

ÉTUDES DES MÉTABOLITES URINAIRES DE LA NORTESTOSTÉRONNE PAR CG-SM/SM ET CG-C-SMRI

Par
Audrey Trudel

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pre Annie Castonguay
INRS-Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Dr. Xavier de la Torre
Laboratoire antidopage FMSI

Directeur de recherche

Pre Christiane Ayotte
INRS-Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

La réalisation d'un projet de maîtrise et l'écriture du mémoire s'y rattachant est un travail de longue haleine et parsemé d'embûches qui ne serait pas possible sans la présence et le soutien de nombreuses personnes. C'est pourquoi je tiens à remercier les personnes suivantes :

Tout d'abord, ma directrice Pre Christiane Ayotte pour m'avoir confié ce projet de recherche stimulant et dont la réalisation apporte beaucoup à mon cursus de formation en tant que scientifique, mais aussi pour sa supervision et son savoir.

Un merci spécial à Karine Lalonde pour sa grande disponibilité, son implication, sa patience, ses conseils et ses connaissances qui ont permis l'aboutissement de ce projet.

Je remercie aussi Maxime Couture et Andrew Barber pour leur soutien et leurs connaissances des appareils CG-SM/SM et CG-C-SMRI. Votre présence a été plus qu'essentielle à l'avancement de mon projet.

Je remercie aussi toute l'équipe du Laboratoire de contrôle du dopage, plus particulièrement l'équipe P4 et IRMS, pour leurs conseils, le partage de leurs installations, ainsi que pour leur aide et leurs réponses à mes questions des plus banales aux plus embêtantes.

RÉSUMÉ

La nandrolone ou 19-nortestostérone (19-NT) est un stéroïde anabolisant fréquemment retrouvé lors des tests antidopage. Les pratiques de laboratoires actuelles prévoient un dépistage par CG-SM/SM (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem) mettant en évidence les deux métabolites principaux issus de la 19-NT et présents dans l'urine, soit la 19-norandrostérone (19-NA) et la 19-norétiocholanolone (19-NE). Toutefois, de faibles concentrations de ces métabolites peuvent être produites de façon endogène dans le corps humain ou par voie microbienne dans les échantillons eux-mêmes. L'Agence mondiale antidopage (AMA) recommande qu'à des concentrations inférieures à 15 ng/mL, les échantillons soient soumis à une procédure de confirmation par CG-C-SMRI (chromatographie en phase gazeuse et combustion couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique du carbone) pour en confirmer la source endogène ou exogène. Dans la présente étude, des échantillons anonymisés (n=189) provenant de programmes de contrôle du dopage sportif et dans lesquels les métabolites de la nandrolone avaient été identifiés, ont été réanalysés en ajoutant à la méthode de détection plusieurs autres métabolites possiblement formés et ciblés dans le cadre de cette étude. En considérant la concentration de 19-NA ainsi que le diagnostic de l'analyse en CG-C-SMRI, les échantillons ont été classés comme étant soit positifs ou négatifs, donc produits par l'activité microbienne. Ainsi, des différences ont pu être mises en évidence en fonction du statut de l'échantillon et des métabolites présents. Notamment, un intérêt pour la 5 α -estran-3 α ,16 α -diol-17-one pourrait être envisagé dû à sa forte prévalence dans la phase glucuroconjuguée des échantillons positifs. Du côté de la phase sulfoconjuguée, la surveillance de la 19-NA, 19-NE, 5 α -estran-3 β -ol-17-one (19-NEA) et 5 α -estran-3 α ,16 α -diol-17-one, qui ont aussi présenté des résultats intéressants, pourrait s'avérer utile dans l'élaboration d'une méthode de confirmation qui inclurait alors l'analyse des métabolites sulfoconjugués.

ABSTRACT

Nandrolone or 19-nortestosterone (19-NT) is an anabolic steroid commonly used in sports by athletes who want to improve their athletic performance. Current laboratory practices include CG-MS/MS screening showing the two main metabolites derived from 19-NT metabolism and present in urine, 19-norandrosterone (19-NA) and 19-noretiocholanolone (19-NE). However, low concentrations of these metabolites can be produced endogenously in the human body or microbially in the samples themselves. The World Anti-Doping Agency (WADA) recommends that at concentrations below 15 ng / mL, the samples be subjected to a confirmation procedure by GC-C-SMRI (gas chromatography and combustion coupled with carbon isotope ratio mass spectrometry) to confirm the endogenous or exogenous source. In the present study, anonymised samples (n = 189) from sports doping control programs and in which the metabolites of nandrolone had been identified, were reanalyzed by considering, this time, several other metabolites possibly formed and targeted in this study. The goal is to evaluate potential markers that could reduce the number of GC-C-IRMS confirmations. Considering the concentration of 19-NA as well as the diagnosis of GC-C-IRMS analysis, samples were either positive or negative, demonstrating microbial activity. Thus, differences could be highlighted depending on the status of the sample and the metabolites present. In particular, an interest for 5 α -estran-3 α ,16 α -diol-17-one could be considered due to its high prevalence in the glucuronide phase of positives samples. Regarding the sulfoconjugate phase, the monitoring of 19-NA, 19-NE, 5 α -estran-3 β -ol-17-one (19-NEA) and 5 α -estran--3 α ,16 α -diol-17-one, which also presented interesting results, could be useful in developing a confirmation method which would then include the analysis of sulfoconjugates metabolites.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
1 INTRODUCTION	1
2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 LES STEROÏDES	3
2.1.1 <i>Origine, structure et nomenclature.....</i>	<i>3</i>
2.2 LES STEROÏDES ANDROGENIQUES ANABOLISANTS ET LEUR MODE D’ACTION	3
2.2.1 <i>Effets androgéniques et anabolisants.....</i>	<i>5</i>
2.2.2 <i>Effets thérapeutiques et autres applications.....</i>	<i>6</i>
2.3 LES STEROÏDES ANABOLISANTS ET LE DOPAGE	6
2.3.1 <i>Historique et techniques d’analyse</i>	<i>6</i>
2.3.2 <i>Effets secondaires et conséquences</i>	<i>8</i>
2.4 LES 19-NORSTEROÏDES	9
2.4.1 <i>La nandrolone</i>	<i>9</i>
2.4.1 <i>Biosynthèse, biotransformation et analyse de la 19-nortestostérone.....</i>	<i>11</i>
2.4.2 <i>Origines endogènes et exogènes de la 19-nortestostérone.....</i>	<i>14</i>
2.4.3 <i>Ratio 19-NA/19-NE</i>	<i>16</i>
2.5 ANALYSE DES METABOLITES URINAIRES DES SAAS	17
2.6 INSTRUMENTS ANALYTIQUES	18
2.6.1 <i>CG-SM et CG-SM/SM.....</i>	<i>18</i>
2.6.2 <i>CLHP.....</i>	<i>21</i>
2.6.3 <i>CG-C-SMRI.....</i>	<i>22</i>
2.7 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	25
3 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	26
3.1 MATÉRIEL UTILISÉ.....	26
3.2 ÉLABORATION DE LA METHODE	27
3.2.1 <i>Sélection des métabolites étudiés</i>	<i>27</i>
3.2.2 <i>Détermination des conditions d’analyse en CG-SM à partir des standards.</i>	<i>27</i>
3.2.3 <i>Sélection des transitions spécifiques à l’aide de la CG-SM/SM et choix de l’énergie de collision</i>	<i>28</i>

3.3	DESCRIPTION DES ECHANTILLONS ANALYSES	33
3.3.1	<i>Population d'échantillons</i>	33
3.3.2	<i>Contrôles positifs et négatifs</i>	33
3.4	PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE CG-SM/SM	34
3.4.1	<i>Élaboration des lots d'analyses</i>	34
3.4.2	<i>Procédure d'extraction des métabolites conjugués</i>	35
3.5	ANALYSE CG-SM/SM	36
3.5.1	<i>Méthode et test de spécificité</i>	36
3.5.2	<i>Application de la méthode</i>	37
3.5.3	<i>Confirmation des signaux et estimation de la concentration</i>	37
3.6	PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE CG-C-SMRI	38
3.6.1	<i>Procédure d'extraction des métabolites conjugués</i>	38
3.6.2	<i>Purification des échantillons par CLHP</i>	38
3.6.3	<i>Préparation des fractions pour l'analyse CG-C-SMRI</i>	42
3.7	ANALYSE CG-C-SMRI	44
3.7.1	<i>Méthode</i>	44
4	RÉSULTATS ET DISCUSSION	46
4.1	DIAGNOSTIQUE DE L'ANALYSE EN SMRI POUR LA POPULATION D'ECHANTILLONS.....	46
4.2	CLASSIFICATION DE LA POPULATION D'ECHANTILLONS.....	48
4.3	RATIO 19-NA/19-NE ET RATIO NORMALISE	49
4.4	DENOMBREMENT DES METABOLITES	52
4.5	NOMBRE DE METABOLITES ET CONCENTRATION DE LA 19-NA	54
4.6	DESCRIPTION DES METABOLITES MESURES	57
4.6.1	<i>Phase glucuroconjuguée</i>	57
4.6.2	<i>Phase sulfoconjuguée</i>	63
4.6.3	<i>Urine de femme enceinte</i>	66
4.7	PRESENCE DES METABOLITES ET CONCENTRATION DE LA 19-NA	68
4.7.1	<i>Ratios de concentration des métabolites</i>	70
5	CONCLUSION.....	75
6	BIBLIOGRAPHIE	79
	ANNEXE I : NOMS ET STRUCTURES DES MOLÉCULES.....	86
	ANNEXE II : SPECTRES DE MASSE OBTENUS DE L'ANALYSE EN MODE SPECTRE D'ION FRAGMENT DES MÉTABOLITES À L'ÉTUDE	90
	ANNEXE III : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DES ION FRAGMENTS EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION APPLIQUÉE POUR FRAGMENTER LES MÉTABOLITES	123
	ANNEXE IV : CONCENTRATIONS MINIMALES MESURÉES (NG/ML) DANS CHAQUE LOT POUR LES DIFFÉRENTS MÉTABOLITES DÉTECTÉS ET DESCRIPTION DES COURBES ÉTALON	137

ANNEXE V : VALEURS DES $\delta^{13}\text{C}$ DE LA 19-NA ET DU CER, $\Delta \delta^{13}\text{C}$ CALCULÉES ET CONCENTRATION EN 19-NA ASSOCIÉE À CHAQUE ÉCHANTILLON.	141
ANNEXE VI : CONCENTRATIONS DE 19-NA, 19-NE, A ET E ET RATIOS RESPECTIFS.	145

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2-1 : STRUCTURE CHIMIQUE ET NUMEROTATION DES ATOMES DE CARBONE DE L'ANDROSTANE.....	3
FIGURE 2-2 : STRUCTURES CHIMIQUES DE : A) T ET B) 19-NT.....	9
FIGURE 2-3 : STRUCTURE CHIMIQUE DU 17-O-DECANOATE DE NANDROLONE	10
FIGURE 2-4 : STRUCTURES CHIMIQUES DE : A) LA 19-NT ET DE SES METABOLITES B) LA 19-NA, c) LA 19-NE ET D) LA 19-NEA.....	11
FIGURE 2-5 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA REACTION DE SYNTHESE DE LL'ŒSTRADIOL A PARTIR DE LA TESTOSTERONE ET MENANT A LA FORMATION DE LA 19-NT LORS D'UNE REACTION SECONDAIRE (ADAPTEE DE (HEMMERSBACH ET AL., 2010).....	12
FIGURE 2-6 : SCHEMA DU METABOLISME DE LA 19-NT VERS SES METABOLITES PRINCIPAUX, LA 19-NA ET LA 19-NE.	13
FIGURE 2-7 : STRUCTURES DE : A) GLUCURONIDE DE LA 19-NA ET B) SULFATE DE LA 19-NEA.	13
FIGURE 2-8 : SCHEMA DEMONTRANT LE PHENOMENE DE DEMETHYLATION IN SITU DES METABOLITES URINAIRES A ET E VERS 19-NA ET 19-NE	15
FIGURE 2-9 : STRUCTURE CHIMIQUE DES METABOLITES PRINCIPAUX ET SECONDAIRES DE LA NORETHISTERONE	16
FIGURE 2-10 : SCHEMA MONTRANT LE COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE AU SPECTROMETRE DE MASSE.	19
FIGURE 2-11 : SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DU MODE A) SIF, B) SRS ET C) SRM	21
FIGURE 2-12 : SCHEMA GENERAL D'UN APPAREIL DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE	22
FIGURE 2-13 : SCHEMA PRESENTANT LA COMBINAISON DE CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COMBUSTION - SPECTROMETRIE DE MASSE D'ISOTOPES STABLES DU CARBONE.....	25
FIGURE 3-1 : GRAPHIQUE DE L'UNITE D'ABSORBANCE UV EN FONCTION DU TEMPS OBTENU A 192 NM A) DES STEROÏDES CONTENUS LORS DE L'INJECTION DU MIX HPLC NON COLLECTE, B) DE LA ZONE CONTENANT LES STEROÏDES D'INTERETS. PICS 1 : E, 2 : A, 3 : Pd, 4 : 16-ENOL, 5 : TESTOSTERONE, 6 : DHEA, 7 : ET, 8 : 5β-ADIOL, 9 : 5α-ADIOL, 10 : 19-NE, 11 : 19-NA.	41
FIGURE 4-1 : δ ¹³ C DU METABOLITE 19-NA EN FONCTION DU δ ¹³ C DU COMPOSE ENDOGENE DE REFERENCE (PREGNANDIOL) DES ECHANTILLONS DONT L'ANALYSE SMRI A ETE REPRIS (BLEU) ET LES ECHANTILLONS POSSEDANT UN DIAGNOSTIC SMRI ULTERIEUR (ORANGE).	47
FIGURE 4-2 : DIAGRAMME A SECTEUR REPRESENTANT LE POURCENTAGE D'ECHANTILLONS DANS CHAQUE CLASSE D'ECHANTILLONS, SOIT NEGATIFS (■), POSITIFS (■) ET NON CONCLUANTS (■).....	49
FIGURE 4-3 : RATIO 19-NA/19-NE POUR LES ECHANTILLONS POSITIFS (■) ET LES ECHANTILLONS NEGATIFS (■).....	50
FIGURE 4-4 : GRAPHIQUE DES RATIOS 19-NA/19-NE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN 19-NA DES ECHANTILLONS POSITIFS (●) ET NEGATIFS (●).....	51
FIGURE 4-5 : RATIO 19-NA/A / 19-NE/E DES ECHANTILLONS POSITIFS (●) ET NEGATIFS (●).....	52
FIGURE 4-6 : NOMBRE DE METABOLITES DANS LES ECHANTILLONS SELON LEUR STATUT POSITIF (■) OU NEGATIF (■) ET SELON LA PHASE ANALYSEE.....	53
FIGURE 4-7 : NOMBRE DE METABOLITES DANS LA PHASE GLUCUROCONJUGUEE (■) ET DANS LA PHASE SULFOCONJUGUEE (■) DANS LES ECHANTILLONS POSITIFS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LA 19-NA MESUREE DANS LES ECHANTILLONS POSITIFS.	55

FIGURE 4-8 : NOMBRE DE METABOLITES DANS LA PHASE GLUCUROCONJUGUEE (■) ET DANS LA PHASE SULFOCONJUGUEE (■) DES ÉCHANTILLONS NÉGATIFS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LA 19-NA MESUREE DANS LES ECHANTILLONS POSITIFS.	56
FIGURE 4-9 : POURCENTAGE DE PRESENCE DES METABOLITES LES PLUS PRESENTS DANS LA PHASE GLUCUROCONJUGUEE DES ECHANTILLONS POSITIFS (■) ET NEGATIFS (■). 1 : 16α-HYDROXY-NA, 2 : 19-NT, 3 : 5α-ESTRAN-3α,17β-DIOL, 4 : NORDIONE, 5 : 5α-ESTRAN-3β,17α-DIOL	57
FIGURE 4-10 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 16α-HYDROXY-NA.....	59
FIGURE 4-11 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 19-NT.....	60
FIGURE 4-12 : STRUCTURE CHIMIQUE DU 5α-ESTRAN-3α,17β-DIOL	61
FIGURE 4-13 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA NORDIONE.....	62
FIGURE 4-14 : STRUCTURE CHIMIQUE DU 5α-ESTRAN-3β,17α-DIOL	62
FIGURE 4-15 : POURCENTAGE DE PRESENCE DES METABOLITES LES PLUS PRESENTS DANS LA PHASE SULFATE DES ECHANTILLONS POSITIFS (■) ET NEGATIFS (■). 1 : 19-NEA, 2 : 5α-ESTRAN-3β,17β-DIOL, 3 : 16α-HYDROXY-NA, 4 : 5α-ESTRAN-3β,17α-DIOL, 5 : 5α-ESTRAN-3α,17β-DIOL.....	63
FIGURE 4-16 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 19-NEA	64
FIGURE 4-17 : STRUCTURE CHIMIQUE DU 5α-ESTRAN-3β,17β-DIOL.....	65
FIGURE A-1 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DE LA 19-NT AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES : A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.....	90
FIGURE A-2 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU NORDIONE AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.....	91
FIGURE A-3 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 4-ESTRÈNE-3α,17β-DIOL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	92
FIGURE A-4 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU NORDIOL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.....	95
FIGURE A-5 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU NORDHEA AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.....	98
FIGURE A-6 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DE LA 4-ESTRÈNE-6β-OL-3,17-DIONE AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	100
FIGURE A-7 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 5α-ESTRAN-3α,17β-DIOL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	101
FIGURE A-8 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DE LA 5α-ESTRAN-3,17-DIONE AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	104
FIGURE A-9 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 19-NEA AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.....	105

