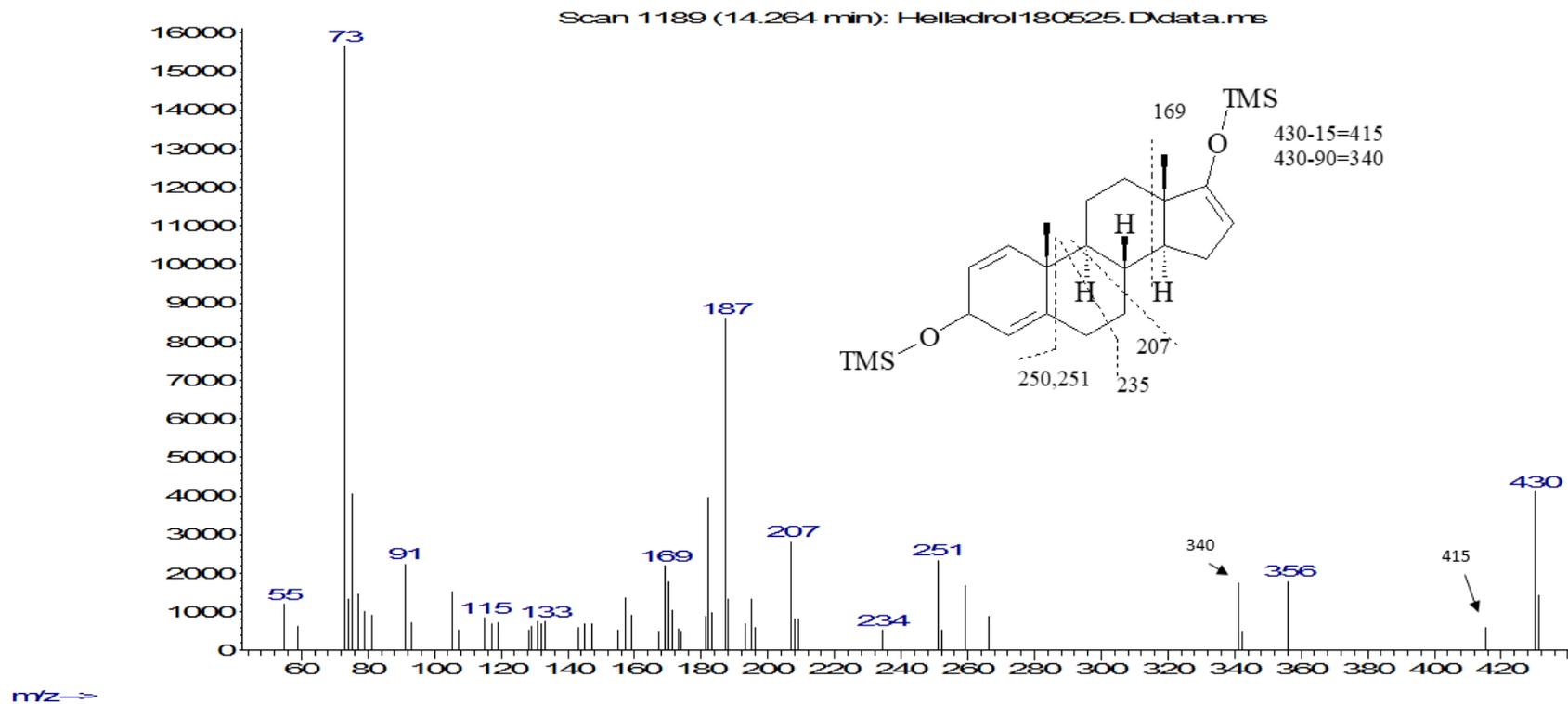


Figure 3.7 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du 1,4-androsten-3-ol,17-one, présent dans le Helladrol(5A).

3.2.2 NOR-ANDRO MAX

Le *NOR-ANDRO MAX* de *Primeval Labs* se vante de permettre l'augmentation de la masse musculaire et de la force physique. La composition du produit, telle qu'annoncé par le commerçant et les distributeurs, semble relativement simple : 75 mg de 19-NorAndro comme seul ingrédient actif, laissant croire sur ces mêmes sites qu'il s'agirait de 19-norandrostérone ou de nandrolone. Encore une fois, le produit s'identifie comme une alternative légale sans effets secondaires notables, puisqu'il s'agit d'une prohormone. L'utilisation de terminologie scientifique associée aux techniques de marketing habituelles permet la mise en valeur d'un produit encore une fois irréal. Le produit n'est plus disponible sur le site de *Primeval Labs* (<https://primevallabs.com/>; consulté 06/09/2021), mais d'autres sites le distribuent (<https://www.bestpricenutrition.com/> ; consulté 06/09/2021 ou <https://www.mysupplementstore.com/> ; consulté 06/09/2021; indisponible, mais toujours listé).



Figure 3.8 : Emballage du supplément NOR-ANDRO MAX de Primeval Labs.

L'analyse par CG-SM de l'extrait obtenu après dérivation TMS de la poudre contenue dans ces gélules montre la présence d'un seul pic majeur. Les spectres de masse du produit, cette fois incluant la dérivation TMS-éther, permettent de proposer la structure de la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one comme produit majoritaire. Le surnom DecaBolin est parfois utilisé pour référer à un produit prétendant contenir la même substance. Ainsi, il s'agirait d'un produit inversant les fonctions cétones et alcool en position C-3 et C-17 en relation avec la nandrolone. La relation avec la 4-androstérone est aussi frappante, à l'exception du H

remplaçant C-19. Celui-ci pourrait donc vraisemblablement être une prohormone de la nandrolone. Le spectre de masse correspond à celui contenu dans la banque du laboratoire.

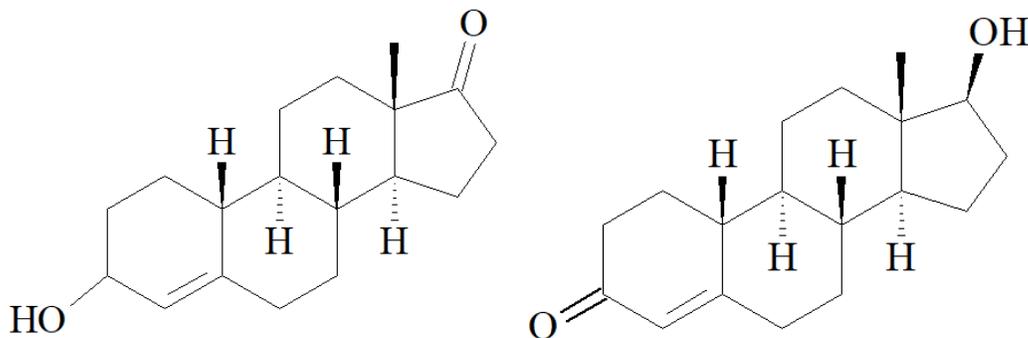


Figure 3.9 : Structures de la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one (gauche) et de la nandrolone (droite).

Le spectre de masse (figure 3.11) résultant de la dérivation triméthylsilyle (TMS-énol et TMS-éther) mène à l'obtention d'un ion moléculaire à m/z 418, la masse étant de 274 uma lorsque non dérivé. Une telle masse peut dénoter l'absence d'un groupement méthyle par rapport à la structure de base d'un androstane (- 15 uma), la présence d'insaturation(s) et/ou d'un groupement cétone. La dérivation TMS-éther mène à l'obtention d'un ion moléculaire à m/z 346, confirmant la présence d'une seule fonction hydroxyle (et donc d'une fonction cétone).

La perte de l'ion à m/z 169 au niveau du spectre de masse dérivé éther permet de confirmer la présence du groupement cétone en C-17 plutôt qu'en C-3, l'ion à m/z 169 étant typique pour les stéroïdes possédant un groupement cétone en C-17 (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Les ions à m/z 403, m/z 328 et m/z 313 proviennent respectivement de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un groupement HOTMS (-90 uma) et de la perte subséquente de ces deux groupements en question à partir de l'ion molécule à m/z 418. L'ion à m/z 221 proviendrait de la fragmentation entre C-7,8 et C-9,10 tandis que l'ion à m/z 182,183(majeur) proviendrait lui de la fragmentation en C-6,7 et C-9,10. Ce mécanisme de fragmentation est observé chez les stéroïdes 1,4-diène-3-keto et les 4-ene-3-keto (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Lorsque dérivé TMS-éther (figure 3.12), les ions à m/z 331 et 256 proviennent respectivement de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma) et d'un HOTMS (-90 uma) à partir de l'ion moléculaire à m/z 346. L'ion à m/z 129 proviendrait de la fragmentation entre C-1,10 et C-3,4, un mécanisme pouvant être observé chez les stéroïdes ayant un groupement alcool en C-3 (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Grâce à l'analyse du spectre de masse résultant de la dérivation TMS-énol TMS-éther et avec le patron de fragmentation proposé, il est possible de proposer la structure du 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one, ou 19-nor-4-androsten-3-ol-17-one, comme substance majoritaire dans le *NORANDRO MAX*. La 19-nor-4-androsten-3-ol-17-one s'apparente à la 19-nortestostérone, ou nandrolone, souvent surnommée Deca-Durabolin, inversant les fonctions hydroxyle et cétone en C-3 et C-17 (en laissant de côté la stéréochimie des fonctions hydroxyles). La littérature identifie quelques substances semblables à la 19-nor-4-androsten-3-ol-17-one, c'est-à-dire dérivées de la 19-norandrostérone, soit la 19-norandrostenedione et la 19-norandrostenediol. Leur présence sur le marché est répertoriée en 2001 et, bien qu'alors légales, mène à l'obtention de tests de dépistage positifs à la nortestostérone (Colker *et al.*, 2001). Considérant que la substance présente dans le *NORANDRO MAX* s'apparente grandement à ces deux substances, un métabolisme semblable risquerait d'être observé et pourrait mener aux mêmes conclusions, soit un test positif à la nortestostérone ou à la 19-norandrosterone (Martín *et al.*, 2001; Strahm *et al.*, 2009). Bien que les effets sur les performances et la composition corporelle ne soient pas répertoriés, il est justifiable de considérer la 19-nor-4-androsten-3-ol-17-one comme une substance illicite, particulièrement en contexte de dopage sportif. Sa présence sur le marché actuel est donc alarmante.

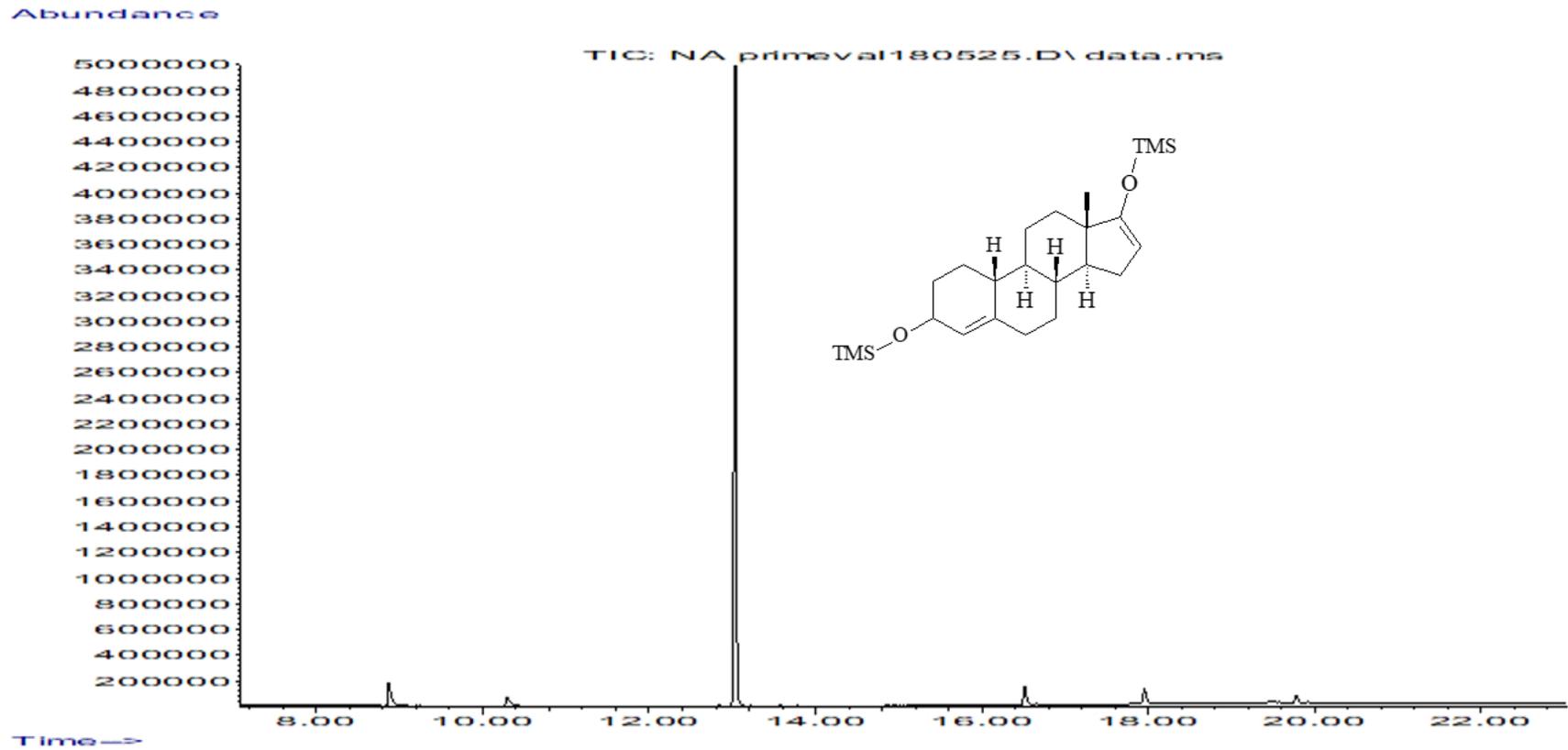


Figure 3.10 : Chromatogramme montrant le produit majoritaire dérivé TMS présent dans le NorAndro Max de Primeval Labs suivant l'injection sur CG-SM en mode balayage complet, soit la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one (TR 13.04 minutes).

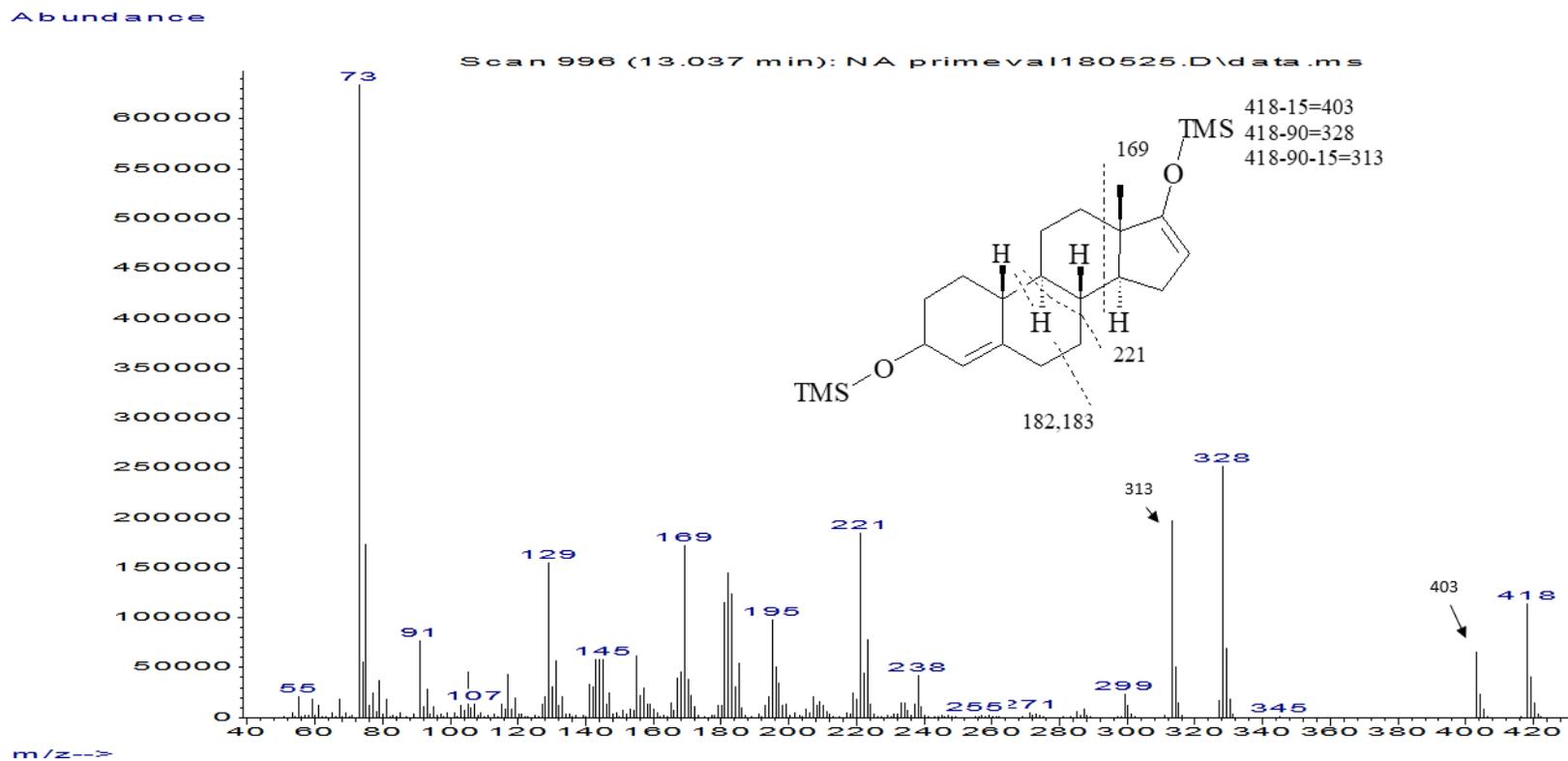


Figure 3.11 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du produit majoritaire retrouvé dans le Nor Andro Max, soit la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one.

Abundance

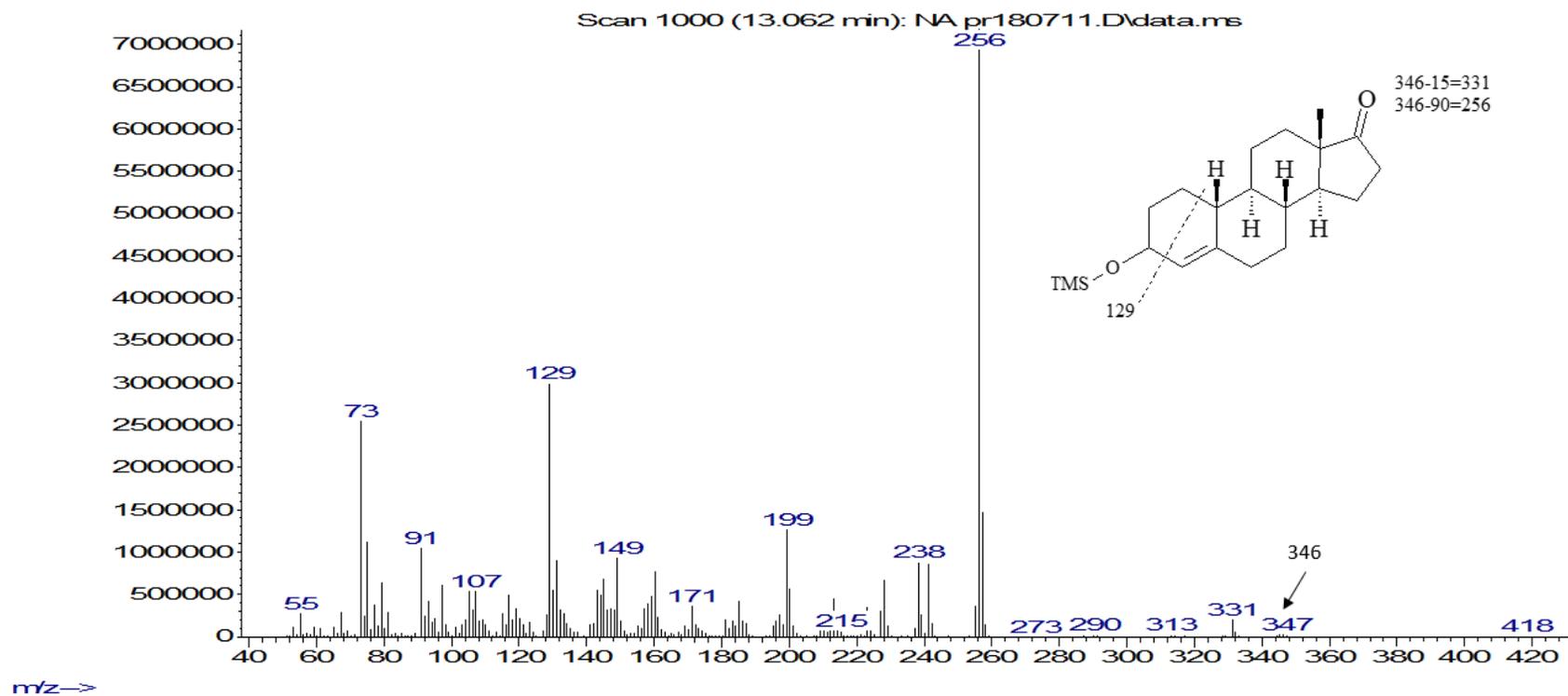


Figure 3.12 : Spectre de masse dérivé éther-TMS du produit majoritaire retrouvé dans NorAndro Max, la 3-hydroxy-estr-4-èn-17-one.

3.2.3 SuperNorAndro Rx

SuperNorAndro Rx d'Ironmag Labs, parfois surnommé *NorAndro*, est affiché comme une prohormone de la nandrolone (19-nortestostérone). Toujours accompagné des techniques visant à incorrectement informer le consommateur, *SuperNorAndro Rx* revendique des effets bénéfiques anaboliques sans toutefois être sujet aux effets androgéniques habituels, en plus d'être résistant à l'action de l'aromatase. Les effets secondaires seraient moindres ou inexistantes et le produit serait vraisemblablement sécuritaire pour usage chez la femme, du moins selon le site vendant le supplément (<https://blackdiamondsupplements.com/> ; consulté 06/09/2021). Les informations nutritionnelles indiquent la présence de 3 ingrédients : la piperine, le 6,7-dihydrobergamottin et l'ingrédient actif soit la *3 β -enanthoxynorandrost-4-en-17-one*. Le site de la compagnie (<https://www.ironmaglabs.com/> ; consulté 04/09/2020) indiquait la présence de 19 Nor-DHEA enanthate comme ingrédient actif dans le produit *SuperNorAndro* plutôt que l'appellation utilisée lors de l'acquisition initiale par le laboratoire, soit le 12 mars 2018. Bien que l'appellation originale soit utilisée dans la présentation du produit pour référer la même substance, notons le fait que la nouvelle appellation fait référence à une substance semblable, mais non identique (insaturation en C-5,6 pour la DHEA vs C-4,5 pour l'ingrédient actif présumé).

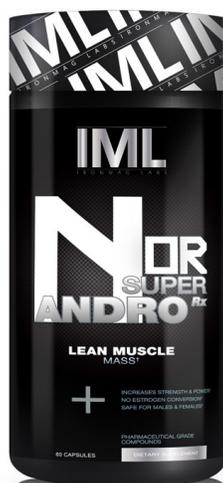


Figure 3.13 : Emballage du supplément SuperNorAndro Rx d'Ironmag Labs.

Un produit comme celui-ci permet toutefois de mettre en évidence les pratiques inacceptables des sites de ventes tels que *Ironmag Labs*. En effet, l'utilisation d'une nomenclature particulière dans le but de profiter de la notoriété d'autres produits (dans ce cas la norandro) met l'accent sur la technique employée par ces compagnies louches visant à bernier tant le consommateur que les autorités sanitaires.

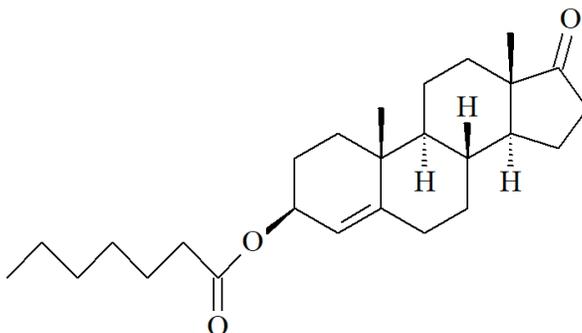


Figure 3.14 : Structure de la 3β-enanthoxynorandro-4-en-17-one, ingrédient actif indiqué sur l'emballage du SuperNorAndro.

L'analyse du chromatogramme suite à l'injection sur CG-SM en mode balayage complet permet de discerner la présence de plusieurs produits. Cependant, l'analyse des spectres de masse mène à la proposition d'une seule substance stéroïdienne, les autres ne pouvant être identifiés. En effet, la substance présumée présente en quantité importante dans le produit serait la 17-hydroxyandrost-1-en-3-one. Le nom 1-testostérone est aussi connu pour une substance semblable, l'alcool en C-17 étant en conformation β. Malheureusement, la stéréochimie de l'alcool en C-17 ne peut pas être identifiée à l'aide du spectre de masse seulement. La 3β-enanthoxynorandro-4-en-17-one ne semble toutefois pas présent dans le supplément, contrairement à ce qui est stipulé sur le produit et dans le matériel de vente. Le chromatogramme et le spectre de masse en question (incluant la structure proposée à l'aide du patron de fragmentation) sont présentés ci-dessous.

Le pic d'intérêt réfère à une substance qui lorsque dérivée triméthylsilyle, possède un ion moléculaire à m/z 432, pouvant suggérer la présence d'une fonction cétone et d'une insaturation sur un cycle. La testostérone a aussi un ion moléculaire à m/z 432 suite à la même dérivation, donc une structure semblable peut être attendue. Il semblerait s'agir de 1-testostérone ou plutôt d'un isomère de la 1-testostérone. L'identification de la stéréochimie des groupements d'intérêts est nécessaire pour confirmer la substance présente.

Les ions à m/z 417, m/z 342 et m/z 327 proviennent respectivement de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), de la perte d'un groupement triméthylsilanol (TMSOH; -90 uma) et de la perte des deux groupements précédents. Les ions à m/z 180,181 proviendraient de la fragmentation entre C-5,6 et C-9,10 alors que les ions à m/z 195 et à m/z 237 de la fragmentation entre C-6,7 et C-9,10. Finalement, les ions à m/z 129 et à m/z 303 proviennent de la fragmentation entre C-13,17 et C-14,15. Ces mécanismes de fragmentation sont en accord avec la littérature (Fragkaki *et al.*, 2009c).

L'utilisation de la 1-testostérone est interdite depuis 2005 et se trouve dans la catégorie des agents anabolisants interdits en tout temps de l'AMA (Agence mondiale antidopage, 2020). Les propriétés anaboliques et androgéniques associées à la 1-testostérone sont rapportées en 2006 (Friedel *et al.*, 2006) tandis que son métabolisme l'est par la suite (Fragkaki *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 2015).

Le spectre de masse obtenu (figure 3.16) ne correspond toutefois pas à celui de la banque du laboratoire, d'où la proposition qu'il s'agit d'un isomère de la 1-testostérone considérant la similarité du spectre de masse, mais la divergence quant au temps de rétention. Des effets semblables à ceux observés pour la 1-testostérone lors de l'administration de cette substance pourraient être observés vu la ressemblance des structures. Des études supplémentaires quant au métabolisme et aux effets anaboliques et androgéniques de cet isomère seraient justifiables.

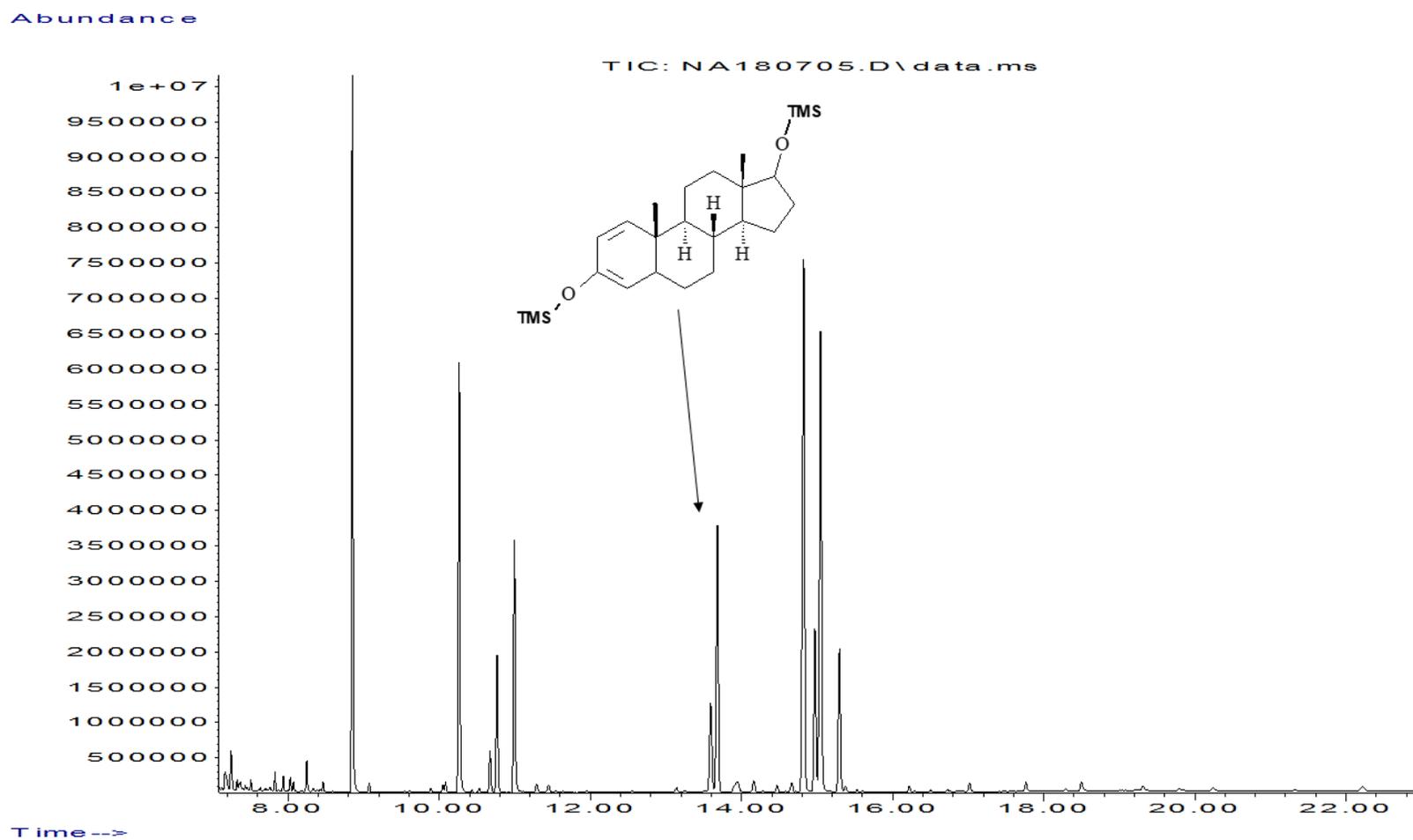


Figure 3.15 : Chromatogramme des produits présents dans SuperNorAndro d'IronMag Labs suivant la dérivation TMS et l'injection sur CG-SM en mode balayage complet. Le seul produit proposé serait un isomère de la 1-testostérone (RT 13.67 minutes), les autres produits n'ayant pas été identifiés.

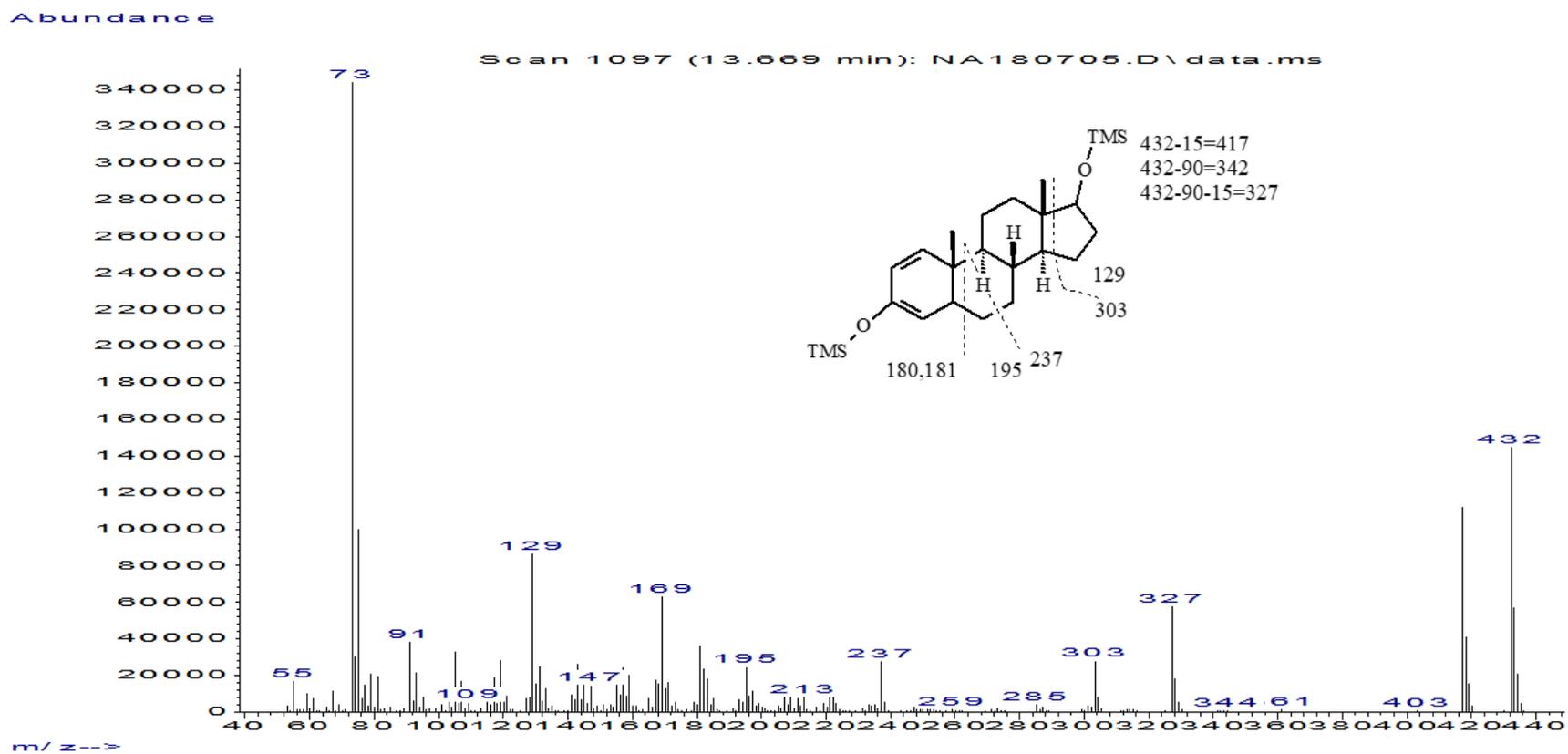


Figure 3.16 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation d'une substance présente dans le SuperNorAndro d'IronMag Labs, soit la 17-hydroxyandrost-1-en-3-one.

3.2.4 Methdrol

Le produit *Methdrol* ou *Fusion Meth* de *Fusion Supplements* réfère dès son introduction sur le site du producteur à un autre produit, soit le Super-drol (surnom de la méthastérone). La substance est encore ici vendue comme l'alternative parfaite aux agents anabolisants connus et habituels. Plusieurs prétentions sont présentes dans le matériel de vente comme l'absence d'effets secondaires œstrogéniques, l'augmentation de la masse musculaire accompagnée d'une diminution de la masse grasse. Par contre, la substance vise ici les « utilisateurs expérimentés » plutôt que la population générale (<https://www.predatornutrition.com/prohormones/fusion-supplements/fusion-meth.html> ; consulté 06/09/2021). L'ingrédient actif est indiqué comme suit au niveau des informations nutritionnelles du fusion meth : 2a-17a-dimethyl-5a-androst-3-one. Il s'agirait donc de méthastérone.