FIGURE A- 10 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 5 α -ESTRAN-3 β ,17 α -DIOL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	108
FIGURE A- 11 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 5 α -ESTRAN-3 β ,17 β -DIOL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	110
FIGURE A- 12 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 5 α -ESTRAN-3-ONE-17 β -OL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	112
FIGURE A-13 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 16 α -HYDROXY-NA AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	114
FIGURE A- 14 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DE LA 5 β -ESTRAN-3,17-DIONE AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	116
FIGURE A- 15 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 5 β -ESTRAN-3 α ,17 β -DIOL AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	117
FIGURE A-16 : SPECTRES DE MASSE DES DIFFÉRENTS IONS PRÉCURSEURS SÉLECTIONNÉS DU 19-NEE AUX ÉNERGIES DE COLLISION SUIVANTES A) 0 eV, B) 5 eV, C) 10 eV, D) 15 eV, E) 20 eV.	120
FIGURE A-17 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 19-NT : A) 418 \rightarrow 287, B) 418 \rightarrow 194, C) 418 \rightarrow 182, D) 403 \rightarrow 327, E) 403 \rightarrow 313, F) 403 \rightarrow 287, G) 403 \rightarrow 271 DU 4-ESTREN-3-ONE-17 β -OL.	123
FIGURE A-18 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU NORDIONE : A) 416 \rightarrow 401, B) 416 \rightarrow 234, C) 416 \rightarrow 220, D) 401 \rightarrow 311, E) 401 \rightarrow 219, F) 401 \rightarrow 207, G) 194 \rightarrow 179.	124
FIGURE A-19 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 4-ESTRENE-3 α ,17 β -DIOL : A) 419 \rightarrow 391, B) 419 \rightarrow 330, C) 419 \rightarrow 240, D) 419 \rightarrow 182, E) 405 \rightarrow 239, F) 330 \rightarrow 240.	125
FIGURE A-20 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 4-ESTRENE-3 β ,17 β -DIOL : A) 420 \rightarrow 330, B) 420 \rightarrow 240, C) 420 \rightarrow 207, D) 420 \rightarrow 182, E) 405 \rightarrow 239, F) 405 \rightarrow 225, G) 330 \rightarrow 225, H) 330 \rightarrow 199.	125
FIGURE A-21 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU NORDHEA : A) 418 \rightarrow 328, B) 418 \rightarrow 313, C) 418 \rightarrow 182, D) 418 \rightarrow 169, E) 403 \rightarrow 237, F) 403 \rightarrow 223.	126
FIGURE A-22 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DE LA 4-ESTREN-6 β -OL-3,17-DIONE: A) 489 \rightarrow 399, B) 489 \rightarrow 206, C) 489 \rightarrow 147, D) 489 \rightarrow 169.	127
FIGURE A-23 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION EMPLOYÉE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 5 α -ESTRAN-3 α ,17 β -DIOL : A) 422 \rightarrow 337, B) 422 \rightarrow 332, C) 422 \rightarrow 242, D) 422 \rightarrow 146, E) 407 \rightarrow 241, F) 407 \rightarrow 199, G) 332 \rightarrow 201, H) 332 \rightarrow 242.	127

FIGURE A-24 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DE LA 5α-ESTRAN-3,17-DIONE : A) 418 \rightarrow 403, B) 418 \rightarrow 182, C) 418 \rightarrow 169, D) 403 \rightarrow 313, E) 403 \rightarrow 261, F) 403 \rightarrow 223, G) 403 \rightarrow 171, H) 261 \rightarrow 171, I) 261 \rightarrow 155.....	128
FIGURE A-25 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 19-NEA : A) 420 \rightarrow 405, B) 420 \rightarrow 315, C) 420 \rightarrow 225, D) 420 \rightarrow 169, E) 405 \rightarrow 315, F) 405 \rightarrow 225, G) 405 \rightarrow 155.	129
FIGURE A-26 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 5α-ESTRAN-3β,17α-DIOL : A) 421 \rightarrow 277, B) 421 \rightarrow 242, C) 421 \rightarrow 201, D) 421 \rightarrow 185, E) 407 \rightarrow 241, F) 407 \rightarrow 199, G) 332 \rightarrow 221.....	130
FIGURE A-27 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 5α-ESTRAN-3β,17β-DIOL : A) 422 \rightarrow 277, B) 422 \rightarrow 242, C) 422 \rightarrow 201, D) 407 \rightarrow 241, E) 407 \rightarrow 199, F) 332 \rightarrow 201.....	131
FIGURE A-28 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 5α-ESTRAN-3-ONE-17β-OL: A) 420 \rightarrow 240, B) 420 \rightarrow 330, C) 420 \rightarrow 180, D) 420 \rightarrow 129, E) 405 \rightarrow 315, F) 405 \rightarrow 187, G) 329 \rightarrow 187.....	132
FIGURE A-29 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 16α-HYDROXY-NA : A) 508 \rightarrow 493, B) 493 \rightarrow 403, C) 493 \rightarrow 217, D) 493 \rightarrow 185, E) 403 \rightarrow 315, F) 403 \rightarrow 217, G) 403 \rightarrow 147.	133
FIGURE A-30 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DE LA 5β-ESTRAN-3,17-DIONE : A) 418 \rightarrow 403, B) 418 \rightarrow 208, C) 403 \rightarrow 313, D) 403 \rightarrow 223, E) 403 \rightarrow 181, F) 403 \rightarrow 169, G) 261 \rightarrow 171, H) 261 \rightarrow 155.....	134
FIGURE A-31 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 5β-ESTRAN-3α,17β-DIOL : A) 422 \rightarrow 332, B) 422 \rightarrow 242, C) 422 \rightarrow 216, D) 422 \rightarrow 185, E) 422 \rightarrow 146, F) 407 \rightarrow 331, G) 407 \rightarrow 241, H) 332 \rightarrow 242, I) 332 \rightarrow 201.....	135
FIGURE A-32 : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DE L'ION FRAGMENT EN FONCTION DE L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE POUR CHAQUE TRANSITION DE FRAGMENTATION DU 19-NEE : A) 420 \rightarrow 405, B) 420 \rightarrow 315, C) 420 \rightarrow 225, D) 420 \rightarrow 169, E) 405 \rightarrow 315, F) 405 \rightarrow 225.....	136

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3-1 : TRANSITIONS ENVISAGEES ENTRE UN ION MAJORITAIRE ET LES FRAGMENTS POUR TOUS LES STEROÏDES	29
TABLEAU 3-2 : TRANSITIONS ENTRE LES IONS PRECURSEURS ET LES FRAGMENTS SELECTIONNES POUR CHACUN DES STEROÏDES AINSI QUE LE TEMPS DE RETENTION ET L'ENERGIE DE COLLISION EMPLOYEE.	32
TABLEAU 3-3 : CONCENTRATIONS (NG/ML) DES STEROÏDES UTILISEES POUR LA COURBE ETALONNAGE	34
TABLEAU 3-4 : TEMPS DE COLLECTE DES STEROÏDES DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS PURIFIEES PAR CLHP-2D	39
TABLEAU 3-5 : POURCENTAGE D'UTILISATION ET DEBIT DES SOLVANTS DE LA PREMIERE ET DEUXIEME DIMENSION SELON LE TEMPS D'ANALYSE. A : EAU, B : ACETONITRILE, C : METHANOL.	42
TABLEAU 3-6 : FRACTIONS COMBINEES POUR L'ANALYSE CG-C-SMRI	42
TABLEAU 3-7 : STEROÏDES CONTENUS DANS LES SOLUTIONS PERFORMS A ET B ET DU STANDARD 19-NA/19-NE AINSI QUE LA VALEUR CERTIFIEE DU $\delta^{13}\text{C}$ DE CHACUN	43
TABLEAU 4-1 : CONCENTRATION MOYENNE (NG/ML) DES METABOLITES RETROUVES DANS L'ECHANTILLON TEMOIN ET LE SUJET ENCEINTE.	67
TABLEAU 4-2 : POURCENTAGE DES ECHANTILLONS POSITIFS POUR LESQUELS LES METABOLITES ONT ETE DETECTES DANS UN ECHANTILLON OU LA 19-NA A ETE MESUREE DANS L'INTERVALLE D'AMBIGUÏTE (0-15 NG/ML) DANS LA PHASE GLUCUROCONJUGUEE	69
TABLEAU 4-3 : RATIOS NORMALISES EN POURCENTAGE DE LA CONCENTRATION DES METABOLITES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN 19-NA	71
TABLEAU A-1 : CONCENTRATIONS MINIMALES (NG/ML) A LAQUELLE IL A PU ETRE IDENTIFIE LES DIFFERENTS STEROÏDES DETECTES DANS LA PORTION GLUCUROCONJUGUEE DE TOUS LES LOTS.	137
TABLEAU A- 2 : CONCENTRATIONS MINIMALES (NG/ML) A LAQUELLE IL A PU ETRE IDENTIFIE LES DIFFERENTS STEROÏDES DETECTES DANS LA PORTION SULFOCONJUGUEE DE TOUS LES LOTS.	138
TABLEAU A- 3 : VALEURS DE LA PENTE, DE L'ORDONNEE A L'ORIGINE ET DU COEFFICIENT DE DETERMINATION DES COURBES ETALON DES METABOLITES POUR LESQUELS UNE COURBE D'ETALONNAGE A PLUSIEURS CONCENTRATIONS A ETE PREPAREE.	139
TABLEAU A- 4 : VALEURS DES $\delta^{13}\text{C}$ DU CER ET DE LA 19-NA AINSI QUE DES $\Delta\delta^{13}\text{C}$ CALCULEES ENTRE CES DEUX VALEURS POUR CHACUN DES ECHANTILLONS DONT L'ANALYSE SMRI A ETE REPRISE ET CONCENTRATION DE LA 19-NA ASSOCIEE A CES ECHANTILLONS.	141
TABLEAU A- 5 : VALEURS DES $\delta^{13}\text{C}$ DU CER ET DE LA 19-NA AINSI QUE DES $\Delta\delta^{13}\text{C}$ CALCULEES ENTRE CES DEUX VALEURS POUR CHACUN DES ECHANTILLONS OBTENUES DE L'ANALYSE SMRI ORIGINALE ET CONCENTRATION DE LA 19-NA ASSOCIEE A CES ECHANTILLONS.	142
TABLEAU A- 6 : CONCENTRATIONS DE LA 19-NA ET DE LA 19-NE DES ECHANTILLONS POSITIFS ET RATIOS 19-NA/19-NE ASSOCIES	145
TABLEAU A- 7 : CONCENTRATIONS DE LA 19-NA ET DE LA 19-NE DES ECHANTILLONS NEGATIFS ET RATIOS 19-NA/19-NE ASSOCIES	148
TABLEAU A- 8 : CONCENTRATIONS DE A ET DE E DES ECHANTILLONS POSITIFS ET RATIOS 19-NA/A / 19-NE/E ASSOCIES	148

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : *degré Celsius*

% p/v : *pourcentage poids/volume*

17 β -HSD : *enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase*

19-NA : *19-norandrostérone ; 5 α -estran-3 α -ol-17-one*

19-NE : *19-norétiocholanolone ; 5 β -estran-3 α -ol-17-one*

19-NEA : *19-norépiandrostérone ; 5 α -estran-3 β -ol-17-one*

19-NT : *19-nortestostérone ; 4-estren-3-one-17 β -ol*

3 β -HSD : *enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase*

A : *androstérone ; 5 α -androstan-3 α -ol-17one*

AcOEt : *acétate d'éthyle*

AE: *androstènedione ; 4-androstén-3,17-one*

AMA : *agence mondiale antidopage*

CER : *composé endogène de référence*

CIO : *comité international olympique*

CLHP : *chromatographie liquide à haute performance*

DCM : *dichlorométhane*

DHEA : *déhydroépiandrostérone ; 5-androstén-3 β -ol-17-one*

DHT : *dihydrotestostérone ; 5 α -androstan-17 β -ol-3-one*

E : *étiocholanolone ; 5 β -androstan-3 α -ol-17one*

EPS : *extraction sur phase solide*

ESTD : *standard externe*

eV: *électron volt*

H₂SO₄ : *acide sulfurique*

HCl : *acide chlorhydrique*

IE : *impact électronique*

ISTD : *standard interne*

M : *concentration Molaire en mol/L*

min : *minute*

mL : *millilitres*

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

nm : *nanomètre*

Nordioli : *19-norandrostènediol ; 4-estrène-3 β ,17 β -diol*

Nordione : *19-norandrostènedione ; 4-estrène-3,17-dione*
pH : *potentiel hydrogène ; Unité de mesure de l'acidité*
RA : *récepteurs des androgènes*
RE: *récepteur de oestrogènes*
RubisCo : *enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase*
SAA : *stéroïdes androgéniques et anabolisants*
SMRI : *spectrométrie de masse à rapport isotopique*
T : *testostérone ; 4-androsten-17 β -ol-3-one*
TEA : *triéthylamine*
THF : *tétrahydrofurane, : tétrahydrofurane*
TMSI : *iodotriméthylsilane*
UV : *ultraviolet*
VPDB : *Vienna Pee Dee Belemnite*

1 INTRODUCTION

Au cours de l'histoire du dopage dans le sport, différentes matières dopantes ont fait l'objet de l'intérêt des sportifs. C'est dans les années 1970 et 1980, avec les améliorations des techniques de détection, qu'a été constatée l'ampleur du problème du dopage à l'aide de stéroïdes androgéniques et anabolisants (SAA), ces molécules synthétiques dérivées de la testostérone (de Mondenard, 2000). Les tests antidopage devenant plus efficaces, certains sportifs se tourneront donc vers les androgènes pouvant être présents normalement dans le corps humain, comme la testostérone et ses dérivés. La nandrolone (4-estrèn-3-one-17 β -ol, 19-NT), sous la forme d'esters à chaîne longue, est l'un des premiers SAAs synthétiques développés par l'industrie pharmaceutique. D'abord utilisé médicalement pour traiter différents problèmes de santé comme l'hémodialyse, différents types d'anémie et d'autres conditions liées au VIH, certains cancer et suite à des traumatismes et chirurgies (Ayotte, 2006). Ainsi, la 19-NT, bien que devant être injectée, a été longtemps perçue comme l'un des composés les plus efficaces et possédant le moins d'effets secondaires indésirables du côté des sportifs. La disponibilité de la 19-NT est encore aujourd'hui à l'origine d'une bonne partie des résultats anormaux détectés en laboratoire en lien avec les SAAs tel que le démontrent les statistiques annuelles publiées par l'AMA (Agence mondiale antidopage, 2019).

Au fil du temps, la nandrolone a aussi fait l'objet de nombreuses études ayant démontré qu'elle est présente naturellement dans le corps humain (origine endogène) compliquant ainsi l'établissement d'un diagnostic de dopage (Dehennin *et al.*, 1999b, Hemmersbach *et al.*, 2010). De nos jours, les procédures de dépistage et de confirmation sont axées sur les deux métabolites majeurs qui sont excrétés principalement sous la forme glucuroconjuguées (liés à l'acide glucuronique) mais également présents comme sulfates. (Guay *et al.*, 2009). Ces métabolites sont la 19-norandrostérone (5 α -estran-3 α -ol-17-one, 19-NA) et la 19-norétiocholanolone (5 β -estran-3 α -ol-17-one, 19-NE) (Engel *et al.*, 1958).

Dans la présente étude, la CG-SM/SM et la CG-C-SMRI ont toutes deux été utilisées dans la recherche de métabolites secondaires, sulfates ou glucuronides, pouvant présenter un intérêt diagnostique dans l'établissement de l'origine naturelle ou due au dopage. Pour se faire, environ 200 échantillons anonymisés ont été sélectionnés et dans lesquels la présence de 19-NA avait été confirmée lors des analyses de routine lors des 20 dernières années.

L'analyse des échantillons nécessite des étapes de préparation afin d'isoler et concentrer ces composés d'intérêt. En bref, ces étapes comprennent une purification par extraction sur

phase solide (EPS), une hydrolyse enzymatique permettant d'hydrolyser sélectivement les métabolites glucuroconjugés (β -glucuronidase de *E. coli*), une extraction liquide-liquide puis, une dérivation chimique facilitant l'analyse subséquente par CG-SM. Lorsque nécessaire, les métabolites sulfoconjugés sont soumis à une hydrolyse chimique, ou solvolysé, à l'aide d'acide sulfurique dans le tétrahydrofurane (THF) (Burstein *et al.*, 1958, Lévesque, 1998). Les travaux effectués préalablement par C. Guay *et al.* ont toutefois montré que l'analyse des métabolites sulfoconjugés « classiques » ou leur ratio ne permettait pas d'en établir l'origine (Guay *et al.*, 2009). Jusqu'à ce jour, seule l'analyse de la signature isotopique du carbone (CG-C-IRMS) de la 19-NA, métabolite principal, permet d'en confirmer l'origine exogène (Ayotte, 2006). Cependant, l'analyse SMRI n'est pas toujours possible et ses résultats pas toujours concluants. En effet, des préparations génériques possédant des signatures isotopiques dites « pseudo-endogènes » ou similaires à celles normalement observées chez les humains dans certains pays ont fait leur apparition ces dernières années, réduisant le potentiel diagnostique de l'IRMS. Seuls les échantillons recueillis auprès d'athlètes issus de certains pays (en fonction de la diète) pourraient montrer une différence significative entre les métabolites urinaires d'origine endogène et ceux provenant de l'administration de ces préparations possédant des signatures isotopiques relativement enrichies (Brailsford *et al.*, 2018). Dans les cas ambigus, l'analyse de métabolites secondaires pourrait s'avérer utile.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les stéroïdes

2.1.1 Origine, structure et nomenclature

Les stéroïdes possèdent différents rôles pouvant aller de molécules constitutives de membranes jusqu'à être impliqués dans des processus de signallement direct ou indirect (communication autocrine et endocrine). Ils ont d'abord été synthétisés par les micro-organismes autotrophes puis par les plantes et les animaux. Tous possèdent donc dans leur génome, l'encodage pour la production des enzymes nécessaires à la synthèse et au métabolisme des stéroïdes (Morfin, 2010). Le stéroïde le plus abondant chez l'humain serait le cholestérol. Il est synthétisé par le corps humain et s'obtient aussi par l'alimentation. Le cholestérol est impliqué dans la synthèse d'une multitude d'autres stéroïdes, notamment les hormones sexuelles mâles et femelles (Payne *et al.*, 2004).

Au niveau structural, les stéroïdes sont des lipides possédant un squelette cyclopentanoperhydrophénanthrène, ou androstane (figure 2-1), à 19 atomes de carbone et portant des fonctions chimiques dirigeant leurs actions. La numérotation des différents cycles et atomes de carbones composant le noyau se fait comme le présente la figure ci-dessous (Moss, 1989) :

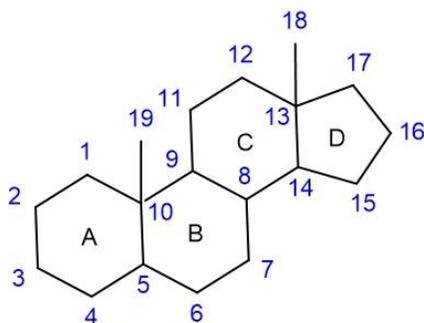


Figure 2-1 : Structure chimique et numérotation des atomes de carbone de l'androstane.

2.2 Les stéroïdes androgéniques anabolisants et leur mode d'action

Les stéroïdes constituent une large gamme de molécules possédant différentes fonctions parmi lesquelles se trouvent les hormones sexuelles qui interagissent soit avec les récepteurs des androgènes (RA) et les récepteurs des estrogènes (RE). La testostérone (T) ou 4-androstène-17 β -ol-3-one, est, chez l'humain, le stéroïde androgène naturel le plus connu. Produite en

majorité dans les cellules de Leydig, elle peut aussi être métabolisée en 5 α -androstane-17 β -ol-3-one, ou 5 α -dihydrotestostérone (DHT), qui est plus active au niveau des récepteurs. Chez la femme, les ovaires et les glandes surrénales produisent une petite quantité de T par la sécrétion d'androgènes plus faibles qui peuvent être convertis comme la 5-androstène-3 β -ol-17-one ou déhydroépiandrostérone (DHEA), et la 4-androstène-3,17-dione ou androstènedione (AE). De plus, les androgènes sont les précurseurs dans la biosynthèse des œstrogènes (Burger *et al.*, 2002).

Les SAAs sont des molécules synthétiques dérivées de la testostérone. Depuis son isolement et sa synthèse en laboratoire en 1935, les efforts se sont regroupés pour créer des dérivés possédant préférentiellement des effets anaboliques plutôt que des effets androgéniques indésirables (Schanzer, 1996). Les deux s'avèrent toutefois indissociables. Il n'existe pas de SAA ayant des effets anaboliques, même plus prononcés, ne démontrant pas d'effets androgéniques (Graham *et al.*, 2008). Suite à son ingestion par voie orale, la testostérone est rapidement désactivée par effet de premier passage (dans le foie). Ceci a poussé la synthèse de molécules dérivées pouvant ralentir ou bloquer les réactions de bio-désactivation tout en augmentant les effets anaboliques recherchés. Quelques modifications fréquemment observées comprennent l'addition de groupement alkyle sur les atomes de carbone en position C-1, 2, 7 et 17, l'introduction d'une liaison double en C-1, l'ajout d'un atome de chlore en C-4, l'estérification des fonctions hydroxyles généralement en position C-17 ainsi que l'enlèvement du groupement méthyle en C-10. Cette dernière modification produit les 19-norstéroïdes. Aussi, à titre d'exemple, l'introduction d'un groupement méthyle en position C-17 bloque la conversion de la fonction hydroxyle en cétone par les 17-hydroxystéroïde déshydrogénases, ce qui permet d'en conserver l'activité (Graham *et al.*, 2008, U. Hoffmann, 2002).

Les SAAs sont de petites molécules qui peuvent diffuser assez facilement dans un grand nombre de tissus. Leur action est possible en grande partie grâce à la présence des RA. Ceux-ci sont des protéines ligand-dépendantes situées dans le noyau des cellules dont aucune n'est dépourvue. Le mécanisme d'action des SAAs diffère d'une molécule à l'autre en fonction de la structure et des groupements fonctionnels qui s'y rattache comme mentionné précédemment. Ainsi, ces dernières ont des affinités différentes pour les enzymes qui permettent le métabolisme et les protéines réceptrices des RA. La formation du complexe hormone/récepteur enclenche la transcription des gènes et active les activités biologiques associées à la prise de ces stéroïdes (Hartgens *et al.*, 2004).

D'autre part, les SAAs sont convertis par une aromatasase pour former les hormones sexuelles femelles telles que l'œstradiol et l'œstrone qui se lient ensuite aux RE. Cette voie n'est toutefois empruntée que lorsque les RA sont saturés. Il y a donc compétition pour la liaison à ce récepteur entre les œstrogènes endogènes et les SAAs présents de façon excessive et empruntant donc la voie du RE (Hartgens *et al.*, 2004).

Finalement, il semble que les androgènes peuvent interférer avec les récepteurs des glucocorticoïdes. Ces derniers sont des molécules impliquées dans des processus cataboliques et libérées dans le sérum lorsque le corps est soumis à un stress physique ou mental (Meyer, 2001). Les SAAs semblent donc pouvoir se lier aux récepteurs des glucocorticoïdes et ainsi empêcher la dégradation des protéines (Kicman, 2008).

2.2.1 Effets androgéniques et anabolisants

Les effets androgéniques correspondent naturellement à une multitude de phénomènes habituellement associés à la masculinisation, soit le développement des caractéristiques sexuelles primaires et secondaires chez le mâle, l'enclenchement de la production de sperme, la mue de la voix, la pilosité, la configuration musculosquelettique (Mottram *et al.*, 2000).

Quant aux effets anaboliques, ils comprennent généralement la croissance musculaire et la favorisation de la synthèse de protéine tout en diminuant le pourcentage de graisse corporelle, l'augmentation de l'absorption de calcium stimulant ainsi la croissance du squelette, la favorisation de la synthèse de globules rouges et la recapture des électrolytes (U. Hoffmann, 2002).

Ce sont ces effets anaboliques qui sont recherchés par les sportifs. Au niveau physiologique, la croissance musculaire peut se faire de différentes façons, notamment, par hypertrophie et hyperplasie. L'hypertrophie est l'augmentation du diamètre et du volume des fibres musculaires. Il est possible d'attribuer l'augmentation de taille des fibres musculaires par la hausse de la synthèse de protéine qui se fait par l'expansion des sarcomères, qui sont les petites unités protéiques composant les myofibrilles, elles-mêmes composant les fibres musculaires. L'hyperplasie est plutôt caractérisée par l'augmentation du nombre de myofibrilles composant les fibres musculaires. Les fibres musculaires sont polynucléées. Toutefois, on n'observe pas de mitose au niveau de ces noyaux. L'expansion des muscles est possible grâce à la présence de cellules satellites en périphérie des fibres musculaires. La prise de SAA mènerait à l'accroissement du nombre de ces cellules satellites ainsi qu'à l'activation de leur mitose. Les

cellules satellites pourraient ensuite fusionner entre elles et ainsi former de nouvelles fibres musculaires (Kadi *et al.*, 1999).

Un autre effet amené par les SAAs serait l'augmentation du nombre de RA dans les noyaux des fibres musculaires, elles-mêmes augmentées en taille et en nombre comme mentionné ci-haut. Cela aurait donc pour effet d'amplifier l'effet des SAAs. (Hartgens *et al.*, 2004, Kadi *et al.*, 1999).

2.2.2 Effets thérapeutiques et autres applications

Les SAAs ont rapidement retenu l'attention dans l'élaboration de traitements cliniques pour différents troubles et maladies. En effet, dû à ses effets anaboliques, ils ont évidemment été ciblés pour le traitement de troubles anorexiques ou de cachexie découlant de maladies chroniques ou de cancers. Effectivement, l'utilisation des SAAs a été suggérée dans le traitement des personnes atteinte du virus de l'immunodéficience humaine, d'insuffisance rénale chronique, de cirrhose hépatique, de certains cancers et maladie pulmonaire ainsi que pour traiter les victimes de brûlures (Basaria *et al.*, 2001).

Autre que pour leurs capacités anaboliques, les SAAs ont aussi d'autres applications thérapeutiques. Il a été remarqué que les SAAs pourraient avoir un impact sur les paramètres hématologiques. Ils ont donc été utilisés pour le traitement de certaines formes d'anémie dès les années 1940. Aussi, ils sont utilisés dans le traitement de l'hypogonadisme (déficit en T), de l'impuissance et dans les cas de retard de puberté (Basaria *et al.*, 2001, Yavari, 2009).

2.3 Les stéroïdes anabolisants et le dopage

2.3.1 Historique et techniques d'analyse

L'Homme a depuis longtemps perçu la nécessité d'être physiquement fort, que ce soit pour la chasse ou dans les temps de guerre. Dans de tels cas, ceux voulant se doter d'une force augmentée avaient surtout recours à des concoctions de plantes ou de préparations provenant d'animaux (de Mondenard, 2000). De telles pratiques n'étaient pas mal vues.

C'est avec l'arrivée des Jeux olympiques de l'ère moderne en 1896 et le développement de la pharmacologie que le recours au dopage a pris une tournure différente. La complexité des recettes passant d'un style artisanal et expérimental à une influence directe de l'industrie pharmaco-scientifique par l'approfondissement des connaissances sur les alcaloïdes et autres structures actives (de Mondenard, 2000, Müller, 2010).

Dès 1938, le Comité international olympique (CIO) amorce sa surveillance du dopage des athlètes de niveau compétitif et l'interdit. Contrat difficile dû au manque de procédures établies pour détecter lesdits cas de dopage. C'est pourquoi la Commission médicale du CIO a été créée en 1967 afin de suivre et collecter des informations à propos de tout agent susceptible d'être utilisé pour améliorer les capacités athlétiques des sportifs. C'est lors des Jeux Olympiques de 1968 que fut implantée la première procédure analytique. Les échantillons recueillis auprès des athlètes furent testés pour la présence de substances stimulantes comme les amphétamines, particulièrement populaires dans les années 1960. À partir de ce moment, les procédures n'ont cessé d'être améliorées afin d'offrir un contrôle complet et systématique pour toutes disciplines (de Mondenard, 2000, Stojanović *et al.*, 2017). C'est lors des Jeux olympiques de 1972 que des tests chromatographiques furent instaurés à grande échelle pour dépister les stimulants et les narcotiques. Alors qu'en 1976, à Montréal, eurent lieu les premiers tests de dépistage d'anabolisants par l'utilisation combinée de méthodes immunométriques et de spectrométrie de masse (Hemmersbach, 2008).

Dans les années 1980, certains athlètes se sont tournés vers un dopage à l'aide de xénobiotiques d'origine naturelle dû aux risques posés par les substances synthétiques et aussi afin d'éviter la détection. C'est ce qui a entraîné l'utilisation de la testostérone et de ses dérivés comme la 19-nortestostérone. Cependant, depuis les années 1980, des améliorations techniques ont permis à la combinaison CG et SM de s'imposer comme la méthode de choix pour l'analyse des SAAs (Ayotte *et al.*, 1996, de Mondenard, 2000).

C'est dans les années 1990 que la spectrométrie de masse à rapport isotopique (SMRI) des atomes de carbone s'est révélée utile pour établir un diagnostic de dopage. Cette technique permettant de différencier l'origine endogène ou exogène des métabolites urinaires de stéroïdes grâce à la distinction entre la signature isotopique des atomes de carbone des molécules produites par le corps ou en laboratoire. L'amélioration de la préparation des échantillons a permis d'en étendre peu à peu l'application à une gamme de stéroïdes endogènes et exogènes, dont la 19-nortestostérone et ses précurseurs. Encore aujourd'hui, il s'agit de la seule technique permettant d'identifier l'origine des stéroïdes naturels tels que la testostérone, ses précurseurs biologiques, ainsi que des analogues tels que la boldénone (androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-one), la nortestostérone, le formestane, la prednisone et la prednisolone (Cawley *et al.*, 2008, Piper *et al.*, 2011).

C'est aussi à la fin des années 1990, dans le but d'harmoniser la législation concernant le dopage dans les différentes associations sportives et de promouvoir la lutte contre le dopage,

que fut créée l'Agence mondiale antidopage. Fondée en 1999 par le CIO, les fédérations sportives et les autorités publiques, cette agence indépendante s'acquitte de plusieurs rôles dont celui de veiller à la qualité des laboratoires, l'établissement de la liste des interdictions et d'autres tâches, allant de la recherche scientifique à l'éducation, au développement de programme antidopage et la surveillance de la conformité au Code mondial antidopage (Agence Mondiale Anti-Dopage, Ljungqvist, 2017).

L'amélioration des techniques de spectrométrie de masse, notamment l'introduction de filtres quadripolaires et la spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR) ont permis, de nos jours, la détection des métabolites de stéroïdes anabolisants présents en faible concentration ceux qui sont persistants. Ces améliorations ont contribué à renforcer la place prédominante de la CG-SM dans le domaine du contrôle du dopage à ces molécules (Graham *et al.*, 2008, Piper *et al.*, 2011, Stojanović *et al.*, 2017).

2.3.2 Effets secondaires et conséquences

La prise autonome non supervisée médicalement de SAAs peut entraîner nombre d'effets secondaires néfastes pouvant être irréversibles. Leur sévérité peut varier en fonction du stéroïde, de la dose ainsi que de la durée durant laquelle le ou les stéroïdes ont été administrés. Toutefois, comme certains utilisent les SAAs à des doses qui peuvent s'éloigner des doses thérapeutiques recommandées, en plus d'utiliser un cocktail de différentes substances, des conséquences sur la santé peuvent être vécues par ces consommateurs. Les effets secondaires observés sont généralement des troubles au niveau du système reproducteur et endocrinien, des effets rénaux, hépatiques, cardiovasculaires, dermatologiques et psychologiques (U. Hoffmann, 2002).

Les effets affectant le système cardiovasculaire sont les plus étendus puisque les SAAs influencent différents aspects de ce système. Notamment le profil lipidique sanguin, ce qui pourrait mener à des maladies cardiovasculaires et de l'hypertension. Les effets sur les tissus musculaires cardiaques pourraient entraîner de l'insuffisance cardiaque pouvant conduire à des infarctus, tandis que d'autres effets sont observés sur la composition et le comportement du sang, ce qui pourrait mener ultimement à des embolies systémiques (Parssinen *et al.*, 2002).

Un autre système chez lequel la prise de SAAs dérivés de la testostérone, semble avoir des effets plus prononcés est le système reproducteur et endocrinien. Un effet souvent discuté du côté des hommes est le développement excessif des glandes mammaires dû à la conversion des SAAs en œstrogènes appelé la gynécomastie. D'autres effets peuvent être l'atrophie testiculaire ainsi qu'une spermatogenèse altérée pouvant mener à l'infertilité ou l'hypertrophie de

la prostate pouvant mener au développement de cancer. Chez la femme, les effets secondaires fréquemment discutés sont une masculinisation un approfondissement de la voix ainsi que des irrégularités dans le cycle menstruel. Une hypertrophie clitoridienne ainsi qu'une atrophie mammaire sont aussi des effets secondaires répertoriés. Pour les enfants et adolescents, la fermeture épiphysaire prématurée entraînant l'arrêt de la croissance en longueur et la puberté précoce sont des effets néfastes rencontrés lors de la prise abusive de SAA (Maravelias *et al.*, 2005).

Au niveau des effets psychologiques, la prise de SAA serait suspectée d'entraîner une panoplie d'effets. Notamment, des sautes d'humeur pouvant aller de l'euphorie à la dépression, de l'agressivité, de l'anxiété, la paranoïa, la dépendance et donc, des symptômes de sevrage (Maravelias *et al.*, 2005).

Les effets sur le foie et les reins sont moins documentés, cependant, la prise de SAA pourrait entraîner des dérèglements et pertes de fonctions dans ces systèmes et, ultimement, entraîner la formation de cancers (Maravelias *et al.*, 2005).

2.4 Les 19-norstéroïdes

2.4.1 La nandrolone

La 19-NT a été synthétisée pour la première fois en 1950 (Birch, 1950). Comme le présente la figure 2-2, la 19-NT diffère de T par l'absence du groupement méthyle en position C-19. Il s'agit de la première molécule synthétique qui a présenté de bonnes capacités anaboliques, tout en possédant un potentiel androgénique réduit (Mottram *et al.*, 2000).