Figure 3.17 : Emballage du supplément Methdrol de Fusion supplements.

À première vue, le chromatogramme du produit dérivé triméthylsilylé semble dénoter la présence de deux substances stéroïdiennes distinctes. L'analyse des spectres de masse de ces pics particuliers permet de confirmer qu'il s'agit en fait d'une substance majoritaire et de proposer son épimère, largement moins abondant. La structure identifiée pour la substance présente dans le *Methdrol* est donc la 2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androst-3-one (et son épimère en C-17 proposé), en accord avec les informations nutritionnelles du supplément. Le chromatogramme et les spectres de masse menant à cette conclusion sont présentés ci-dessous et sont en accord avec ce qui avait été observé au laboratoire auparavant (Gauthier *et al.*, 2009).

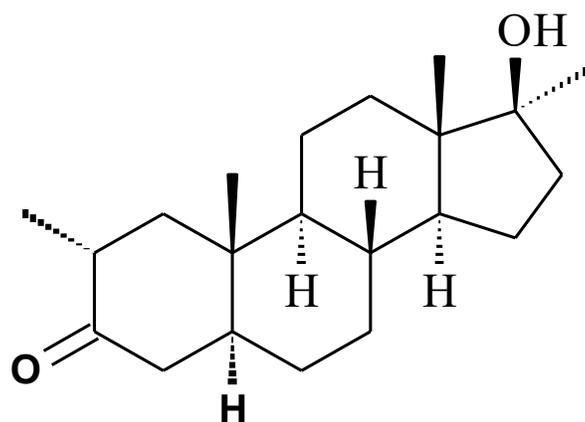


Figure 3.18 : Structure de la 2 α -17 α -diméthyl-5 α -androst-3-one, indiqué comme produit actif dans le *Methdrol*.

Abundance

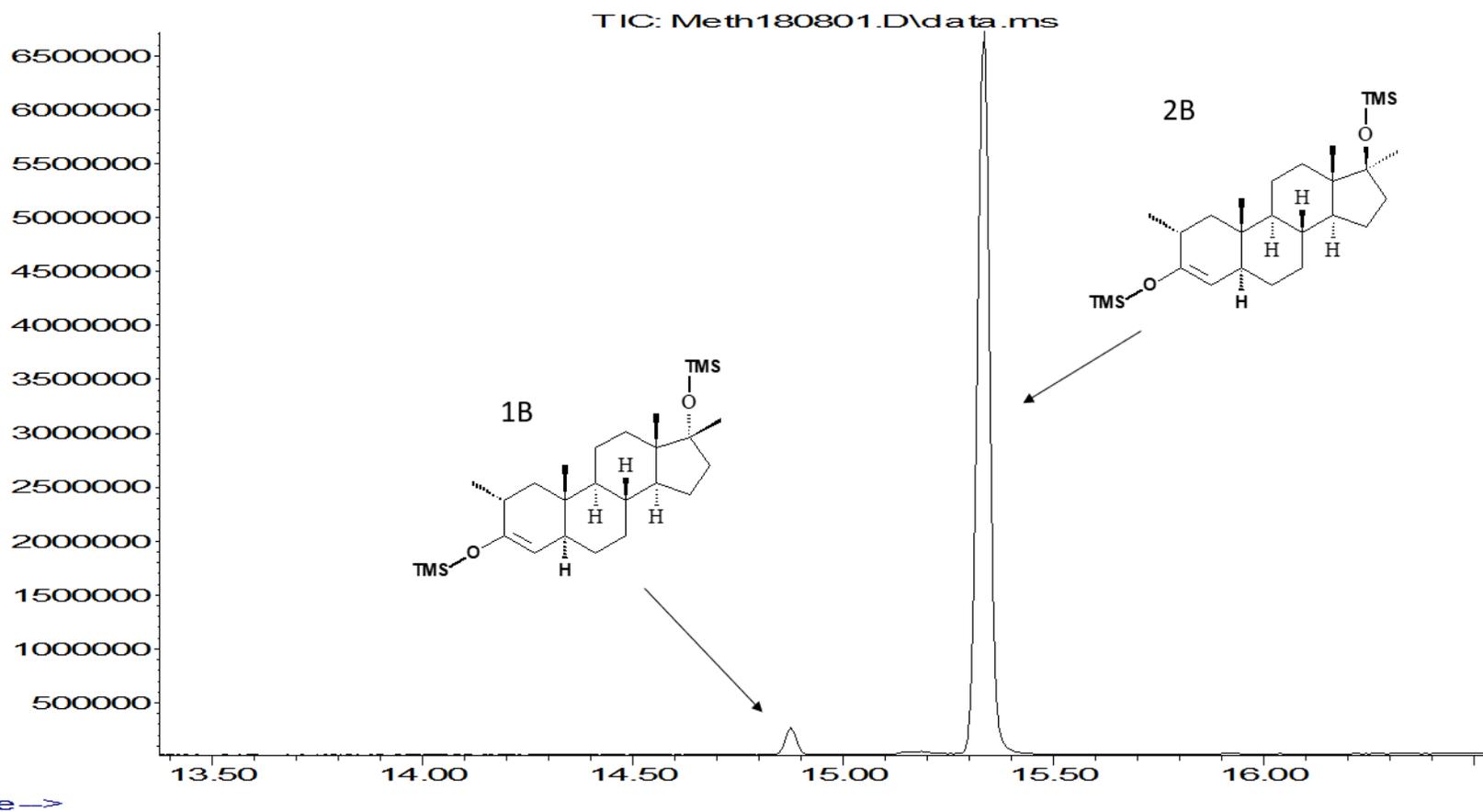


Figure 3.19 : Chromatogramme des substances dérivées TMS présentes dans le Methrol de Fusion supplements et suivant l'injection sur CG-SM en mode balayage complet. Pic 1B : 2 α ,17 β -dimethyl-5 α -androstan-17 α -ol-3-one (TR 14.9 minutes), pic 2B : 2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one (TR 15.3 minutes).

Tels qu'observés à la figure 3.19, 2 pics d'intérêts sont présents au temps de rétention 14.9 minutes et 15.3 minutes.

Tout d'abord, l'ion moléculaire du produit associé au spectre de masse du pic 2B est ici à m/z 462 (dérivé triméthylsilyle) et à m/z 318, lorsque non dérivé. Le spectre de masse (figure 3.21) du produit représenté par le pic 2B dans le chromatogramme (figure 3.19) correspond au spectre de masse de la banque du laboratoire pour la $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- 17β -ol-3-one, aussi répertorié dans la littérature par (Ayotte *et al.*, 2006), confirmant ainsi l'identification de la méthastérone. Le métabolisme de la méthastérone est connu (Gauthier *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2019; Parr *et al.*, 2006) et son usage en contexte sportif est interdit en permanence (Agence mondiale antidopage, 2020).

L'ion moléculaire associé au pic 1B est à m/z 462 suite à la dérivation triméthylsilyle. Cette variation du spectre de masse n'étant pas répertoriée dans la littérature, une analyse de celui-ci et la proposition du patron de fragmentation sont justifiables. Lorsque non dérivée, la masse du produit en question est de 318 uma. Une telle masse suggère la présence de fonctions supplémentaires, considérant que l'ion moléculaire de la testostérone lorsque dérivé triméthylsilyle est à m/z 432. L'ajout de 2 groupements méthyles (15 uma chacun) et la saturation du cycle A permettraient d'expliquer la différence de masse. Le spectre de masse à RT 14.875 (figure 3.20) correspondrait à un épimère en C-17 de la méthastérone ($2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- 17β -ol-3-one), soit la $2\alpha,17\beta$ -diméthyl- 5α -androstane- 17α -ol-3-one. Un autre épimère (épimérisation en C-5) de la méthastérone associé à son métabolisme est rapporté (Magalhães *et al.*, 2019), mais son usage à des fins de dopage semble inexistant. Les ions à m/z 447, m/z 372 et m/z 357 proviennent de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un groupement triméthylsilanol (TMSOH ; -90 uma) et de la perte subséquente des deux groupements en question (-105 uma), en accord le patron de fragmentation de la $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- 17β -ol-3-one (Ayotte *et al.*, 2006). La fragmentation entre C-5,6 et C-9,10 explique l'obtention des ions à m/z 195 et m/z 267. Lorsque fragmenté entre C-6,7 et C-9,10, l'ion obtenu à m/z 210 est associé au fragment incluant le cycle A. Les mécanismes de fragmentations visant le cycle D mènent aux ions à m/z 130 et m/z 332 (C-15,16 et C-13,17) et à l'ion à m/z 143 (C-14,15 et C-13-17). Les mécanismes de fragmentation se rapportant au cycle D sont en accord avec ce qui est habituellement observé tandis que ceux se rapportant aux cycles A et B semblent moins usuels (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Abundance

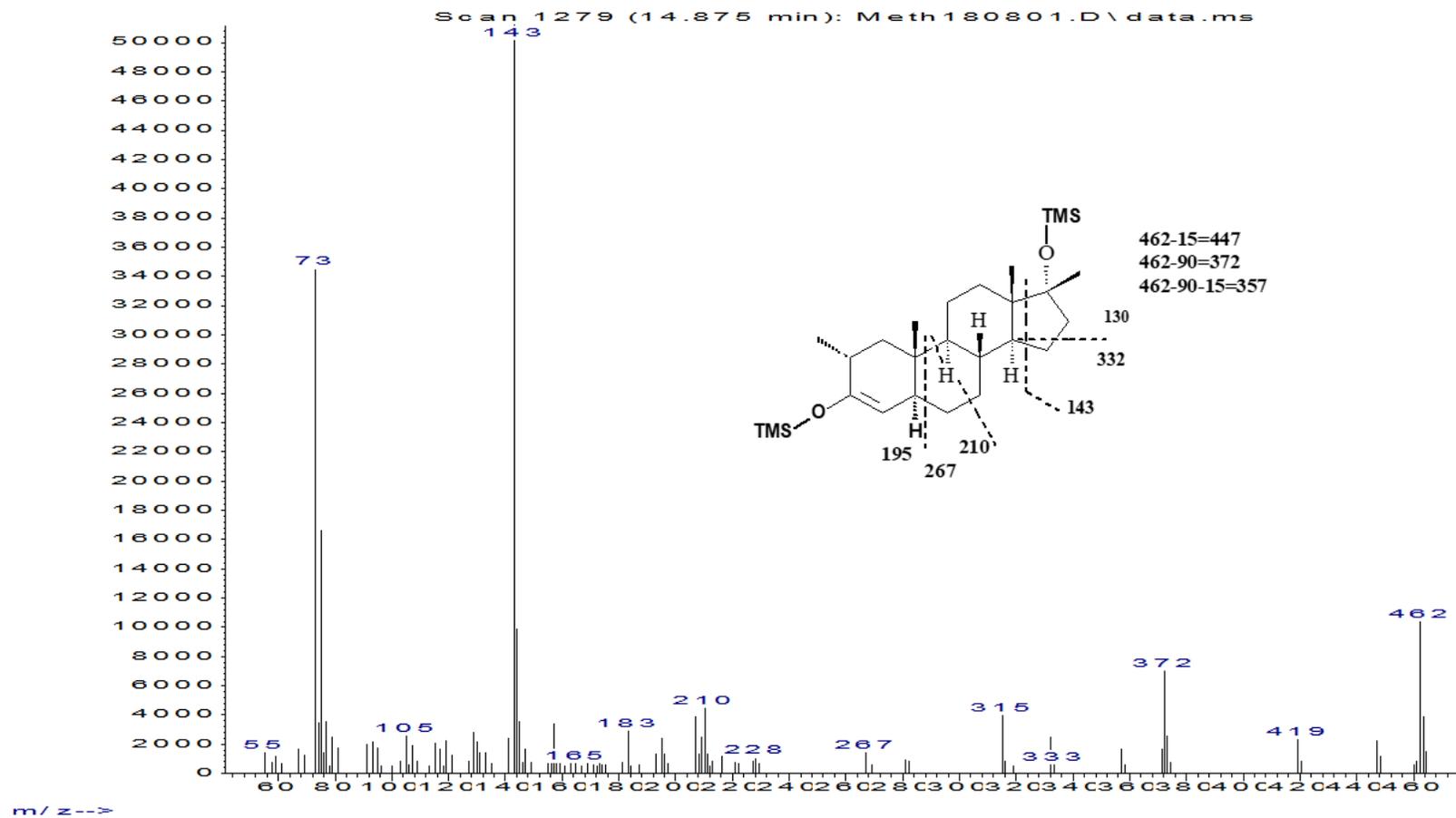


Figure 3.20 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation pour la 2 α ,17 β -diméthyl-5 α -androstane-17 α -ol-3-one (épipère du produit d'intérêt), présent dans le Methrol(1B).

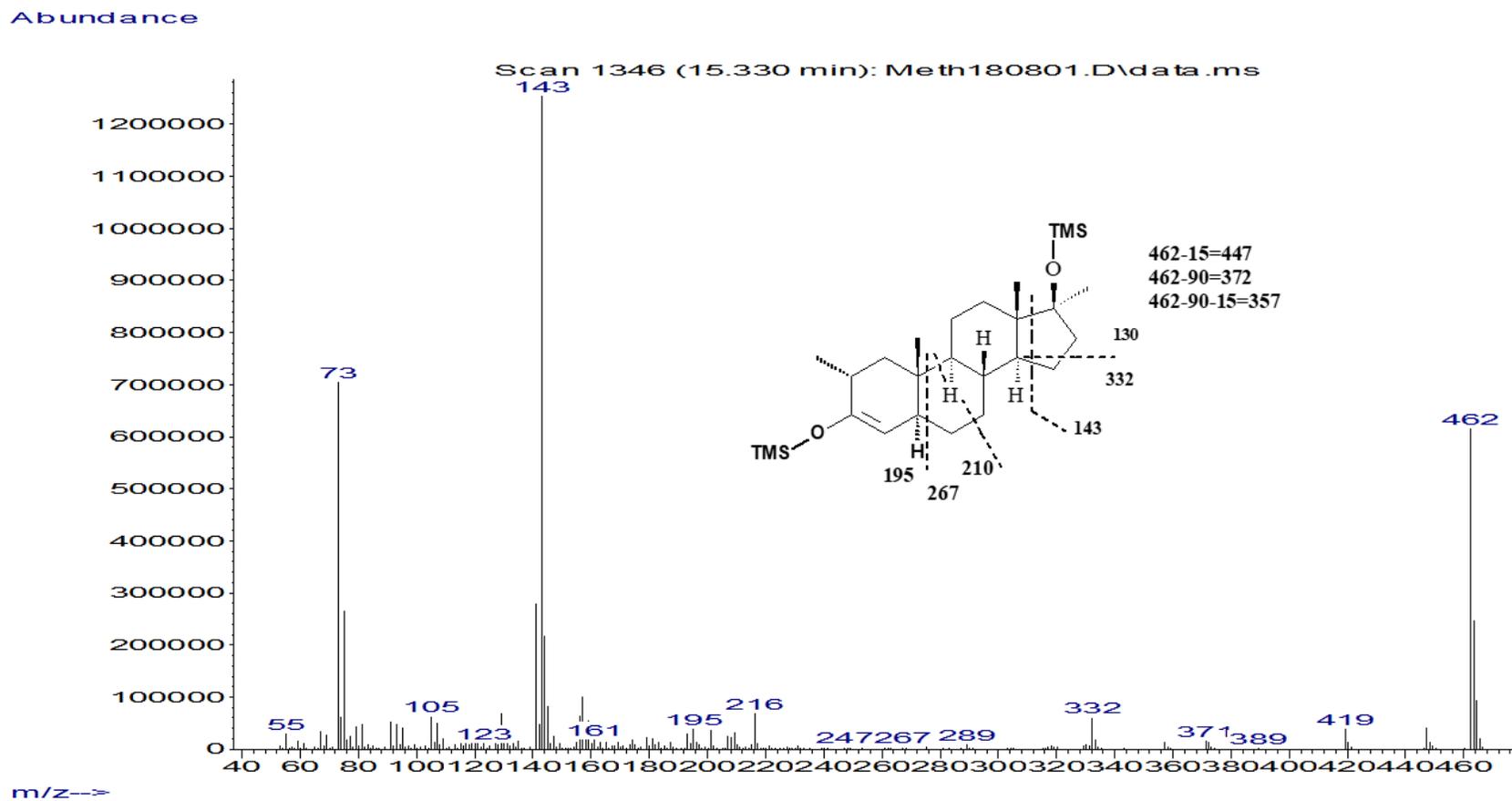


Figure 3.21 : Spectre de masse pour la 2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one, présent dans le Methdrol(2B).

3.2.5 HALODROL

Un autre produit populaire de la compagnie *Fusion supplements* est l'halodrol. Définis comme une prohormone, les sites de revente profitent de la notoriété de ce stéroïde synthétique en mentionnant son utilisation par l'Allemagne de l'Est. Les avantages mentionnés attribués à l'halodrol sont multiples et irréalistes : importante augmentation de la masse musculaire et de la force, diminution de la masse grasse, et ce, sans effet œstrogénique. Ce produit est attrayant pour les amateurs, car il est considéré comme moins toxique que ses homologues. L'ingrédient actif mentionné est cette fois le *4-chloro-17 α -methyl-androst-1,4-diene-3 β ,17 β -diol* (promagnon). Le nom *Halodrol* avait aussi été utilisé auparavant pour commercialiser un produit semblable (Gauthier *et al.*, 2012).



Figure 3.22 : Emballage du supplément Halodrol de Fusion supplements.

Le chromatogramme du produit suivant la dérivation chimique triméthylsilyle et l'injection sur CG-SM montre la présence de trois substances stéroïdiennes. L'analyse des spectres de masse permet de proposer les structures suivantes : la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-1,4-diene-3-one, la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-en-3-one et son épimère en C-17.

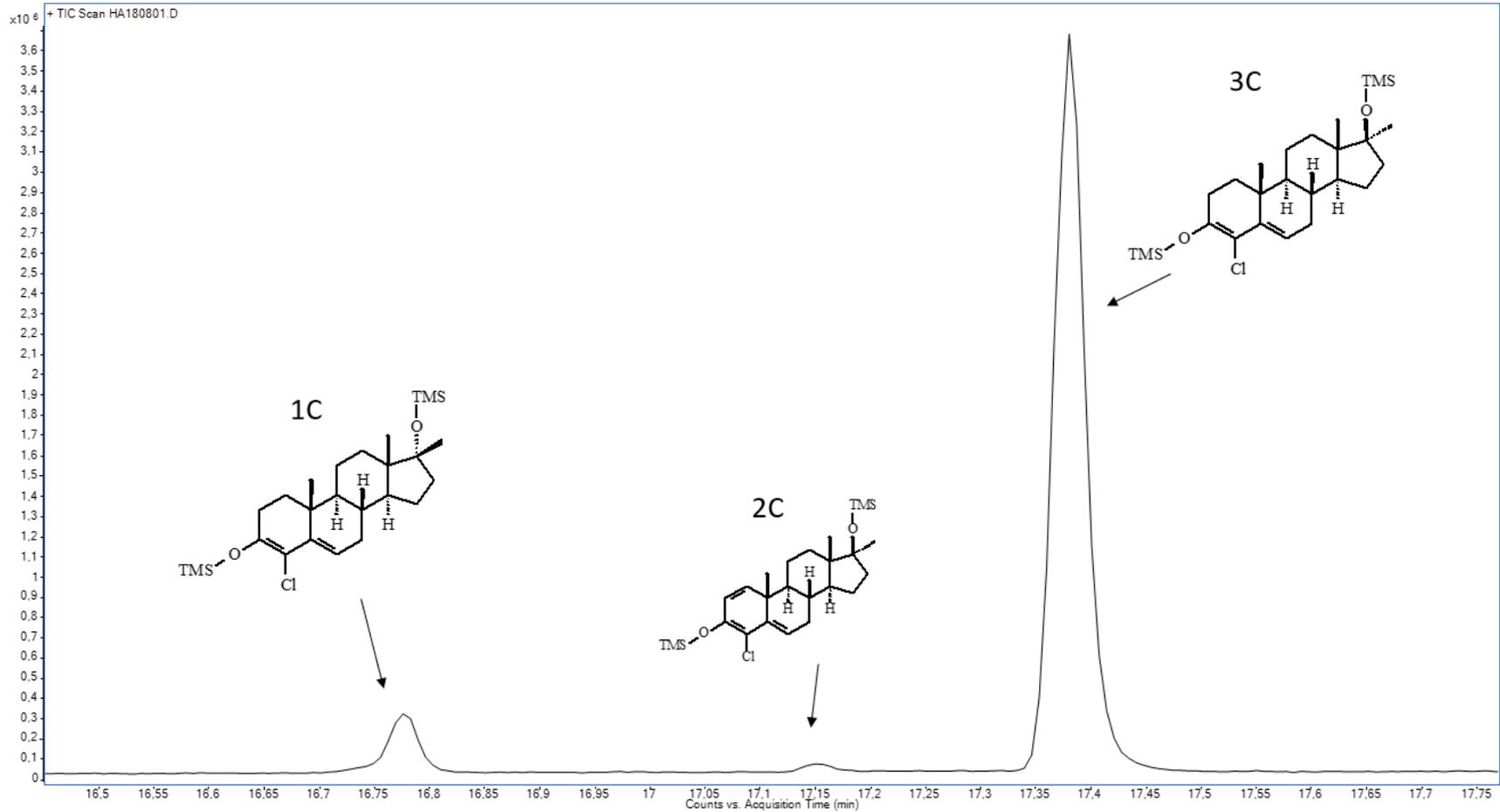


Figure 3.23 : Chromatogramme des substances présentes dans le supplément Halodrol suivant la dérivation chimique et l'injection sur CG-SM en mode balayage complet. Pic 1C : 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandroste-4-èn-3-one (TR 16.78 minutes), pic 2C : 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandroste-1,4-dièn-3-one (TR 17.1 minutes), pic 3C : 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandroste-4-èn-3-one (TR 17.38 minutes).

Suivant la dérivation triméthylsilyle, l'ion moléculaire de la substance pour le pic 1C à 16.78 minutes est de m/z 480. Non dérivée, cette substance a une masse de 336. La présence de groupements supplémentaires, en prenant la testostérone comme point de départ (m/z 432), est à prévoir. En prenant l'information présente sur les informations nutritionnelles et en prenant la différence de masse avec la testostérone (soit de 48 uma), il est possible de supposer que ces groupements supplémentaires seraient un groupement méthyle (15 uma) et un chlore (35 uma), totalisant 50 uma (-2 H lors de l'addition des groupements, expliquant le 2 uma restant). Le spectre de masse (figure 3.24) permet de confirmer la présence d'un chlore par le motif A + 2, prenant en considération la contribution isotopique du chlore 37. Ce motif est connu pour certains atomes ayant des isotopes plus abondants (McLafferty *et al.*, 1993). Les ions à m/z 465, 390 et 375 découlent respectivement de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un groupement triméthylsilanol (-90 uma) et de ces deux groupements en question (-105 uma). L'ion à m/z 445 provient de la perte du chlore (-35 uma) à partir de l'ion moléculaire, perte confirmée par l'absence du motif A + 2, associé à l'atome de chlore. La fragmentation du cycle B mène à l'ion à m/z 242, provenant du bris des liaisons entre C-9,10 et C-7,8. Les patrons de fragmentation habituels associés aux stéroïdes méthylés en C-17 sont observés, menant aux ions m/z 143 (C-13,17 et C-14,15) et m/z 130/350 (C-13,17 et C-15,16) (Fragkaki *et al.*, 2009c). Finalement, l'ion à m/z 335, particulièrement abondant, proviendrait de la perte d'un groupement méthyle à partir de l'ion à m/z 350, précédemment décrit. Ici encore, l'isomère ne semble pas répertorié comme substance d'intérêt en contexte de dopage, mais le produit mère (pic 3C) est lui bien connu et sera discuté par la suite.

L'ion moléculaire à m/z 478 et 17.1 minutes lorsque dérivé et à 334 lorsque non dérivé pour le pic 2C peut sous-entendre la présence d'une insaturation supplémentaire par rapport à l'autre substance présente dans le produit (m/z 480). L'analyse et la comparaison avec la banque de spectre de masse connu du laboratoire permet de proposer qu'il s'agit de 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-1,4-dièn-3-one (déhydrochlorométhyltestostérone; DHCMT). La DHCMT est un stéroïde anabolisant, aussi connu comme étant le dérivé chloré de la métandiénone. L'utilisation de la DHCMT, parfois surnommé oral-turinabol, est plus particulièrement associée au scandale entourant le programme de dopage gouvernemental de l'Allemagne de l'Est durant les années 1960 (Thieme & Hemmersbach, 2009). L'utilisation de la DHCMT est interdite en tout temps en contexte sportif, étant listée auprès des stéroïdes anabolisants de l'AMA (Agence mondiale antidopage, 2020). Le métabolisme de cette substance a fait l'objet de plusieurs études (Forsdahl *et al.*, 2018; Kozyrkov *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 1991; Sobolevsky & Rodchenkov, 2012).

Le pic 3C à 17.38 minutes représentant la substance majoritaire du produit *Halodrol*, son identification est centrale. L'ion moléculaire non dérivé étant m/z 336 et dérivé triméthylsilyle étant m/z 480, une substance semblable à celle observée pour le pic 1C est attendue. Les ions d'intérêts étant les mêmes que ceux observés pour le pic 1C (bien que variant en abondance), le même raisonnement et les mêmes patrons de fragmentation permettent de les expliquer. De plus, suite à la comparaison auprès de la bibliothèque du laboratoire et auprès d'un standard de référence, il est possible de confirmer que le pic 3C correspond bel et bien à la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandroste-4-èn-3-one, mieux connu sous le nom de méthylclostébol. Le méthylclostébol est une substance connue et abusée en contexte de dopage sportif, étant le dérivé chloré de la méthyltestostérone (Franke & Berendonk, 1997; Lootens *et al.*, 2011; Rahnema *et al.*, 2015). Peu de littérature se rapporte toutefois à son métabolisme (Lootens *et al.*, 2011). Tout comme la DHCMT, l'usage du méthylclostébol est interdit en tout temps par l'AMA. Bien que le méthylclostébol se métaboliserait en promagnon lors de son administration, la substance définie et identifiée par le fabricant n'est pas celle retrouvée dans le produit. Il s'agit ici d'un autre exemple de mauvaise pratique du fabricant.

Plusieurs des produits identifiés ci-dessus et le métabolisme associé étant déjà pour la plupart connus de la littérature, les quatre substances suivantes ont été retenues pour la suite des tests. En effet, le métabolisme associé à chacun des quatre produits semblait moins bien connu du milieu, confirmant le besoin de tester ceux-ci avec le modèle des fractions cellulaires S9, que ce soit pour confirmer le peu de connaissances recensé et/ou permettre d'obtenir de nouvelles connaissances entourant ces substances non répertoriées.

Abundance

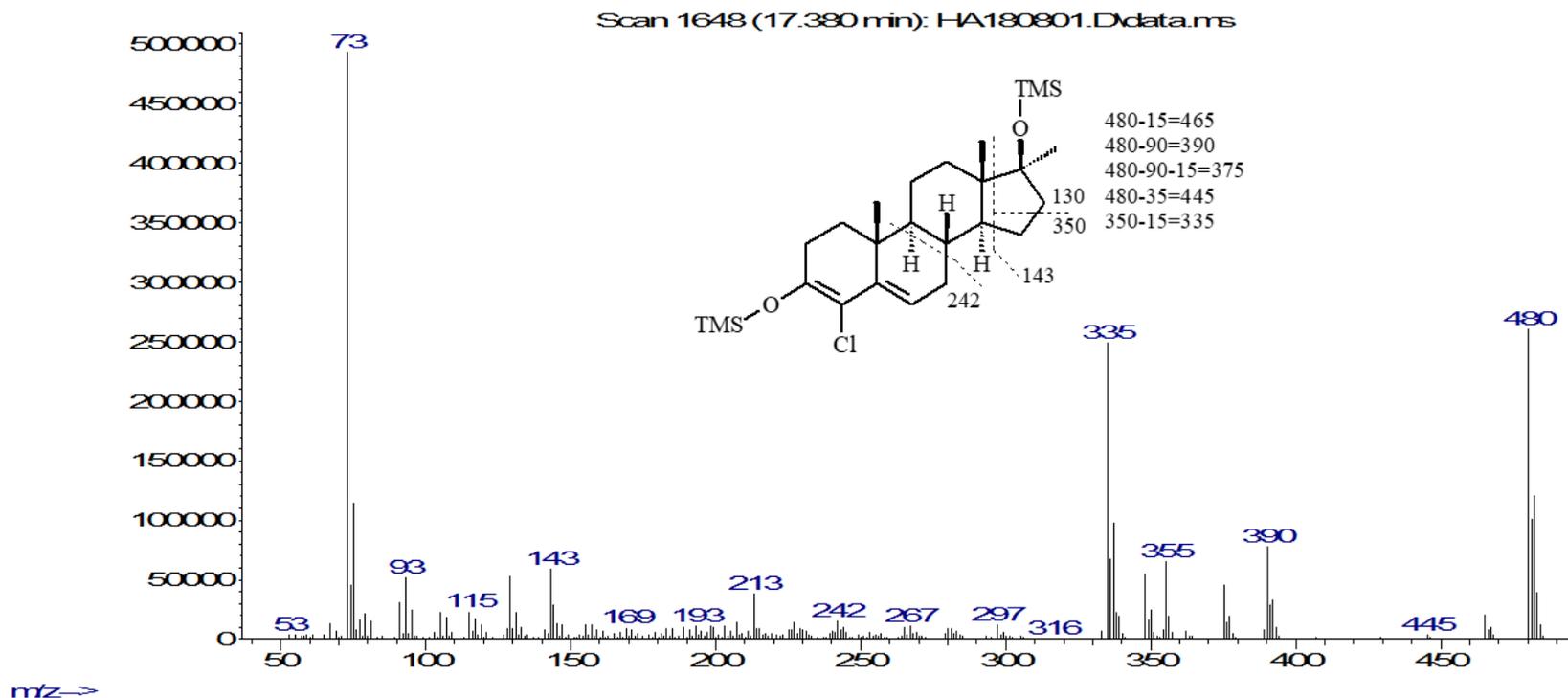


Figure 3.24 : Spectre de masse et structure proposée à l'aide du patron de fragmentation du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrosta-4-èn-3-one, substance majoritaire présente dans le Halodrol(3C).

3.3 Identification des produits retenus pour les incubations

Les substances d'intérêt contenues dans les produits retenus pour les tests impliquant les incubations en présence des fractions cellulaires S9 ont été identifiées à l'aide de standard, lorsque disponibles. Comme précédemment vue, l'interprétation des chromatogrammes à l'aide des temps de rétention et des spectres de masse des pics servira à l'identification des composés. En effet, l'identification est satisfaisante lorsque la substance inconnue et le standard (connu) possèdent des temps de rétentions et des spectres de masse équivalents, voire identiques (Ayotte *et al.*, 1996). Une variation au niveau du chromatogramme pourrait dénoter une différence quant à l'orientation des groupements présents ou tout simplement une autre substance complètement (considérant que l'ion moléculaire serait le même). Dans les 2 cas, le spectre de masse pourrait montrer une variation minime quant à l'abondance des pics pour une substance semblable tandis qu'une substance tout autre démontrerait un spectre de masse complètement différent (Halket *et al.*, 2005).

3.3.1 Identification du 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one dans le 1-Superandro et le 1-Andro MaxV2

L'identification de la substance majoritaire dans le 1-Superandro Rx d'IronMag Labs et le 1-Andro Max V2 de Primeval Labs permet aussi de confirmer la stéréochimie des différents groupements et atomes présents sur la substance. Deux standards de référence étaient disponibles, le premier étant la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one et l'autre son épimère. Le produit 1-Superandro d'IronMag Labs, d'après les informations nutritionnelles apposées, devrait contenir du 3 β -enanthoxyandrost-1-en-17-one comme ingrédient actif. Ainsi, la forme non estérifiée attendue du composé serait la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one.



Figure 3.25 : Emballage du produit 1-SuperAndro d'IronMag Labs et l'étiquette d'informations nutritionnelles du produit.

Le 1-Andro Max V2 de Primeval Labs contiendrait quant à lui de la 1-androstérone comme ingrédient principal. Le surnom 1-androstérone réfère habituellement à la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \AA -17-one ou à son épimère.

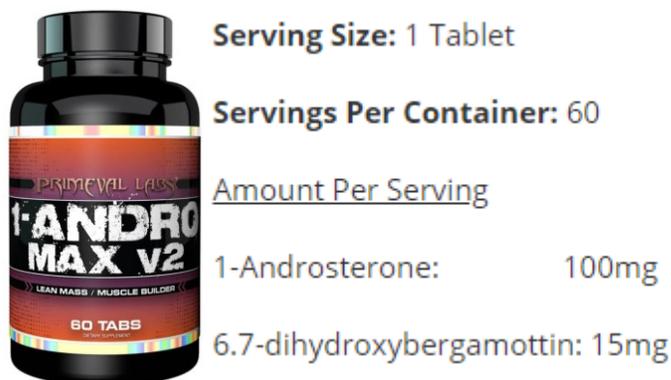


Figure 3.26 : Emballage du 1-Andro Max V2 de Primeval Labs et les ingrédients affichés en ligne.

L'injection de l'extraction dérivée TMS-énols du *1-SuperAndro* sur CG-SM en mode balayage complet permet l'obtention du chromatogramme à la figure 3.27. Un produit, représenté par le pic à 13.662 minutes, est grandement plus abondant que les deux autres pics présents sur le chromatogramme. Les produits associés à ces pics mineurs seraient possiblement ceux mentionnés dans les informations nutritionnelles. Le produit majoritaire serait donc le produit d'intérêt nécessitant l'identification.

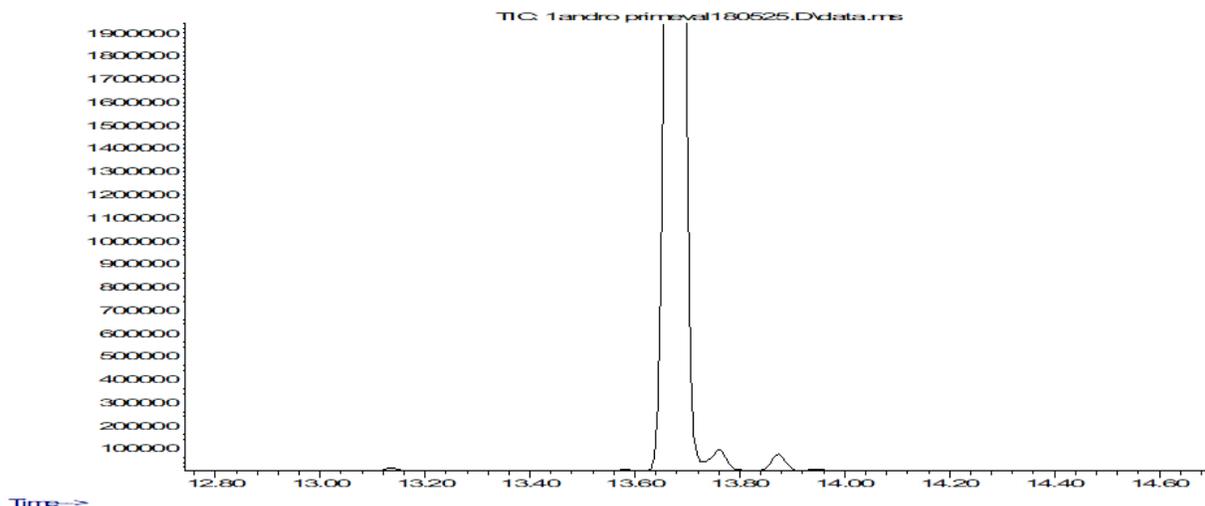


Figure 3.27 : Chromatogramme des produits retrouvés dans le supplément *1-Superandro* d'IronMag Labs, le produit majoritaire étant la 3β -hydroxy- 5α -androst-1-èn-17-one (TR 13.66 minutes).

L'analyse du spectre de masse du produit en comparant avec le spectre de masse du standard de référence permet de confirmer qu'il s'agit bel et bien de la même substance, soit la 3β -hydroxy- 5α -androst-1-èn-17-one. En effet, les spectres de masse sont identiques (figures 3.29 et 3.30). De plus, l'écart entre les temps de rétention est minime et donc convenable à l'identification. Ainsi, il est possible de confirmer que le produit présent dans le *1-SuperAndro* est bel et bien la 3β -hydroxy- 5α -androst-1-èn-17-one grâce à l'identification à l'aide d'un standard de référence connu.

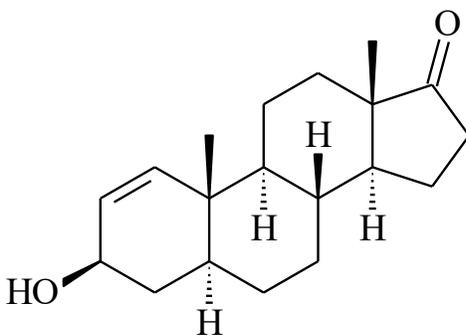


Figure 3.28 : Structure du 3β -hydroxy- 5α -androst-1-èn-17-one, identifiée dans le *1-Superandro*.

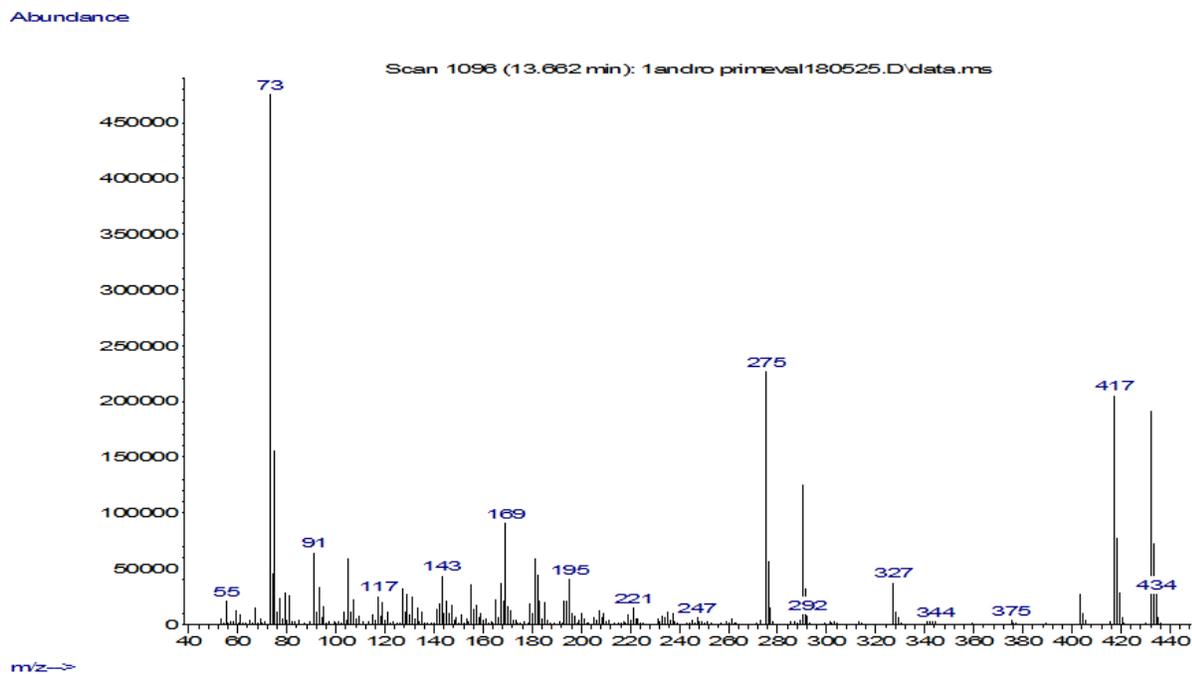


Figure 3.29 : Spectre de masse du produit majoritaire présent dans le supplément 1-Superandro.

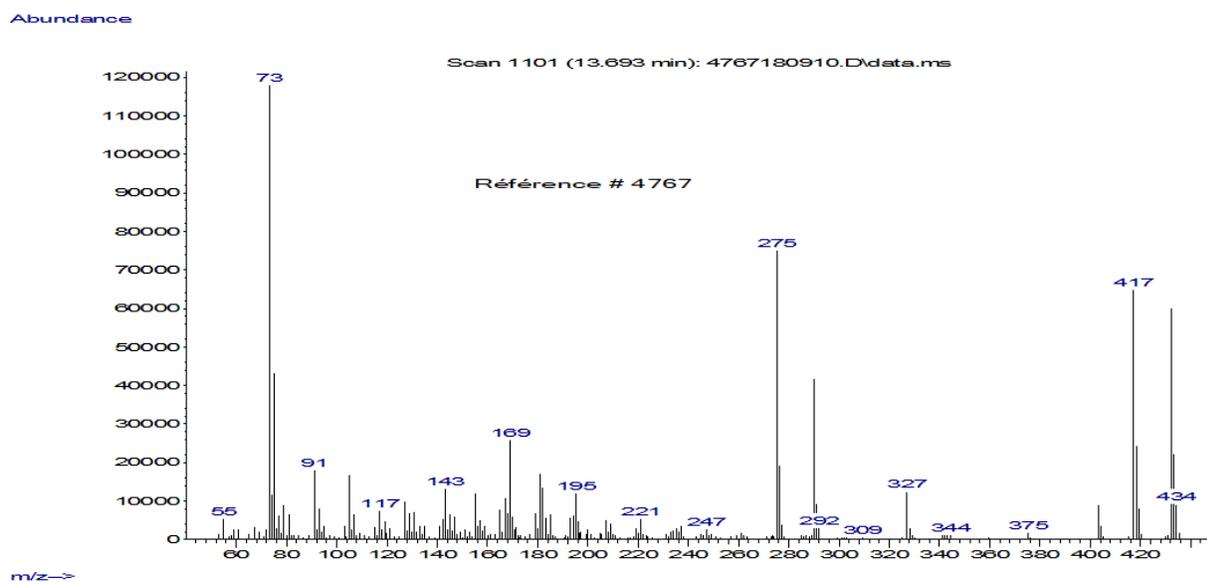


Figure 3.30 : Spectre de masse du standard de référence, étant du 3β -hydroxy- 5α -androst-1-èn-17-one (plus communément surnommé 1-épiandro).

3.3.2 Identification du 3 β -hydroxyandrost-4- \`e n-17-one dans le 4-Superandro

Les analyses CG-SM du 4-Superandro dévoile encore ici une substance vastement majoritaire accompagnée de traces d'autres produits. L'orientation des groupements clés est encore ici très importante, voire centrale, à l'identification de la substance en circulation. L'ingrédient actif principal présent dans le 4-Superandro est déclaré par le fabricant comme étant du 3 β -enanthoxyandrost-4-en-17-one. La substance non estérifiée attendue devrait donc être la 3 β -hydroxyandrost-4-en-17-one.



Figure 3.31 : Emballage du produit 4-Superandro d'IronMag Labs et l'étiquette d'informations nutritionnelles du produit.

Des standards de référence de 3 α -hydroxyandrost-4- \`e n-17-one et de 3 β -hydroxyandrost-4- \`e n-17-one sont disponibles au laboratoire. L'injection sur CG-SM est ici non dérivée et expose une situation particulièrement intéressante. En effet, l'injection de la substance non dérivée, bien qu'extraite et relativement pure, mène à l'obtention de plusieurs pics sur les chromatogrammes, tant pour la substance que pour les standards de référence. Les autres pics observés représentent des produits secondaires provenant d'une réaction d'élimination d'eau à partir de l'alcool en C-3 et d'un carbone vicinal. Ceci permet l'obtention d'une conjugaison supplémentaire visant à augmenter la stabilité de la molécule à haute température, puisque non dérivée. Cette situation démontre l'importance et même la nécessité de la dérivation chimique préalablement à l'injection sur CG-SM, permettant l'obtention d'un seul pic sur le chromatogramme suivant la dérivation plutôt que plusieurs, comme montré au niveau de la figure 3.34.

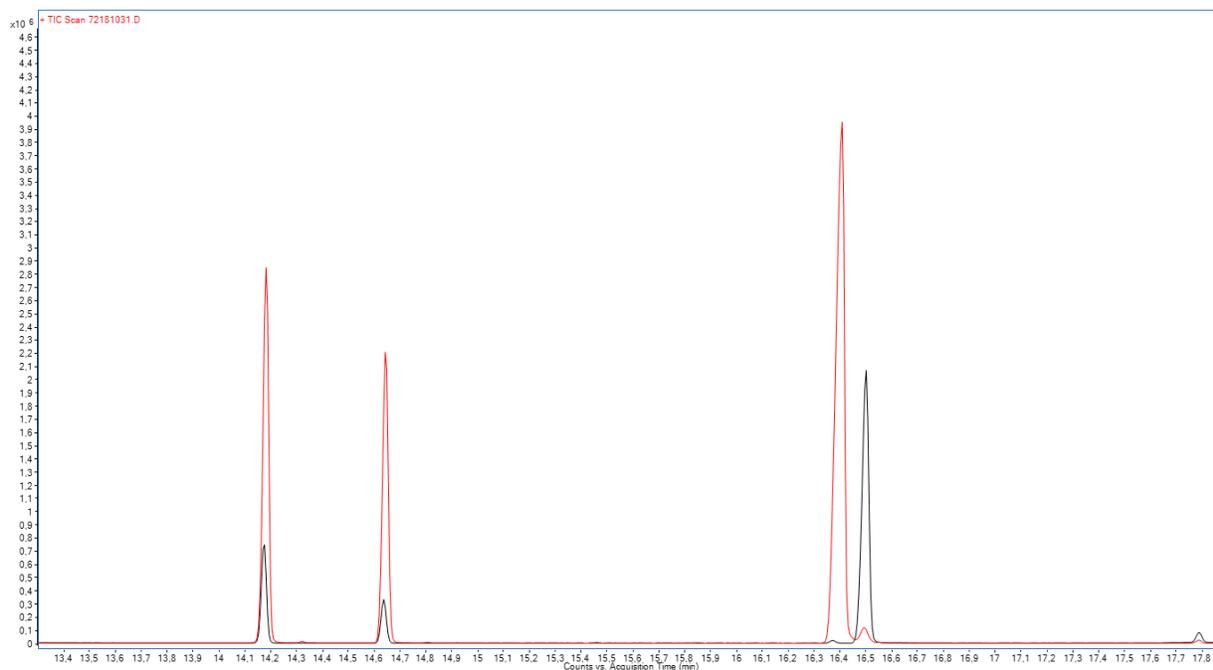


Figure 3.32 : Chromatogrammes superposés du standard de 3 α -hydroxyandrost-4-èn-17-one (trait rouge) et du 4-Superandro (trait noir), injectés tout deux sur CG-SM non dérivés.

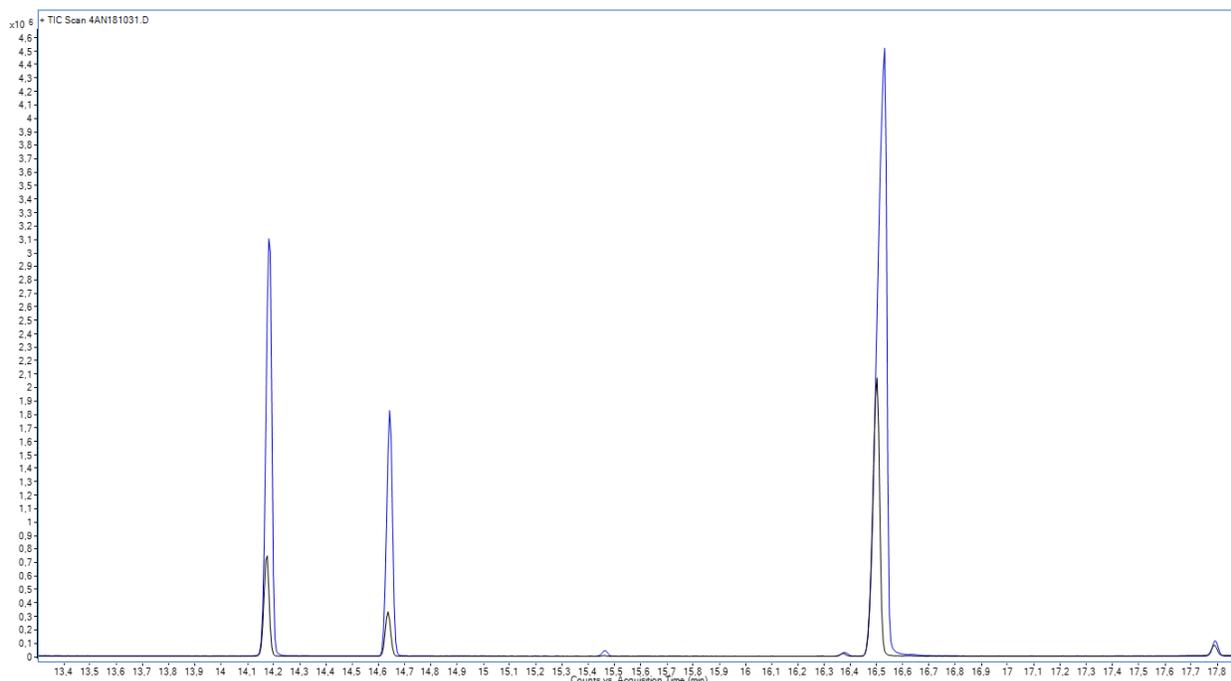


Figure 3.33 : Chromatogrammes superposés du standard de 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one (trait bleu) et du 4-Superandro (trait noir), injectés tout deux sur CG-SM non dérivés.

La superposition des chromatogrammes à la figure 3.33 démontre que la substance présente dans le *4-Superandro* est la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one. En contraste, la superposition des chromatogrammes du *4-Superandro* et du standard de 3α -hydroxyandrost-4-èn-17-one (figure 3.32) montre un écart significatif entre les temps de rétention du pic principal, montrant qu'il ne s'agit pas de la même substance.

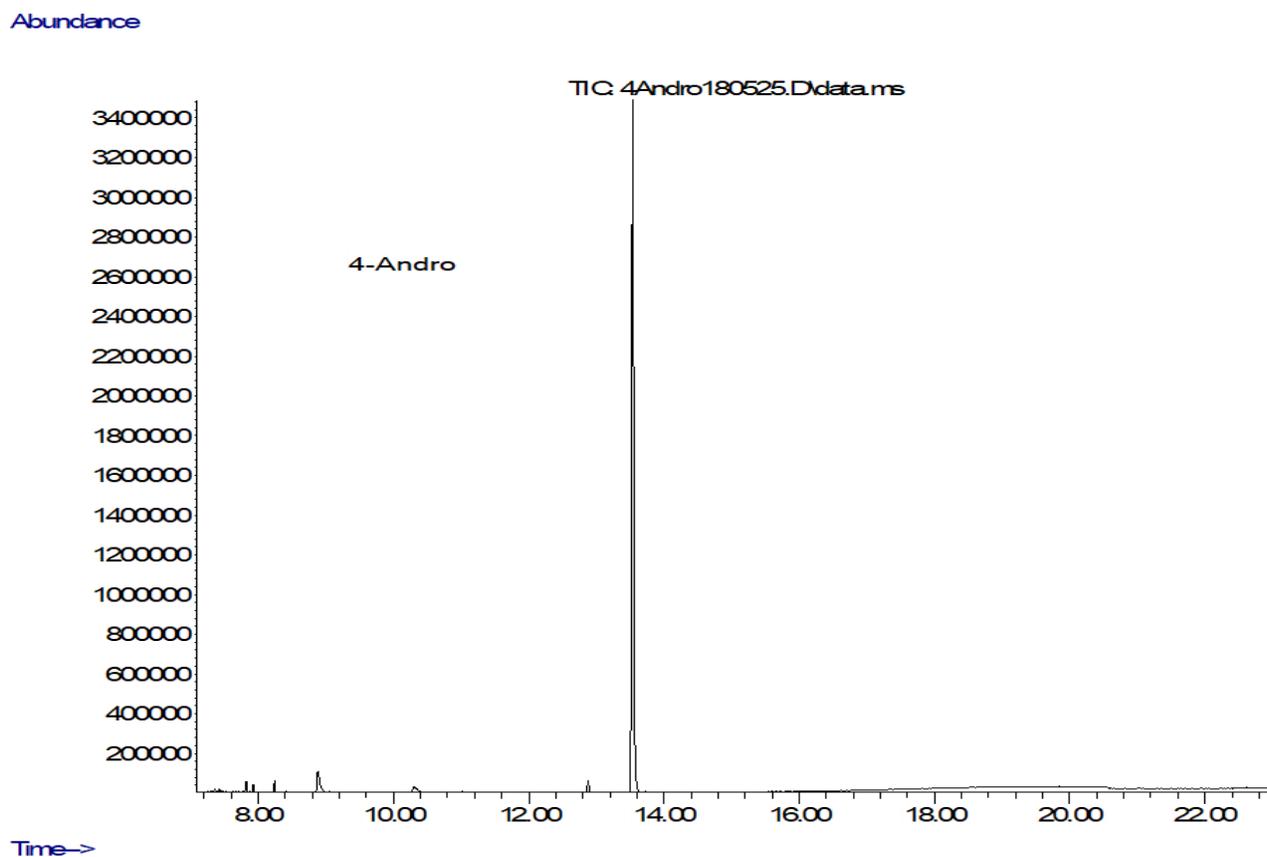


Figure 3.34 : Chromatogramme des produits dans le supplément 4-Superandro de IronMag Labs suite à la dérivation chimique et l'injection sur CG-SM en balayage complet, le produit majoritaire étant la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one (TR 13.53 minutes).

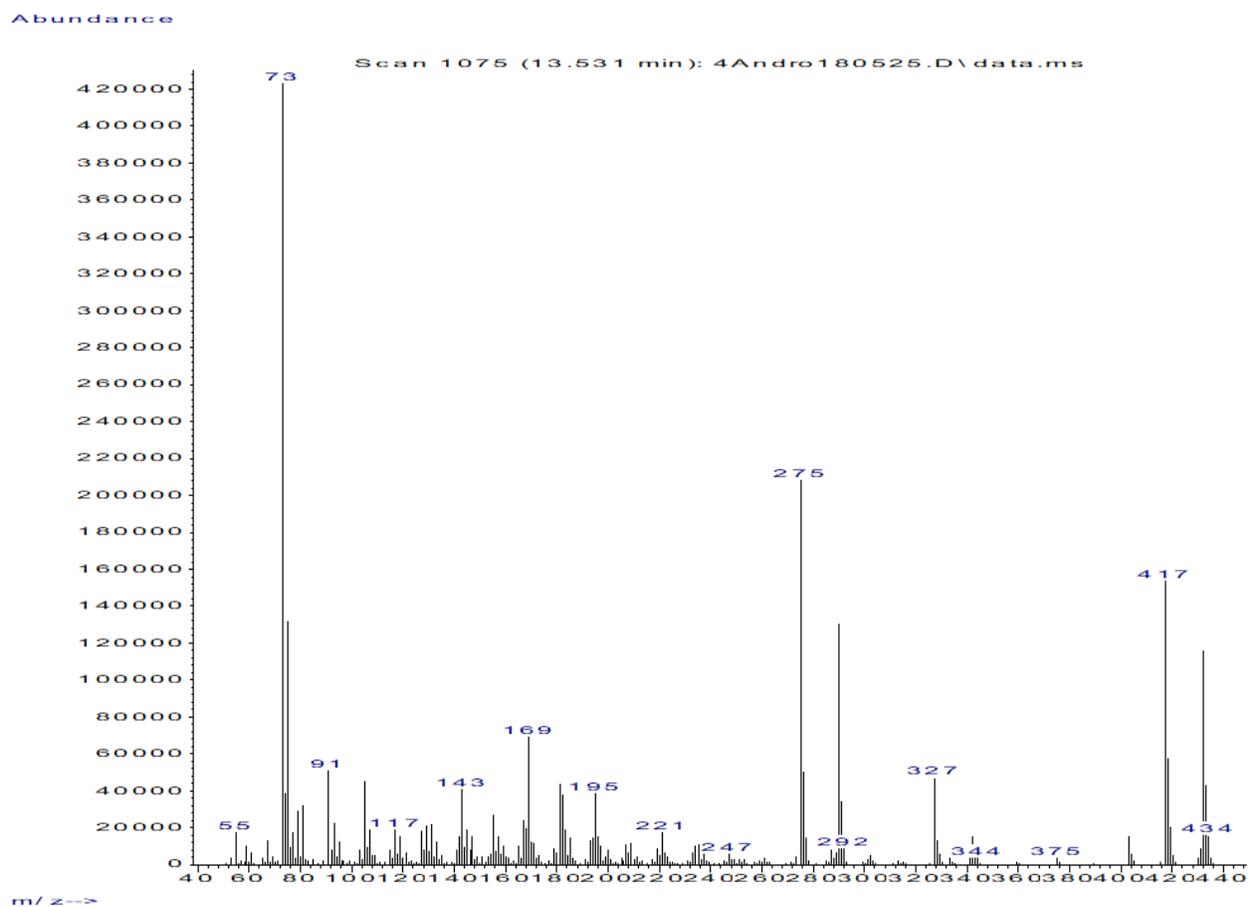


Figure 3.35 : Spectre de masse du produit majoritaire présent dans le supplément 4-Superandro, identifié comme étant du 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one.

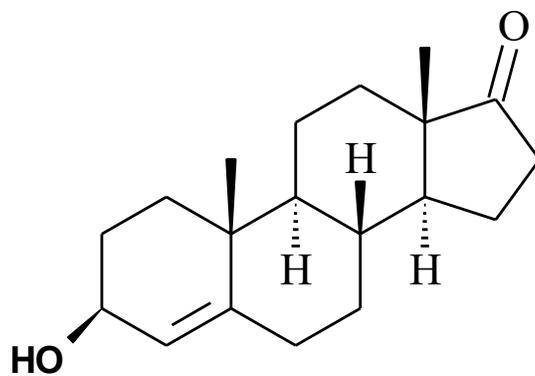


Figure 3.36 : Structure du 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one, identifiée dans le 4-Superandro.

3.3.3 Identification du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one dans le *Nanobol*

Le supplément *Nanobol* de *Fusion Supplements* mentionne la présence de 4-chloro-17 α -methyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one comme ingrédient exclusif du produit. Cette substance est connue sous le nom de méthylclostébol et est apparentée à la déhydrochlorométhyltestostérone (DHCMT). Le fabricant désigne le méthylclostébol comme une prohormone sans vraiment spécifier la substance générée suite à son administration. Un standard de référence était disponible au laboratoire pour l'identification, celui-ci ayant été synthétisé au sein du laboratoire de Dr Poirier (centre de recherche du CHU de Québec, Université Laval).



Figure 3.37 : Emballage du produit Nanobol de Fusion Supplements et l'étiquette d'informations nutritionnelles présente sur le produit.

L'injection sur CG-SM de l'extrait de Nanobol dérivé génère un chromatogramme avec trois pics distincts, les pics à 16.8 minutes et 17.4 minutes représentant la substance d'intérêt. Deux pics sont décelés sur le chromatogramme suivant l'injection du standard synthétisé à 16.8 minutes et 17.4 minutes. La comparaison entre les chromatogrammes du Nanobol et du standard démontre que le pic majoritaire au temps de rétention de 17.4 minutes est la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one (méthylclostébol) tandis que le pic moins abondant à 16.8 minutes correspond à son épimère en C-17, soit la 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandro-4-èn-3-one (figures 3.38 et 3.39). La correspondance des spectres de masse pour le méthylclostébol présent dans le standard et le Nanobol permet de confirmer qu'il s'agit bel et bien de la même substance (figures 3.42 et 3.43). Pour l'épimère, la 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandro-4-èn-3-one, la correspondance des spectres de masses avec le standard confirme son identification (figures 3.40 et 3.41).

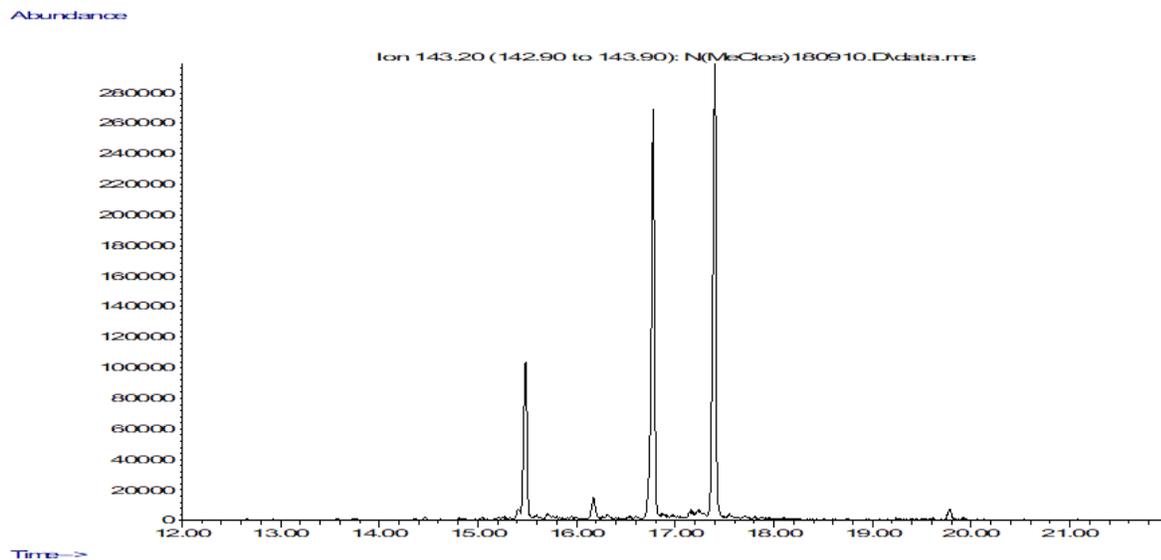


Figure 3.38 : Chromatogramme du produit Nanobol de FusionSupplements, contenant la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one (majeur; TR 17.4 minutes) et son épimère en C-17 (TR 16.776 minutes).

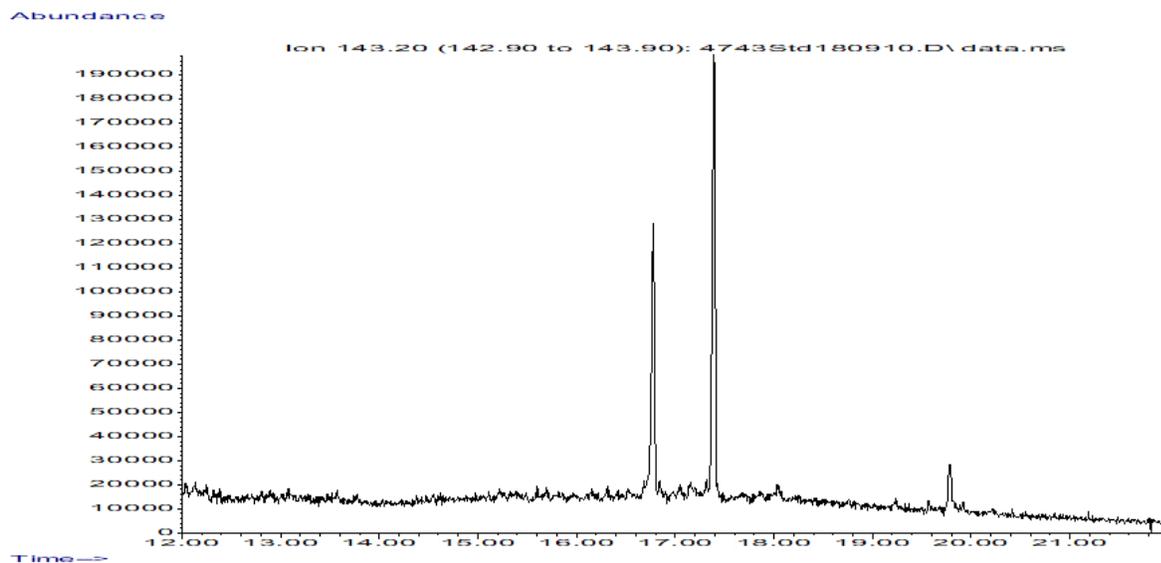


Figure 3.39 : Chromatogramme d'un standard de référence de 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one (majeur; TR 17.4 minutes) et son épimère en C-17 (TR 16.762 minutes).

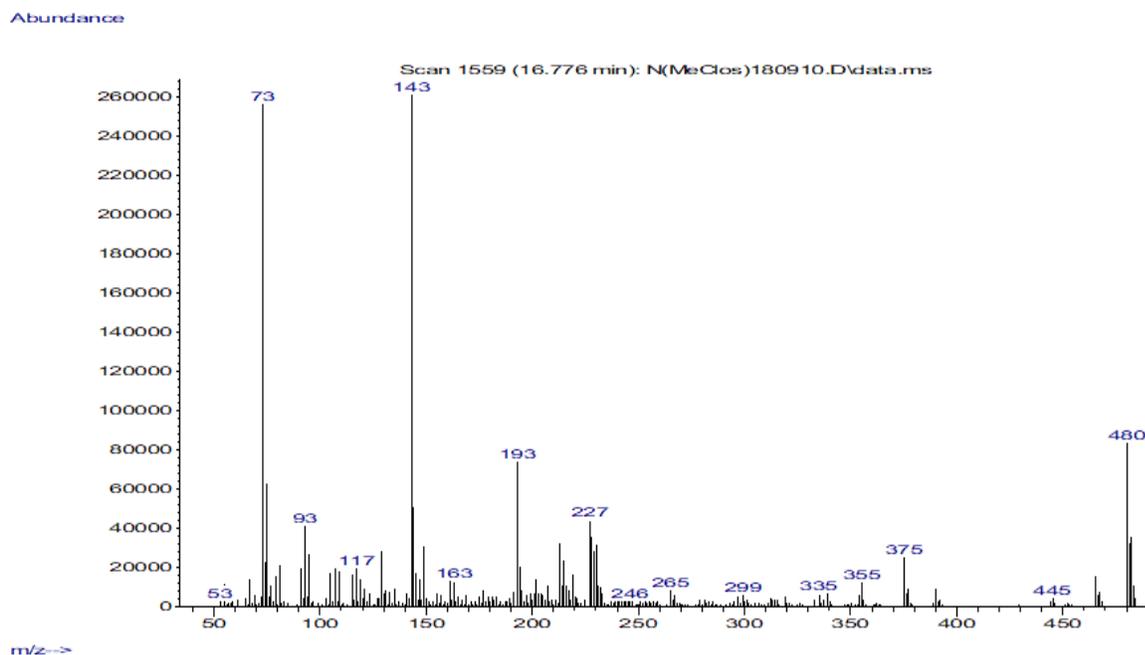


Figure 3.40 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrost-4-èn-3-one, l'épimère en C-17 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one, présent dans le Nanobol.

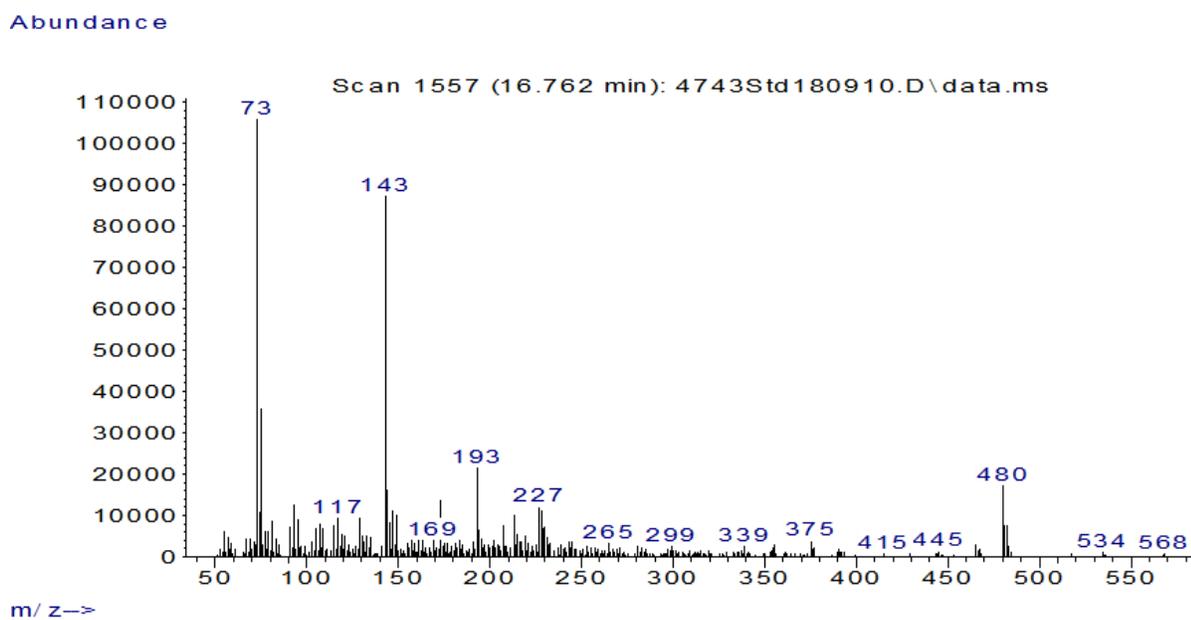


Figure 3.41 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrost-4-èn-3-one présent dans le standard, l'épimère en C-17 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one.

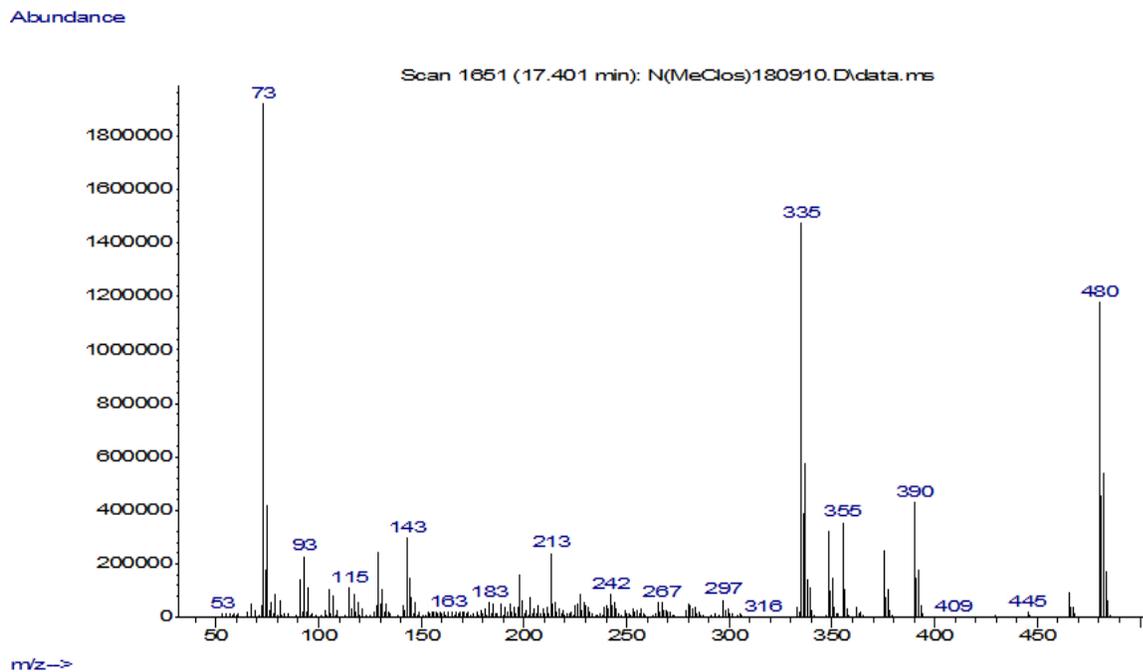


Figure 3.42 : Spectre de masse du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one présent en majorité dans le Nanobol.