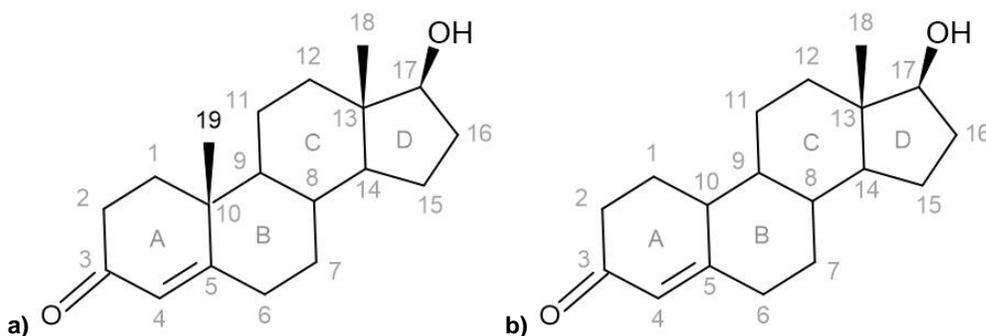


Figure 2-2 : Structures chimiques de : a) T et b) 19-NT.

Tout comme la testostérone, la prise orale de 19-NT est inefficace étant donné la biodisponibilité faible par effet de premier passage dans le foie. La formation d'un ester à longue

chaîne en position C-17 (figure 2-3) permet de prolonger la durée d'action et d'augmenter la biodisponibilité en empêchant la conversion en cétone active par les 17 β -HSD (Geusens, 1995). C'est donc sous cette forme que la 19-NT a été commercialisée pour des traitements médicaux afin de contrer certains effets cataboliques subits par les victimes du cancer, du VIH, traiter des maladies comme l'ostéoporose ou des patients aux prises avec des problèmes rénaux et certaines formes d'anémie, ou dans la guérison de brûlures sévères ou à la suite de chirurgies (Ayotte, 2006, Deicher *et al.*, 2005, Sattler *et al.*, 1999).

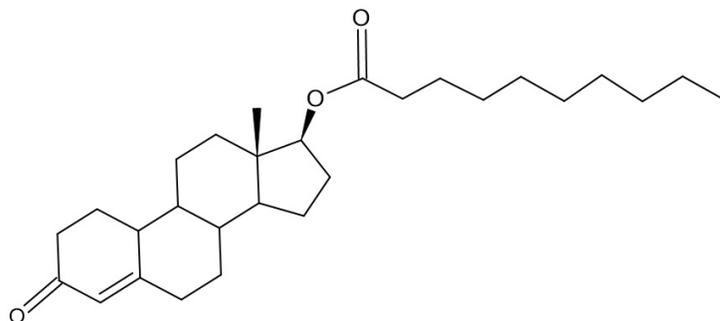


Figure 2-3 : Structure chimique du 17-O-décanoate de nandrolone

Les SAAs représentent 44 % de tous les résultats anormaux détectés dans tous les laboratoires accrédités par l'AMA. De ces cas, 11 % sont dus à la 19-NT (Agence mondiale antidopage, 2019). Il faut spécifier que ceux-ci sont interdits en tout temps, alors que les substances stimulantes, par exemple, ne le sont qu'en compétition.

Il a rapidement été établi que la 19-norandrostérone (5 α -estran-3 α -ol-17-one, 19-NA), la 19-norétiocholanolone (5 β -estran-3 α -ol-17-one, 19-NE) et la 19-norépiandrostérone (5 α -estran-3 β -ol-17-one, 19-NEA) sont les métabolites principaux (figure 2-4) de la 19-NT ou de ses prohormones soit la 19-norandrostènedione (4-estrène-3,17-dione, Nordione) et le 19-norandrostènediol (4-estrène-3 β ,17 β -diol, Nordiol). Ces prohormones ont été commercialisées durant quelques années dès la fin 1990s sans réel contrôle des autorités sanitaires et la vente de ces produits sous forme de supplément de diète a connu un essor sur l'internet. Et ce, jusqu'à l'adoption de lois interdisant la mise en marché et la vente dans les années 2000s (Hemmersbach *et al.*, 2010).

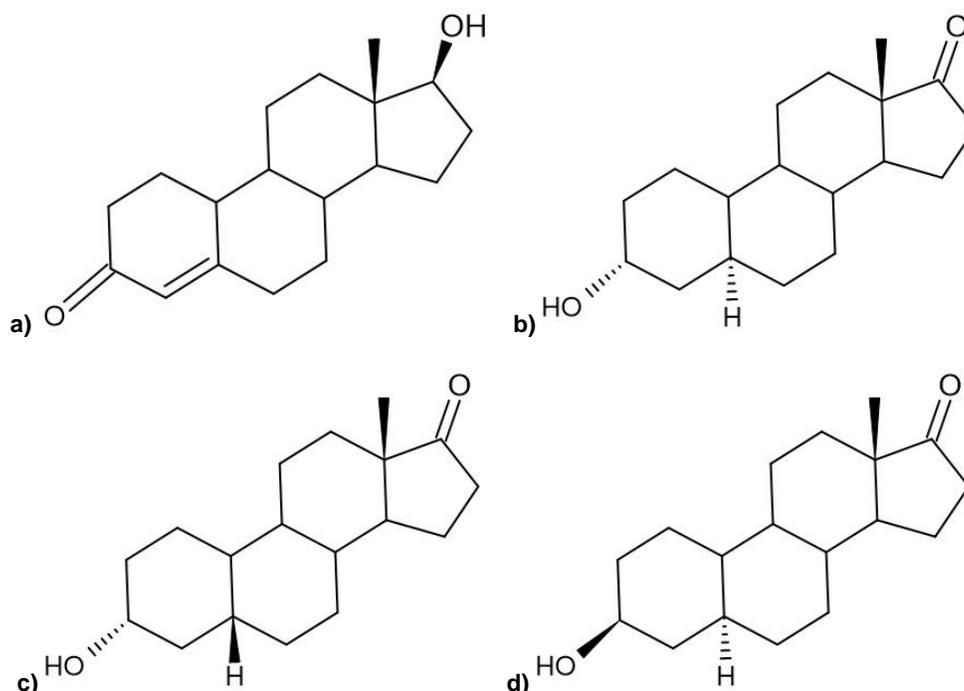


Figure 2-4 : Structures chimiques de : a) la 19-NT et de ses métabolites b) la 19-NA, c) la 19-NE et d) la 19-NEA.

2.4.1 Biosynthèse, biotransformation et analyse de la 19-nortestostérone.

La biosynthèse de la 19-nortestostérone implique différentes enzymes de la famille du cytochrome P450 qui catalysent les réactions d'hydroxylation et de clivage menant à la synthèse des androstanes (C19) à partir du cholestérol. L'intervention d'autres enzymes comme les 3 β - et 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases (3 β -HSD et 17 β -HSD) permettent de finaliser la biosynthèse vers l'obtention de la testostérone, androgène précurseur de la 19-NT (Payne *et al.*, 2004).

C'est lors de la conversion des androgènes en œstrogènes que se produit la synthèse de la 19-nortestostérone (figure 2-5). Bien que le processus de synthèse d'œstrogènes à partir d'androgènes implique la liaison du substrat (T) au complexe enzymatique, il a été observé que les intermédiaires peuvent s'échapper du complexe (Bricout *et al.*, 2004). La réaction est effectuée par un complexe d'enzyme de la superfamille du cytochrome P450, dans ce cas, l'aromatase, qui est présente dans la majorité des cellules. L'aromatase catalyse l'hydroxylation et le clivage du substrat en présence de cofacteur NADPH et de dioxygène permettant alors le transfert d'électrons et, ultimement, d'atomes (Payne *et al.*, 2004). Dans le cas présent, l'aromatase catalyse trois réactions d'oxydation consécutives transformant ainsi les androgènes

à 19 atomes de carbone, comme la testostérone, en stéroïdes en possédant un de moins comme la 19-nortestostérone. Les deux premières réactions se caractérisent par l'ajout de deux groupements hydroxyles sur le carbone en position C-19 qui est par la suite oxydé en aldéhyde. La dernière étape mène à l'aromatisation de l'anneau A et à l'élimination du groupement méthyle en C-19 menant ainsi à la formation de norstéroïdes lors d'une réaction secondaire dont le mécanisme n'est pas complètement résolu (figure 2-5) (Hemmersbach *et al.*, 2010, Simpson *et al.*, 1994).

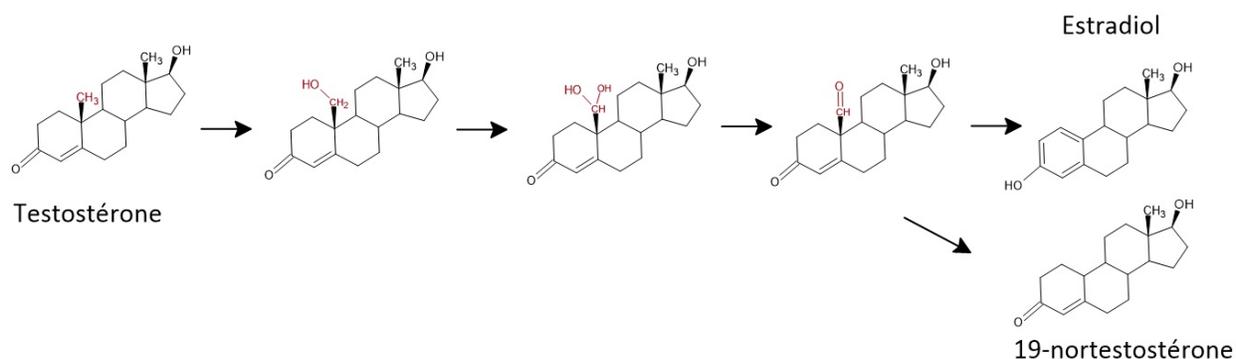


Figure 2-5 : Schéma simplifié de la réaction de synthèse de l'œstradiol à partir de la testostérone et menant à la formation de la 19-NT lors d'une réaction secondaire (adaptée de (Hemmersbach *et al.*, 2010))

Ensuite, le métabolisme de la nandrolone est semblable à celui de la testostérone. La 19-NT et ses dérivés subissent une série de modifications structurales avant d'être excrétés. Il s'agit de réactions de biotransformation de phase I et II. Les premières sont principalement des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydroxylation. Celles-ci produisent des métabolites plus polaires et inactifs puisqu'ils sont moins portés à diffuser dans les tissus. Les principales enzymes impliquées dans le processus sont les 5 α -réductase ou 5 β -réductase ainsi que les 3 α/β et 17 β -HSD en fonction de la configuration du stéroïde substrat et des groupements fonctionnels présents (Schanzer, 1996).

Premièrement, la liaison double C4-C5 est réduite par l'activité des enzymes 5 α/β -réductase (voir figure 2-6). Le centre asymétrique situé en C5 permet la formation de deux isomères : un ayant l'hydrogène en position α ou l'autre en β . La proportion de chacun des métabolites est influencée par la voie d'absorption puisque certains organes présentent une plus forte activité pour l'une ou l'autre des réductases (Flenker *et al.*, 2008). Ensuite, le groupement cétone situé en C-3 subit une réduction par la 3 α/β -hydroxystéroïde déshydrogénase pour former un groupement hydroxyle (α et β). Sur l'anneau D, la principale réaction consiste en l'oxydation du groupement hydroxyle par la 17 β -HSD pour former une cétone. La production de 19-NA est

généralement favorisée comparativement à la 19-NE, bien que le ratio semble s'inverser à la fin de la période d'excrétion (Engel *et al.*, 1958, Jin *et al.*, 2001, Schanzer, 1996).

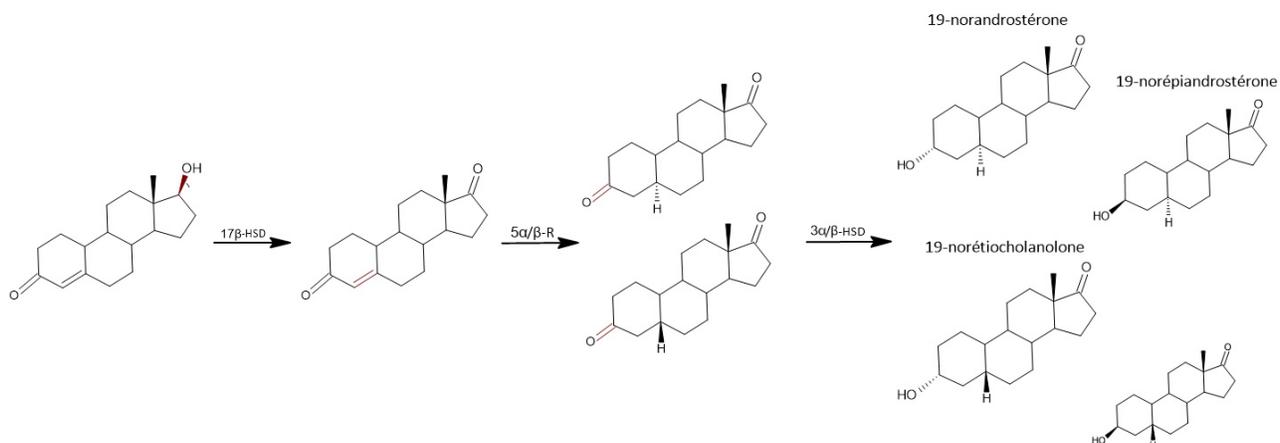


Figure 2-6 : Schéma du métabolisme de la 19-NT vers ses métabolites principaux, la 19-NA et la 19-NE.

(Selon Schanzer, 1996)

Les réactions de phase II ont lieu par la suite afin de faciliter l'élimination. Les métabolites qui en sont issus viennent de réactions de conjugaison avec l'acide glucuronique ou un sulfate (voir figure 2-7). La conjugaison aide à l'élimination des stéroïdes en réduisant finalement leur caractère lipophile, les rendant solubles dans l'urine. Les enzymes UDP-glucuronosyltransférases et sulfotransférases sont impliquées dans la synthèse des glucuronides et des sulfates (Kuورانne, 2010). La réaction de conjugaison se produit sur le groupement hydroxyle aux positions C-3 ou C-17. La conjugaison à l'acide glucuronique est favorisée pour la configuration C-3α de l'hydroxyle pour 19-NA et 19-NE bien que la combinaison au sulfate se produise aussi et représente environ 20 % (Guay *et al.*, 2009). La 19-NEA est, quant à elle, totalement sulfoconjuguée (Guay *et al.*, 2009, Hemmersbach *et al.*, 2010, Schanzer, 1996).

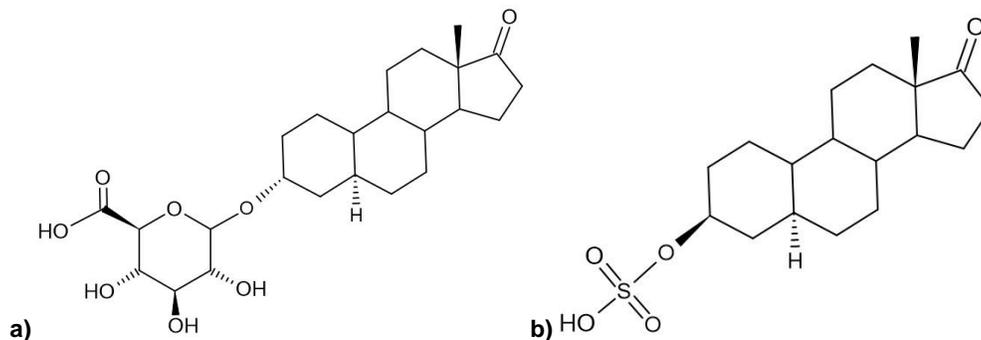


Figure 2-7 : Structures de : a) glucuronide de la 19-NA et b) sulfate de la 19-NEA.

2.4.2 Origines endogènes et exogènes de la 19-nortestostérone

La présence de 19-NT a été observée chez plusieurs espèces animales, notamment chez le cheval, le sanglier/cochon non castré et se retrouve dans l'urine de femelles enceintes de plusieurs espèces, dont les brebis, chèvres, juments et vaches (Courtot *et al.*, 1984, Debruyckere *et al.*, 1990, Sterk *et al.*, 1998).

Chez l'humain, il a été établi que la 19-NT et son précurseur, la nordione, se trouvent dans le fluide folliculaire humain (Short, 1960). Elle a aussi été mesurée dans le plasma de femmes enceintes à des valeurs plus importantes au troisième trimestre, ce qui pourrait expliquer la présence de son métabolite urinaire, la 19-NA, à des concentrations allant jusqu'à 16,5 ng/mL (Hemmersbach *et al.*, 2010, Reznik *et al.*, 1987). Autre que dans le cas des femmes enceintes, ce sont de plus faibles quantités de 19-NA urinaire endogène qui ont pu être mesurées. Notamment, lors de l'ovulation à des niveaux maximaux de 0,6 ng/mL puisque son précurseur, la 19-NT, est un intermédiaire dans la synthèse des œstrogènes (Hemmersbach *et al.*, 2006, Van Eenoo *et al.*, 2001). D'autres études ont démontré qu'une faible quantité de 19-NA pourrait se retrouver naturellement aussi chez certains des sujets masculins à des concentrations inférieures à 0,3 ng/mL (Dehennin *et al.*, 1999a, Le Bizec *et al.*, 1999). Finalement, une association avec l'activité sportive et l'augmentation des concentrations des métabolites mesurées n'a pas pu être établie (Ayotte, 2006, Schmitt *et al.*, 2002).