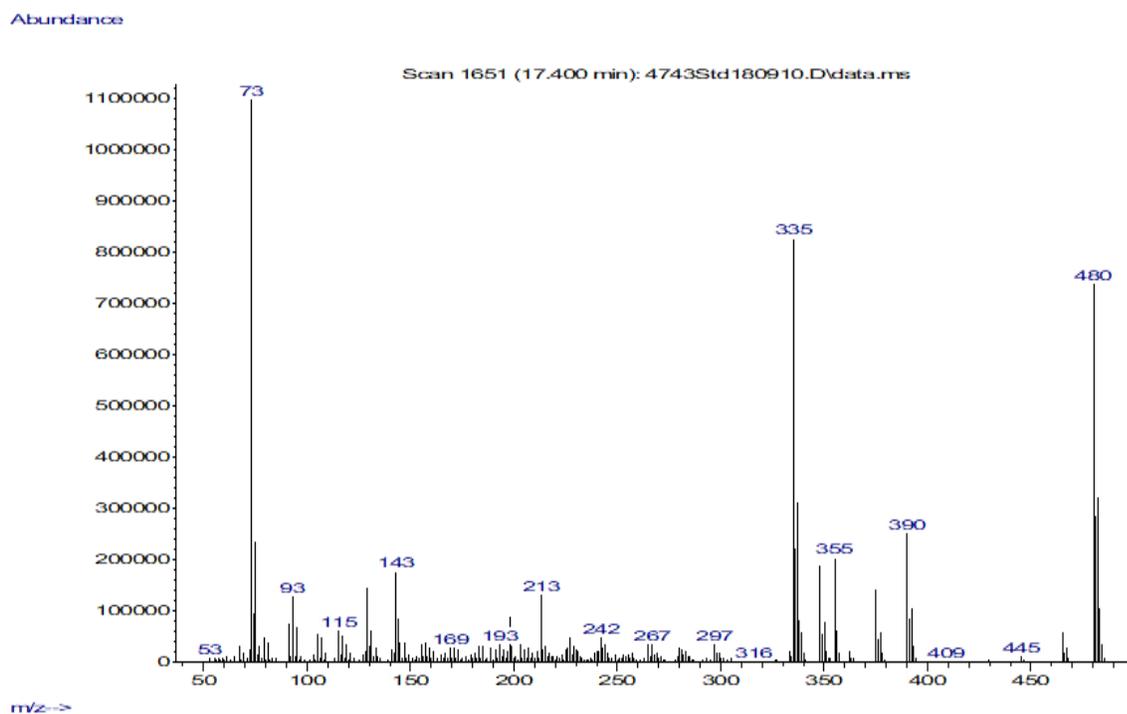


Figure 3.43 : Spectre de masse du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandro-4-èn-3-one présent dans le standard de référence.

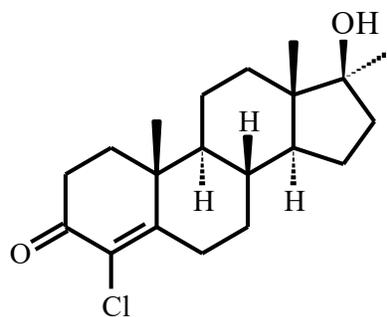


Figure 3.44 : Structure du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrosta-4-èn-3-one.

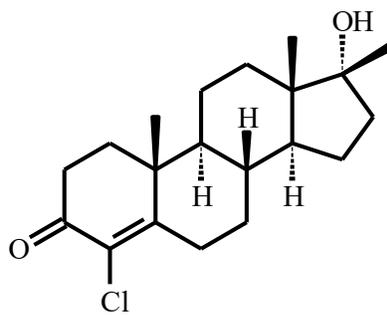


Figure 3.45 : Structure du 4-chloro-17 α -hydroxy-17 β -méthylandrosta-4-èn-3-one, l'épimère en C-17 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrosta-4-èn-3-one.

3.3.4 Identification du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-one

L'étiquette d'informations nutritionnelles affirme que l'ingrédient actif contenu dans le *Cynostane* est la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-androst-3-one.

Les cyanostéroïdes sont peu utilisés en contexte de dopage, mais certains offrent un potentiel intéressant dans d'autres sphères médicales telles que pour des traitements de cancers, des traitements bactériens et de fungus (Levitsky *et al.*, 2017). La présence du cynostane sur le marché est intrigante, mais ne constitue pas une nouveauté (Abbate *et al.*, 2015). En effet, le cynostane contient un groupement méthyle en C-17 α ce qui rend la biodisponibilité orale de la substance attrayante en contexte de dopage sportif (Kicman, 2008).

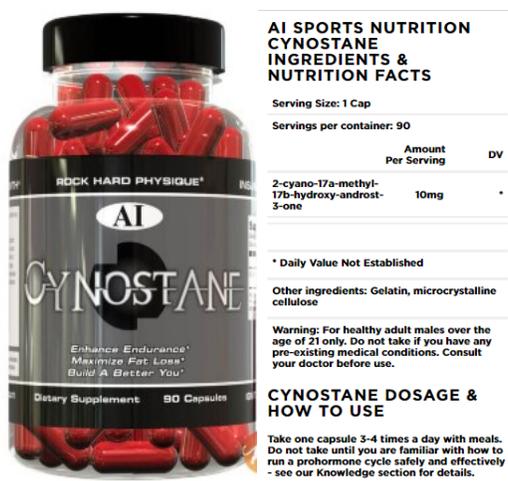


Figure 3.46 : Emballage du produit Cynostane d'AI Sports Nutrition et l'étiquette d'informations nutritionnelles présentes sur le produit.

Aucun standard de référence de 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-one n'était disponible commercialement ou disponible au laboratoire pour permettre l'identification de la substance présumée dans le produit *Cynostane*. Ainsi, l'analyse du chromatogramme et celle du spectre de masse étaient les seuls outils disponibles pour tenter l'identification. L'utilisation exclusive de ces outils ne permettant pas l'identification d'une substance, l'analyse permet plutôt de proposer une structure en accord avec les différentes informations recueillies et ainsi de confirmer ou d'infirmer, selon le cas, l'affirmation de la compagnie produisant le supplément. L'injection sur CG-SM de l'extrait dérivé TMS-énols permet

l'obtention du chromatogramme à la figure 3.47. Un produit majoritaire au temps de rétention de 18.18 minutes est obtenu. L'analyse du spectre de masse associé à celui-ci (figure 3.48) permet ensuite de proposer la structure associée à la substance présente.

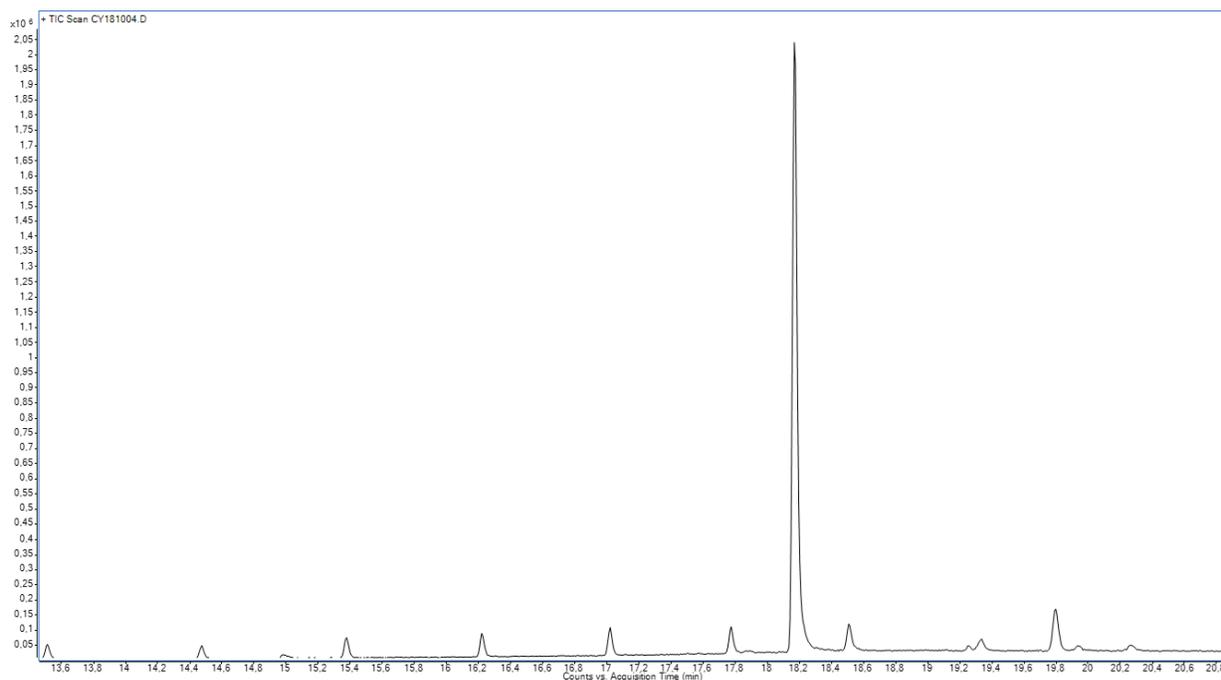


Figure 3.47 : Chromatogramme de l'extrait dérivé du supplément Cynostane de AI Sports Nutrition, le produit majoritaire étant la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstane-3-one (TR 18.18 minutes).

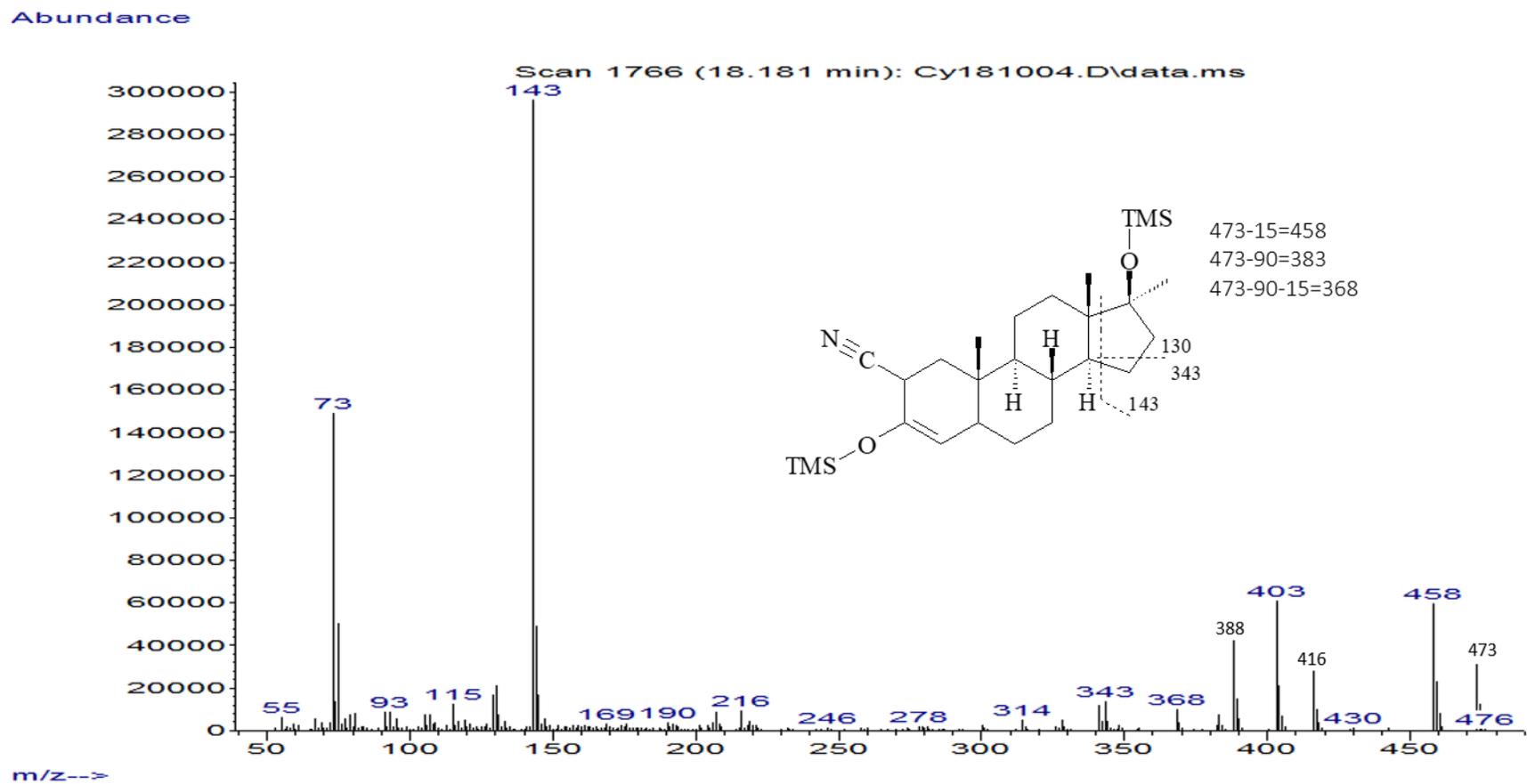


Figure 3.48 : Spectre de masse du produit majoritaire présent dans le supplément Cynostane et le patron de fragmentation permettant la proposition de la structure.

Abundance

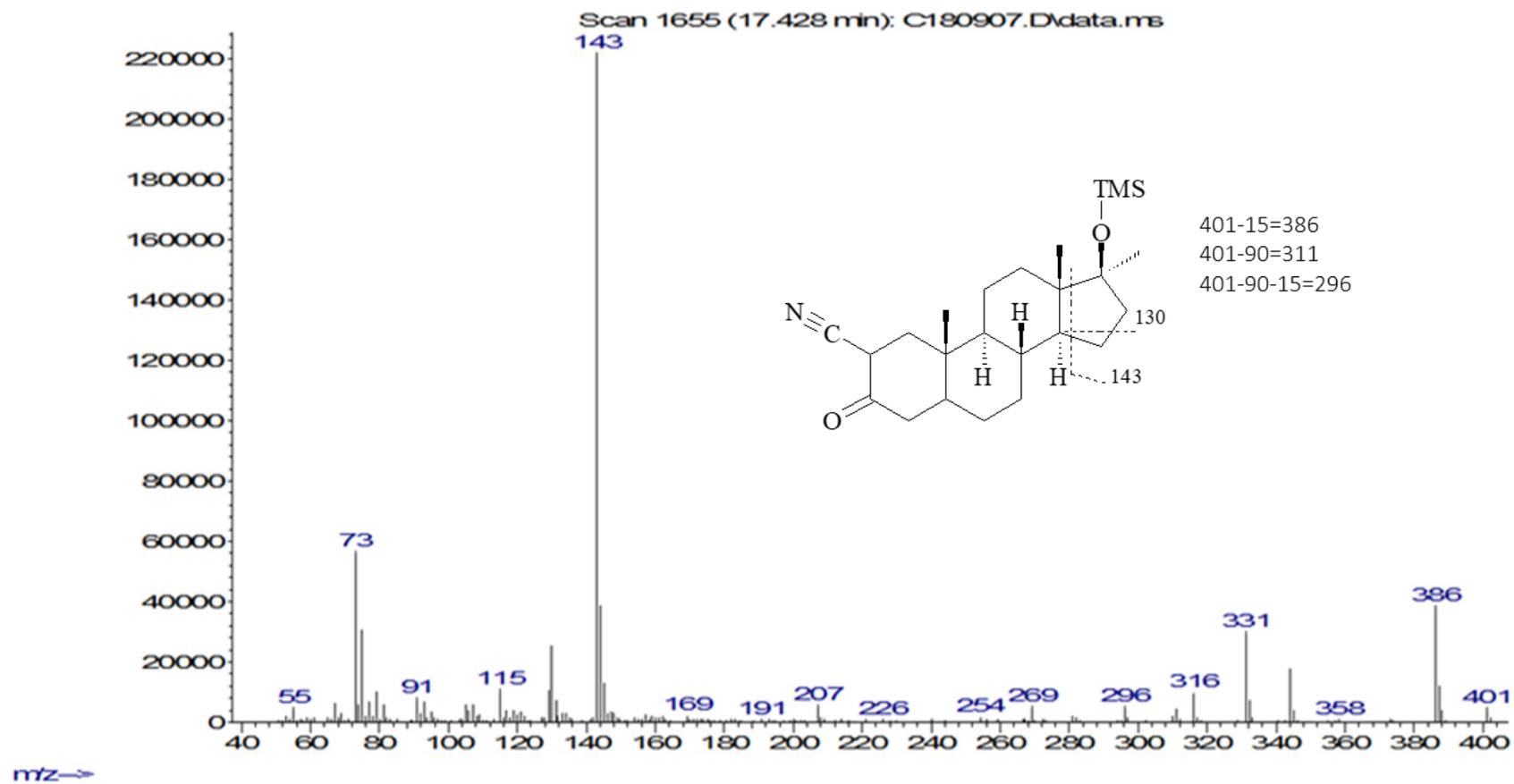


Figure 3.49 : Spectre de masse du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstan-3-one dérivé éther TMS.

Analyse du spectre de masse et proposition de la structure de la substance renfermée dans le *Cynostane*

La structure initialement proposée par Abbate et al. pour le même produit était [3,2-d]isoxazole. Cependant, cette structure n'avait pas pu être confirmée par ceux-ci dans le même article, suivant des tests supplémentaires non concluants (Abbate *et al.*, 2015). Plusieurs autres dérivés stéroïdiens synthétiques répertoriés dans la littérature adoptent la conformation 2-cyano-3-oxo tel l'acide 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oïque (Bardoxolone), la 2 α -cyano-4,4',17 α -triméthylandro-5-èn-17 β -ol-3-one (cyanocétone) et bien d'autres (Levitsky *et al.*, 2017). Ainsi, en absence de preuve irréfutable favorisant l'adoption d'une conformation particulière, les deux conformations seraient possibles.

Le spectre de masse (figure 3.48) est obtenu suite à la dérivation TMS-énols. L'ion moléculaire de la substance est de m/z 473. Tout d'abord, la masse impaire à 473 pourrait dénoter la présence d'un seul atome d'azote sur la substance (Abbate *et al.*, 2015). Les ions à m/z 458, 383 et 368 proviendraient de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un HOTMS (-90 uma) et des deux (-105 uma), respectivement. Les pertes de 57 uma et 70 uma étant caractéristiques des stéroïdes méthylés en C-17 (Dürbeck & Büker, 1980), celles-ci mènent à l'obtention des ions à m/z 416 et m/z 403 respectivement, et ce à partir de l'ion moléculaire. La perte additionnelle d'un groupement méthyle (-15 uma) suivant la perte caractéristique de 70 uma à partir de l'ion moléculaire pourrait expliquer l'ion à m/z 388. Finalement, les ions à m/z 343 et m/z 130 découlent de la fragmentation entre C-13,17 et C-15,16 tandis que celui à m/z 143 de la fragmentation entre C-13,17 et C-14,15. Ces mécanismes de fragmentation et ions obtenus sont habituels chez les stéroïdes méthylés en C-17 (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Ensuite, le spectre de masse (figure 3.49) découle de la dérivation TMS-éthers. L'ion moléculaire est alors de m/z 401, permettant de confirmer la présence d'un groupement cétone sur la molécule, puisque non dérivé (m/z 473 lorsque TMS-énols). Néanmoins, l'emplacement de ce groupement cétone en C-3 ne peut être confirmé puisqu'il n'y a pas d'ion propre à un patron de fragmentation du cycle A de la substance par rapport à celle observée pour la dérivation TMS-énols. Encore une fois ici, les pertes d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un groupement HOTMS (-90 uma) et des deux groupements (-105 uma) permettent de produire les ions à m/z 386, 311 et 296 respectivement. Les pertes caractéristiques de 57 uma et 70 uma à partir de l'ion moléculaire des stéroïdes 17-méthylés mènent aux ions m/z 344 et m/z 331, tandis qu'une perte supplémentaire d'un groupement méthyle à partir de l'ion à m/z 331 résulte en l'ion à m/z 316.

La structure proposée pour l'ingrédient actif du produit *Cynostane* est la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one puisque la conformation 2-cyano-3-oxo est rependu chez plusieurs autres dérivés stéroïdiens synthétiques donc plus probable (Levitsky *et al.*, 2017). Bien qu'une structure différente eût été suggérée en 2015 (Abbate *et al.*, 2015), il n'est pas possible de confirmer celle-ci à l'aide des outils utilisés. Cependant, il n'est pas non plus possible d'infirmier celle-ci. Des tests supplémentaires d'analyses infrarouges et RMN seraient pertinents afin d'élucider la structure du cynostane. L'extrait de méthanol a ensuite été purifié sur CLHP et concentré dans le but d'obtenir un standard pour la suite des expérimentations.

Résumés des identifications et des propositions

Des onze produits commandés, cinq contiennent des substances stéroïdiennes connues et interdites tandis que les six autres renferment quant à eux des substances stéroïdiennes présumées (tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Résumé des produits commandés, leurs contenus comme stipulé par la compagnie, les substances identifiées/proposées et les fabricants/distributeurs.

Produits commandés	Ingrédient(s)/produits actifs selon les informations nutritionnels	Substances identifiées ou proposées	Fabricants et distributeurs
Nanobol	4-chloro-17 α -methyl-17 β -hydroxy-androst-4- \Rightarrow -3-one	4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthyl-androst-4- \Rightarrow -3-one et épimère en C-17	Fusionsupplements Predator nutrition
1-Superandro Rx	3 β -enanthoxyandrost-1-en-17-one	3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \Rightarrow -17-one	Ironmag labs
4-Superandro Rx	3 β -enanthoxyandrost-4-en-17-one	3 β -hydroxy-androst-4- \Rightarrow -17-one	Superandro stack
SuperNorAndro Rx	3 β -enanthoxynorandrost-4-en-17-one	Isomère de la 1-testostérone Autres non identifiés	Bestpricenutrition
Cynostane	2-cyano-17 α -methyl-17 β -hydroxy-androst-3-one	2-cyano-17 α -methyl-17 β -hydroxyandrost-3-one	AI Sports Nutrition Predatornutrition
Helladrol	4-androstene-3 β -ol,17-one 3-hydroxy-17-oxo-5-androstane 17 β -(1-ketoethyl)-delta-1,4-androstadiene 1,4-androstène-3 β -ol,17-one Androstan-3,5-diene-7,17-dione	Androstan-3,5-diene-7,17-dione 4-androstene-3-ol,17-one et isomère Épiandrostérone 1,4-androsten-3-ol,17-one	Innovative lab Vitaminebox.com
Methdrol	2 α -17 α -dimethyl-5 α -androst-3-one	2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one et épimère en C-17	Fusionsupplements Predatornutrition
Halodrol	4-chloro-17 α -methyl-andros-1,4-diene-3 β ,17 β -diol	4-Chlorodehydrométhyltestostérone(DHCMT) 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthyl-androst-4- \Rightarrow -3-one et épimère en C-17	Fusionsupplements Predatornutrition
NOR-ANDRO MAX	19-NorAndro	3-hydroxy-estr-4- \Rightarrow -17-one	Primeval Labs
1-andro Max V2	1-Androstérone	3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \Rightarrow -17-one	
Epistane	Jamais reçu	Jamais reçu	Bodyconsciousuk
6-keto diosgenin	Jamais reçu	Jamais reçu	Supplementcentral
Dymethazine	Jamais reçu	Jamais reçu	Iconsupplement

3.4 Obtention des métabolites à l'aide du modèle choisi

3.4.1 Utilisation du modèle S9

Le bienfondé derrière l'utilisation des fractions cellulaires S9 a été confirmé à l'aide d'essais métaboliques impliquant des stéroïdes dont le métabolisme est préalablement connu. Cet essai permet aussi de confirmer certaines conditions entourant l'incubation, d'apporter des modifications pour améliorer le rendement et le protocole d'isolation des métabolites obtenus avant de tester les substances préconisées. À noter que les fractions cellulaires S9 utilisées proviennent de plusieurs donneurs humains aux antécédents, ethnicités, sexes et âges variables. Ceci permet une meilleure représentation populationnelle quant au métabolisme attendu donc évite ainsi des résultats aberrants pour la suite des tests impliquant les substances potentiellement nouvelles et/ou au métabolisme inconnu.

Pour que la confirmation du modèle soit valable, les stéroïdes utilisés possèdent des caractéristiques semblables à ceux qui seront ensuite étudiés. Ainsi, pour les stéroïdes non méthylés en position C-17, la testostérone est incubée pour observer le rendement métabolique, soit la transformation de la substance de base par les enzymes cytosoliques et microsomales au profit de la production de métabolites. Pour les stéroïdes méthylés en position C-17, la méthastérone est utilisée comme substance type, le métabolisme étant déjà connu par le laboratoire. Puisque le protocole entourant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 était optimisé en vue de l'obtention des métabolites de phase 1, seulement ceux-ci étaient recherchés lors de l'analyse sur CG-SM.

Une meilleure efficacité est attendue lors des incubations en présence de fractions cellulaires S9 pour les substances stéroïdiennes semblables à la testostérone comparativement aux incubations impliquant des stéroïdes de synthèses méthylés en C-17, par exemple la méthastérone. Ceci peut être expliqué par le fait que la dégradation hépatique de la substance testée est grandement diminuée lors de l'administration de stéroïdes méthylés en C-17 (Saudan *et al.*, 2006) en plus de la possible difficulté à convenablement solubiliser ce type de produit dans le méthanol (problématique rencontrée à plusieurs reprises auparavant par le laboratoire). Suite à plusieurs essais impliquant d'autres solvants, dont l'éthanol, l'acétonitrile et l'éther diéthylique, le rendement obtenu ne s'améliore pas assez significativement pour motiver une modification du solvant usuel, soit le méthanol. Des études réalisées par d'autres équipes de recherche démontrent que des solvants comme le *N,N*-diméthylformamide (DMF), l'acétonitrile et le diméthyl sulfoxyde (DMSO) permettent parfois une meilleure solubilité par rapport au méthanol. Par contre, à l'utilisation de certains de ses solvants se greffent parfois d'autres problématiques. Un bon exemple est

l'inhibition dose-dépendante du DMSO sur les différents enzymes hépatiques, bien que ce solvant permette une meilleure solubilité pour plusieurs substances. Le méthanol reste un solvant de choix, lorsqu'utilisé adéquatement, puisque les effets indésirables sont moindres sur l'activité enzymatique et nécessite souvent de plus importantes concentrations pour se produire (Brown *et al.*, 2007; Easterbrook *et al.*, 2001). Ainsi, les tests ont donc été effectués avec le méthanol comme solvant pour les solutions stéroïdiennes.

Une modification a été apportée au protocole de Cawley afin de diminuer la quantité de substance de départ nécessaire par incubation d'un facteur d'environ 20, le protocole original utilisant 250 µg de stéroïde par incubation. Plutôt que d'utiliser une quantité si importante de produits, les différents stéroïdes d'intérêt (standard lorsque disponible, suite à l'identification) étaient dilués dans du méthanol pour obtenir une solution de 10 mM. Lors des incubations, 4 µL des solutions méthanoliques étaient ajoutés au mélange réactionnel, permettant d'utiliser grandement moins de matériel que le protocole original.

Une étape supplémentaire était ajoutée avant l'extraction liquide-liquide, elle-même modifiée. En effet, plutôt que d'extraire directement le surnageant transféré suivant l'arrêt de la réaction avec l'acétonitrile et la centrifugation du mélange réactionnel, celui-ci était d'abord évaporé à sec à 50 °C sous jet d'azote. Ensuite, 1 mL de tampon carbonate 1 M à pH 9 était ajouté suivi de l'acétate d'éthyle. Ainsi, l'étape additionnelle d'extraction liquide-liquide et l'utilisation d'une phase aqueuse plus polaire permettaient de retirer d'autres impuretés hydrosolubles associées aux essais métaboliques. La phase aqueuse est ajustée à un pH de 9 pour favoriser la forme neutre des métabolites et donc leur passage dans la phase organique. Dans tous les cas, les chromatogrammes obtenus semblent plus propres suivant l'addition de cette étape.

3.4.2 Études préalables visant la vérification du modèle *in vitro*

Incubation de la testostérone en présence de fractions cellulaires S9

L'incubation de la testostérone a pour but d'évaluer le rendement métabolique du modèle des fractions cellulaires S9 et de confirmer les conditions d'incubations. À ce jour, sept substances sont caractéristiques du profil stéroïdien endogène d'un athlète (Ouellet *et al.*, 2013; Thieme & Hemmersbach, 2009). La testostérone et l'épitéstostérone sont incluses dans le profil stéroïdien. L'épitéstostérone n'est pas altérée par l'administration exogène de testostérone, ce qui rend son suivi particulièrement important (Sjöqvist *et al.*, 2008). D'autres métabolites sont aussi inclus dans le profil endogène soit : l'androstérone (5 α -androst-3 α -ol-17-one), l'étiocolanolone (3 α -hydroxy-5 β -androst-17-one), les androstanediols (5 α -

androstan-3 α ,17 β -diol et 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol) et la dehydroepiandrosterone (DHEA) (Thieme & Hemmersbach, 2009).

Les métabolites diagnostiques les plus pertinents associés à l'administration de testostérone recherchés lors de dépistage comprennent la testostérone non altérée, l'androstérone, l'étiocolanolone, l'épiandrostérone et les androstanediols (5 α -androstan-3 α ,17 β -diol et 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol) (Ayotte *et al.*, 1996; Ouellet *et al.*, 2013; Schanzer, 1996). Bien que plusieurs d'entre eux n'aient pas été obtenus des incubations, ou du moins en quantité suffisante pour permettre l'analyse par balayage complet en CG-SM, il est toutefois évident que les réactions métaboliques sont importantes, mais ne semblent pas spécifiques (figure 3.50 ci-dessous).

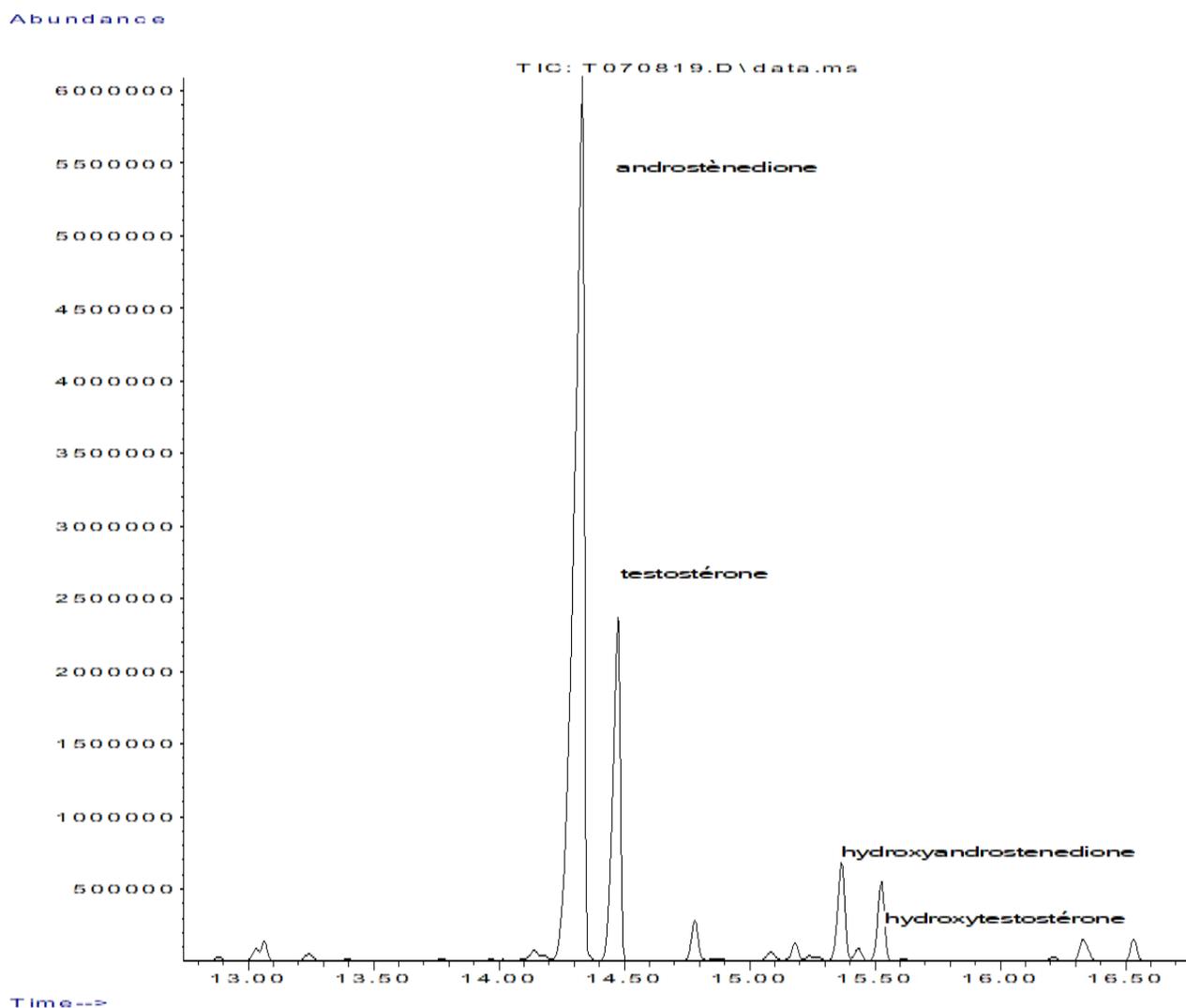


Figure 3.50 : Chromatogramme montrant le résultat de l'incubation de la testostérone en présence de fractions cellulaires S9.

Certains métabolites majoritaires découlant de l'incubation, soit l'androstènedione, la 6-hydroxyandrostènedione et la 6-hydroxytestostérone, ne se retrouvent pas dans la liste des métabolites diagnostiques. Les réactions d'oxydation, réduction et hydroxylation étant centrales au métabolisme de phase 1, l'obtention de résultats tels que la 6-hydroxyandrostènedione et la 6-hydroxytestostérone n'est pas surprenante. Un modèle utilisant des microsomes menait à des hydroxylations à plusieurs endroits sur la testostérone, semblable à ce qui est observé ici (Lisboa & Gustafsson, 1970). En ce qui concerne l'androstènedione, un précurseur métabolique de la testostérone, la cinétique enzymatique pourrait expliquer son importante quantité relative obtenue. En effet, puisque la réaction de réduction permettant de produire la testostérone est réversible, la réaction inverse serait favorisée dans les conditions actuelles.

Selon ces résultats, il est possible d'estimer qu'une efficacité métabolique semblable pourrait être observée pour d'autres substances stéroïdiennes partageant ces caractéristiques. Ainsi, l'efficacité métabolique seulement des fractions cellulaires S9 apparaît à première vue intéressante. Par contre, l'obtention des métabolites caractéristiques au profil stéroïdien de la testostérone n'est pas atteinte, ou du moins possiblement en quantité insuffisante pour permettre l'analyse par CG-SM. Cette dernière information implique donc que le modèle n'est possiblement pas idéal pour caractériser le métabolisme de substances semblables à la testostérone et montre une limite du modèle.

Ainsi, il est impératif que le modèle soit testé sur d'autres substances stéroïdiennes possédant des caractéristiques différentes qui pourraient être similaires à celles des stéroïdes de synthèses sur le marché puisque le protocole initial semblait permettre l'obtention de résultats satisfaisants. D'autres essais impliquant une autre substance stéroïdienne, cette fois méthylée en C-17 α , ont aussi été conduits en parallèle pour confirmer la pertinence du modèle dans ce contexte particulier. Ces essais supplémentaires impliquent la méthastérone.

Incubation de la méthastérone (2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-17 β -ol-3-one) en présence de fractions cellulaires S9

Le métabolisme *in vitro* et *in vivo* de la méthastérone a été caractérisé ce qui permet de confirmer ou d'infirmer le bienfondé du modèle utilisé (Gauthier *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2019; Parr *et al.*, 2006). De plus, la structure de la méthastérone comporte un groupement méthyle en C-17 α en plus d'être similaire à des suppléments retenus pour les tests d'incubations (le cynostane; 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one et le méthylclostébol). Celle-ci représente donc un important segment des stéroïdes de synthèses, souvent reconnu pour leurs efficacités maintenues malgré l'administration orale, un avantage clé.

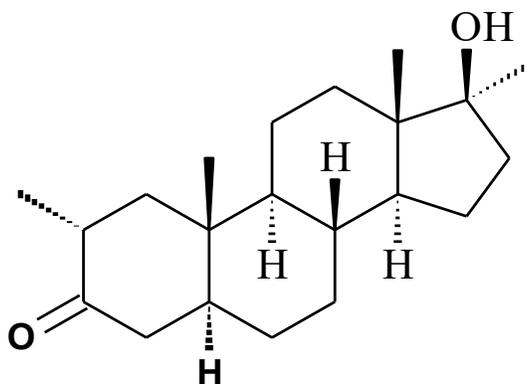


Figure 3.51 : Structure du 2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androstane-17 β -ol-3-one, surnommé méthastérone.

Efficacité du modèle pour la méthastérone

Le produit majoritaire retrouvé suivant l'incubation de la méthastérone est le produit mère non altéré, pouvant être expliqué par la résistance à la dégradation et au métabolisme hépatique que confère le groupement méthyle en C-17 α , comme vu précédemment. Cinq autres substances sont obtenues en quantité suffisante, certains étant des métabolites et leurs isomères. Ainsi, l'efficacité associée au modèle des fractions cellulaires S9 semble à première vue assez faible lorsque confrontée à des substances méthylées en C-17 α (figure 3.52).

Métabolites attendus pour la méthastérone

Les résultats obtenus à la suite de l'incubation de la méthastérone sont en accord avec ceux obtenus auparavant au laboratoire (Gauthier *et al.*, 2009) et dans la littérature (Magalhães *et al.*, 2019; Parr *et al.*, 2006). En effet, plusieurs des métabolites correspondent à ceux obtenus par d'autres laboratoires dont le 2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol, le 2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstan-2 β ,3,17 β -triol, et la 2 α ,17 α -dimethyl-16,17 β -dihydroxy-5 α -androstan-3-one (16-hydroxymethylrostanolone). Les deux métabolites principaux (2 α ,17 α -dimethyl-16 ϵ ,17 β -dihydroxy-5 α -androstan-3-one représentée sur la figure 3.54 et 2 α ,17 α -dimethyl-5 α -androstane-3 ϵ ,17 β -diol représentée sur la figure 3.53) recherchés par le laboratoire dans le cadre des dépistages associés à la méthastérone ont été générés grâce aux fractions cellulaires S9, à l'exception du métabolite long terme connu, soit la 18-nor-17 β -hydroxyméthyl-2 α ,17 α -diméthyl-5 α -androst-13(14)-èn-3-one. Puisque le protocole utilisé pour les fractions cellulaires S9 permet l'obtention des métabolites de phase I seulement, l'absence du métabolite long terme est normal.

Ces résultats permettent de confirmer le modèle puisque les principaux métabolites attendus sont produits.

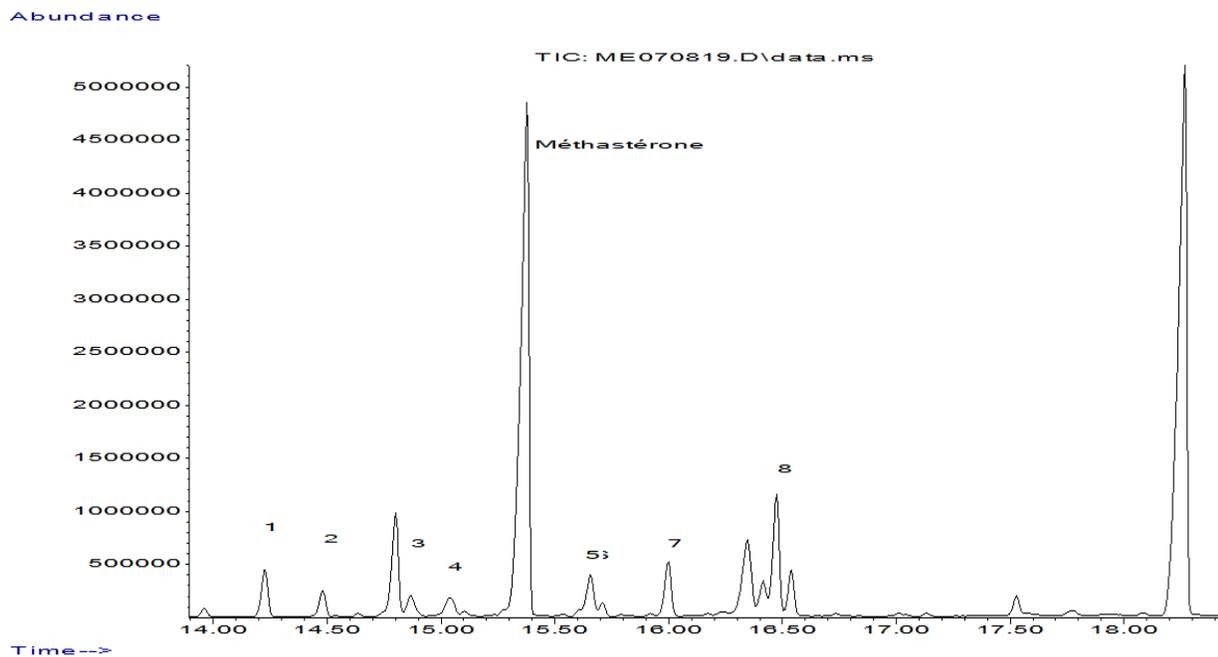


Figure 3.52 : Résultat de l'incubation de la méthastérone en présence de fractions cellulaires S9, menant à l'obtention de multiples métabolites potentiels (entre TR 14 et 17 minutes).

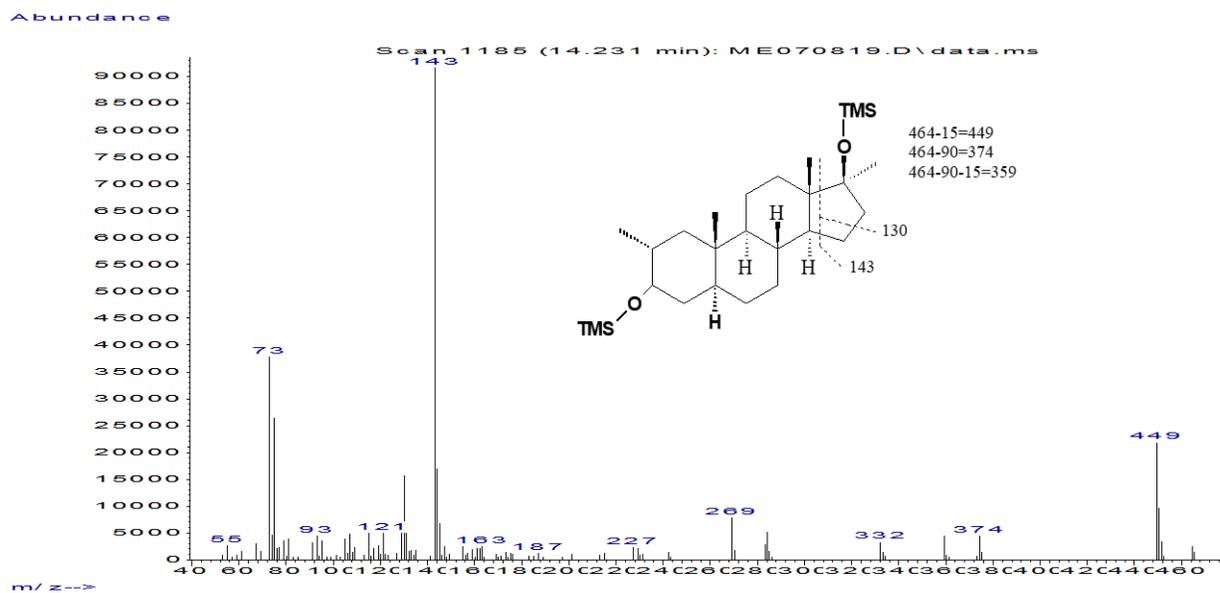


Figure 3.53 : Spectre de masse du $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- $3\epsilon,17\beta$ -diol, métabolite obtenu dans le cadre des incubations de la méthastérone en présence de fractions cellulaires S9.

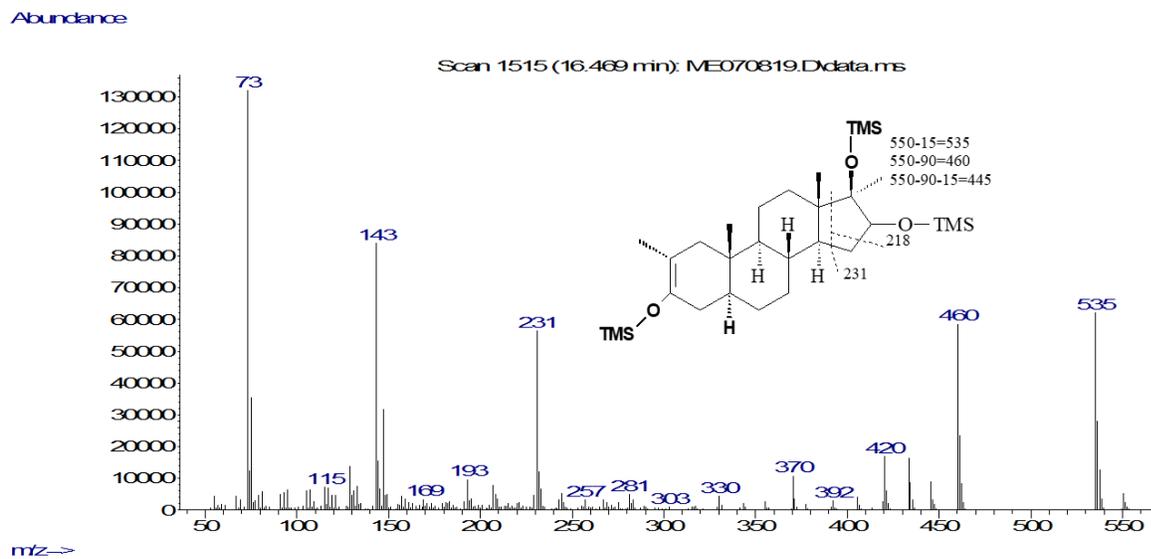


Figure 3.54 : Spectre de masse du 2 α ,17 α -diméthyl-16 ϵ ,17 β -dihydroxy-5 α -androstan-3-one, métabolite obtenu dans le cadre des incubations de la méthastérone en présence de fractions cellulaires S9.

3.5 Obtention éthique des métabolites de stéroïdes de synthèse présents sur le marché à l'aide des fractions cellulaires S9

3.5.1 3 β -hydroxy androst-4-èn-17-one

La 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one, plus communément surnommée la 4-androstérone, 4-andro ou 4-DHEA, est un métabolite possible de la testostérone qui serait obtenu suivant l'oxydation de l'alcool en C-17 et la réduction de la cétone en C-3 de la testostérone du moins théoriquement (Schanzer, 1996; Shahidi, 2001). La structure exacte est présentée ci-dessous.

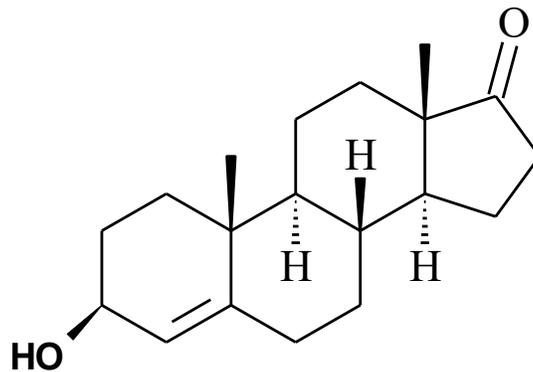


Figure 3.55 : Structure de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one

Ainsi, il est concevable que le rendement lors d'incubation avec les fractions cellulaires S9 soit comparable à celui de la testostérone, les deux substances étant structurellement semblables. De ce fait, l'obtention de la testostérone comme métabolite de la 4-androstérone est attendue suite à des réactions d'oxydoréductions.

À noter que la terminologie Super 4-Andro utilisée sur l'emballage du supplément contenant la substance semble se baser sur une nomenclature axée sur le marketing plutôt que sur la terminologie scientifique. Quelques buts hypothétiques associés à cette stratégie pourraient varier entre tenter de duper les autorités sanitaires pour éviter tout type de sanction et viser à attirer d'anciens utilisateurs de substances portant des noms semblables. En effet, le surnom 4-andro a été et est encore relativement populaire, possiblement des vestiges de sa popularité alors qu'il accompagnait plusieurs prohormones se retrouvant sur le marché des suppléments alimentaires il y a de cela quelques années. Ce nom mène encore à plusieurs résultats intéressants lors de recherche internet rapide, pouvant autant proposer d'autres suppléments portant le même nom/certaines variations ou des blogues et forums louangeant son efficacité comme alternative naturelle aux stéroïdes anabolisants.



Figure 3.56 : Emballage du produit reçu contenant la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one

Les résultats provenant des incubations de la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one avec les fractions cellulaires S9 démontrent une bonne efficacité du modèle. En effet, les produits principaux obtenus sont exclusivement des métabolites résultants, contrairement aux essais avec la testostérone, où le produit mère représentait encore un important pic sur le chromatogramme montrant le rendement. Le chromatogramme ci-dessous montre clairement que les métabolites obtenus suite à l'incubation de la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one (figure 3.57) représentent les 4 pics principaux. De plus, le pic associé au produit de départ n'était que très peu présent ou même parfois si minime que la détection sur CG-SM en balayage complet était ardue.

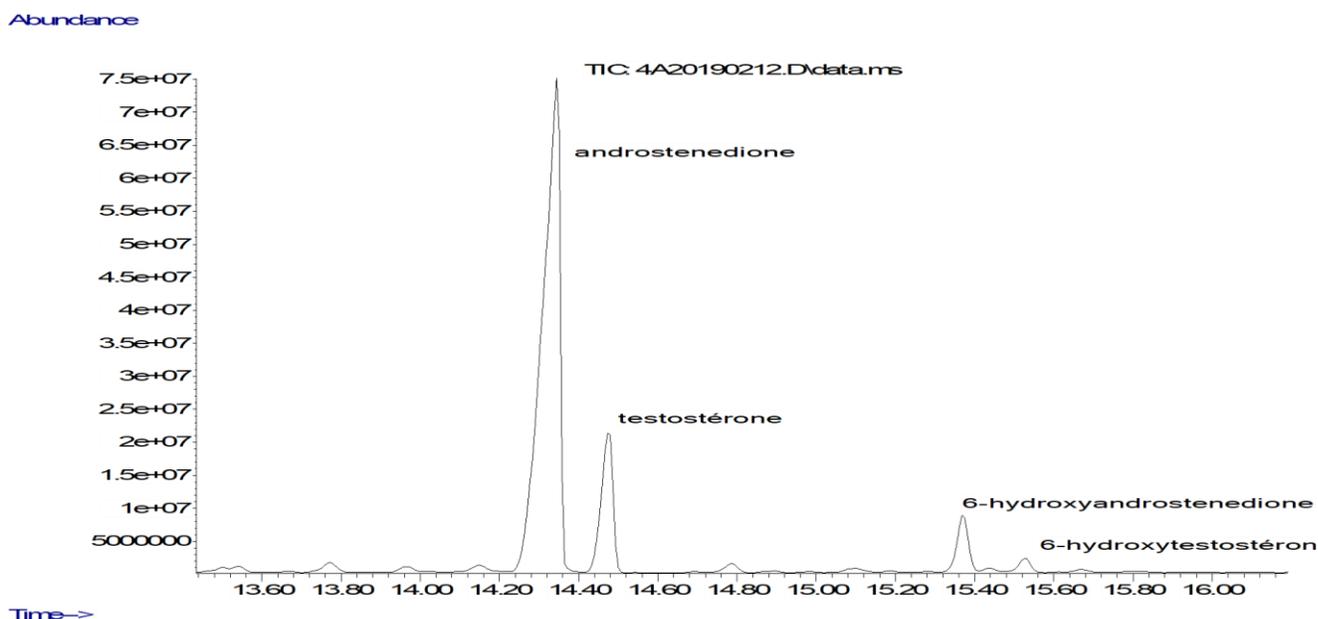


Figure 3.57 : Chromatogramme des métabolites de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one obtenus à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9, montrant la présence d'androstènedione (TR 14.3 minutes), de testostérone (TR 14.48 minutes) et de leurs 6-hydroxy respectifs (TR 15.38 minutes et TR 15.5 minutes).

L'efficacité métabolique observée sur la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one est donc particulièrement intéressante et permet l'obtention de plusieurs métabolites, dont la testostérone, qui était attendue. Toutefois, le rendement n'est pas calculé donc les résultats obtenus ne peuvent être considérés que comme étant qualitatifs.

Métabolites obtenus et structures proposées

L'analyse des spectres de masse permet de proposer les structures des métabolites obtenus. De plus, la comparaison avec des spectres de masse provenant de bibliothèques de référence permet un niveau de confirmation supplémentaire pour certaines substances. Les spectres de masse et les mécanismes de fragmentation suggérés sont présentés ci-dessous.

Suite à l'incubation, on observe quatre métabolites de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one, soit l'androstènedione, la testostérone, la 6-hydroxyandrostènedione et la 6-hydroxytestostérone.

Androstènedione (androst-4-ene-3,17-dione)

L'androstènedione est obtenue suite à l'oxydation du groupement alcool en C-3 β de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one.

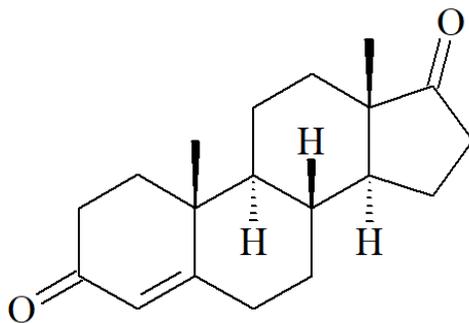


Figure 3.58 : Structure de l'androstènedione.

L'ion moléculaire de l'androstènedione lorsque dérivée TMS est de m/z 430, contre m/z 432 pour la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one. La perte d'un groupement méthyle (-15 uma) résulte en l'obtention d'un pic à m/z 415. Le pic observé à m/z 340 (minime) provient de la perte d'un HOTMS (-90 uma) tandis que celui à m/z 325 (minime) provient de la perte d'un HOTMS (-90 uma) et d'un groupement méthyle (-15 uma). L'ion à m/z 169 provient de la fragmentation entre C-8,14 ; C-12,13 et dénote la présence d'une cétone en C-17. Ce mécanisme de fragmentation et l'ion obtenu sont usuels pour cette fonction. Finalement, l'ion à m/z 208 provient de la fragmentation entre C-7,8 et C-9,10. Encore une fois, ce mécanisme et l'ion observé sont habituels pour les stéroïdes ayant une fonction cétone en C-3 et une insaturation sur le cycle A en C-4,5 (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Abundance

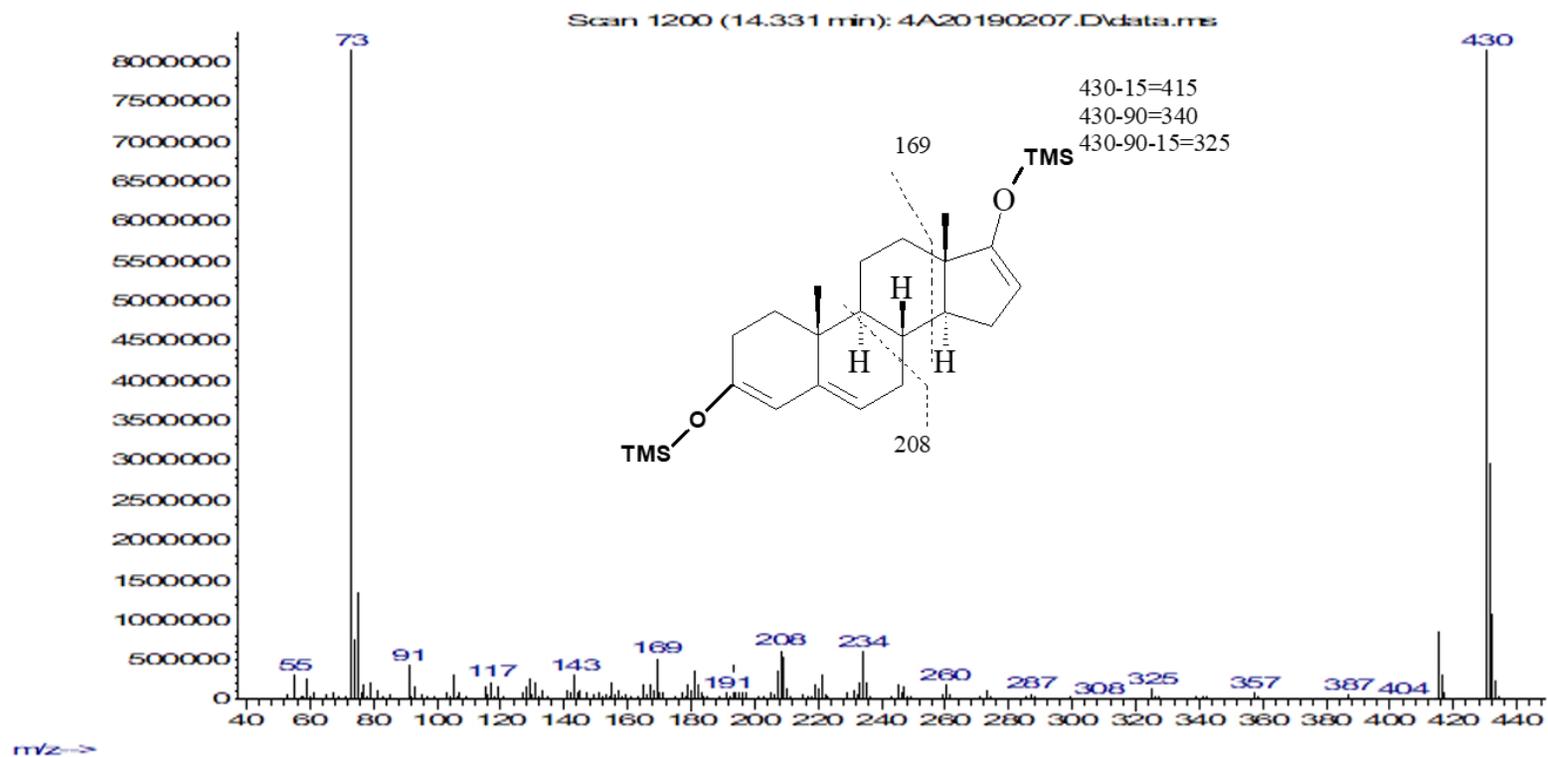


Figure 3.59 : Spectre de masse de l'androstènedione, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.

Testostérone (androst-4-en-17 β -ol-3-one)

La testostérone est obtenue suite à la réduction de la cétone en C-17 de l'androstènedione par la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase pour obtenir une fonction alcool en C-17 β . La réaction inverse peut aussi être observée lors de l'administration de la testostérone. L'androstènedione est considérée comme un précurseur dans la biosynthèse de la testostérone (Hoffman *et al.*, 2009; Sjöqvist *et al.*, 2008; Van de Kerkhof *et al.*, 2000).

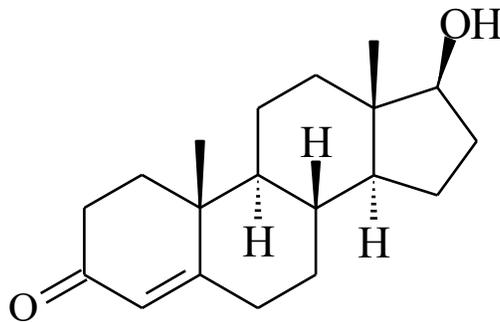


Figure 3.60 : Structure de la testostérone

L'ion moléculaire de la testostérone dérivée TMS est de m/z 432. La perte d'un groupement méthyle (-15 uma) permet l'obtention d'un pic à m/z 417. Deux pics minimes à m/z 342 et m/z 327 proviennent de la perte d'un HOTMS (-90 uma) et de la perte d'un HOTMS (-90 uma) et d'un groupement méthyle (-15 uma) respectivement. La fragmentation entre C-7,8 et C-9,10 permet aussi ici d'obtenir l'ion à m/z 208. Toutefois, l'ion à m/z 129 provient ici de la fragmentation entre C-14,15 et C-13,17 et dénote la présence d'un groupement alcool en C-17 β (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Abundance

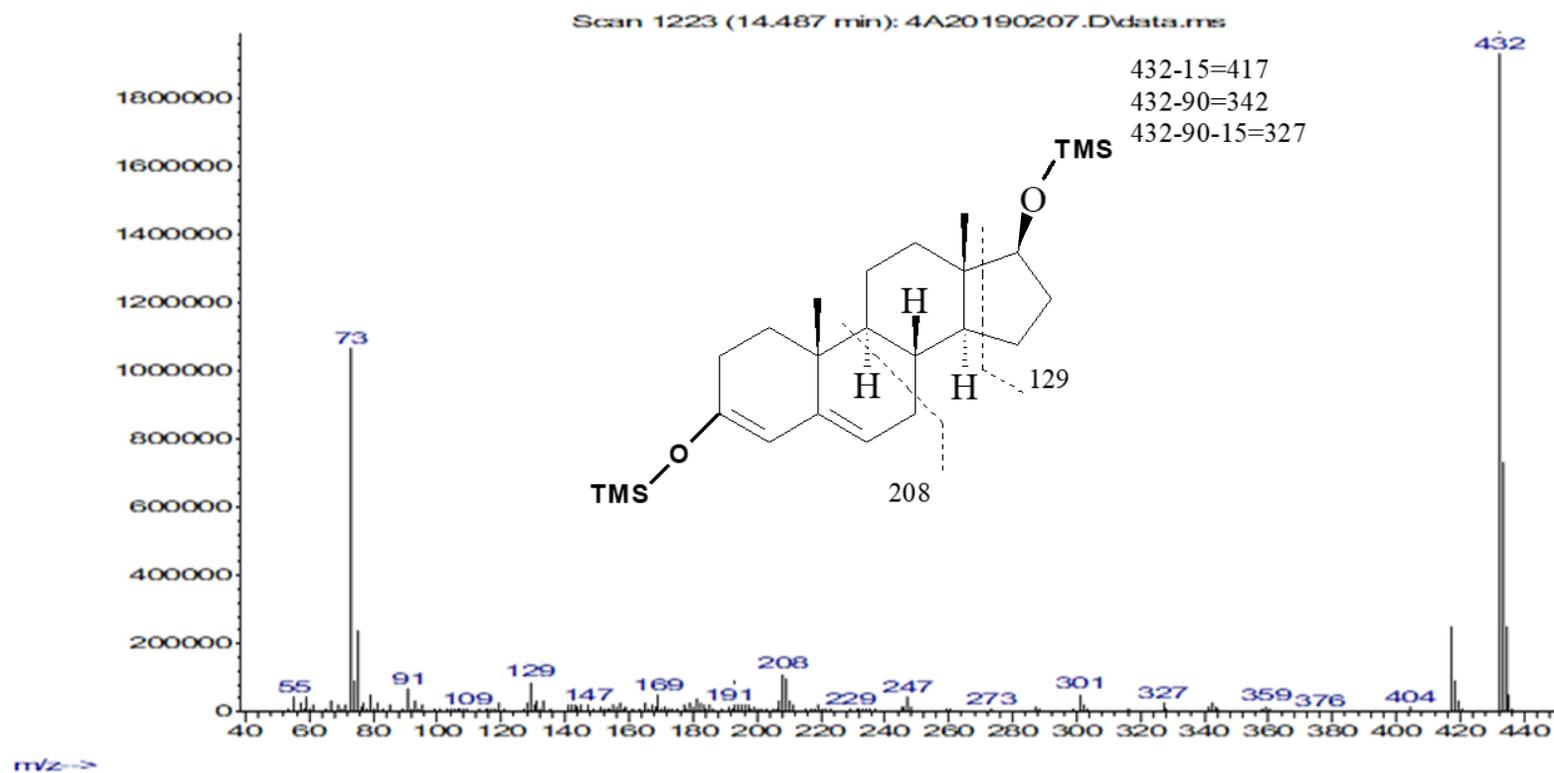


Figure 3.61 : Spectre de masse de la testostérone, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.

6-hydroxyandrostènedione

L'hydroxylation à différentes positions telle qu'en C-6 et C-12 peut être observée lors du métabolisme de phase 1 (Schanzer, 1996; Shahidi, 2001). Le 6-hydroxyandrostènedione est donc bel et bien un métabolite probable de la 4-androstérone.

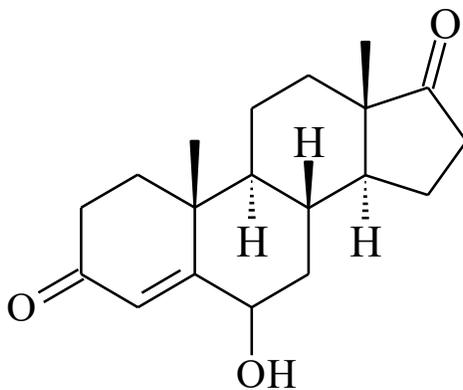


Figure 3.62 : Structure du 6-hydroxyandrostènedione

L'ion moléculaire du 6-hydroxyandrostènedione est à m/z 518. L'ion à m/z 169 provient de la fragmentation entre C-8,14 ; C-12,13 et dénote la présence d'une cétone en C-17. Les ions faibles à m/z 296 et 221 proviennent de la fragmentation entre C-7,8 et C-9,10, mécanisme observé au niveau des stéroïdes comportant des groupements alcool en C-6 (Fragkaki *et al.*, 2009c).

6-hydroxytestostérone

L'ion moléculaire de la 6-hydroxytestostérone est de m/z 520. Techniquement, le même mécanisme de fragmentation que celui observé pour la 6-hydroxyandrostènedione entre C-7,8 et C-9,10 devrait être observé considérant la structure chimique de la substance. En revanche, les ions à m/z 296 et m/z 223-224 devraient être présents sur le spectre de masse. Pourtant, ceux-ci ne sont pas observés. Encore ici, l'ion à m/z 129 est associé à la fragmentation entre C-14,15 et C-13,17 et dénote la présence d'un groupement alcool en C-17 β (Fragkaki *et al.*, 2009c).

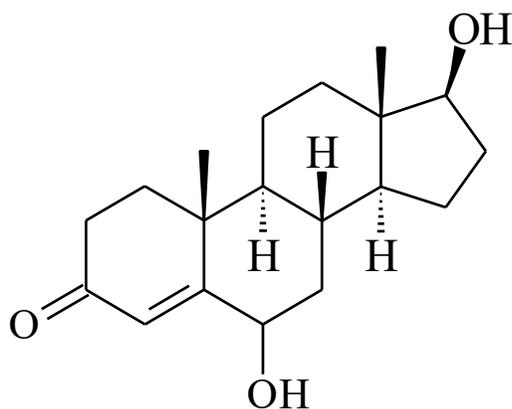


Figure 3.63 : Structure de la 6-hydroxytestostérone

Abundance

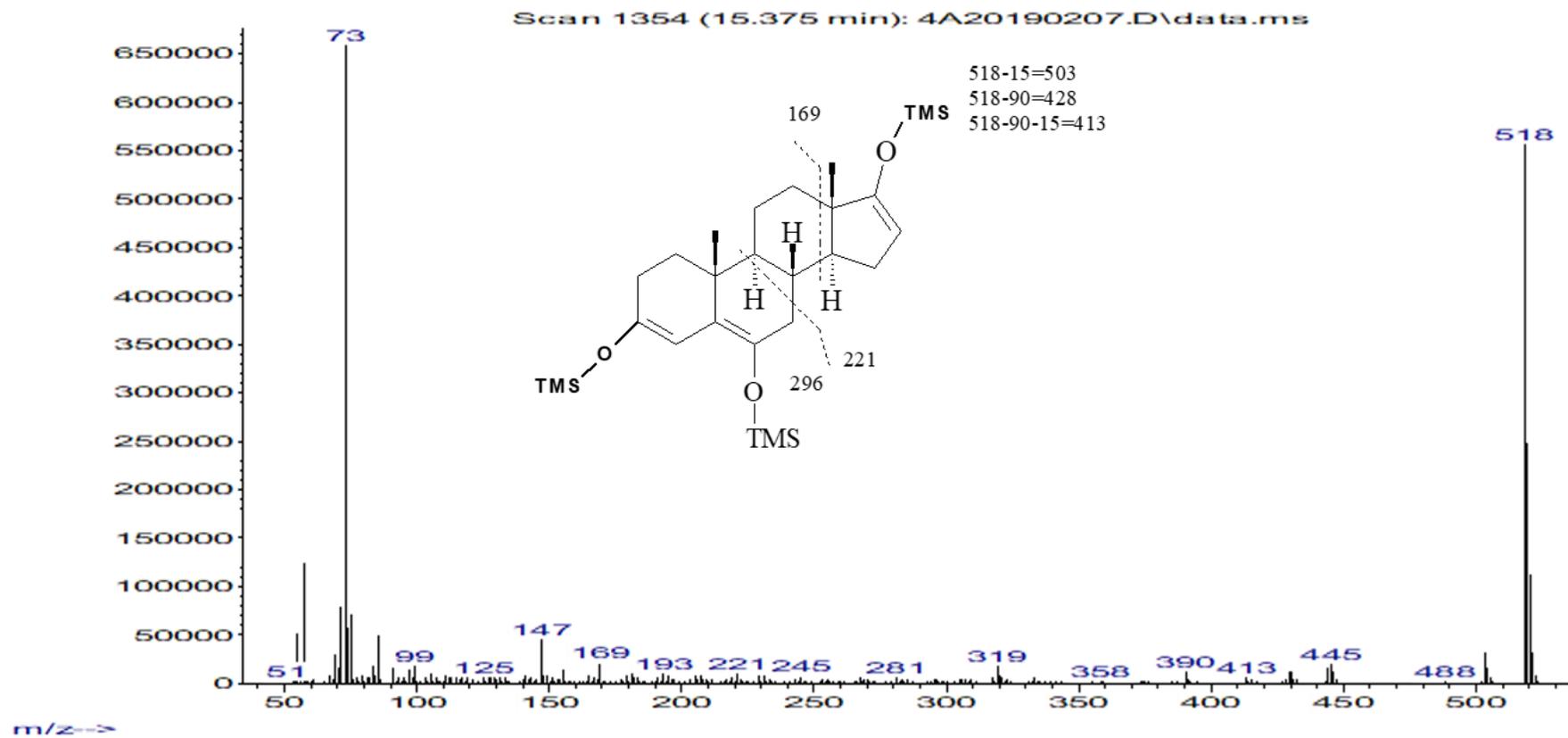


Figure 3.64 : Spectre de masse de la 6-hydroxyandrostènedione, métabolite de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.