En 2000, Le Bizec a montré que la consommation d'organes ou tissus d'abats de porc mâle non castré entraînait l'excrétion de 19-NA, la 19-nortestostérone étant endogène chez cette espèce (Le Bizec *et al.*, 2000). Une étude plus poussée a montré que la consommation d'une quantité relativement importante de reins de cochons intacts pouvait causer l'élimination de 19-NA et 19-NE dans les urines des consommateurs (Guay *et al.*, 2009). Cependant, la disponibilité d'un tel type de viande pour la consommation humaine est rare, car dans plusieurs pays, les cochonnets sont castrés en très bas âge (Ayotte, 2006).

D'autre part, Grosse *et al.* ont rapporté que les principaux métabolites urinaires des androgènes, soit l'androstérone (5α -androstane- 3α -ol-17one, A) et l'étiocolanolone (5β -androstane- 3α -ol-17one, E), peuvent subir une réaction de déméthylation microbienne en C-10 pour former la 19-NA et la 19-NE (figure 2-8) dans des concentrations dans l'intervalle 2 à 15 ng/mL dans les échantillons urinaires après leur recueil (Grosse *et al.*, 2005). Cette réaction toutefois mineure et rare semble être favorisée chez l'isomère en 5β , soit E produisant 19-NE en

quantité supérieure à celle de la 19-NA provenant de A (5α). La configuration semble donc jouer un rôle sur la prédisposition des molécules substrat à subir une déméthylation *in situ*.

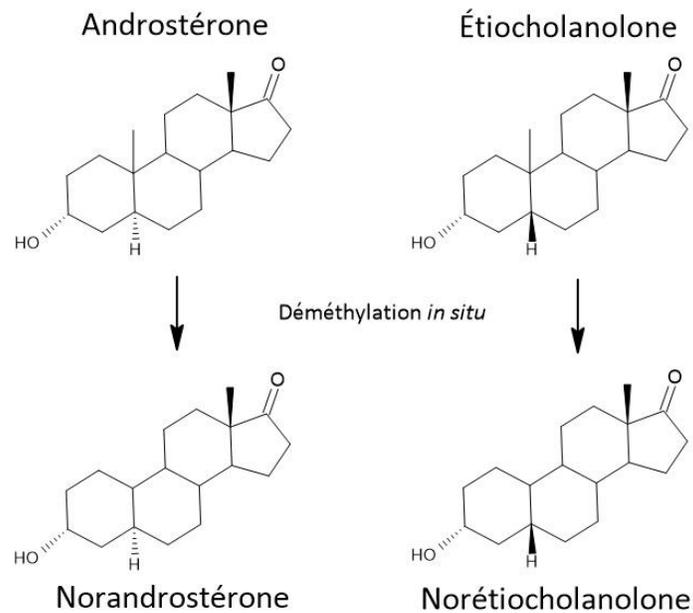


Figure 2-8 : Schéma démontrant le phénomène de déméthylation *in situ* des métabolites urinaires A et E vers 19-NA et 19-NE

La 19-NA est aussi un métabolite mineur de la noréthistérone (figure 2-9), ingrédient de contraceptifs oraux. Toutefois, la présence des métabolites réduits de la noréthistérone, les isomères de tétrahydronoréthistérone, dans l'analyse permet d'exclure la prise d'un norstéroïde interdit (de Boer *et al.*, 1988, Hemmersbach *et al.*, 2010, Van Eenoo *et al.*, 2006).

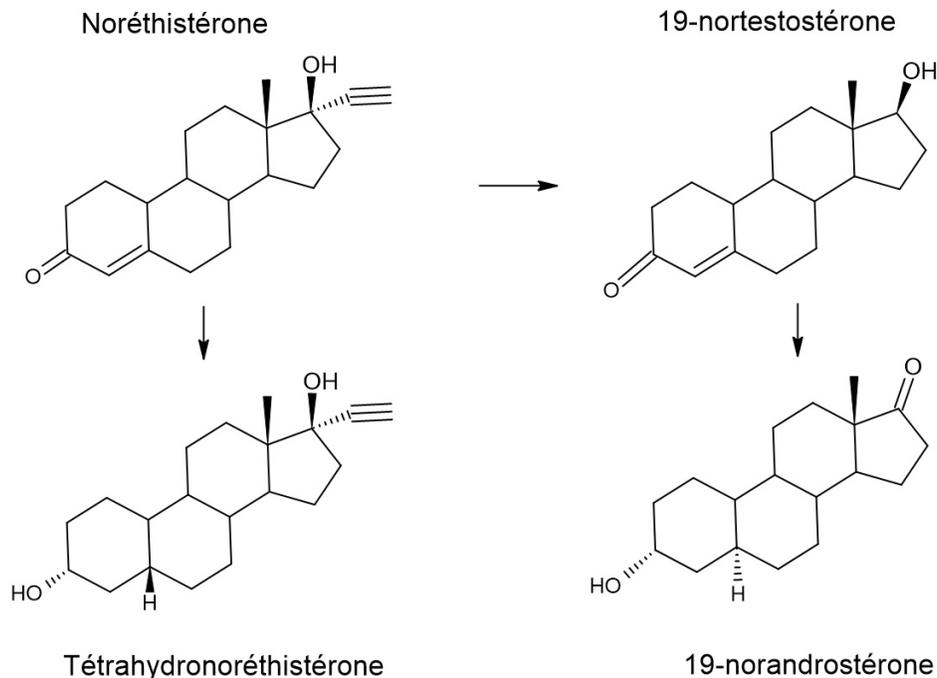


Figure 2-9 : Structure chimique des métabolites principaux et secondaires de la noréthistérone

Suite à l'administration par voie orale d'un norstéroïde exogène et naturel, provenant d'abats de cochons non castrés, l'excrétion des métabolites principaux, 19-NA, 19-NE, 19-NEA, dans l'urine est rapide et se produit majoritairement dans les vingt-quatre premières heures comme il a été démontré dans l'étude d'excrétion effectuée par C. Guay *et al.* (Guay *et al.*, 2009). Dans le cas où l'ingestion se fait par la prise d'un comprimé de Nordione, précurseurs synthétiques, V.P. Uralets *et al.* et C. Guay *et al.* ont tous deux démontré que la prohormone est rapidement convertie en 19-nortestostérone et produit ainsi les métabolites d'intérêts, ce qui a permis de détecter ces métabolites sur plusieurs jours (Guay *et al.*, 2009, Uralets *et al.*, 1999).

Pour toutes les raisons énumérées ci-haut, la nécessité de devoir différencier la nature endogène et exogène des métabolites a été mise en évidence. C'est pourquoi l'Agence mondiale antidopage requiert l'analyse de confirmation CG-C-SMRI (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2021b).

2.4.3 Ratio 19-NA/19-NE

Le ratio 19-NA/19-NE a aussi été investigué pour son utilité à établir un diagnostic pour le dopage à la 19-NT, mais celui-ci fait l'objet d'une grande variation inter et intra-individuelle (Le Bizec *et al.*, 2002, Strahm *et al.*, 2009). La 19-NA est généralement excrétée en plus grande

proportion sous sa forme glucuroconjuguée dans les premières heures suite à l'ingestion orale ou intra-musculaire de norstéroïdes. La 19-NE possède aussi cette cinétique d'excrétion bien qu'habituellement excrétée en plus petite proportion. Le rapport des deux métabolites est conséquemment supérieur à 1. Ainsi, un ratio <3 est utilisé pour signaler un échantillon atypique provenant de la déméthylation de l'androstérone et l'étiocolanolone (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2021b).

La période suivant l'ingestion d'un norstéroïde semble toutefois avoir un impact sur ce rapport, ce dernier semblant s'inverser à des temps supérieurs. Il est possible que ce soit dû à l'augmentation de la sulfoconjugaison de la 19-NA après 24h comme observé par Guay *et al.* chez un volontaire ayant consommé la nordione en dose unique (Guay *et al.*, 2009). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la sulfoconjugaison est prédominante à faible concentration du substrat alors que la glucuronidation est le principal processus de conjugaison à des niveaux de substrat élevés en raison de la cinétique de saturation affectant la réaction de sulfatation (Torrado *et al.*, 2008, Tseng *et al.*, 2006). Aussi, cette différence pourrait s'expliquer par le caractère irréversible de la liaison des stéroïdes à l'acide glucuronique et seraient donc excrétés plus rapidement tandis que la liaison au sulfate est plutôt une réaction réversible (Schiffer *et al.*, 2019). L'importance de l'utilisation d'une technique d'hydrolyse appropriée a aussi été mise en évidence afin de relever la proportion des conjugués correctement (Guay *et al.*, 2009).

Dans les cas de déméthylation *in situ* des androgènes, l'interprétation du ratio 19-NA/19-NE pourrait aider à cibler ces échantillons. Dû au fait que le processus est favorisé pour l'isomère 5 β , cela mènerait donc à une inversion de ce ratio 19-NA/19-NE normalement supérieur à 3/1 et qui serait alors inférieur à 1. Ce ratio étant aussi plus petit que le ratio de leurs précurseurs androgènes A/E aussi monitorés, cela pourrait témoigner de la présence d'un échantillon actif (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2021b). C'est pourquoi, en présence de concentrations de 19-NA inférieures à 15 ng/mL, l'analyse par CG-C-SMRI est requise afin d'exclure la formation microbienne de 19-NA particulièrement en présence d'un rapport de 19-NA sur 19-NE inférieur à 3 (Ayotte, 2006).

2.5 Analyse des métabolites urinaires des SAAs

L'analyse des stéroïdes urinaires nécessite de prendre en considération plusieurs facteurs afin de cibler la meilleure approche. Notamment la matrice de laquelle ils doivent être extraits, les étapes de purification nécessaires ou, par exemple, l'intégration d'échantillons de contrôle de qualité (Makin *et al.*, 2010).

Les étapes d'extraction et de purification entraînent inmanquablement la perte d'une certaine quantité d'analyte. L'ajout d'un standard interne avant de commencer les étapes de préparation permet d'évaluer et de quantifier cette perte. Ce standard interne peut être constitué d'un ou plusieurs composés possédant des propriétés physico-chimiques semblables à celles des stéroïdes analysés ou bien être une des molécules ciblées ou d'un marqueur d'isotope stable. Ainsi, il est assuré que le standard interne réagit de la même façon lors des différentes étapes de manipulation et sera donc extrait au même titre que les stéroïdes cibles, mais sera tout de même distinguable de ceux-ci lors des analyses de quantification (Makin *et al.*, 2010).

Généralement, comme dans notre laboratoire, les métabolites urinaires de norstéroïdes ne sont pas analysés directement. Ils sont isolés de cette matrice en différentes étapes généralement, une extraction en phase solide, suivie de l'hydrolyse enzymatique avec la β -glucuronidase, une extraction liquide-liquide et finalement, la conversion des groupements labiles en ester et énoil-triméthylsilyles (TMS).

L'analyse par CG-SM nécessite la conversion de tous les métabolites sous leur forme libre. À cette fin, l'emploi d'une β -glucuronidase de *E.coli*, permet l'hydrolyse du glucuronide de manière efficace et sélective, ne produisant pas de sous-produits non désirés (Gomes *et al.*, 2009). Une partie non négligeable de métabolites se retrouve aussi conjuguée au sulfate et lorsque requise, la déconjugaison s'effectue par solvolysse chimique dont la méthode a été mise au point par Lévesque (1998) et optimisée par Amireault (2019). La dernière étape consiste en la dérivation des métabolites leur assurant une plus grande volatilité et stabilité, ce qui améliore la chromatographie et les patrons de fragmentation en spectrométrie de masse. La dérivation se fait par per-triméthylsilylation des groupements cétone- et hydroxyyles par l'emploi d'un mélange de MSTFA en présence d'une catalyse de TMIS, d'un thiol comme réducteur et d'une amine pour piéger l'iode libéré. Cette méthode est utilisée depuis sa description dans les années 1980 par Donike *et al.* (Ayotte *et al.*, 1996).

2.6 Instruments analytiques

2.6.1 CG-SM et CG-SM/SM

Les méthodes utilisées dans ce projet sont basées sur l'emploi de la combinaison chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. La séparation des constituants du mélange injecté est effectuée par le passage sur une colonne comprenant une phase stationnaire et une phase mobile. L'élution des analytes se produit en fonction de la différence dans leur vitesse de progression qui dépend de leur affinité pour l'une ou l'autre des phases

(Skoog *et al.*, 2012). La phase mobile est un gaz vecteur, l'hélium qui est un gaz inerte. Celui-ci circule dans une colonne capillaire dont les parois constituent la phase stationnaire tel que montré au schéma suivant :

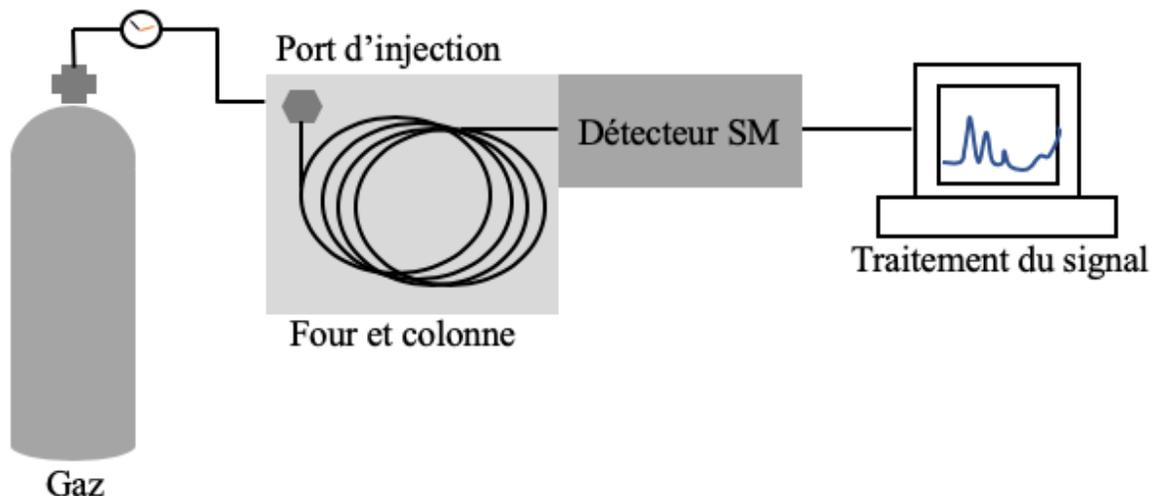
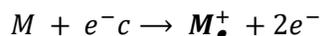


Figure 2-10 : Schéma montrant le couplage de la chromatographie gazeuse au spectromètre de masse.

L'échantillon est inséré à l'injecteur où il est vaporisé dans une chambre à vaporisation instantanée (port d'injection) située avant la colonne afin d'assurer le transport des composés par le gaz vecteur. Les composés sont donc condensés à l'entrée de la colonne puis la température est augmentée graduellement ce qui assure la séparation des composés grâce à leur affinité avec la phase stationnaire et à leur volatilité. Leur vitesse de propagation est individuelle à chacun (Karasek, 1988). À la sortie de la colonne, les analytes sont introduits dans la source du spectromètre de masse où ils seront ionisés. Dans le cas présent, la source d'ions est par impact électronique (IE). Un faisceau d'électrons est dirigé et entre en collision avec les molécules à analyser. L'énergie cinétique des électrons permet d'ioniser la molécule en arrachant un électron, on obtient alors l'ion moléculaire positif (M^{\oplus}) comme représenté dans l'équation suivante :



L'énergie d'ionisation moléculaire est généralement dans l'ordre de 6 à 12 eV tandis que le faisceau d'électrons est envoyé à 70 eV. L'énergie supplémentaire est donc emmagasinée par l'ion moléculaire en énergie interne et permet sa fragmentation en ions fils. Ces ions sont focalisés et séparés dans l'analyseur en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) par l'implication de champ électrique et/ou magnétique (E. Hoffmann *et al.*, 2007).

La majeure partie des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées à l'aide du CG-SM/SM qui offre l'avantage d'un analyseur à triple quadripôle. Dans ce cas, il y a combinaison d'analyseurs en séquence. On utilise souvent la notation QqQ dans laquelle le second analyseur, indiqué par une lettre minuscule, sert de cellule de collision. Cela augmente la polyvalence de l'instrument et permet plusieurs types d'analyses. La combinaison des analyseurs donne lieu à des analyses plus sensibles et spécifiques en plus de réduire le bruit des signaux obtenus (Agilent Technologies, 2009, E. Hoffmann *et al.*, 2007).

Les différents modes d'analyse (figure 2-11) pouvant être employés grâce à la présence des triples quadripôles et qui permettent la caractérisation de la fragmentation des stéroïdes sont notamment l'analyse des spectres d'ions fragments (SIF), la surveillance de réaction sélectionnée (SRS) et la surveillance de réactions multiples (SRM). Ils sont basés généralement sur le même principe, soit la sélection d'un ou plusieurs ions d'intérêt possédant un rapport m/z connu au premier quadripôle. Ils sont alors envoyés au deuxième quadripôle servant de cellule de collision où un gaz inerte, l'azote, est introduit afin de fragmenter l'ion ou les ions d'intérêt. Ces ions précurseurs sont alors fragmentés en d'autres ions qui sont analysés et sélectionnés dans le troisième quadripôle. On peut alors obtenir différentes informations spécifiques sur la fragmentation du stéroïde injecté (E. Hoffmann *et al.*, 2007).