Abundance

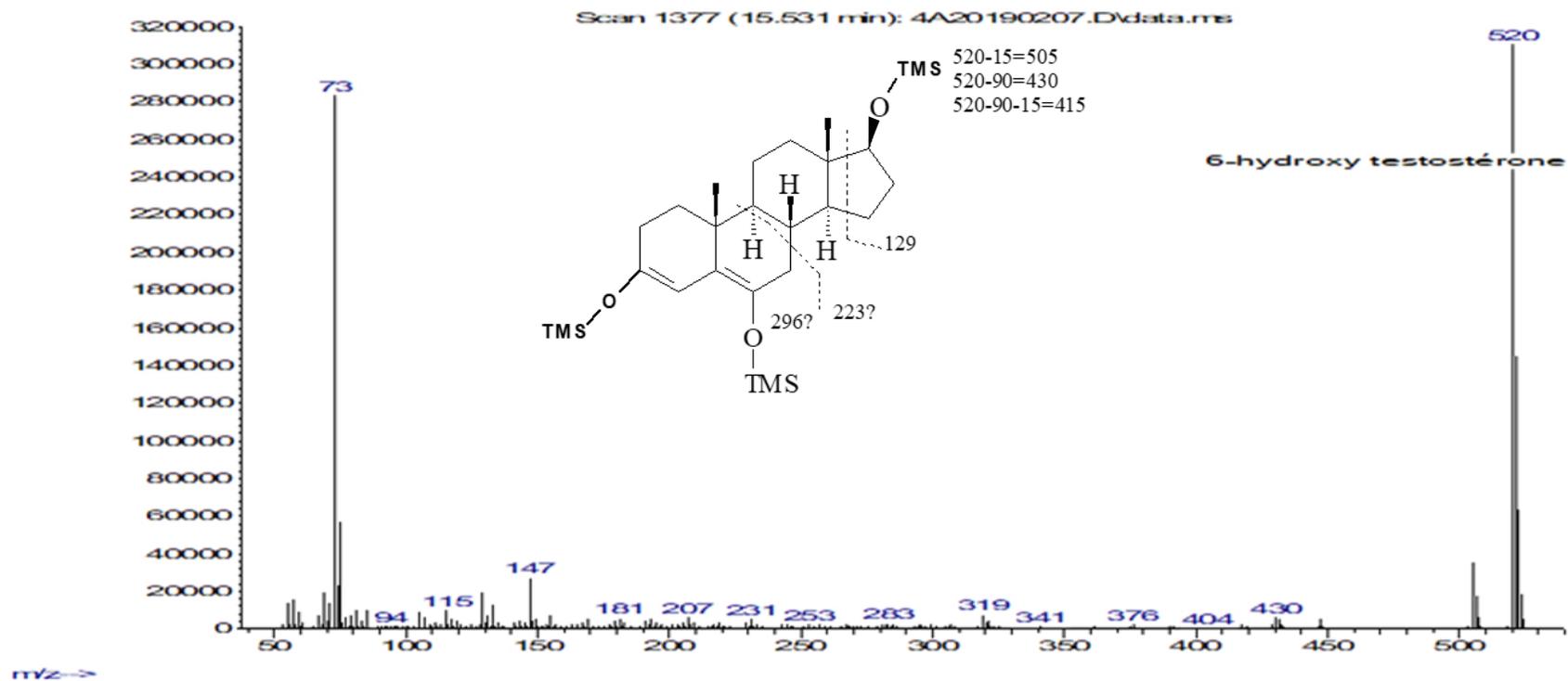


Figure 3.65 : Spectre de masse de la 6-hydroxytestostérone, métabolite de la 3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one obtenu suivant l'incubation en présence de fractions cellulaires S9.

Métabolites obtenus et littérature

Actuellement, il ne semble pas avoir de littérature sur le profil métabolique de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one. Cependant, la substance est aussi connue sous le nom de Δ 4-DHEA (Jellinck *et al.*, 2006). Selon les différents patrons de fragmentation pour les différentes structures proposées et le métabolisme attendu, il est soutenable de proposer ces métabolites. De plus, un des métabolites de la déhydroépiandrostérone (DHEA) est l'androstènedione, obtenue suite à l'action de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase sur la DHEA (El Kihel, 2012; Jellinck *et al.*, 2006; Mo *et al.*, 2006). Ainsi, puisque les substances sont comparables, l'obtention de l'androstènedione comme métabolite s'avère logique.

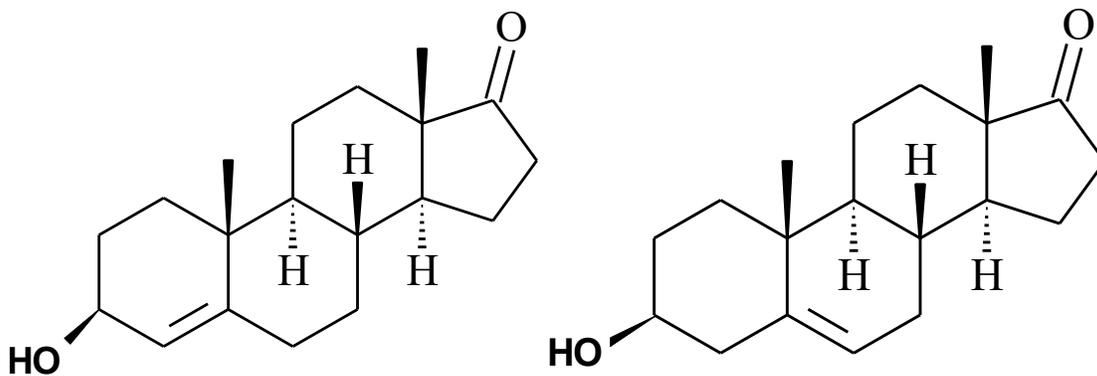


Figure 3.66 : Structure de la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one (gauche) et structure de la DHEA (droite).

À noter que la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one avait été testée comme inhibiteur de l'aromatase de troisième génération et démontrait un potentiel prometteur, sa distribution ne semblant pas altérée par les membranes cellulaires (Amaral *et al.*, 2013). Ainsi, son utilisation dans le dopage athlétique pourrait plutôt se rapporter à cette caractéristique plutôt qu'à titre d'agent anabolisant.

Néanmoins, considérant les résultats obtenus suite aux incubations impliquant la testostérone, il est possible que ces résultats ne représentent pas le profil métabolique exact chez l'homme. Il apparaît nécessaire de contre-vérifier ceux-ci à l'aide d'un autre modèle, possiblement plus complexe, tel qu'une étude d'excrétion chez l'humain. Cette étude pourrait aussi vérifier l'impact sur les niveaux de testostérone des sujets lors de l'administration de la 4-androstérone.

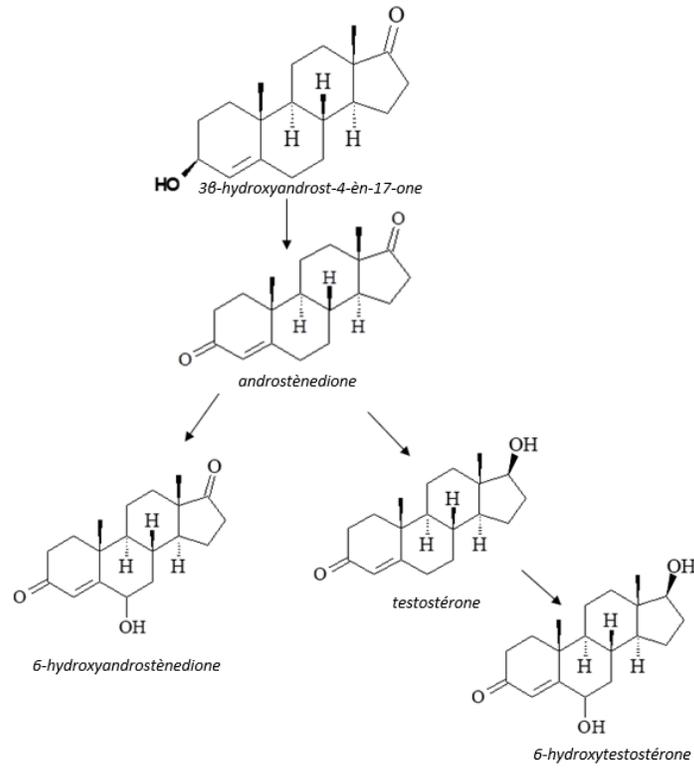


Figure 3.67 : Schéma du métabolisme proposé pour la 3β-hydroxyandrost-4-en-17-one lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.

3.5.2 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one

L'utilisation du nom 1-androstérone, 1-andro, en plus de certaines variations, est un bon exemple de la réutilisation d'une terminologie populaire visant à bernier les consommateurs et les autorités sanitaires. Cette technique a aussi été observée avec le NorAndro, une autre substance actuellement en circulation sur le marché. Un autre but hypothétique derrière l'utilisation du terme 1-Andro pourrait être de profiter des retombées d'une réputation antérieure de la substance, le 1-Andro étant relativement populaire lorsque le marché accueillait entre autres le 4-Andro et plusieurs prohormones précédant le *steroid act* de 2014.

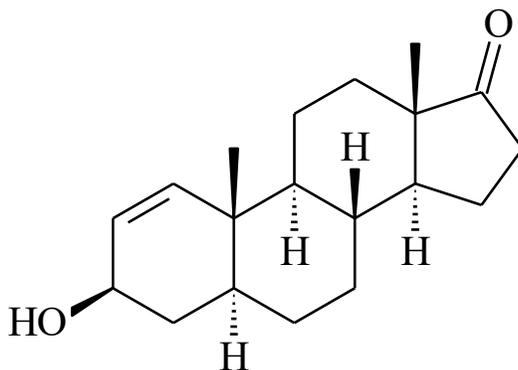


Figure 3.68 : Structure de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one.

La substance est très semblable à la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one étudiée précédemment. L'insaturation sur le cycle A se trouve entre C-1,2 pour la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one plutôt qu'entre C-4,5, comme vu pour la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one. Ainsi, le rendement des incubations devrait théoriquement être semblable à celui déjà observé, vu la grande ressemblance des deux structures.



Figure 3.69 : Emballage du produit reçu contenant la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one.

Le chromatogramme (figure 3.70) montre le résultat obtenu pour les incubations impliquant la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one. L'efficacité métabolique pour la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one est semblable à celui observé pour ceux impliquant la 3 β -hydroxyandrost-4-èn-17-one.

Métabolites obtenus et structures proposées

Comme discuté antérieurement, l'analyse des spectres de masse permet de proposer les structures des métabolites obtenus. Ici encore, les bibliothèques intégrées au logiciel ChemStation du CG-SM permettent aussi, au besoin, de réorienter les possibilités quant aux structures grâce aux spectres de masse de substances connues. Les spectres de masse, structures et mécanismes de fragmentation proposés sont présentés ci-dessous.

Cette fois, seulement 2 métabolites proposés résultent de l'incubation du 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one en présence de fractions cellulaires S9, soit la 1-androstènedione et la 1-testostérone.

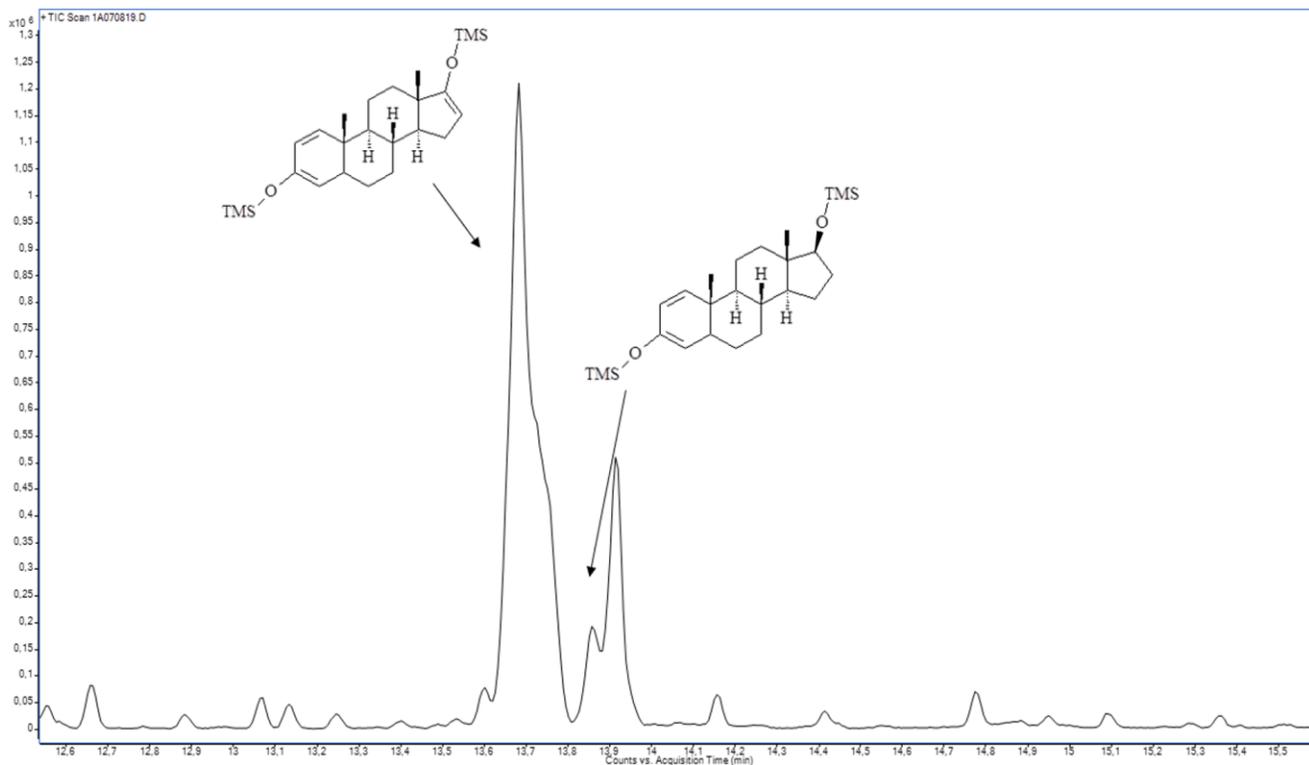


Figure 3.70 : Chromatogramme des métabolites de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one obtenus à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 montrant la présence de 1-androstènedione (TR 13.67 minutes) et de 1-testostérone (TR 13.86 minutes).

1-androstènedione

La 1-androstènedione peut être obtenue suite à l'oxydation du groupement alcool en C-3 β présent sur la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one.

L'ion moléculaire de la 1-androstènedione dérivée TMS est de m/z 430, contre l'ion moléculaire de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one dérivée TMS de m/z 432. Les ions m/z 415, m/z 340 et m/z 325 proviennent respectivement de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), de la perte d'un HOTMS (-90 uma) et de la perte de ces deux groupements subséquentement (-105 uma) à partir de l'ion moléculaire de m/z 430. L'ion à m/z 207 est issu de la fragmentation entre C-7,8 et C-9,10. L'ion à m/z 194 découle de la fragmentation entre C-6,7 et C-9,10 tandis que l'ion à m/z 179 résulte de la fragmentation entre C-5,6 et C-9,10, tous sur le cycle B. Il s'agit de patrons de fragmentation connus pour les stéroïdes ayant une insaturation en C-1,2 et un groupement cétone en C-3. Finalement l'ion à m/z 169 provient de la fragmentation entre C-8,14 ; C-12,13 et dénote la présence d'une cétone en C-17 (Fragkaki *et al.*, 2009c).

1-testostérone

La 1-testostérone résulterait de la réduction de la cétone en C-17 et de l'oxydation de l'alcool en C-3 β à partir de la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one.

L'ion moléculaire, suite à la dérivation triméthylsilyle, est de m/z 432. La perte d'un groupement méthyle (-15 uma) permet l'obtention de l'ion à m/z 417 et la perte d'un groupement HOTMS (-90 uma) celui de l'ion à m/z 342. La perte subséquente de ces derniers mène à l'ion à m/z 327. Les ions à m/z 207, 194 et 179 découlent des mêmes mécanismes de fragmentation que ceux observés sur le cycle B chez la 1-androstènedione, pour les mêmes ions. Cependant, l'ion à m/z 129 confirme la présence d'un groupement alcool en C-17, obtenu suite à une fragmentation entre C-13,17 et C-14,15 (Fragkaki *et al.*, 2009c). La correspondance du spectre de masse de la 1-testostérone a été confirmée auprès de la banque de référence du laboratoire.

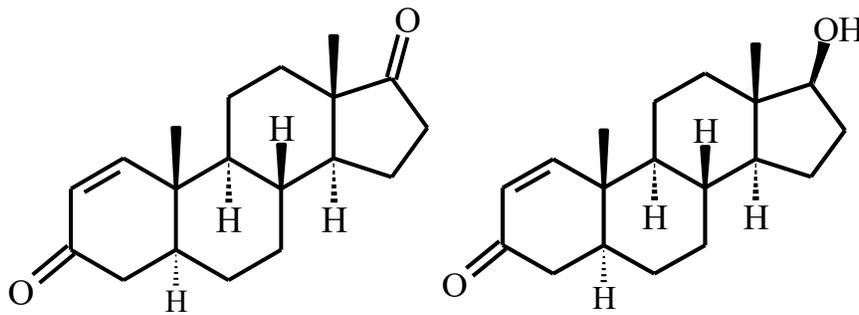


Figure 3.71 : Structures de la 1-androstènedione et de la 1-testostérone, métabolites obtenus suite aux incubations en présence de fractions cellulaires S9.

Abundance

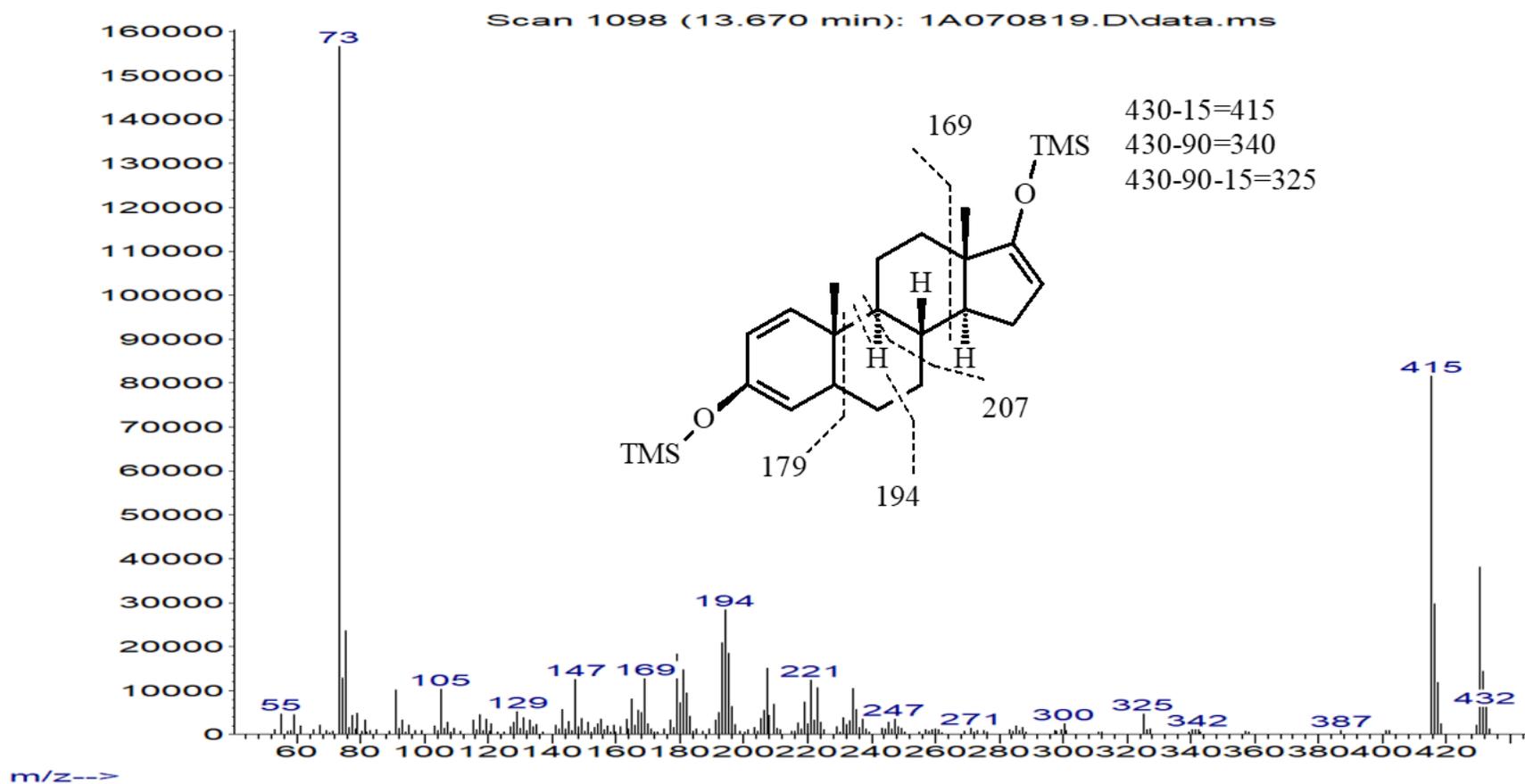


Figure 3.72 : Spectre de masse du 1-androstènedione, obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

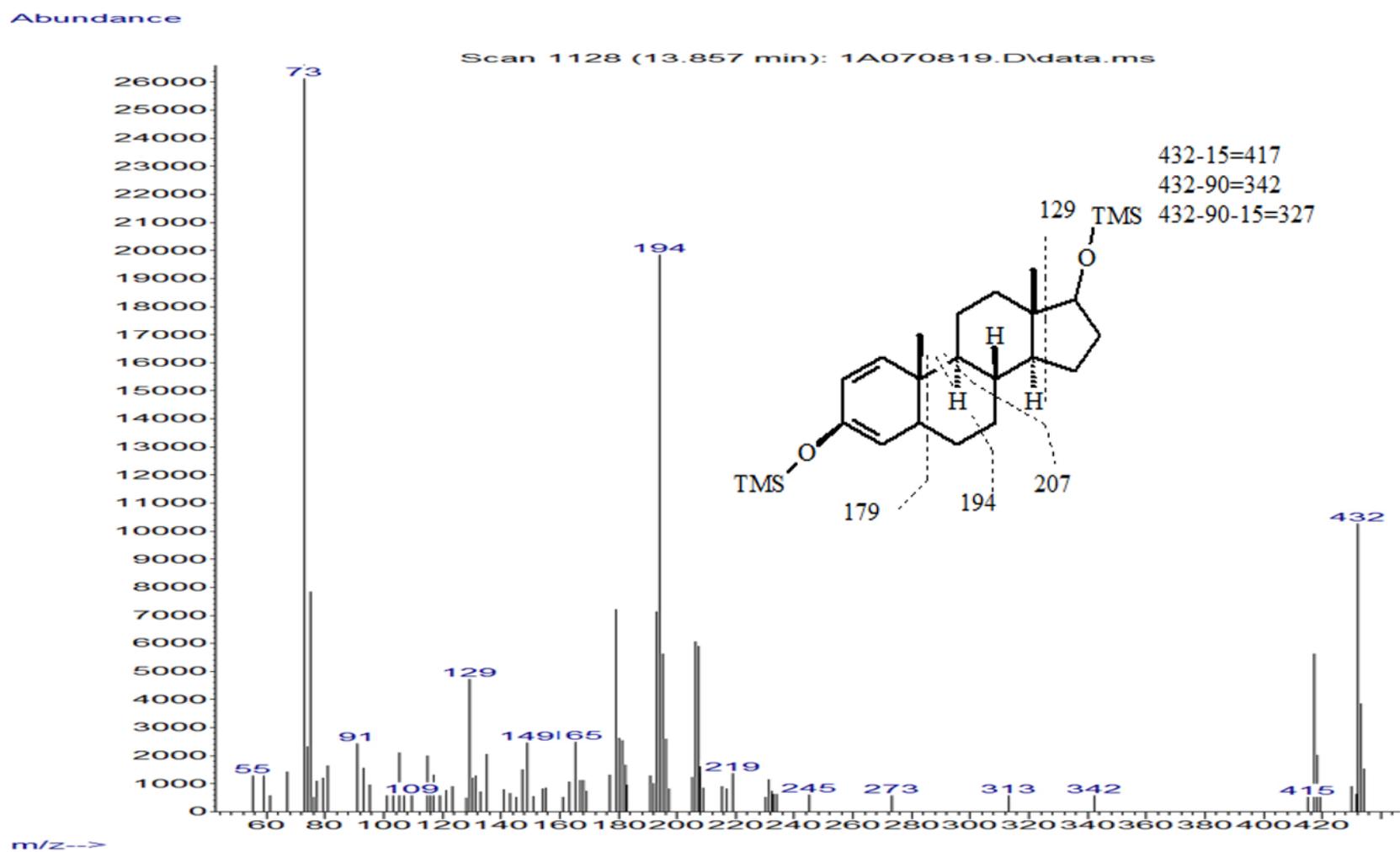


Figure 3.73 : Spectre de masse du 1-testostérone obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

Métabolites obtenus et littérature

Une publication de 2011 s'intéressait à l'identification des métabolites urinaires du 3β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one lorsqu'administré oralement à un humain. Le produit mère se retrouvait alors dans l'urine jusqu'à 2 jours suivant l'administration. L'isomère 3α , quant à lui, pouvait être détecté jusqu'à sept jours suivant l'administration, représentant donc un métabolite particulièrement intéressant. La 1-androstènedione et la 1-testostérone étaient aussi obtenues et considérées comme d'importants métabolites (Parr *et al.*, 2011).

Suite aux incubations du 3β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one en présence de fractions cellulaires S9, la 1-androstènedione et la 1-testostérone sont proposés comme métabolites obtenus. Bien que ces deux métabolites soient centraux au profil métabolique du 3β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one, le modèle ne permet pas d'obtenir une représentation du métabolisme total de la substance. Il est aussi possible que d'autres métabolites aient été produits, mais encore une fois en quantité insuffisante pour permettre la détection et l'analyse par CG-SM. Toutefois, le modèle permet l'obtention de métabolites clés, ce qui pourrait permettre de justifier son utilisation future pour estimer le métabolisme de molécules semblables.

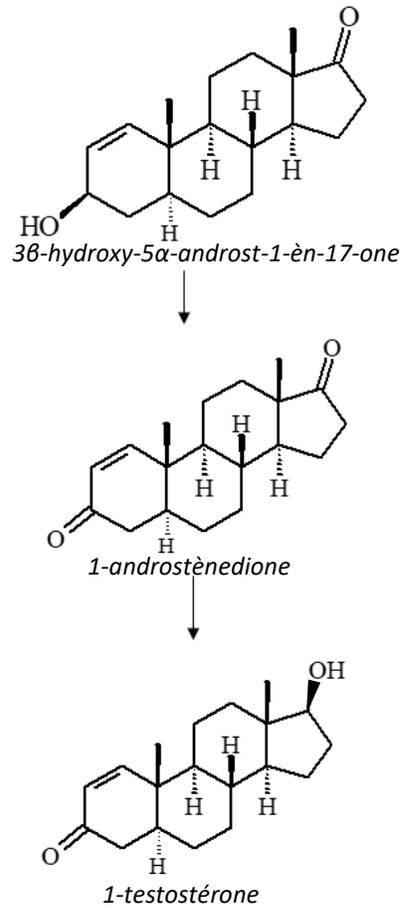


Figure 3.74 : Schéma du métabolisme proposé pour la 3β-hydroxy-5α-androst-1-èn-17-one lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.

3.5.3 Méthylclostébol

La 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one est mieux connu sous le nom commun méthylclostébol. Il s'agit en fait d'une substance autrefois populaire, utilisée abusivement par plusieurs, mais depuis relativement délaissée au profit de substances au profil anabolique plus intéressantes ou aux effets secondaires comparativement minimales (Franke & Berendonk, 1997; Lootens *et al.*, 2011; Rahnema *et al.*, 2015). Par contre, le fait qu'elle soit encore en circulation démontre la nécessité d'améliorer les connaissances l'entourant. La présence du produit sur le marché met aussi la lumière sur son utilisation potentielle par certains, malgré les alternatives plus prisées.



Figure 3.75 : Emballage du produit reçu contenant la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one.

La présence d'un groupement méthyle en C-17 α pourrait avoir un impact négatif sur le rendement des incubations avec les fractions cellulaires S9 par rapport aux substances non méthylées (Kicman, 2008).

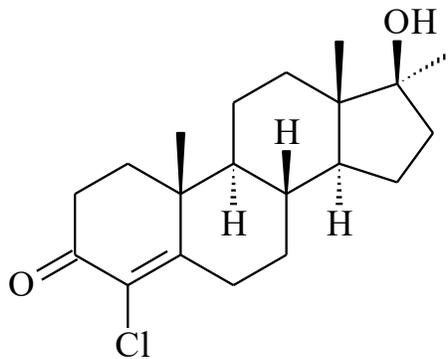


Figure 3.76 : Structure du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one.

Métabolites obtenus et structures proposées

Les incubations avec les fractions cellulaires S9 ont permis d'obtenir quatre métabolites proposés pour le méthylclostébol. En effet, les métabolites proposés suivants sont produits : le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol (3 α -promagnon), le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 α ,17 β -diol (3 β -promagnon), le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxypromagnon) et le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxyméthylclostébol). La contribution isotopique de l'atome de chlore est ici particulièrement importante, donnant un modèle particulier (souvent référé comme A + 2) aux différents pics du spectre de masse. En effet, l'atome de chlore ayant une contribution isotopique d'environ 3 : 1 pour les isotopes 35 et 37, ce patron spécifique dénote sa présence et la perte de celui-ci son absence, advenant qu'aucun autre atome aux mêmes propriétés ne soit présent ailleurs sur la substance (un modèle A + 4 pourrait alors être observé) (Lootens *et al.*, 2011; McLafferty *et al.*, 1993). Finalement, des pertes caractéristiques chez les stéroïdes méthylés en C-17 de 57 uma et 70 uma pourraient aussi être observées sur les spectres de masse (Dürbeck & Büker, 1980).

Abundance

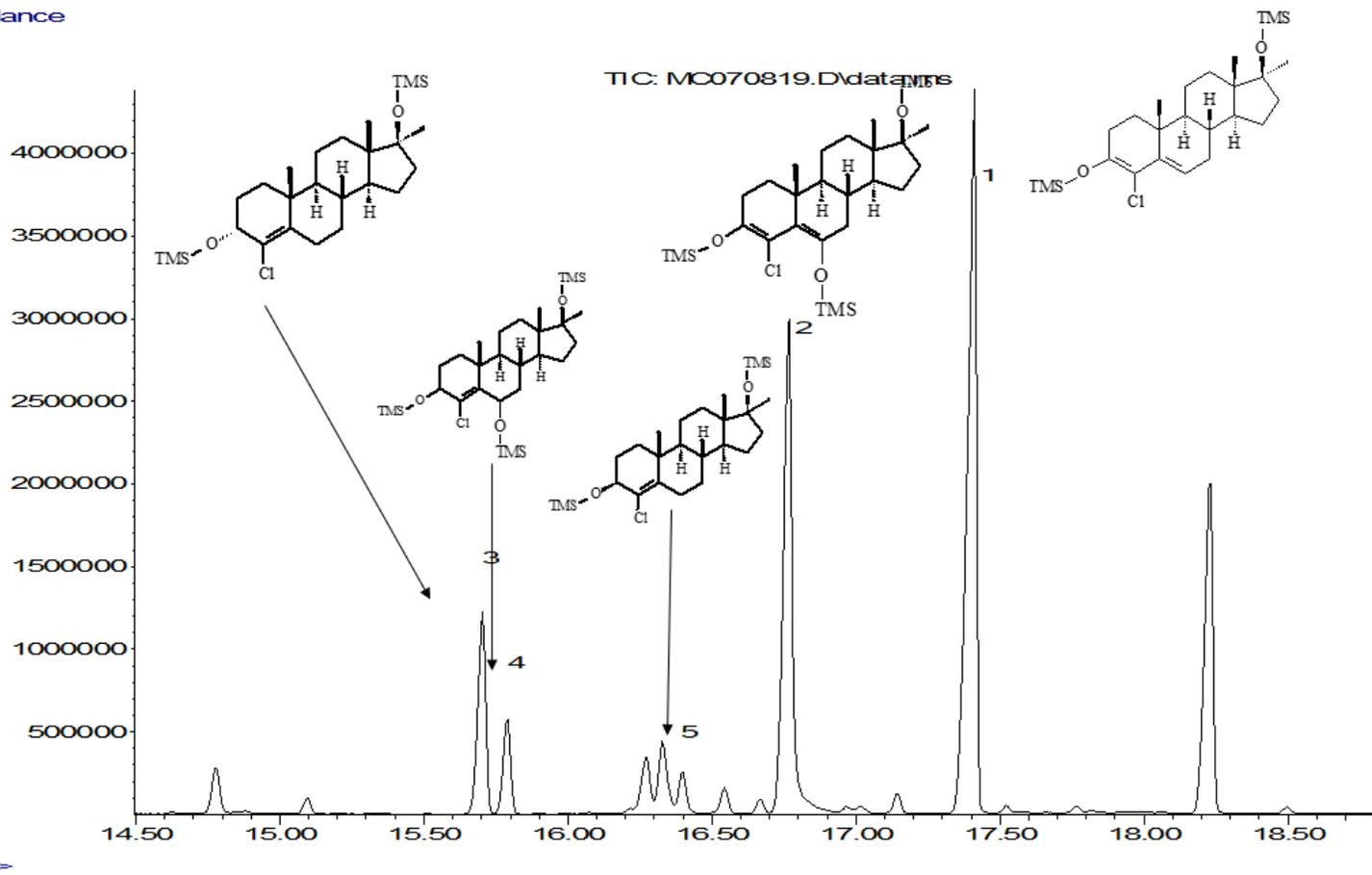


Figure 3.77 : Chromatogramme du résultat obtenu suite à l'incubation en présence de fractions cellulaires S9, montrant plusieurs métabolites soit le 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3 α ,17 β -diol (TR 15.7 minutes), le 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3 β ,17 β -diol (TR 16.4 minutes), le 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3,6,17 β -triol (TR 15.79 minutes), le 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3,6,17 β -triol (TR 16.76 minutes) et le produit mère, le méthylclostébol en TR 17.4 minutes.

4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol (promagnon)

Le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol découlerait de la réduction de la cétone en position C-3 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one par l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD). L'ion moléculaire du promagnon est de m/z 482 et son temps de rétention est de 16.4 minutes. L'ion à m/z 467 découle de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma). Lors de la perte du chlore, l'ion à m/z 447 est obtenu et la perte subséquente d'un HOTMS (-90 uma) résulte en l'ion à m/z 357. La perte du chlore est mise en évidence puisque le modèle A + 2 n'est plus observable pour les ions à m/z 447 et 357. Les ions à m/z 267 et 215 proviennent de la fragmentation impliquant C-5,6 et C-9,10 tandis que l'ion à m/z 143 de celle entre C-13,17 et C-14,15, marquant la présence d'un groupement méthyle en C-17 α (Fragkaki *et al.*, 2009c).

4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 α ,17 β -diol

Ce métabolite résulterait, comme le promagnon, de la réduction du groupement cétone en C-3 du méthylclostébol, mais cette fois par la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 α -HSD) plutôt que la 3 β -HSD. L'isomère α est souvent favorisé donc plus abondant que son homologue β (Schanzer, 1996).

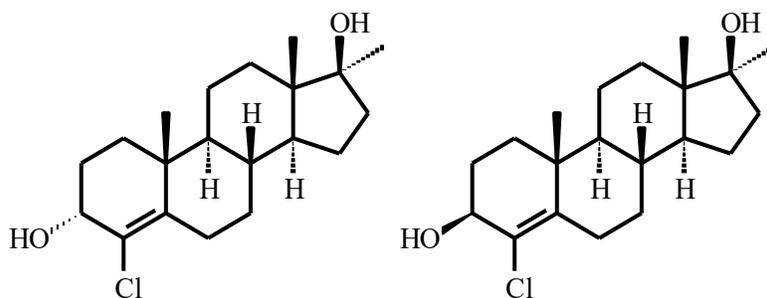


Figure 3.78 : Structures du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 α ,17 β -diol et du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol, deux isomères obtenus suite à l'incubation du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one en présence de fractions cellulaires S9.

L'ion moléculaire est aussi de m/z 482 et s'élué à 15.7 minutes. Le spectre de masse est pratiquement identique à celui du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol, les mécanismes de fragmentation étant donc les mêmes. Le temps de rétention et l'abondance relative des deux substances permettent la distinction.

Abundance

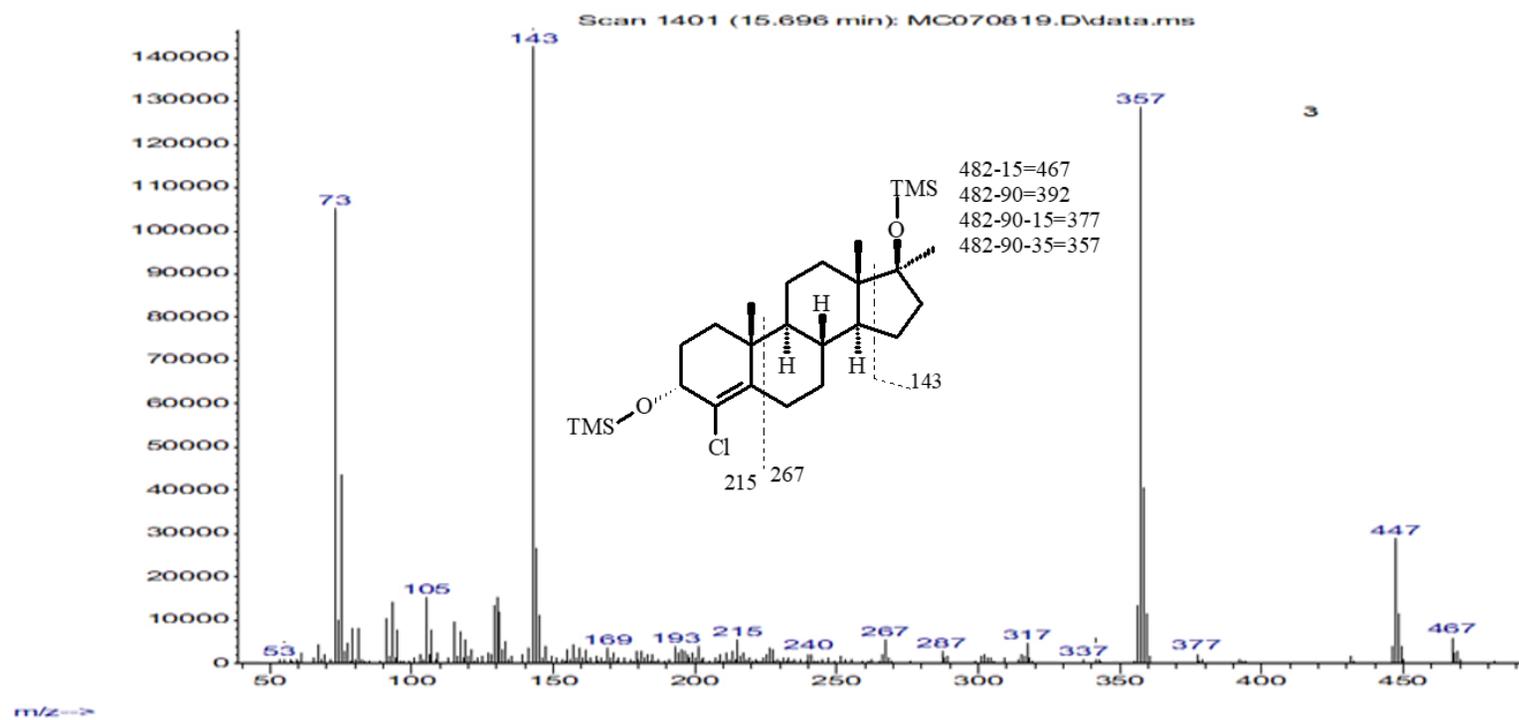


Figure 3.79 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3 α ,17 β -diol (3 α -promagnon) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

Abundance

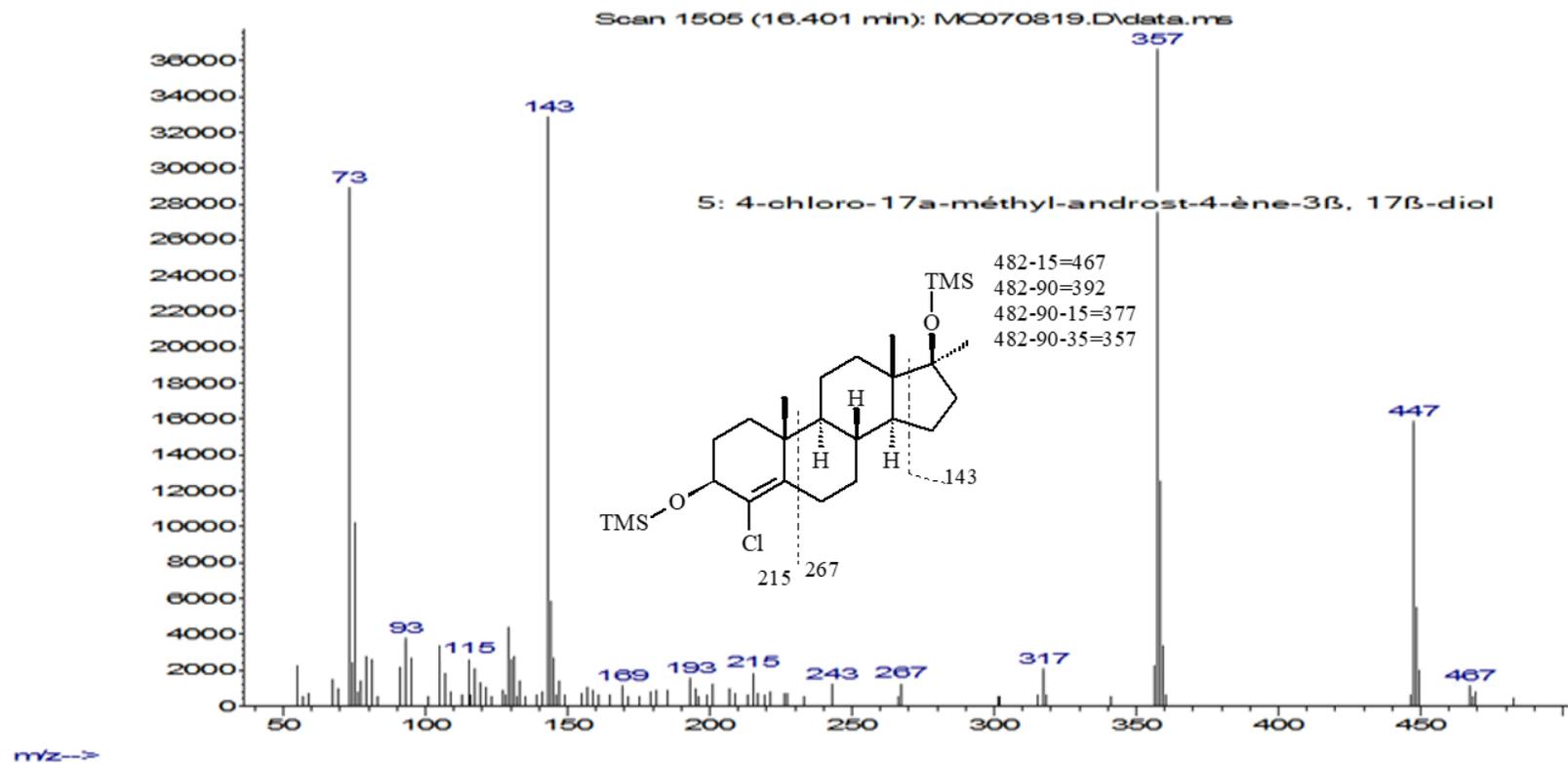


Figure 3.80 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthyl-androst-4-ène-3 β ,17 β -diol (3 β -promagnon) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxypromagnon)

Le 6-hydroxypromagnon est issu de l'hydroxylation en C-6 du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3 β ,17 β -diol. Son ion moléculaire est de m/z 570, équivalent à l'ajout d'un groupement hydroxyle au promagnon. Les ions à m/z 555, 480 et 465 résultent respectivement de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), d'un HOTMS (-90 uma) et des deux (-105 uma). Les ions à m/z 535 (perte du chlore seulement; -35 uma) et 445 (perte du chlore et HOTMS) dénotent l'absence d'un atome de chlore résultant en la perte du modèle A + 2. L'ion à m/z 143 dénote la présence du groupement méthyle en C-17 α tandis que l'ion à m/z 318 proviendrait de la fragmentation entre C-6,7 et C-9,10, marquant la présence d'un hydroxyle en C-6. L'ion à m/z 303 serait obtenu suite à la perte subséquente d'un groupement méthyle.

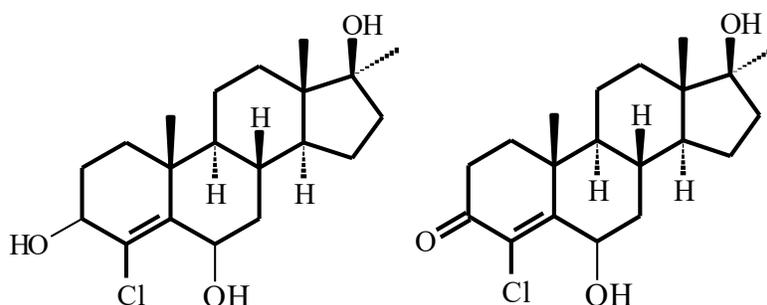


Figure 3.81 : Structure du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (gauche) et du 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-6,17 β -diol-3-one (droite), métabolites obtenus suite à l'incubation du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one en présence de fractions cellulaires S9.

4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxyméthylclostébol)

Similaire aux 6-hydroxypromagnon, le 6-hydroxyméthylclostébol est obtenu suite à l'hydroxylation en C-6 du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one. Ainsi, le spectre de masse est relativement semblable à celui du 6-hydroxypromagnon. L'ion moléculaire est cette fois à m/z 568. Les ions à m/z 553, 478 et 463 proviennent de la perte d'un groupement méthyle, d'un HOTMS et des deux groupements, respectivement. À noter que la différence d'abondance pour les ions dénotant la perte du chlore est inverse à ce qui est observé pour le 6-hydroxypromagnon. En effet, l'ion à m/z 533 est ici beaucoup plus abondant que celui à m/z 443 tandis que pour le 6-hydroxypromagnon, l'ion 445 était plus abondant que l'ion 535. De plus, l'ion à m/z 518 (-Cl -Me) est cette fois présent et abondant sur le spectre à l'inverse du spectre de masse du 6-hydroxypromagnon.

Abundance

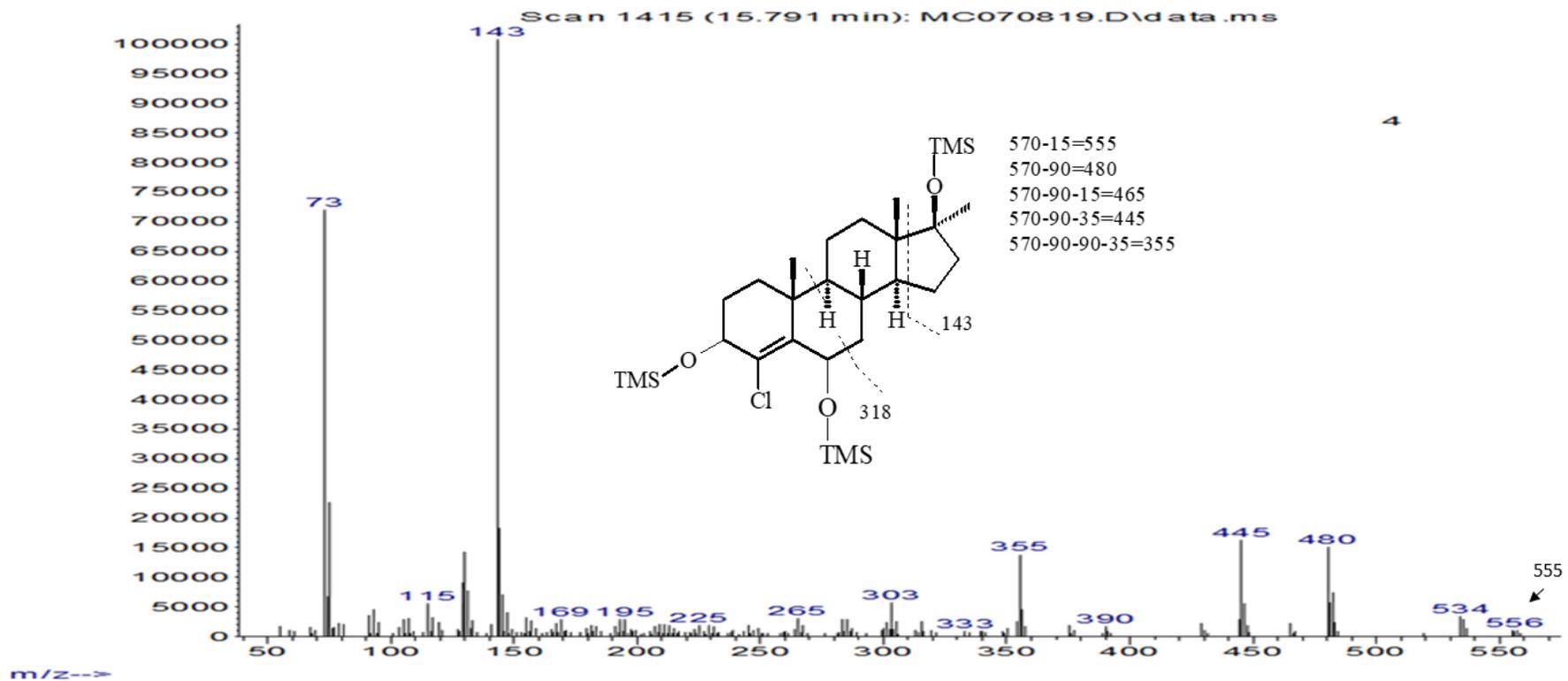


Figure 3.82 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxypromagnon) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

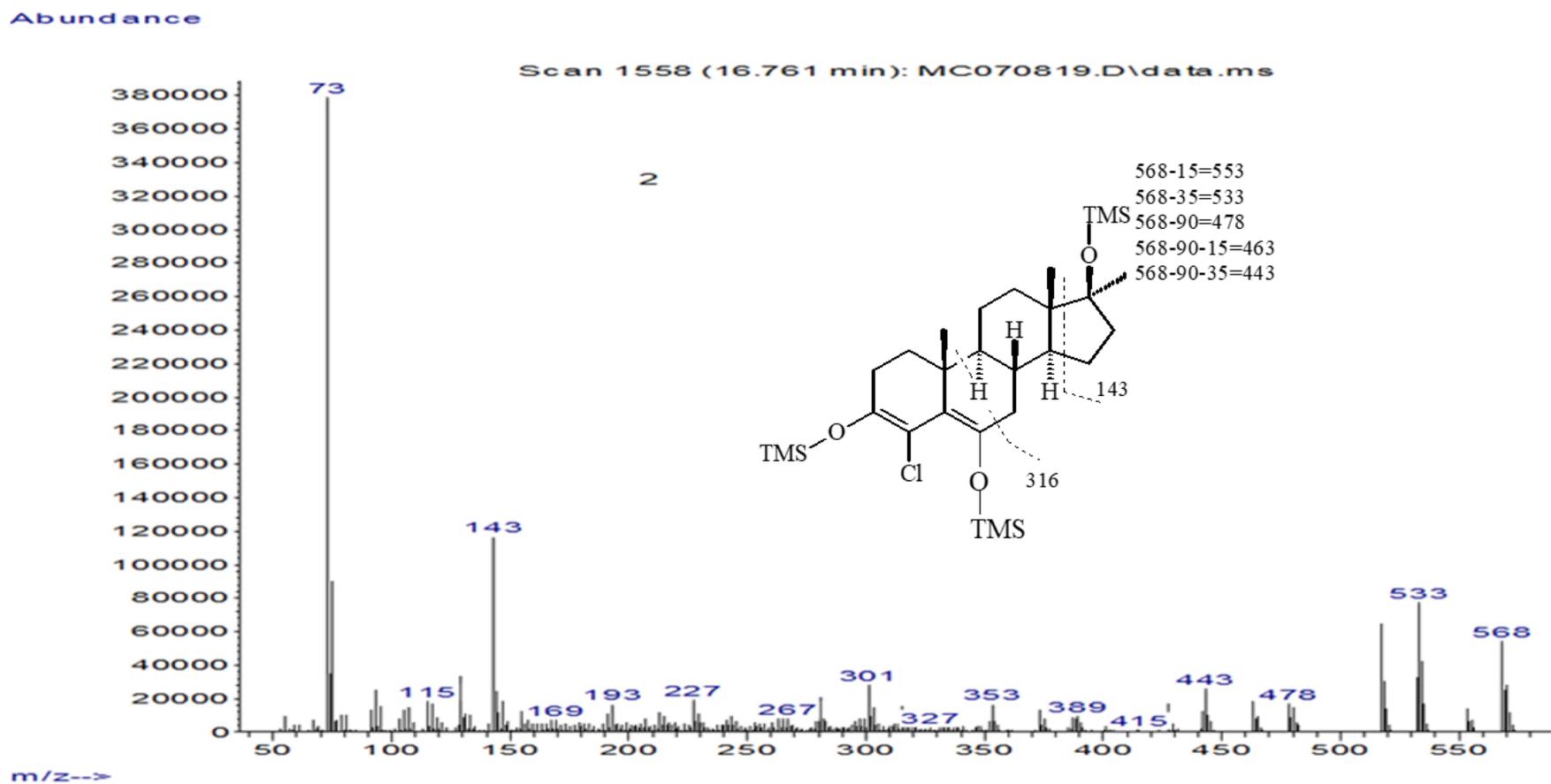


Figure 3.83 : Spectre de masse du 4-chloro-17 α -méthylandrosta-4-èn-3,6,17 β -triol (6-hydroxyméthylclostébol) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

Abundance

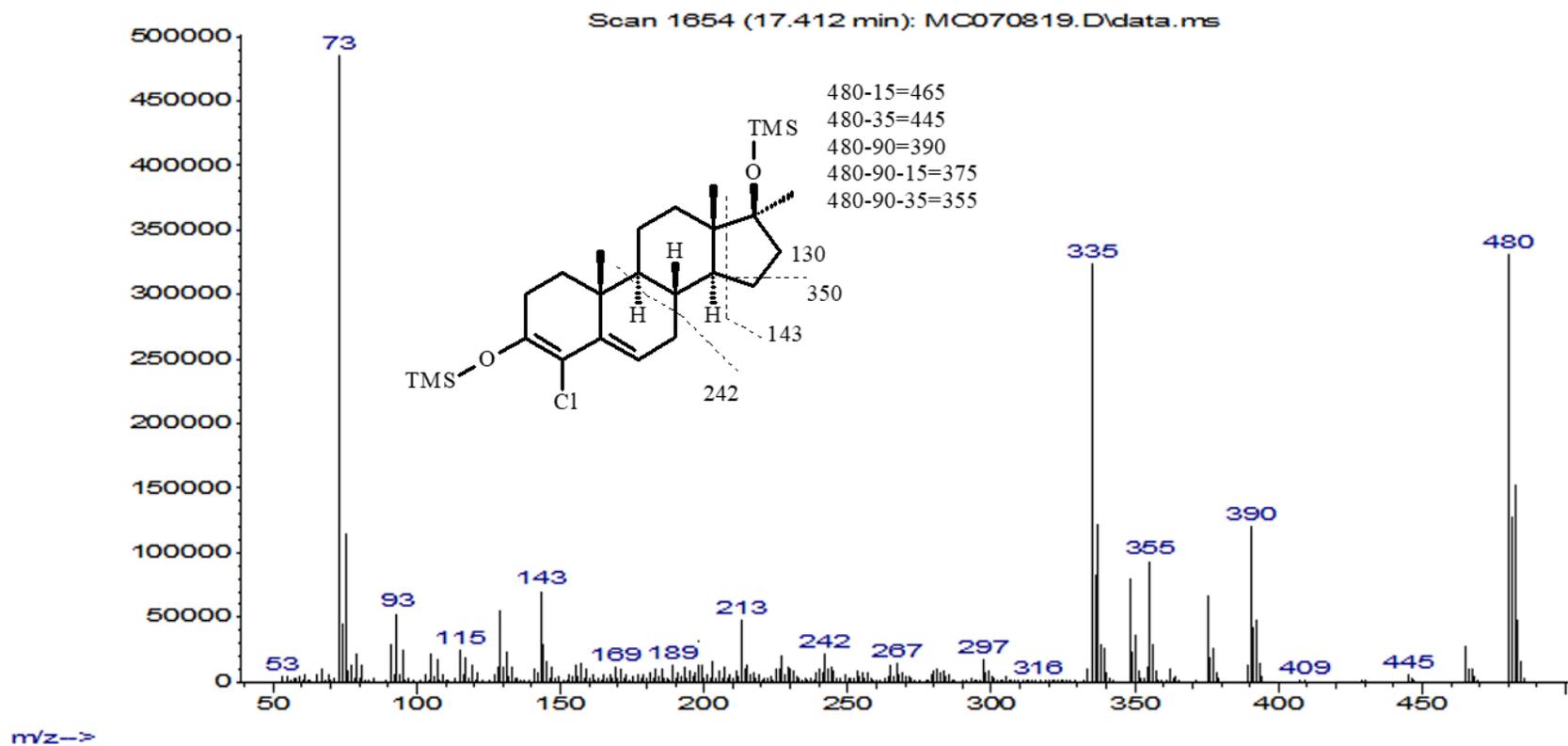


Figure 3.84 : Spectre de masse du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrosta-4-èn-3-one (méthylclostebol) obtenu à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 et le patron de fragmentation proposé.

4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one (méthylclostébol/produit mère)

Le produit mère reste le produit majoritaire (en abondance) à la suite des incubations en présence de fractions cellulaires S9. L'ion moléculaire est à m/z 480 et le spectre de masse résultant diffère grandement de ceux associés aux homologues à cétone réduite. Les ions à m/z 445 et 355 sont obtenus suivant la perte du chlore (-35 uma) et la perte additionnelle d'un HOTMS (-90 uma), respectivement. Les ions à m/z 465, 390 et 375 proviennent encore une fois de la perte d'un groupement méthyle (-15 uma), la perte d'un HOTMS et la perte des deux groupements (-105 uma). La fragmentation sur le cycle B entre C-7,8 et C-9,10 permet l'obtention de l'ion à m/z 242, un mécanisme habituel pour les stéroïdes possédant une cétone en C-3 et une insaturation en C-4,5. La fragmentation sur le cycle D permet l'obtention des ions m/z 143 (C-13,17 et C-14,15), m/z 130 et 350 (C-13,17 et C-15,16), les ions 143 et 130 étant habituels pour les stéroïdes méthylés en C-17 α (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Métabolites obtenus et littérature

Tel qu'attendu, le pic majoritaire du chromatogramme des métabolites du 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrost-4-èn-3-one est le produit mère lui-même. On dénote aussi la présence d'un autre pic abondant qui représenterait le 4-chloro-17 α -méthylandrost-4-èn-3,6,17 β -triol. Quatre métabolites sont formés grâce aux incubations en présence de fractions cellulaires S9. Il est possible que plusieurs autres métabolites ne soient pas formés en quantité suffisante pour permettre la détection. Ceci pourrait subséquemment mener à une estimation erronée du profil métabolique.

Les métabolites proposés sont en accord partiel avec la littérature actuelle. En effet, les métabolites hydroxylés en position C-6 sont habituellement observés pour les stéroïdes ayant un alcool en C-17 β et un groupement méthyle en C-17 α (Schanzer, 1996). De plus, une procédure interne du laboratoire dénote la présence de métabolites hydroxylés en C-6 au sein du profil métabolique du 4-chlorodehydrométhyltestostérone (DHCMT). Le document technique en question considère le 4-chlorodehydrométhyltestostérone comme un précurseur du méthylclostébol. Finalement, les métabolites hydroxylés en C-12, en C-16 et doublement hydroxylés en C-x,16 avaient été obtenus en 2011 lors d'une étude avec des souris chimériques exprimant des hépatocytes humains (Lootens *et al.*, 2011). Ainsi, l'obtention des 6-hydroxyméthylclostébol et 6-hydroxypromagnon est en accord avec le métabolisme théorique des stéroïdes méthylés en C-17 α et avec le métabolisme observé par le laboratoire pour la DHCMT, un précurseur métabolique du méthylclostébol.

Le métabolisme exact du méthylclostébol n'est pas actuellement confirmé à l'aide d'une étude d'excrétion ni répertorié. L'étude d'excrétion chez l'humain reste actuellement le modèle le plus représentatif. Bien qu'éthiquement regrettables, les métabolites obtenus à l'aide des incubations doivent donc être confirmés à l'aide d'étude d'excrétion contrôlée pour s'assurer du bienfondé du modèle. Puisque le métabolisme exact du méthylclostébol n'est pas actuellement confirmé, cette étude permet d'améliorer la connaissance actuelle et d'obtenir des métabolites potentiels.

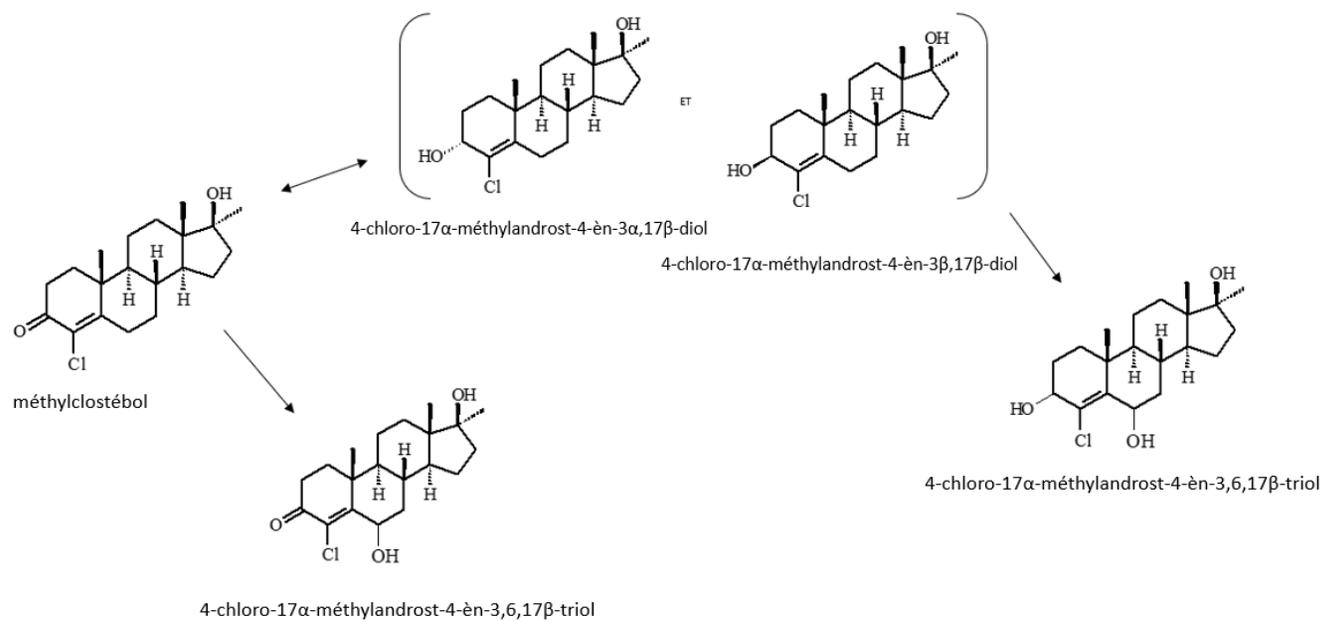


Figure 3.85 : Schéma du métabolisme proposé pour la 4-chloro-17 β -hydroxy-17 α -méthylandrosta-4-èn-3-one lors d'incubations en présence de fractions cellulaires S9.

3.5.4 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one

L'apparition du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one sur le marché des agents anaboliques alternatifs semble surgir en 2011 et se maintenir jusqu'à aujourd'hui, sous différents distributeurs (Abbate *et al.*, 2015; Magdziak *et al.*, 2011). La voie des cyanostéroïdes avait été poursuivie comme analogues aux agents anaboliques il y a de cela plus de 60 ans (Levitsky *et al.*, 2017), mais ne semble pas populaire vu le peu de littérature disponible à ce sujet.

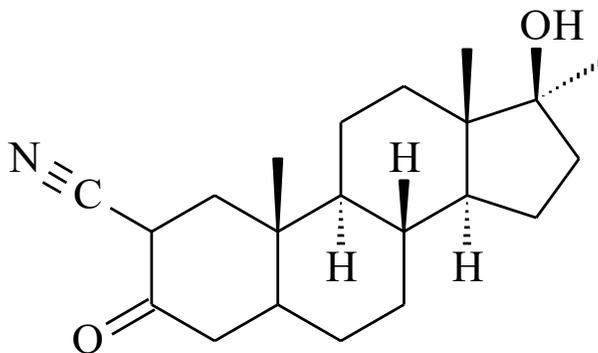


Figure 3.86 : Structure du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one.

Le cynostane semble se retrouver périodiquement sur le marché, parfois sous différents distributeurs ou accompagné d'autres substances désignées comme alternatives (Abbate *et al.*, 2015). Les noms cyanostane, cyanobol et 2-cyano-dromostolone sont parfois utilisés sur internet pour référer à cette substance.

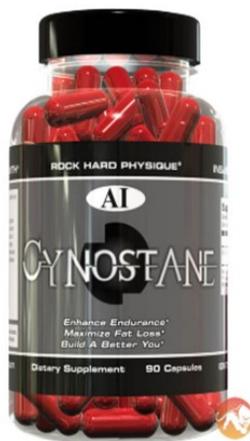


Figure 3.87 : Emballage du produit reçu contenant la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one.

Métabolites obtenus et structures proposées

Le profil métabolique de phase 1 attendu pour le cynostane pourrait inclure un métabolite résultant de la réduction de la cétone en C-3, des métabolites hydroxylés en C-6 considérant la présence des groupements alcool et méthyle en C-17 β et C-17 α respectivement (Schanzer, 1996). L'importante présence d'un produit mère intact à la suite des incubations est probable étant donné la présence d'un groupement méthyle en C-17 α , modification visant l'inhibition de la dégradation et du métabolisme hépatique (Kicman, 2008; Shahidi, 2001).

2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstan-3-ol

Suivant la proposition selon laquelle la structure du produit présent dans le cynostane serait la 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one(p.99), le 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstan-3-ol est le métabolite proposé, qui résulterait de la réduction de la cétone en position C-3 du produit mère.

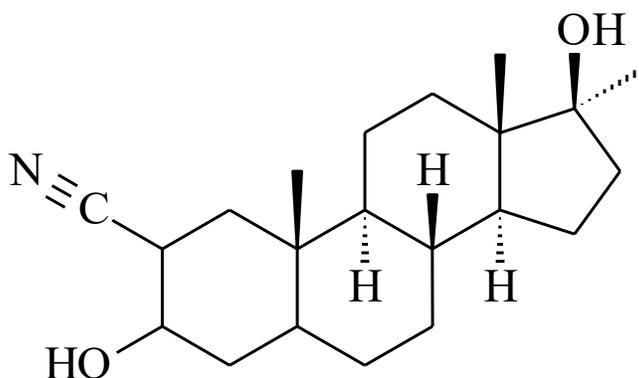


Figure 3.88 : Structure du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstan-3-ol, métabolite réduit obtenu suite à l'incubation du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one en présence de fractions cellulaires S9.

Abundance

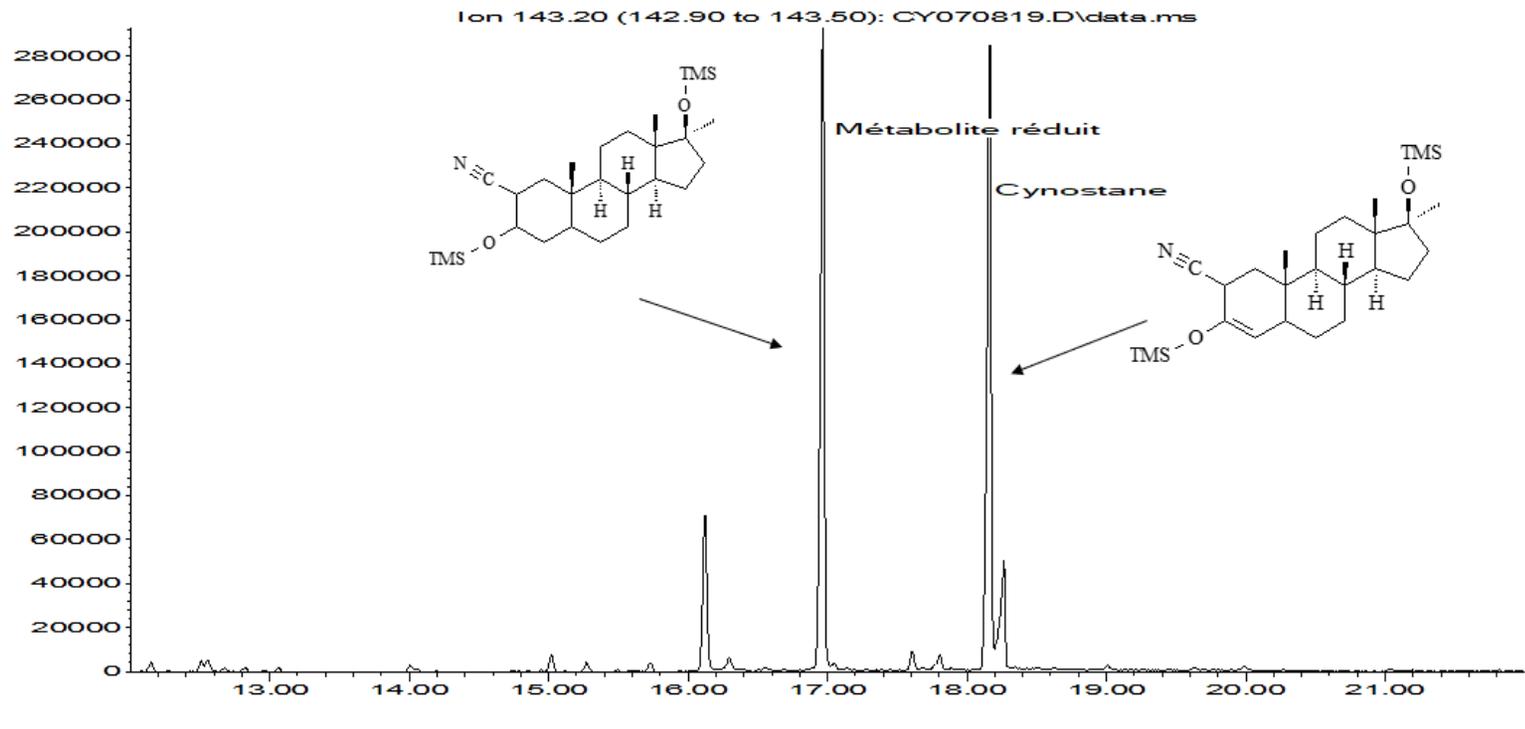


Figure 3.89 : Chromatogramme des métabolites obtenus à la suite de l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 du cynostane, soit le produit mère (TR 18.18 minutes) et le 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstan-3-ol (TR 16.96 minutes).