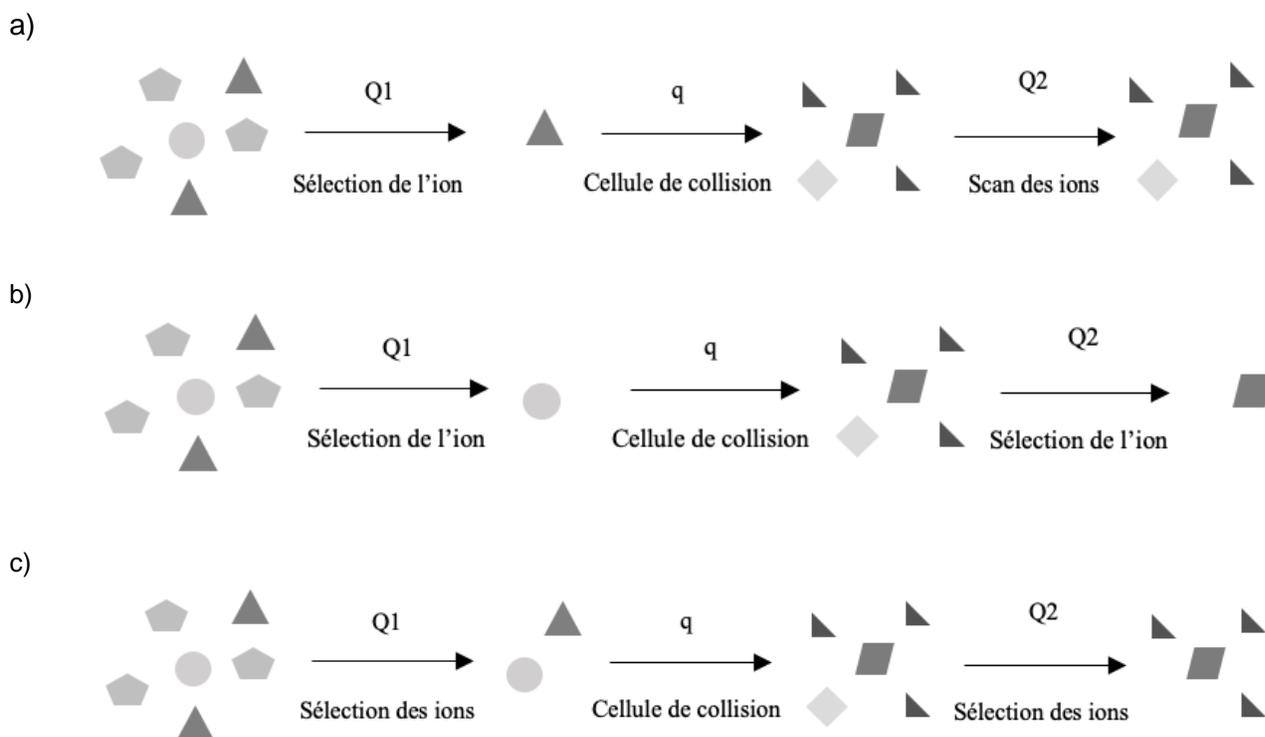


Figure 2-11 : Schéma de fonctionnement du mode a) SIF, b) SRS et c) SRM

Enfin, une fois sortis de l'analyseur, les ions sont détectés et transformés en un signal utilisable à l'aide d'un détecteur. Ce dernier génère, à partir des ions, un courant électrique proportionnel à l'abondance des ions. Ainsi, il permet le compte des ions et amplifie leurs signaux. Un système informatique collecte les données et s'occupe ensuite de produire un graphique de l'intensité des ions en fonction de la valeur m/z et fournit toutes autres données voulues en lien avec la SM (courant ionique total, températures, composition, etc.) (Gross, 2006, E. Hoffmann *et al.*, 2007, Skoog *et al.*, 2012). L'abondance d'une fragmentation est spécifique au stéroïde analysé, il est donc possible de calculer des ratios entre les différentes transitions et d'utiliser ces ratios comme critères d'identification pour un stéroïde (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2015).

2.6.2 CLHP

Nous avons utilisé la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à deux dimensions pour séparer et purifier les extraits urinaires en vue de l'analyse par CG-C-SMRI. Plus précisément, la CL à deux dimensions à phase inversée. Ce type de CL emploie une phase stationnaire liquide qui est non soluble avec la phase mobile aussi liquide. C'est une CL dite inversée puisque la phase stationnaire est non polaire et la phase mobile est un solvant polaire. Afin d'augmenter le pouvoir de séparation de la phase mobile, l'élution se fait selon un gradient. Le rapport des volumes de chacun des solvants est modifié de manière continue et préprogrammée, ce qui permet de faire varier l'affinité des différents composés avec la phase mobile et ainsi influencer leur temps d'élution (Makin *et al.*, 2010, Skoog *et al.*, 2012). Elle est dite en 2 dimensions puisqu'une première séparation est effectuée, normalement sur un premier type de colonne puis, des portions de l'éluant de cette première colonne sont acheminées vers une deuxième colonne possédant des propriétés différentes à l'aide d'un système de valve. Ce principe permet donc d'augmenter le pouvoir de séparation et de purification de la CLHP (Lalonde *et al.*, 2021). De plus, il est possible de récupérer l'éluant contenant les analytes et ainsi de procéder à d'autres procédures analytiques, dans le cas présent, la CG-C-SMRI (Skoog *et al.*, 2012). Les composantes principales de ce type de CL sont représentées dans la figure 2-12 (Fallon *et al.*, 1987). Alors que les conditions analytiques employées ont été mises au point et perfectionnées par Lalonde *et al.* (Lalonde *et al.*, s.d.).

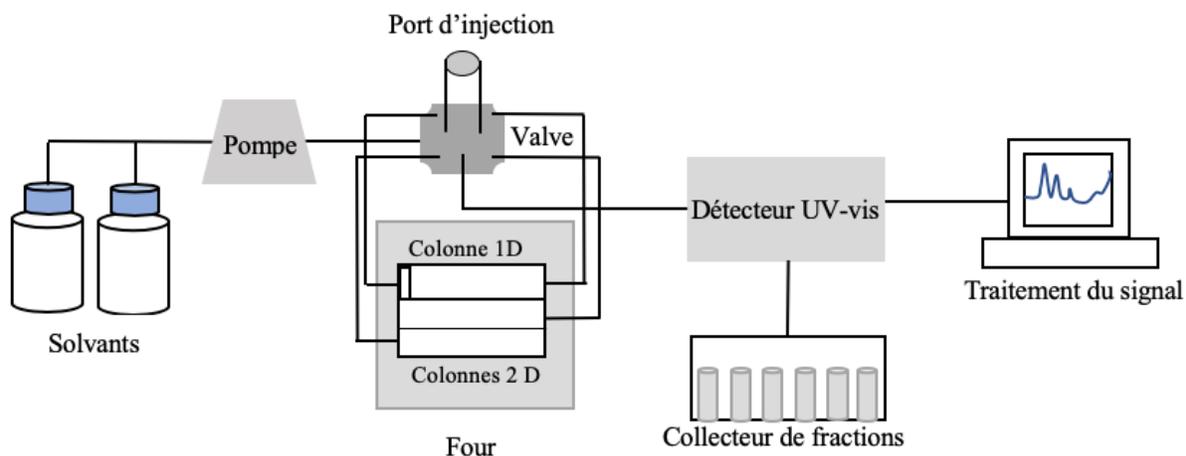


Figure 2-12 : Schéma général d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance

Un risque de la CL à phase inverse est l'accumulation de composés non polaires sur la colonne, ce qui réduit la qualité de la séparation. Pour contrer ce problème, il y a introduction d'une petite colonne de garde longue de quelques millimètres juste avant la colonne analytique. Il s'agit d'une petite colonne de même nature que la colonne analytique. La deuxième dimension est composée de deux colonnes (Lalonde *et al.*, 2021). Enfin, la détection se fait à l'aide d'un détecteur Ultraviolet-Visible (UV-Vis) qui est le détecteur le plus populaire dû à sa polyvalence, sa fiabilité, sa sensibilité et son coût peu élevé. Les stéroïdes absorbent les rayons ultraviolets grâce à la présence de chromophores permettant ainsi l'acquisition d'un signal servant à établir les temps de rétention des différents stéroïdes menant ainsi à leur récolte (Kasal *et al.*, 2010).

2.6.3 CG-C-SMRI

Tel que mentionné précédemment, la CG-C-SMRI est utilisée comme procédure de confirmation puisqu'elle permet de distinguer l'origine endogène ou exogène de la 19-NA et la 19-NE urinaires.

Le tissu de la plante reflète la différence dans la composition isotopique du carbone fixé lors de la photosynthèse provenant de l'atmosphère, soit le ^{12}C , isotope majoritaire à 98,9 % et le ^{13}C , isotope minoritaire à 1,1 % (O'Leary, 1988). Et, comme le processus de photosynthèse responsable de l'incorporation du carbone est différent d'un type de plante à l'autre, cela résulte donc en une différence isotopique mesurable entre les types de plante (Cawley *et al.*, 2009).

Une enzyme importante dans la photosynthèse est la RubisCo (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase). Elle est responsable de la catalyse de la réaction de fixation du CO_2 . Toutefois, c'est lors de cette fixation que se produit le fractionnement isotopique des composantes de la plante puisque cette enzyme favorise la fixation du ^{12}C comparativement au ^{13}C qui possède

une réactivité inférieure. Les plantes C_3 fixent le CO_2 atmosphérique selon le cycle de Calvin directement en un intermédiaire à 3 carbones, soit le 3-phosphoglycérate, tandis que le processus de photosynthèse dans les plantes C_4 passe par le cycle Hatch-Slack (Cawley *et al.*, 2009). Celui-ci possède un système de pompe à CO_2 par lequel ce dernier est spécifiquement dissous sous forme de bicarbonate et jumelé au phosphoénolpyruvate pour former l'oxaloacétate, intermédiaire à 4 carbones, qui diffuse plus facilement dans les cellules vers les sites de Rubisco. Le CO_2 est alors relâché par une enzyme décarboxylase et est soumis au même processus de fixation par Rubisco que les plantes en C_3 . Toutefois, le système de pompe améliore la capture du CO_2 qui entre plus facilement et donc en plus grande proportion dans la cellule. Cela augmente la disponibilité et minimise la discrimination par Rubisco (Osborne *et al.*, 2006). Les plantes C_4 sont donc plus enrichies en ^{13}C que les plantes C_3 respectivement selon des $\delta^{13}C$ allant de -6‰ à -19‰ contre des $\delta^{13}C$ de -24‰ à -34‰ (Smith *et al.*, 1971). Cette différence transparait donc sur les préparations génériques de stéroïdes.

Les stéroïdes synthétiques sont dérivés de stérols extraits de plantes « C_3 », dont font partie le blé, le riz et le soja (Ueki *et al.*, 2001). Pour ce qui est des stéroïdes formés dans le corps humain, donc endogènes, ceux-ci proviennent plutôt d'un mélange de plantes C_3 et C_4 en fonction de la diète, qui, elle, est influencée par la localisation et les habitudes alimentaires des populations. En effet, la composition isotopique des stéroïdes synthétisés dans les testicules ou les ovaires provient des plantes et animaux ingérés par les humains (Piper *et al.*, 2011, Shackleton *et al.*, 1997). Les plantes en C_4 étant notamment le maïs et la canne à sucre (Cawley *et al.*, 2009).

Cette différence de composition isotopique peut être mesurée en CG-C-SMRI. Au sortir du chromatographe en phase gazeuse, les analytes subissent une combustion produisant alors du CO_2 et H_2O . Une trappe à eau capte l'eau afin d'éviter que l'eau résiduelle réagisse avec le CO_2 afin de former des ions HCO_2^+ . Artéfact qui viendrait fausser les masses détectées et donc causer une erreur systématique sur la mesure du ^{13}C (Ayotte, 2010). Le CO_2 portant la signature isotopique du stéroïde injecté est alors acheminé vers la source pour y être ionisé. Les ions sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) correspondant aux différentes combinaisons isotopiques du dioxyde de carbone, soit 44 ($^{12}C^{16}O_2$), 45 ($^{13}C^{16}O_2 = ^{12}C^{17}O^{16}O$) et 46 ($^{12}C^{18}O^{16}O$) (Ayotte, 2010). Le calcul du $\delta^{13}C$ ainsi que la calibration de l'appareil dépend du gaz de référence CO_2 utilisé. Celui-ci est injecté par pulsation à partir d'un second capillaire indépendant directement dans la source d'ionisation de la SMRI (Kioussi *et al.*, 2011). La masse du dioxyde de carbone possédant les isotopes majoritaires étant 44. Les données sont par la

suite analysées par ordinateur. Le résultat obtenu est donné en valeurs $\delta^{13}\text{C}$ obtenu de la formule suivante :

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right] \times 1000$$

où R représente le rapport du dioxyde de carbone constitué de l'isotope minoritaire (^{13}C) sur le dioxyde de carbone composé de l'isotope majoritaire (^{12}C) de l'échantillon testé contre celui du standard international, Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) (Shackleton *et al.*, 1997). L'unité de mesure est donnée en pour mille (‰). En règle générale, le standard possède une plus grande proportion en ^{13}C . Un $\delta^{13}\text{C}$ plus négatif signifie une plus grande proportion de ^{12}C donc une masse plus petite. Inversement, un $\delta^{13}\text{C}$ plus positif signifie plus de l'isotope minoritaire et donc une masse plus lourde (O'Leary, 1988). Les préparations pharmaceutiques possèdent habituellement un $\delta^{13}\text{C}$ en dessous de -27 ‰. Pour les stéroïdes endogènes, le $\delta^{13}\text{C}$ tombe plutôt entre -26 ‰ et -16 ‰, ces valeurs varient en fonction de l'emplacement géographique du sujet à l'origine des stéroïdes analysés en raison des variantes entre les différentes diètes (Piper *et al.*, 2011). Étant donné que la différence entre un composé endogène et exogène peut être assez mince, les échantillons sont toujours analysés avec un composé endogène de référence (CER). Ce composé est choisi puisque sa valeur de $\delta^{13}\text{C}$ n'est pas affecté par la prise de stéroïdes exogènes (Shackleton *et al.*, 1997). La différence absolue ($\Delta[\text{‰}]$) entre le $\delta^{13}\text{C}$ du CER et celle des composés cibles de l'échantillon ne doit pas dépasser 3 ‰ selon les critères établis par l'AMA dans le TD2019IRMS pour témoigner d'une origine commune, i.e., endogène (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2019a, Piper *et al.*, 2008).

Certains désavantages quant à l'utilisation de la CG-C-SMRI sont que l'analyte doit être pur afin d'éviter que d'autres composés viennent apporter leur contribution isotopique et ainsi fausser le résultat obtenu. Il faut aussi prêter attention à la perte d'échantillon qui pourrait mener au fractionnement isotopique. Celui-ci peut subvenir lors des étapes de préparation des échantillons tout comme lors de leur passage sur l'appareil analytique (Piper *et al.*, 2011). De longues étapes de purification préliminaire, notamment en CLHP, sont nécessaires afin de bien isoler les stéroïdes d'intérêts bien que du fractionnement isotopique peut aussi subvenir lors de cette étape. Le traitement des échantillons nécessite donc de prendre plusieurs précautions lors de manipulations et l'utilisation d'une méthode validée est d'autant plus importante afin de permettre d'éviter et de vérifier l'apparition de tel phénomène.

La figure suivante présente les différentes composantes nécessaires à un système de CG-C-SMRI fonctionnel.

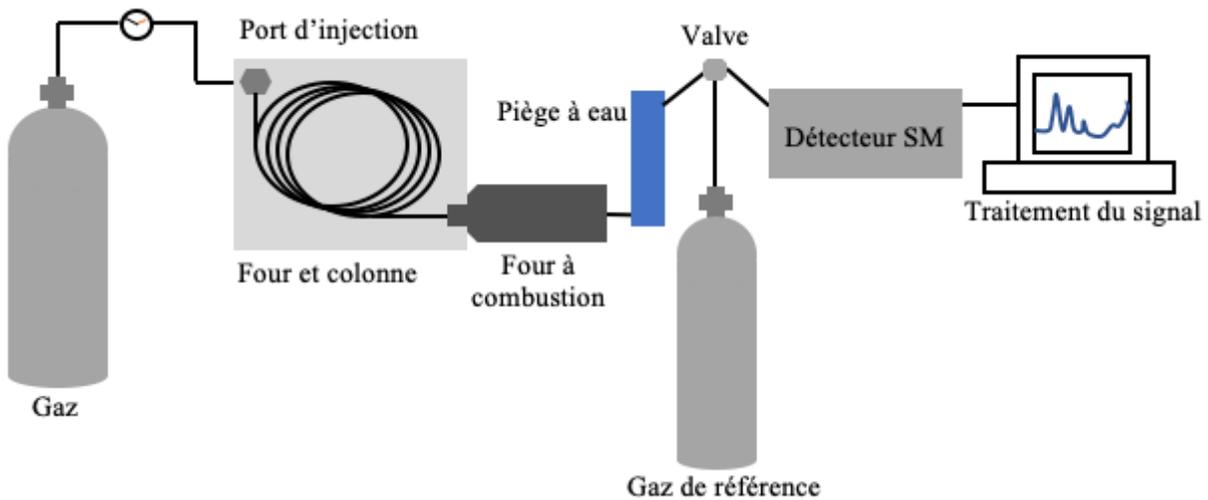


Figure 2-13 : Schéma présentant la combinaison de chromatographie gazeuse combustion - spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone.

2.7 Objectifs de la recherche

En premier lieu, nous avons sélectionné des métabolites, précurseurs et prohormones pouvant possiblement servir de sondes secondaires diagnostiques, stéroïde d'intérêt dans la présente étude. Le choix de ces métabolites s'est fait en faisant une revue systématique de la littérature en lien avec la 19-NT. Puis une méthode d'analyse a été développée avec des standards disponibles commercialement des analytes sélectionnés. Des molécules telles que la 19-NEA et la 19-NEE, sont considérées importantes dans le métabolisme des norstéroïdes et excrétées dans la phase sulfatée jusqu'ici peu étudiée. Il sera donc intéressant d'évaluer leur comportement et d'établir leur potentiel dans la distinction du statut d'un échantillon. Les estranediols, métabolites usuels de T, ont jusqu'ici été peu étudiés dans le métabolisme des norstéroïdes chez l'humain. Il est attendu que leur présence et/ou absence fournisse quelques indices sur l'établissement d'un diagnostic.

Une fois terminée la mise au point de la méthode analytique, nous avons étudié une population d'échantillons anonymisés reçus et analysés au laboratoire durant les analyses de routine et dans lesquels la 19-NA avait été détectée. Nous avons effectué l'analyse de confirmation en SMRI pour les échantillons qui n'y avaient pas été soumis lors des analyses initiales. Ainsi, les échantillons ont un diagnostic établi permettant de les classer.

Enfin, le but est d'appliquer la méthode d'analyse du CG-SM/SM à cette population d'échantillons afin de détecter la présence de ces possibles sondes secondaires. Ainsi, des

tendances qualitative et/ou quantitative pourraient permettre d'étudier le potentiel diagnostique de ces métabolites. Une meilleure compréhension du métabolisme des norstéroïdes dans l'une ou l'autre des phases pourrait résulter de cette étude en plus de déceler une distinction entre les échantillons positifs et négatifs.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Matériel utilisé

Les standards de stéroïdes ont été obtenus des sources suivantes : la 4-estrène-3,17-dione (Nordione), 4-estrène-3 α ,17 β -diol (4Een3 α 17 β), 4-estrène-3 β ,17 β -diol (Nordiol), 4-estrène-6 β -ol-3,17-dione (4Een6 β), 5 α -estran-3 α -ol-17-one (19-NA), 5 α -estran-3 α ,17 β -diol (5 α Ean3 α 17 β), 5 α -estran-3,17-dione (5 α Ean), 5 α -estran-3 β -ol-17-one (19-NEA), 5 α -estran-3 β ,17 α -diol (5 α Ean3 β 17 α), 5 α -estran-3 β ,17 β -diol (5 α Ean3 β 17 β), 5 α -estran-3-one-17 β -ol (5 α Ean17 β), 5 β -estran-3 α -ol-17-one (19-NE), 5 β -estran-3,17-dione (5 β Ean), 5 β -estran-3 α ,17 β -diol (5 β Ean3 α 17 β) et 5 β -estran-3 β -ol-17-one (19-NEE) proviennent de Steraloids Inc. (Newport, RI, USA). Le 4-estrène-3-one-17 β -ol (19-NT) a été obtenue auprès de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CAN). La 5 α -estran-3 α ,16 α -diol-17-one (16 α -hydroxy-NA) a été fournie par l'Institut de Biochimie – German sport University Cologne. La 4-estrène-3 β -ol-17-one (*nor*DHEA), a été extraite à partir d'un produit commercial, le Nor-andro MAX (Primeval Labs, Batesville, AR, US).

Les solvants et réactifs utilisés pour préparer les différentes solutions et tampons, soit le méthanol (MeOH), l'hexane, l'éther diéthylique (Et₂O), l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide sulfurique (H₂SO₄), l'acide acétique glacial (AcOH), l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le dichlorométhane (DCM) proviennent de Caledon (Georgetown, ON, CAN). La triéthylamine (TEA) provient de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CAN) tandis que l'éthanthiol provient de Acros (New Jersey, USA). Sans oublier l'eau déionisée obtenue à l'aide d'un système de gradient Milli-Q (Fisher, Ottawa, ON, CAN).

Le phosphate de sodium dibasique provient de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CAN). Les phosphate de sodium monobasique, acétate de sodium et carbonate de sodium anhydre ont été

achetés chez Fisher (Ottawa, ON, CAN), le bicarbonate de sodium de EMD Millipore (Etobicoke, ON, CAN). L'enzyme β -glucuronidase lyophilisée de *E. Coli* de type 1X-A, a été obtenue de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CAN) tout comme le tétrahydrofurane (THF) utilisé pour la solvolysé chimique. Le MSTFA (N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) et le TMSI (iodotriméthylsilane), proviennent de Chemfabrik (Budenheim, GER).

Les standards utilisés pour la correction des valeurs isotopiques lors des analyses GC-C-SMRI, soit dans les Perform MSD, Perf-IRMS A et B proviennent des sources suivantes : La 5 α -androstane-17-one, le 3 β -hydroxy-5 β -androstane-17-one (épiétiocholanolone), l'épitéstostérone (ET), le 5 α -androst-16-en-3 α -ol, le pregnanediol (Pd), le 5 α -androstane-17 β -diol (5 α -adiol), le 5 β -androstane-17 β -diol (5 β -adiol), l'androst-4,9(11)-dien-3,17-dione de Stérols Inc. Newport, RI, US), le 5 α -androstane-3 β -ol, l'étiocolanolone (E), la testostérone (T), l'androstérone (A) de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CAN) et la déhydroépiandrostérone (DHEA) a été acquis chez Cerilliant (Round Rock, TX, US).

Le mélange d'alcane utilisé dans les analyses en CG-C-SMRI pour en vérifier la stabilité n-C17, n-C19, n-C21, n-C23, n-C25 certifiés, venant de l'Université d'Indiana (IN, US). Le mélange de référence CU- 34, quant à lui, est composé de stéroïdes certifiés (androstérone, étiocolanolone et pregnanediol) provenant de l'Université Cornell eux-mêmes fournis par NMI (Canberra, AU).

3.2 Élaboration de la méthode

3.2.1 Sélection des métabolites étudiés

Tous les stéroïdes faisant partie de la méthode d'analyse, ou envisagés pour en faire partie, se retrouvent dans le tableau de l'ANNEXE I. Il s'agit de molécules qui ont été mentionnées dans les articles en lien avec la nandrolone et ses métabolites, ou des molécules possédant une structure chimique semblable pouvant être obtenue suite à des réactions métaboliques. Le tableau dans l'annexe présente le nom scientifique de chacune des 18 molécules initialement considérées, l'abréviation utilisée, s'il y a lieu, ainsi que la structure chimique.

3.2.2 Détermination des conditions d'analyse en CG-SM à partir des standards.

L'analyse des standards des molécules choisies par CG-SM est essentielle afin de choisir les ions les plus représentatifs issus de la fragmentation des métabolites de chaque standard. Des solutions stock dans le méthanol d'une concentration de 100 ng/ μ L ont été préparées pour

chaque standard. Ces solutions ont été utilisées pour préparer des solutions de concentration finale d'environ 10 ng/ μ L dans un vial de 250 μ L.

L'appareil CG-SM utilisé dans cette étude est le modèle *HP 6890 Series GC System* couplé à un spectromètre de masse de modèle *HP 5973 Mass Selective Detector*. Les conditions analytiques employées sont les suivantes : la température de l'injecteur est fixée à 270°C. Le volume d'échantillon est de 1 μ L en mode de débit non partagé. La colonne utilisée est un modèle DB-5MS (Agilent Technologies, Mississauga, ON, CAN) et dont les dimensions sont 25 m x 0.2 mm x 0.33 μ m d'épaisseur de film. Le débit de la phase mobile est de 0,9 mL/min. La température initiale du four est de 100 °C. Cette température est maintenue durant 0,5 min et augmente jusqu'à 240°C durant les 7,5 min suivantes à un taux de 20 °C/min. Par la suite, la température augmente de 6°C/min pour atteindre une température de 278°C. Enfin, la température est élevée de 10°C/min pour atteindre la température finale de 320°C qui est maintenue durant 5 min. À la sortie de la colonne, la température de l'interface est de 320°C tandis que celle de la source est de 230°C. L'ionisation se fait par impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV. L'analyse des stéroïdes se fait en mode balayage complet couvrant la gamme de masse de X à y. Le logiciel d'acquisition et de traitement de données est Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 ou MSD Chemstation E.02.00.493.

Du spectre de masse obtenu pour chaque stéroïde lors de la fragmentation, il a été ciblé des fragments majoritaires. Ces ions majoritaires serviront aux analyses subséquentes.

3.2.3 Sélection des transitions spécifiques à l'aide de la CG-SM/SM et choix de l'énergie de collision

L'appareil de CG-SM/SM employé est le modèle *Agilent Technologies 7890A GC System* couplé à un système de SM de modèle *Agilent Technologies 7000 (ou 7010) GC/MS Triple Quad*. Les conditions analytiques de l'appareillage sont les mêmes que celles décrites dans la section précédente à l'exception que l'emploi de triples quadripôles permet l'analyse des stéroïdes en mode SIF. Le logiciel d'acquisition données pour ce CG-SM/SM est MassHunter GC/MS Acquisition version B.07.02.1938.

Donc, à partir des ions majoritaires obtenus des spectres de la section précédente, le mode SIF a permis d'obtenir les spectres de tous les ions (voir ANNEXE II) et cibler des transitions qui semblent spécifiques à chaque stéroïde. Le tableau suivant présente les transitions préliminaires pour chacun des métabolites :

Tableau 3-1 : Transitions envisagées entre un ion majoritaire et les fragments pour tous les stéroïdes

Molécule	Ion précurseur	Ion fragment
19-NT	418,4	194,2 182,2
	403,4	327,3 313,3 287,3
Nordione	416,4	401,4 311,3 234,2 220,2
	401,4	311,2 219,2 207,2
	193,3	179,2
4Een3 α 17 β	420	391 330 240 207 182
	405	330 240
	330	240
Nordiol	419	330 240 207 182
	405	240 143
	330	225 199
norDHEA	418	328 313 182 169
	403	237 223
4Een6 β	504	489
	489	413 399 206 169 147
5 α Ean3 α 17 β	422	337 332

		242
		146
	407	241
	332	242
		201
5 α Ean	418	403
		182
		169
	403	313
		261
		223
		171
	261	171
		155
19-NEA	420	405
		315
		225
		169
	405	315
		225
		155
	315	225
		183
5 α Ean3 β 17 α	422	277
		242
		201
		185
	407	241
		199
	332	201
5 α Ean3 β 17 β	422	277
		242
		201
	407	241
		199
	332	201
5 α Ean17 β	420	180
		129
		315
	405	187
	329	187
16 α -hydroxy-NA	508	493
		417
	493	403
		217
		185

	403	315 217 181 147
5 β Ean	418	403 207
	403	313 223 181 169
	261	171 155
5 β Ean3 α 17 β	422	332 242 215 185 146
	407	331 241
	332	242 201
	242	185
19-NEE	420	405 315 225 169
	405	315 225
	315	225
	225	183

Aussi, afin de s'assurer d'obtenir les meilleures transitions en termes de spécificité lors de la fragmentation, les stéroïdes ont tous été soumis à des injections lors desquelles l'énergie avec laquelle les ions précurseurs ont été fragmentés vers les ions fragments a été variée. Les ions ont donc tous été fragmentés selon des énergies de 0 eV, 5 eV, 10 eV, 15 eV et 20 eV. Ensuite, un graphique de l'abondance de chacun des ions fragments en fonction de l'énergie de collision à laquelle l'ion précurseur a été fragmenté a été effectué. Ce graphique a permis de sélectionner l'énergie de collision optimale. Les graphiques représentant la variation d'abondance des ions fragments mesurée à partir des spectres de l'ANNEXE II, selon les différentes énergies de collision sont présentés dans l'ANNEXE III. C'est à partir de ces graphiques qu'a été ciblée cette énergie optimale à laquelle seront fragmentés les ions dans la méthode finale. Afin d'améliorer

d'autant plus la spécificité des transitions, il a aussi été injecté des urines blanches afin de vérifier la présence ou l'absence des transitions choisies dans des urines ne contenant pas de norstéroïdes. Les transitions non spécifiques ont alors été retirées de la méthode. Le tableau suivant présente les conditions retenues pour l'analyse des métabolites choisis.

Tableau 3-2 : Transitions entre les ions précurseurs et les fragments sélectionnés pour chacun des stéroïdes ainsi que le temps de rétention et l'énergie de collision employée.

Molécule	Temps de rétention	Transitions	Énergie de collision (eV)
5 β Ean	12,18	403 \rightarrow 181	17
		403 \rightarrow 223	17
		403 \rightarrow 313	17
19-NA	12,19	420 \rightarrow 405	10
		420 \rightarrow 315	10
		420 \rightarrow 225	10
5 α Ean3 α 17 β	12,39	332 \rightarrow 201	17
		407 \rightarrow 241	12
		407 \rightarrow 199	17
19-NEE	12,59	405 \rightarrow 225	12
		405 \rightarrow 315	12
		420 \rightarrow 315	12
5 α Ean3 β 17 α	12,63	332 \rightarrow 201	12
		407 \rightarrow 199	12
		407 \rightarrow 241	12
19-NE	12,72	420 \rightarrow 405	10
		420 \rightarrow 315	10
		420 \rightarrow 225	10
4Een3 α 17 β	12,74	420 \rightarrow 240	7
		420 \rightarrow 182	17
		420 \rightarrow 391	17
19-NEA	12,87	405 \rightarrow 225	17
		405 \rightarrow 155	17
5 α Ean3 β 17 β	13,06	332 \rightarrow 201	12
		407 \rightarrow 199	12
		407 \rightarrow 241	12
5 α Ean	13,27	403 \rightarrow 171	17
		403 \rightarrow 261	12
		403 \rightarrow 313	12
		418 \rightarrow 403	17
Nordiol	13,35	420 \rightarrow 240	2
		330 \rightarrow 225	17
		330 \rightarrow 199	17
		420 \rightarrow 207	12
5 α Ean17 β	13,45	420 \rightarrow 180	12

		420 → 129	12
		329 → 187	12
Nordione	13,89	416 → 220	17
		416 → 234	17
		416 → 401	17
19-NT	14,10	418 → 182	17
		418 → 194	17
		418 → 287	17
16 α -hydroxy-NA	14,31	493 → 185	17
		493 → 217	17
		508 → 493	12

3.3 Description des échantillons analysés

3.3.1 Population d'échantillons

Les échantillons recueillis dans le cadre des procédures de routine, ont été choisis en fonction des concentrations plus ou moins élevées de 19-NA, 19-NE mesurées. Ces échantillons avaient été anonymisés et conservés au congélateur à -20°C.

De plus, des échantillons provenant d'études effectuées préalablement après l'administration de norstéroïdes synthétiques ont été inclus dans l'étude (Guay et al., 2009, Strahm et al., 2009). Les échantillons présentant des signes de dégradation dus à la présence d'inhibiteur en 5 α comme la finaséride ont été retirés de l'étude.

3.3.2 Contrôles positifs et négatifs

Des urines de volontaires ne contenant ni 19-NA ni 19-NE en quantité significative ont été utilisées comme contrôles négatifs.

La quantification des composés nécessite l'élaboration et l'intégration d'une courbe standard contenant tous les métabolites à l'analyse. Une urine négative a été utilisée comme matrice pour le rehaussement des standards choisis en concentrations différentes dans différentes séries de tubes (Tableau 3-1). Dans cette série de standards, deux tubes (7 et 8) contiennent la 19-NA et la 19-NE, en proportion différente. Ces solutions sont utilisées pour courbe de calibration à trois points, soit un ratio de 1, 3 et 10, afin d'évaluer les ratios 19-NA/19-NE. Une courbe de deux points seulement est employée pour les métabolites secondaires.

Tableau 3-3 : Concentrations (ng/mL) des stéroïdes utilisées pour la courbe étalonnage

	1	2	3	4	5	6	7	8
19-NA	0,515	1,030	2,575	6,180	10,300	25,750	6,180	10,300
19-NE	0,510	1,020	2,550	6,120	10,200	25,500	2,040	1,020
19-NT	0,061	0,121	0,605	1,513	2,420	6,050		
19-NEE	0,058	0,115	0,575	1,438	2,300	5,750		
19-NEA	0,053	0,106	0,530	1,325	2,120	5,300		
5βEan	1,030					10,30		
5αEan3α17β	0,990					9,900		
5αEan3β17α	0,990					9,900		
4Een3α17β	1,010					10,100		
5αEan3β17β	1,090					10,900		
5αEan	1,180					11,800		
Nordioli	1,000					10,000		
5αEan17β	1,010					10,100		
Nordione	1,040					10,400		
16α-hydroxy-NA	1,000					10,000		

Un échantillon contrôle positif endogène de 19-NA et 19-NE en vue des analyses par SMRI a été inclus (l'urine de femme enceinte).