Abundance

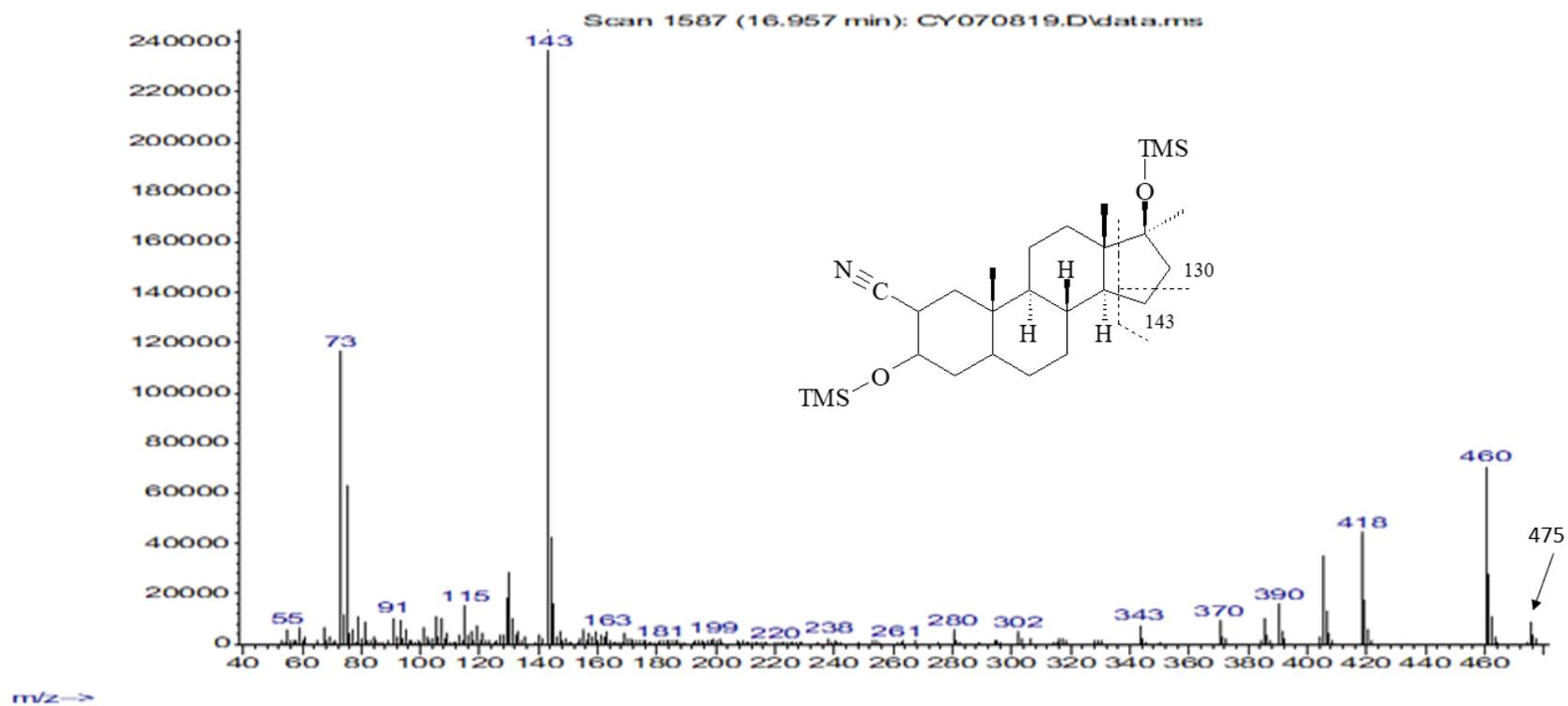


Figure 3.90 : Spectre de masse du métabolite réduit du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one, le 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androst-3-ol.

L'ion moléculaire est de m/z 475, plutôt que celui de m/z 473 pour le produit mère, appuyant la réduction de la cétone. La perte de 70 uma et 57 uma, caractéristique pour les stéroïdes méthylés en C-17 (Dürbeck & Bölker, 1980), mène à l'obtention respective des ions à m/z 405 et 418. L'ion à m/z 390 serait expliqué par la perte subséquente d'un groupement méthyle suivant la perte du 70 uma caractéristique, menant à l'ion à m/z 390. L'ion à m/z 460 provient de la perte d'un groupement méthyle (15 uma), celui à m/z 385 de la perte d'un HOTMS (-90 uma) tandis que la perte subséquente des deux permet d'expliquer l'ion à m/z 370.

La fragmentation sur le cycle D entre les carbones C-13,17 et C-14,15 abouti à l'ion à m/z 143 alors que la fragmentation entre C-13,17 et C-15,16 entraîne l'obtention de l'ion à m/z 130. Ces ions permettent de confirmer la présence des groupements méthyles en C-17 α et alcool en C-17 β (Fragkaki *et al.*, 2009c).

Les incubations du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one en présence de fractions cellulaires S9 permettraient donc d'obtenir un seul métabolite proposé, présenté ci-dessus. Il s'agit du métabolite réduit en C-3 proposé, soit le 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxy-5 ϵ -androstan-3-ol.

Le produit mère est aussi obtenu suite aux incubations, comme attendu. Le spectre de masse et temps de rétention correspondent à ceux observés pour la substance mère précédant les incubations (figure 3.48).

Métabolites obtenus et littérature

L'absence de littérature entourant le métabolisme des cyanostéroïdes et plus particulièrement du 2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one ne permet pas de confirmer les résultats obtenus. De plus, en l'absence d'ions caractéristiques provenant de la fragmentation du cycle A, il n'est pas possible de confirmer ou d'infirmer la conformation adoptée par la structure, tant pour le produit mère que pour le métabolite obtenu. Cependant, comme précédemment mentionné, puisque la conformation 2-cyano-3-oxo est répandue chez plusieurs autres dérivés stéroïdiens synthétiques (Levitsky *et al.*, 2017), l'adoption de cette conformation au profit de la conformation proposée par Abbate (Abbate *et al.*, 2015) est plus probable, d'où la proposition.

Les résultats obtenus pourraient s'avérer bénéfiques à l'amélioration des connaissances actuelles entourant la substance testée, mais ne peuvent actuellement qu'être considérés comme une estimation du profil métabolique réel. Cette substance devrait faire l'objet d'études supplémentaires. Celles-ci pourraient tant porter sur l'identification à l'aide d'un standard synthétisé que sur la confirmation quant à la précision du modèle par rapport à un modèle représentatif connu. Il serait ensuite possible de comparer le profil métabolique atteint face à l'étendue du profil réel, advenant une divergence. Une étude d'excrétion semble nécessaire pour permettre la comparaison des résultats avec le profil métabolique observé chez l'humain.

4 CONCLUSION

4.1 Rappel de l'état actuel du marché

L'aisance entourant la circulation de produits illégaux sur internet pouvant être utilisé en contexte de dopage sportif est alarmante. Plusieurs stéroïdes anabolisants, souvent présentés sous forme d'alternatives légales ou même indiqués par des nomenclatures abandonnées/erronées, se trouvent en circulation sur internet. Ceux-ci sont parfois référés sur des forums par différents spécialistes autoprofessés, ou simplement mis en évidence sur les différents sites des distributeurs. Ces produits sont couramment entourés des habituelles techniques de marketing et de désinformation visant à duper autant l'acheteur que les autorités législatives, dissimulant les molécules réelles pour éviter aussi longtemps que possible les mesures en place visant le retrait de tels produits sur le marché (Abbate *et al.*, 2015; Ayotte *et al.*, 2016; Ljungqvist, 2017; Parr *et al.*, 2004; Rahnema *et al.*, 2015). Quatorze produits d'intérêts ont été commandés et onze reçu dans le cadre de ce projet de recherche (voir tableau 3.1 p.46).

4.2 Rappel du modèle permettant l'estimation du métabolisme et son utilité

Le modèle des fractions cellulaires S9 visait à obtenir éthiquement des métabolites de phase 1 représentatifs du métabolisme observé chez l'humain pour les stéroïdes sur le marché. Comme précédemment mentionnée, l'administration de stéroïdes anabolisants est associée à plusieurs effets délétères sur la santé des utilisateurs, tant en contexte d'interventions médicales qu'en contextes externes (Evans, 2004; Hatton *et al.*, 2014; Kicman, 2008; Shahidi, 2001; Thieme & Hemmersbach, 2009). Les fractions cellulaires S9, dérivées des cellules hépatiques de l'humain, permettent d'obtenir une estimation du métabolisme attendu des différentes substances sans toutefois devoir soumettre des patients/volontaires à l'administration de produits nocifs pour leurs santés (Brandon *et al.*, 2003; Ekins *et al.*, 2000; Plant, 2004). Bien que les candidats soient en connaissance de cause lors d'étude d'excrétion, le volet éthique est discutable puisque les effets néfastes sont connus. De surcroit, la logique entre l'antidopage et l'administration de substances dopantes même dans des buts de recherche peut être perçue comme contradictoire. La mise en place d'un modèle alternatif est importante, même si celui-ci n'est pas parfait. Celui-ci adhérerait aux principes fondamentaux de la lutte contre le dopage ou du moins pourrait diminuer le besoin et/ou la fréquence des études d'excrétions.

Ainsi, les métabolites obtenus pour les produits moins connus et/ou étudiés pourraient aussi être proposés comme substances à rechercher dans les tests de dépistage antidopage. Ces produits méconnus

pourraient être abusés par des individus visant à contourner les réglementations en place en utilisant des produits dopants non recherchés permettant des améliorations variables à leurs performances dans des contextes de compétition. De plus, cette réalité pourrait être en vigueur depuis un certain temps.

Le modèle visé, soit les fractions cellulaires S9, est relativement intéressant, mais son utilité semblerait plus spécifique à certains types de produits seulement. En effet, l'efficacité métabolique observée lors de l'incubation de la testostérone en présence des fractions cellulaires S9 était très intéressante. Par contre, les métabolites diagnostiques associés au métabolisme de la testostérone chez l'humain n'étaient pas obtenus, ou du moins en quantité insuffisante pour permettre l'analyse. D'autres métabolites étaient obtenus en quantité importante, dont un (le précurseur métabolique de la testostérone, soit l'androstènedione) surpassant l'abondance du produit mère. Ainsi, l'efficacité métabolique est considérée intéressante, mais non représentative de l'ensemble pour la testostérone. En ce qui a trait aux essais métaboliques impliquant la méthastérone, les deux métabolites principaux associés à la méthastérone recherchés lors des dépistages par le laboratoire ont été obtenus, soit la $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- $16\epsilon,17\beta$ -dihydroxy- 5α -androstane- 3-one et le $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- $3\epsilon,17\beta$ -diol. Le métabolite long terme n'a pas été obtenu, ce qui est associé à une limitation du modèle utilisé. De plus, les incubations mènent à l'obtention du $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- $2\beta,3,17\beta$ -triol, répertorié dans la littérature (Gauthier *et al.*, 2009) et d'un métabolite non répertorié, la $2\alpha,17\alpha$ -diméthyl- 5α -androstane- $2\beta,17\beta$ -diol- 3-one . Ceci peut montrer tant une force qu'une faiblesse du modèle.

Le modèle montrait une efficacité métabolique importante, mais non spécifique pour la testostérone, le stéroïde de référence. En revanche, son efficacité était acceptable et représentative lors des incubations en présence de la méthastérone. Son utilisation dans le but d'obtenir des métabolites de façon éthique est donc soutenable en retenant que certains métabolites obtenus, peu importe l'abondance, pourraient toutefois n'être observés que dans ce contexte.

Le modèle des fractions cellulaires S9 n'implique pas l'administration de substances potentiellement nocives pour la santé des sujets et n'est pas en désaccord avec le fondement même de la lutte contre le dopage. Celui-ci permet l'obtention rapide, éthique et à relativement faible coût de métabolites, que ce soit pour des stéroïdes connus ou non. Son usage visant l'estimation du métabolisme attendu est donc fondé. Cependant, une faiblesse du modèle se rapportant à sa spécificité, l'usage de celui-ci en parallèle avec d'autres modèles confirmés reste de rigueur pour obtenir un métabolisme représentatif de celui attendu chez l'humain.

4.3 Rappel des métabolites obtenus

Les principaux métabolites obtenus dans le cadre des incubations en présence des fractions cellulaires S9 sont présentés dans le tableau 4.1. Seulement deux métabolites importants sont obtenus pour la 3 β -hydroxy-5 α -androst-1- \Rightarrow -17-one, soit la 1-androstènedione et la 1-testostérone. Bien qu'il s'agisse de métabolites centraux obtenus auparavant, il s'agit ici de seulement deux des cinq répertoriés dans la littérature.

Quatre métabolites sont obtenus suite à l'incubation de la 3 β -hydroxyandrost-4- \Rightarrow -17-one, soit l'androstènedione, la testostérone et leurs 6-OH respectifs. L'absence de littérature entourant le métabolisme de la 3 β -hydroxyandrost-4- \Rightarrow -17-one n'offre donc aucun repère quant à la justesse de l'estimation provenant des fractions cellulaires S9. Par contre, la substance étant structurellement rapprochée de la DHEA, un métabolisme semblable peut être attendu. L'androstènedione est un métabolite qui serait ainsi partagé par les profils de la DHEA et de la 3 β -hydroxyandrost-4- \Rightarrow -17-one. Les autres métabolites sont en accord avec le métabolisme usuel observé pour les stéroïdes chez l'humain.

Les métabolites entourant l'incubation du méthylclostébol sont aussi en accord partiel avec la littérature impliquant d'autres modèles imparfaits. Outre le produit mère restant abondant suite à l'incubation, le promagnon (métabolite réduit en C-3) ainsi que les 6-hydroxy respectifs sont obtenus. De plus, ceux-ci respectent les contraintes théoriques entourant le métabolisme des stéroïdes chez l'humain.

Le cynostane (2-cyano-17 α -méthyl-17 β -hydroxyandrost-3-one) représente une substance dont le métabolisme était jusqu'alors inconnu du contrôle antidopage. Son incubation mène à l'obtention d'un seul métabolite, étant le métabolite réduit en C-3 relatif à la substance mère. Étant inconnu du milieu, les deux structures pourront toutefois être ajoutées aux contrôles de routine et ainsi améliorer les connaissances des instances responsables de ce combat continu.

Tableau 4.1 Métabolites obtenus pour les 4 substances d'intérêts suite à l'incubation en présence des fractions cellulaires S9.

	Métabolites obtenus
1-Andro	<ul style="list-style-type: none"> - 1-Androstènedione - 1-Testostérone
4-Andro	<ul style="list-style-type: none"> - Androstènedione - Testostérone - 6-Hydroxyandrostenedione - 6-Hydroxytestostérone
Cynostane	<ul style="list-style-type: none"> - 2-cyano-17α-méthyl-17β-hydroxy-5ϵ-androstan-3-ol (Métabolite 3-hydroxylé)
Méthylclostebol	<ul style="list-style-type: none"> - Promagnon (Métabolite 3-hydroxylé) - 6-Hydroxyméthylclostébol - 6-Hydroxypromagnon

L'ajout des résultats provenant de ces tests étant bénéfique à l'amélioration des connaissances et des techniques entourant la lutte contre le dopage sportif, il faudra toutefois que les résultats obtenus soient contre-vérifiés auprès d'un ou plusieurs modèles plus robustes et représentatifs du métabolisme chez l'humain. Actuellement, bien qu'éthiquement discutable, le meilleur modèle semble toujours être l'étude d'excrétion, impliquant malheureusement l'administration de substances potentiellement dangereuses à des sujets humains. En effet, ce modèle représente actuellement le meilleur outil pour évaluer le métabolisme chez l'humain puisqu'il s'agit directement d'observer le métabolisme d'un humain suivant la prise d'une substance. Dans le but de contrer les problématiques éthiques et l'absurdité entourant l'administration de substances dopantes délétères à des sujets humains visant l'étude du métabolisme pour améliorer la lutte contre le dopage, l'incubation en présence de fractions cellulaires S9 avait été choisie pour permettre l'estimation et l'étude du métabolisme sans toutefois impliquer les mêmes contraintes. Bien que plusieurs informations découlent des essais, le modèle ne permet pas l'obtention d'un métabolisme représentatif et/ou du profil complet entourant certaines substances. Ainsi, il peut

s'agir d'un outil complémentaire permettant d'étudier de nouvelles substances, mais aussi de diminuer le besoin ou la fréquence d'études d'excrétions. Plusieurs des informations obtenues dans le cadre de ce projet pourront être utilisées ou ajoutées dans l'étendue des connaissances de l'antidopage, et ce, en évitant le recours aux études d'excrétions.

Lors des incubations, des métabolites de phase 1 ont été obtenus. Des réactions d'hydroxylation en C-6 ont majoritairement été observées, en plus des usuelles réactions d'oxydation et de réduction concentrées en C-3 et C-17. L'efficacité métabolique était grandement supérieure en présence de substances stéroïdiennes non méthylées en C-17 tandis que l'hydroxylation en C-6 ne semblait réservée qu'à un type de stéroïdes en particulier. Les informations récoltées permettent de définir la 4-andro (3β -hydroxyandrost-4-èn-17-one) comme une prohormone probable de la testostérone et de l'androstènedione suivant sa prise orale, étant tous deux des produits connus et interdits. À la lumière du même type d'informations, la 1-andro (3β -hydroxy-5 α -androst-1-èn-17-one) peut aussi être considérée comme une prohormone de la 1-androstènedione et 1-testostérone. Encore ici, ces deux substances sont connues du domaine et leur utilisation, interdite.

4.4 Sommaire

Plusieurs stéroïdes de synthèse sont disponibles sur internet. Certains ne sont pas testés au cours des analyses de routine au sein des laboratoires antidopage. Suite à l'analyse du marché, quatorze produits ont été commandés et onze ont été reçus. Une importante fraction des substances contenues dans ces produits ont été identifiées comme étant des stéroïdes anabolisants interdits. L'analyse des spectres de masse des substances non identifiées puisqu'inconnus ou en l'absence de standard permet de proposer des structures se basant sur le squelette stéroïdien. Ainsi, la majorité des substances renfermées dans les produits seraient soit des substances connues interdites ou structurellement reliées à celles-ci. Quatre produits méconnus ou au métabolisme ambigu ont été incubés en présence des fractions cellulaires S9. Plusieurs métabolites d'importances en sont ressortis comme présentés auparavant. Le métabolisme du cynostane était jusqu'alors inconnu, celui du 4-andro non répertorié tandis que les profils métaboliques des 1-andro et méthylclostébol sont en accord partiel avec la littérature.

4.5 Ouverture

L'ajout des métabolites obtenus découlant des substances moins banales au sein des procédures de dépistages du contrôle antidopage permettra d'améliorer les connaissances du domaine. De plus, ces connaissances pourraient aiguiller les laboratoires vers le produit réellement utilisé par les athlètes, advenant que les produits subséquents varient selon la substance initialement administrée. La mise en place et l'intégration de méthodes spécifiques reliées à ces nouvelles substances et le métabolisme s'y rattachant seront nécessaires pour pouvoir profiter des informations obtenues. Plusieurs autres voies et pistes pourraient être poursuivies suite à ce projet.

Tout d'abord, pour s'assurer de la justesse de la représentation du modèle utilisé quant au métabolisme chez l'humain pour les substances inconnues, les résultats devraient être contre-vérifiés auprès d'un modèle reconnu comme étant représentatif et robuste. Il semble que les études d'excrétions sont encore le modèle de référence pouvant permettre ce genre de comparaison. Advenant une importante divergence entre le modèle et le métabolisme observé, d'autres améliorations visant à contrer les limitations du modèle pourraient être poursuivies. À noter que le modèle des fractions cellulaires S9 habilite l'utilisateur à accéder à l'obtention de métabolites de phase II moyennant quelques modifications.

Ensuite, la confirmation de la stéréochimie des métabolites obtenus en l'absence de matériel de référence nécessiterait l'usage de technique concomitante, telle une analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) par exemple. De plus, la synthèse de matériaux de référence pourrait s'avérer nécessaire.

L'utilisation du modèle des fractions cellulaires S9 pourrait aussi être transposée pour permettre l'obtention de quantité importante de certains produits sans toutefois recourir à la synthèse chimique, moyennant un avantage marqué et une confirmation des produits découlant auprès de standard(s). Dans ce cas précis, la purification subséquente des substances sur chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) et le développement de méthodes s'y rattachant seraient à prévoir.

L'amélioration des connaissances quant aux substances en circulation, celles entourant le métabolisme des produits méconnus et le transfert technologique en découlant sont essentiels au maintien d'un niveau adéquat des capacités des laboratoires dans un domaine constamment en évolution qu'est le contrôle du dopage sportif. De plus, l'utilisation de substances illicites, aussi déplorable soit-elle, n'est pas négligeable, et ce particulièrement au niveau de la population. Initialement, la problématique reliée à la production et la distribution, accompagnée de celle associée à l'utilisation illicite de stéroïdes anabolisants androgènes,

mènent à leur classification comme substances contrôlées de classe 3 par le Congrès américain en 1991, démontrant la gravité du problème (Shahidi, 2001).

Malgré la mise en place de cette législation, l'utilisation d'agents anabolisants par les clients de salles de sports et de musculation était estimée, entre 1993 et 1997, à 5 % alors que ce pourcentage augmentait entre 25-50 % au niveau des salles de musculations spécialisées en culturisme (Kicman, 2008). En 2000, on estime à trois millions d'utilisateurs de stéroïdes anabolisants androgènes au sein de la population américaine. Entre 2.7 % et 2.9 % de jeunes Américains adultes auraient déjà consommé des stéroïdes anabolisants androgènes (Evans, 2004).

Il est primordial que la problématique d'accès aux substances illicites soit constamment mise en lumière tant que le contrôle législatif sera latent pour que les autorités compétentes prennent les mesures nécessaires permettant de retirer du marché ce genre de produits à haut potentiel délétère sur la santé de ses utilisateurs.

5 RÉFÉRENCES

- Abbate V, Kicman AT, Evans-Brown M, McVeigh J, Cowan DA, Wilson C, Coles SJ & Walker CJ (2015) Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements - a significant risk to public health. *Drug testing and analysis* 7(7):609-618.
- Abourashed EA, El-Alfy AT, Khan IA & Walker L (2003) Ephedra in perspective--a current review. *Phytotherapy research : PTR* 17(7):703-712.
- Abushareeda W, Fragkaki A, Vonaparti A, Angelis Y, Tsviou M, Saad K, Kraiem S, Lyris E, Alsayrafi M & Georgakopoulos C (2014) Advances in the detection of designer steroids in anti-doping. *Bioanalysis* 6(6):881-896.
- Agence mondiale antidopage A (2020) *CODE MONDIAL ANTIDOPAGE STANDARD INTERNATIONAL*. Montréal, Canada. 10 p
- Alquraini H & Auchus RJ (2018) Strategies that athletes use to avoid detection of androgenic-anabolic steroid doping and sanctions. *Molecular and cellular endocrinology* 464:28-33.
- Amaral C, Varela C, Azevedo M, da Silva ET, Roleira FM, Chen S, Correia-da-Silva G & Teixeira N (2013) Effects of steroidal aromatase inhibitors on sensitive and resistant breast cancer cells: aromatase inhibition and autophagy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 135:51-59.
- AnaSci.Org (2004) *Anavar-Oxandrolone*. <http://www.anasci.org/vB/showthread.php?t=1404> (Consulté le 19/04/2021)
- Andrén-Sandberg A (2016) The History of Doping and Anti-Doping.).
- Ayotte C, Goudreault D & Charlebois A (1996) Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J. Chromatogr. B* 687(1):3-25.
- Ayotte C, Goudreault D, Cyr D, Gauthier J, Ayotte P, Larochelle C & Poirier D (2006) Characterisation of chemical and pharmacological properties of new steroids related to doping of athletes. *Recent advances in doping analysis* 14:151-160.
- Ayotte C, Sylvestre A, Charlebois A & Poirier D (2016) Detection of 5alpha-androst-2-en-17-one and variants: Identification of main urinary metabolites in human urine samples by GC-MS and NMR. *Drug testing and analysis* 8(11-12):1174-1185.
- Baume N, Mahler N, Kamber M, Mangin P & Saugy M (2006) Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 16(1):41-48.
- Beckett A & Cowan D (1978) Misuse of drugs in sport. *British journal of sports medicine* 12(4):185-194.
- Bowden JA, Colosi DM, Mora-Montero DC, Garrett TJ & Yost RA (2009) Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 877(27):3237-3242.
- Bowers LD (2008) Testosterone doping: dealing with genetic differences in metabolism and excretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93(7):2469-2471.
- Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH & Schellens JHM (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 189(3):233-246.
- Brown HS, Griffin M & Houston JB (2007) Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative in vitro system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35(2):293-301.
- Cavalcanti Gde A, Leal FD, Garrido BC, Padilha MC & de Aquino Neto FR (2013) Detection of designer steroid methylstenbolone in "nutritional supplement" using gas chromatography and tandem mass spectrometry: elucidation of its urinary metabolites. *Steroids* 78(2):228-233.

- Cawley AT, Blakey K, Waller CC, McLeod MD, Boyd S, Heather A, McGrath KC, Handelsman DJ & Willis AC (2016) Detection and metabolic investigations of a novel designer steroid: 3-chloro-17 α -methyl-5 α -androstan-17 β -ol. *Drug testing and analysis* 8(7):621-632.
- Chalbot S & Morfin R (2005) Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33(4):563-569.
- Chung B, Choo H-YP, Kim T, Eom K, Kwon O, Suh J, Yang J & Park J (1990) Analysis of Anabolic Steroids Using GC/MS with Selected Ion Monitoring. *Journal of Analytical Toxicology* 14(2):91-95.
- Colker CM, Antonio J & Kalman D (2001) The Metabolism of Orally Ingested 19-Nor-4-androstene-3,17-dione and 19-Nor-4-androstene-3,17-diol in Healthy, Resistance-Trained Men. *Journal of Strength and Conditioning Research* 15(1):144-147.
- De Wilde L, Van Renterghem P, Van Eenoo P & Polet M (2020) Development and validation of a fast gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry method for the detection of epiandrosterone sulfate in urine. *Drug testing and analysis* 12(8):1006-1018.
- DeMeersman R, Getty D & Schaefer DC (1987) Sympathomimetics and exercise enhancement: All in the mind? *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 28(3):361-365.
- Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D & Claessens F (2012) Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(10):1651-1667.
- Dürbeck HW & Büker I (1980) Studies on anabolic steroids. The mass spectra of 17 α -methyl-17 β -hydroxy-1, 4-androstadien-3-one (dianabol) and its metabolites. *Biomedical mass spectrometry* 7(10):437-445.
- Duval A (2017) The Russian doping scandal at the court of arbitration for sport: lessons for the world anti-doping system. *The International Sports Law Journal* 16(3-4):177-197.
- Easterbrook J, Lu C, Sakai Y & Li AP (2001) Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 29(2):141-144.
- Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ & Wrighton SA (2000) Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44(1):313-324.
- El Kihel L (2012) Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA)--recent reports. *Steroids* 77(1-2):10-26.
- Evans NA (2004) Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *The American journal of sports medicine* 32(2):534-542.
- Falkenstein E, Tillmann H-C, Christ M, Feuring M & Wehling M (2000) Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52(4):513-556.
- Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, Xie Q, Perkins R, Owens W & Sheehan DM (2003) Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical research in toxicology* 16(10):1338-1358.
- 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 testing and analysis* 10(8):1244-1250.
- Fragkaki AG, Angelis YS, Koupparis M, Tsantili-Kakoulidou A, Kokotos G & Georgakopoulos C (2009a) 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.
- Fragkaki AG, Angelis YS, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M & Georgakopoulos C (2009 b) Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer

- steroids in human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 115(1-2):44-61.
- Fragkaki AG, Angelis YS, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M & Georgakopoulos C (2009c) Statistical analysis of fragmentation patterns of electron ionization mass spectra of enolized-trimethylsilylated anabolic androgenic steroids. *International Journal of Mass Spectrometry* 285(1-2):58-69.
- Franke WW & Berendonk B (1997) Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. *Clin. Chem.* 43(7):1262-1279.
- Freeman ER, Bloom DA & McGuire EJ (2001) A brief history of testosterone. *The Journal of urology* 165(2):371-373.
- Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenbach-Leschowsky U, Schanzer W, Thevis M, Vollmer G, Zierau O & Diel P (2006) 17beta-hydroxy-5alpha-androst-1-en-3-one (1-testosterone) is a potent androgen with anabolic properties. *Toxicology letters* 165(2):149-155.
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babaï D, Portier CJ & McDonnell DP (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and applied pharmacology* 143(1):205-212.
- Gao W, Bohl CE & Dalton JT (2005) Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical reviews* 105(9):3352-3370.
- Gauthier J, Goudreault D, Poirier D & Ayotte C (2009) Identification of drostanolone and 17-methyl drostanolone 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.
- Granados J, Gillum TL, Christmas KM & Kuennen MR (2014) Prohormone supplement 3beta-hydroxy-5alpha-androst-1-en-17-one enhances resistance training gains but impairs user health. *J Appl Physiol* (1985) 116(5):560-569.
- Gupte SA, Tateyama M, Okada T, Oka M & Ochi R (2002) Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34(6):679-688.
- Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RK, Fraser PD & Bramley PM (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of experimental botany* 56(410):219-243.
- Handelsman DJ & Bermon S (2019) Detection of testosterone doping in female athletes. *Drug testing and analysis* 11(10):1566-1571.
- Hatton CK, Green GA & Ambrose PJ (2014) Performance-enhancing drugs: understanding the risks. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* 25(4):897-913.
- Hoberman JM & Yesalis CE (1995) The history of synthetic testosterone. *Scientific American* 272(2):76-81.
- Hoffman JR, Kraemer WJ, Bhasin S, Storer T, Ratamess NA, Haff GG, Willoughby DS & Rogol AD (2009) Position stand on androgen and human growth hormone use. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 23:S1-S59.
- Holt RI, Erotokritou-Mulligan I & Sonksen PH (2009) The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 19(4):320-326.
- Jellinck PH, Kaufmann M, Gottfried-Blackmore A, Croft G, Byford V, McEwen BS, Jones G & Bulloch K (2006) Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in the brain: identification by liquid chromatography/mass spectrometry of the delta-4-isomer of DHEA and related steroids formed from androstenedione by mouse BV2 microglia. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 98(1):41-47.

- Kazlauskas R & Goebel C (2015) Androst-3, 5-diene-7, 17-dione in supplements and its urinary metabolite. *Recent advances in doping analysis* :197-200.
- Kicman AT (2008) Pharmacology of anabolic steroids. *British journal of pharmacology* 154(3):502-521.
- Kopera H (1985) The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. *European Journal of Endocrinology* 110(3_Suppl):S11-S18.
- Kozyrkov YY, Shostko DY & Beliaev SA (2019) Isomers of halodrol: synthesis and partial reduction to form A-ring of a long-term metabolite of dehydrochloromethyltestosterone (oral turinabol). *Chemical Papers* 73(3):731-736.
- Levesque JF, Gaudreault M, Aubin Y & Chauret N (2005) Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of new metabolites of norandrostenedione using in vitro systems. *Steroids* 70(4):305-317.
- Levitsky DO, Glorizova TA, Poroikov VV & Dembitsky VM (2017) Anabolic cyanosteroids and their biological activities-A brief review.
- Li J & Al-Azzawi F (2009) Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 63(2):142-148.
- Liao S, Liang T, Fang S, Castañeda E & Shao T-C (1973) Steroid structure and androgenic activity specificities involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens. *Journal of Biological Chemistry* 248(17):6154-6162.
- Lisboa BP & Gustafsson JÅ (1970) Studies on the Metabolism of Steroids in the Foetus: Biosynthesis of 3-Hydroxy- Δ^4 -C₁₉ Steroids in the Human Foetal Liver. *European Journal of Biochemistry* 14(3):556-559.
- Liu C, Zhang J & Zhou T (1991) Investigation on the metabolism of dehydrochloromethyltestosterone in man. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica* 26(9):682-687.
- Liu Y, Lu J, Yang S, Xu Y & Wang X (2015) A new potential biomarker for 1-testosterone misuse in human urine by liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Methods* 7(11):4486-4492.
- Ljungqvist A (2017) Brief History of Anti-Doping. *Medicine and sport science* 62:1-10.
- Lootens L, Meuleman P, Leroux-Roels G & Van Eenoo P (2011) Metabolic studies with promagnon, methylclostebol and methasterone in the uPA+/+SCID chimeric mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127(3-5):374-381.
- Magalhães W, Garrido B, Cavalcanti G, Padilha M, Casilli A, Pereira H & de Aquino F (2019) Human Metabolism of The Anabolic Steroid Methasterone: Detection and Kinetic Excretion of New Phase I Urinary Metabolites and Investigation of Phase II Metabolism by GC-MS and UPLC-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 10.21577/0103-5053.20190010.
- Magdziak K, Osman N, Tvaroha A, Ding J & Fagan JM (2011) Pro-hormones and Body Image: How Much is Too Much?
- Magkos F & Kavouras SA (2004) Caffeine and ephedrine. *Sports Medicine* 34(13):871-889.
- Martín AG, Marino JM, de Tiedra MG, Marabé JR, Loscos MC & Marino MM (2001) Determination of nandrolone and metabolites in urine samples from sedentary persons and sportsmen. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 761(2):229-236.
- Martinez Brito D, de la Torre X & Botre F (2019) Detection of urinary metabolites of arimistane in humans by gas chromatography coupled to high-accuracy mass spectrometry for antidoping analyses. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 33(24):1894-1905.
- Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T & Kato S (2008) Androgen receptor functions in male and female physiology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109(3-5):236-241.
- McLafferty FW, Tureček F & Turecek F (1993) *Interpretation of mass spectra*. University science books, California. 371 p
- McLaren RH (2016) McLaren Independent Investigation Report - Part II.

- Mo Q, Lu SF & Simon NG (2006) Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 99(1):50-58.
- Nair VS, Doman CE, Morrison MS, Miller GD, Husk J, van Eenoo P, Crouch AK & Eichner D (2020) Evaluation of epiandrosterone as a long-term marker of testosterone use. *Drug testing and analysis* 12(11-12):1554-1560.
- Orata F (2012) Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *Advanced gas chromatography-Progress in agricultural, biomedical and industrial applications* :83-108.
- Orr R & Fiatarone Singh M (2004) The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders: review of efficacy and safety. *Drugs* 64(7):725-750.
- Ouellet A, LeBerre 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 Communications in Mass Spectrometry* 27(15):1739-1750.
- Pappo R & Jung CJ (1962) 2-Oxasteroids: a new class of biologically active compounds. *Tetrahedron Letters* 3(9):365-371.
- Parr M, Opfermann G & Schänzer W (2006) Detection of new 17-alkylated anabolic steroids on WADA 2006 list. *Recent advances in doping analysis (14)* 14:249-258.
- Parr MK, Geyer H, Reinhart U & Schanzer W (2004) Analytical strategies for the detection of non-labelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements. *Food additives and contaminants* 21(7):632-640.
- Parr MK, Opfermann G, Geyer H, Westphal F, Sonnichsen FD, Zapp J, Kwiatkowska D & Schanzer W (2011) Seized designer supplement named "1-Androsterone": identification as 3beta-hydroxy-5alpha-androst-1-en-17-one and its urinary elimination. *Steroids* 76(6):540-547.
- Pereira de Jesus-Tran K, Cote PL, Cantin L, Blanchet J, Labrie F & Breton R (2006) Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein science : a publication of the Protein Society* 15(5):987-999.
- Piper T, Putz M, Schanzer W, Pop V, McLeod MD, Uduwela DR, Stevenson BJ & Thevis M (2017) Epiandrosterone sulfate prolongs the detectability of testosterone, 4-androstenedione, and dihydrotestosterone misuse by means of carbon isotope ratio mass spectrometry. *Drug testing and analysis* 9(11-12):1695-1703.
- Plant N (2004) Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. *Drug Discovery Today* 9(7):328-336.
- Rahnema CD, Crosnoe LE & Kim ED (2015) Designer steroids - over-the-counter supplements and their androgenic component: review of an increasing problem. *Andrology* 3(2):150-155.
- Rasmussen N (2011) Medical science and the military: the Allies' use of amphetamine during World War II. *The Journal of interdisciplinary history* 42(2):205-233.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM & Romas NA (1999) Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69(1-6):481-485.
- Saudan C, Baume N, Robinson N, Avois L, Mangin P & Saugy M (2006) Testosterone and doping control. *Br J Sports Med* 40 Suppl 1:i21-24.
- Schanzer W (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.* 42(7):1001-1020.
- Shahidi NT (2001) A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical therapeutics* 23(9):1355-1390.
- Sjöqvist F, Garle M & Rane A (2008) Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *The Lancet* 371(9627):1872-1882.

- Sobolevsky T & Rodchenkov G (2012) Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 128(3-5):121-127.
- Strahm E, Baume N, Mangin P, Saugy M, Ayotte C & Saudan C (2009) Profiling of 19-norandrosterone sulfate and glucuronide in human urine: implications in athlete's drug testing. *Steroids* 74(3):359-364.
- StrongChap (2020) *Anavar Cycle For Men : Dosage, Results, And Side Effects!*, <https://strongchap.com/what-is-anavar-cycle/> (Consulté le 19/04/2021)
- Thieme D & Hemmersbach P (2009) *Doping in sports*. Springer Science & Business Media. 540 p
- Van de Kerkhof D, De Boer D, Thijssen J & Maes R (2000) Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis. *Journal of analytical toxicology* 24(2):102-115.
- Venetianer P, Netherlands JR, Cantor C, Loening K, Sharon N, van Lenten E, Velick S, Australia EW, Popjjik G & Uskokovic M (NOMENCLATURE OF STEROIDS).
- Wagner U & Pedersen KM (2014) The IOC and the doping issue—An institutional discursive approach to organizational identity construction. *Sport Management Review* 17(2):160-173.
- Yesalis CE & Bahrke MS (2002) History of doping in sport. *International sports studies* 24(1):42-76.