3.4 Préparation des échantillons pour l'analyse CG-SM/SM

3.4.1 Élaboration des lots d'analyses

Les échantillons ont d'abord été séparés en fonction de leur concentration en 19-NA. Des volumes de 2 mL de tous les échantillons ont été prélevés, sauf pour les urines positives contenant la 19-NA en forte concentration (>100ng/mL) dont le volume a été choisi afin de rester à l'intérieur de la gamme de concentrations de la courbe d'étalonnage.

Un lot est d'abord constitué des huit tubes composant la courbe de standards. Ensuite viennent l'échantillon témoin, les trois blancs d'urine, puis les échantillons. Un lot est ainsi formé de 30 à 50 échantillons.

3.4.2 Procédure d'extraction des métabolites conjugués

La procédure utilisée a été décrite par Lévesque et *al.* (2002). En résumé, à tous les tubes sont ajoutés 2,5 mL de tampon acétate 0,1 M (pH de 5,2) ainsi que 25 µL du standard interne (ISTD) contenant la norandrostérone-d4. Les échantillons subissent ensuite une extraction en phase solide (section 2.3.5) sur des cartouches Sep Pak C18 préalablement conditionnées avec 5 mL d'hexane, 5 mL de MeOH et 5 mL d'eau déionisée. La cartouche est ensuite rincée avec 5 mL d'eau déionisée, séchée sous un jet d'azote, puis les composés cibles sont élués avec 5 mL de MeOH dans un tube de 15 mL. Le MeOH est évaporé sous un jet continu d'azote. L'hydrolyse est effectuée par l'ajout de 1 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH 6.9) et d'environ 1200 unités (50 uL) de β -glucuronidase de *E. coli*. fraîchement préparée. Les tubes sont ensuite placés dans un bain chauffé à 50°C. pour une incubation d'une heure. Par la suite, la double extraction est effectuée par l'ajout de 400 µL de tampon carbonate 1,0 M à pH 9 et de 2 X 5 mL de Et₂O. Les phases sont séparées après congélation (-80C). Les phases organiques combinées sont ensuite évaporées sous un jet d'azote à 50 °C, puis le résidu est repris dans 200 µL de MeOH. Cette solution est ensuite transférée dans un vial conique de 250 µL contenant 25 µL de standard externe (ESTD) de 5 α -androstane-17-one et d'épiétiocholanolone. Le contenu du vial est évaporé sous un jet d'azote, puis scellé sous atmosphère d'azote.

La préparation du réactif de dérivation (MSTFA X% : TMIS X% : etc) a été décrite précédemment. 50 µL du mélange de dérivation TMS est ajouté au résidu contenu dans les vials qui sont chauffés à 70°C durant 30 minutes.

La préparation des échantillons contenant les métabolites glucuroconjugués est ainsi terminée. La procédure pour la fraction sulfate qui est présente dans la phase aqueuse, précédemment mise de côté, comporte quelques modifications. Les tubes contenant la phase aqueuse obtenue suite à l'extraction liquide-liquide sont récupérés. L'ajout de 100 µL d'une solution de HCl à 5 M est effectué dans ces tubes contenant les stéroïdes sulfoconjugués. À cette étape, est aussi additionné 25 µL de l'ISTD et 2,5 mL de tampon acétate. Les échantillons subissent ensuite une extraction sur phase solide comme expliquée antérieurement. Le résidu méthanolique est évaporé à sec, puis 1 mL de THF et 2 µL de H₂SO₄ à 4M sont ajoutés avant de mettre les tubes dans un bain chauffé à 50°C pendant 1 heure pour permettre l'hydrolyse chimique. Suite à l'incubation, 1 mL d'une solution de bicarbonate de sodium (5 % p/v) est ajouté, ainsi que l'hexane afin d'effectuer la double extraction liquide-liquide aussi expliquée plus haut. La récupération des métabolites à l'aide de MeOH et le transfert dans des vials de 250 µL ne sont

pas sujet à des variations de procédure, tout comme la dérivation des vials. Il faut cependant noter que, pour ces étapes d'extraction ciblant les métabolites sulfatés, les tubes composant la courbe de standards ont été remplacés par une nouvelle série de tubes à partir de l'étape de l'ajout de l'ISTD.

3.5 Analyse CG-SM/SM

3.5.1 Méthode et test de spécificité

Selon les différentes transitions sélectionnées à l'aide des étapes décrites dans la section 3.2, un essai préliminaire a été effectué sur le CG-SM/SM en mode MRM. Le modèle de l'appareillage utilisé est de marque *Thermo Scientific* avec une interface CG de modèle *Trace 1310 Gas Chromatograph* couplé à un appareil de SM *TSQ 9000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer*.

Ce test préliminaire a permis de vérifier la spécificité de la méthode ainsi que vérifier la précision des concentrations mesurées pour les courbes de quantification des stéroïdes. Ce lot test comprenait : huit tubes d'échantillons standards utilisés pour faire les courbes de quantification, trois blancs d'urine afin d'éliminer la possibilité que les transitions apparaissent dans les urines négatives, ainsi que six urines actives et six urines positives. Les échantillons ont subi la procédure d'extraction des métabolites glucuroconjugés et sulfoconjugés.

L'appareil CG-SM/SM est réglé avec une température à l'injecteur de 270°C. La quantité d'échantillon injectée est de 1µL en mode de débit non partagé d'hélium. La colonne utilisée dans la partie CG est un modèle DB-5ms de la compagnie Agilent Technologies (Mississauga, ON, CAN) et dont les dimensions sont 25 m x 0.2 mm x 0.33 µm d'épaisseur de film. La température initiale du système est de 100 °C. Cette température est maintenue durant 0,5 minute. Ensuite, la température augmente jusqu'à 240°C durant les 7,5 min suivantes selon un taux de 20 °C/min. Par la suite, la température augmente de 6°C/min pour atteindre une température de 278°C. Enfin, la température est élevée de 10°C/min pour atteindre la température finale de 320°C qui est maintenu durant 5 min. À la sortie de la colonne, la température de l'interface est de 325°C tandis que celle de la source est de 310°C. L'ionisation se fait par impact électronique selon une énergie d'ionisation de 70 eV. Le logiciel d'acquisition et de traitement de données pour ce CG-SM/SM est Chromeleon 7.2.10.

Cette étape a permis de détecter si des contaminations présentes dans l'urine seraient susceptibles d'interférer avec le signal des transitions choisies par l'observation du

chromatogramme d'ions totaux obtenu qui démontre l'abondance de chaque transition en fonction du temps selon une courbe de forme bayésienne. Si des contaminants sont présents ou si la transition ne répond pas bien à la fragmentation dans la matrice urinaire, la courbe est alors déformée. Si tel était le cas, la transition était retirée de la méthode. Si aucune transition pour un métabolite n'offrait de potentiel d'analyse, le métabolite était lui-même retiré de la méthode.

3.5.2 Application de la méthode

Ainsi, chaque lot d'échantillons élaborés et préparés comme décrit dans les sous-sections précédentes, ont été injectés sur le CG-SM/SM en utilisant la méthode présentée dans le tableau 3-2. Les conditions de l'appareil sont les mêmes que celles décrites dans la section 3.5.1.

De cette analyse, les chromatogrammes d'ions totaux sont obtenus pour chaque métabolite. Il est alors possible d'observer le signal de l'abondance en fonction du temps de chaque transition sélectionnée. Le traitement de ces signaux, si présents, est effectué en ajustant l'aire sous la courbe afin de ne sélectionner que le signal du stéroïde.

3.5.3 Confirmation des signaux et estimation de la concentration

Pour chaque métabolite, lorsque la présence d'un signal pour les différentes transitions est détectée, ceux-ci sont soumis aux critères d'identification pour la confirmation de l'identité par CG-SM. De tels critères sont émis par l'AMA sous la forme d'un document technique (TD2015IDCR) (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2015). À l'interne, le Laboratoire de contrôle de dopage a donc créé un tableur Excel permettant de mettre en pratique ces critères et de confirmer rapidement les transitions mesurées dans les échantillons par comparaison avec la substance de référence présente dans les tubes composant la courbe de standard. Ces critères concernent notamment les temps de rétention observés ainsi que les abondances relatives représentées par les aires sous la courbe des transitions cibles. Ainsi, si les transitions ne respectent pas les critères et dévient trop des pourcentages acceptés, leur identité ne peut être confirmée et le signal n'est pas pris en considération dans l'étude.

Le tableau dans l'ANNEXE IV présente les concentrations minimales pour lesquelles il a été possible de confirmer la présence d'un signal pour les métabolites retrouvés dans chacun des lots. Ces concentrations sont calculées par le logiciel de traitement de données Chroméléon de l'appareil. Il prend en compte les concentrations de chacun des échantillons de la courbe de standard ainsi que l'aire sous la courbe de la transition pour créer une courbe de type $y=ax+b$.

Cette équation sert ensuite à estimer la concentration des métabolites dont la présence est confirmée dans les échantillons.

3.6 Préparation des échantillons pour l'analyse CG-C-SMRI

3.6.1 Procédure d'extraction des métabolites conjugués

La préparation des échantillons pour l'analyse en CG-C-SMRI ressemble à celle pour l'analyse en CG-SM/SM. Toutefois, elle nécessite une plus grande quantité d'urine pour chaque échantillon. Une quantité entre 15 et 30 mL est donc aliquotée dans des tubes de 15 mL en fonction de la concentration de la 19-NA estimée. La préparation de l'analyse en CG-C-SMRI nécessite aussi l'ajout de tubes dans la série faisant office de contrôle négatif (SA65) et positif (Std-U-NA). Ce dernier est préparé en prélevant 15 μ L d'une solution 19-NA/19-NE à 100 ng/mL, elle-même préparée dans le cadre des activités journalières du laboratoire, qui est transféré dans un tube d'urine négative. Aucun ISTD ou ESTD n'est ajouté dans les tubes. L'extraction en phase solide est effectuée comme décrite antérieurement. Cependant, au lieu d'évacuer le surplus d'eau avec un jet d'azote, la cartouche est plutôt rincée avec une portion de 5 mL d'hexane. Ensuite, une différence relevée entre les procédures est une double extraction avec de l'hexane au lieu de Et₂O. Aussi, une fois les doubles portions d'hexane évaporées, le résidu est transféré dans des vials munis d'embouts de verre avec ressorts en plastique à l'aide de MeOH. Enfin, celui-ci est évaporé à sec, puis le vial est reconstitué avec 20 μ L de MeOH et bouché hermétiquement avec un capuchon en aluminium avec un sceau en téflon.

L'analyse en CG-C-SMRI est seulement effectuée sur la portion glucuroconjuguée des échantillons puisqu'elle sert à établir le diagnostic endogène ou exogène des échantillons possédant une concentration en 19-NA dans la zone ambiguë, soit 2,5 à 15 ng/mL. Aucune étape d'extraction n'est donc effectuée sur la portion aqueuse obtenue de l'extraction liquide-liquide.

3.6.2 Purification des échantillons par CLHP

Suite à cette procédure d'extraction, les métabolites ne sont pas immédiatement analysés en CG-C-SMRI, ils nécessitent d'abord d'être purifiés par CLHP de modèle *Agilent 1100*. À la série de vials contenant les échantillons et les contrôles, il faut aussi ajouter deux vials, soit le vial Mix-HPLC-NA non collecté et collecté. Ces vials contiennent une solution de stéroïdes préparée au préalable à laquelle est ajouté une quantité déterminée des standards 19-NA et 19-NE à partir de la solution à 100 ng/mL. Ces deux vials sont placés en début de série. Le premier,

le vial Mix-HPLC-NA non collecté, servira à déterminer les temps de collecte des différentes fractions de stéroïdes recueillies lors de leur séparation en CLHP. Le deuxième, le vial Mix-HPLC-NA collecté, comme son nom l'indique, sera recueilli comme tout autre échantillon et servira d'échantillon de référence lors de l'analyse CG-C-SMRI afin de s'assurer que la purification par CLHP s'est bien déroulée.

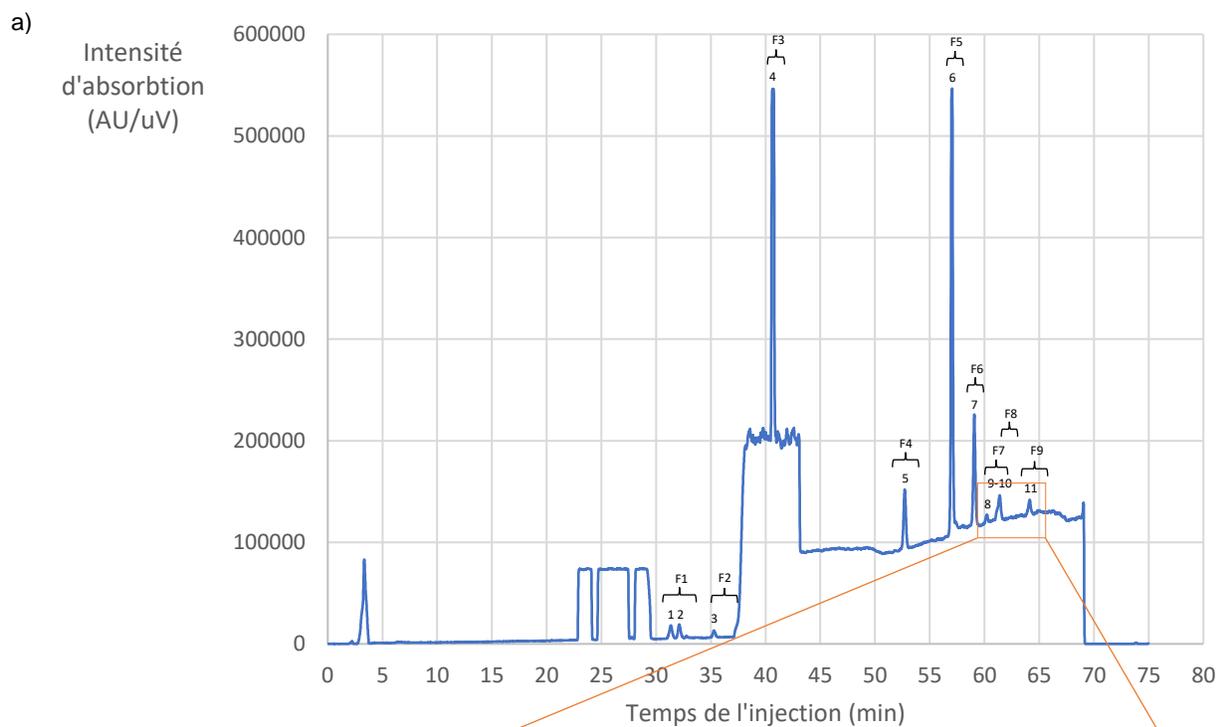
Avant l'injection des échantillons d'intérêts, l'appareil est purgé et conditionné à l'aide de deux blancs. Ensuite, le premier mix non collecté est injecté. L'éluant sortant de la première dimension est envoyé vers le détecteur. Ce premier éluant envoyé au détecteur se compose de trois portions pour lesquelles les temps de chargement doivent être relevés. Ces temps de récolte approximatifs de la première dimension sont présentés dans le tableau 3-3. Ces temps serviront lors de la deuxième injection du mix non collecté et seront appliqués afin que l'éluant, sortant de la première dimension, soit correctement dévié vers la deuxième dimension. Les composés sont ainsi déviés et analysés sur la deuxième dimension puis envoyés au détecteur où les temps de récolte des différentes fractions sont aussi notés et dont les temps approximatifs apparaissent dans le tableau 3-5.

Tableau 3-4 : Temps de collecte des stéroïdes dans les différentes fractions purifiées par CLHP-2D

	# de fraction	Stéroïde(s) récolté(s)	Temps de chargement approximatif (min)
1^{er} mix non collecté	F1	T	22 - 24
	F2	DHEA, ET, 5 β -Adiol, 19-NE	24 - 28
	F3	19-NA	29 - 30
2^{ème} mix non collecté	F1	E-A	31 - 34
	F2	Pd	35 - 37
	F3	16En	41 - 42
	F4	T	52 - 54
	F5	DHEA	57 - 58
	F6	ET	59 - 60
	F7	5 β -Adiol	60 - 62
	F8	19-NE	62 - 63
	F9	19-NA	64 - 66

Neuf portions sont mises en évidence lors de l'injection du 2^e mix, soit E-A (Étiocholanolone et Androstérone), Pd (Pregnanediol), 16-En (16-Androsténol), T (Testostérone),

DHEA (Déhydroépiandrostérone), ET (Épitéstostérone), 5 β -Adiol (5 β -Androstanediol), 19-NA et 19-NE (tableau 3-3). Ces portions sont recueillies en deux temps selon les deux dimensions de l'appareil comme énoncé auparavant. Les fractions recueillies dans la première dimension sont : E-A, Pd et 16-En. Les fractions recueillies en deuxième dimension sont : T, DHEA, ET, 5 β -Adiol, 19-NE et 19-NA. Dans le contexte de cette étude, la fraction contenant le CER, soit Pd ou A, et la fraction de la 19-NA sont importantes puisqu'elles serviront à établir le diagnostic en SMRI. La figure 3-1 présente le chromatogramme-UV obtenu lors de la détection des différentes fractions du deuxième mix non collecté. Chaque fraction dont le temps de chargement est relevé est mise en valeur par les crochets ainsi que chaque composé numéroté faisant partie de ces fractions.



b)

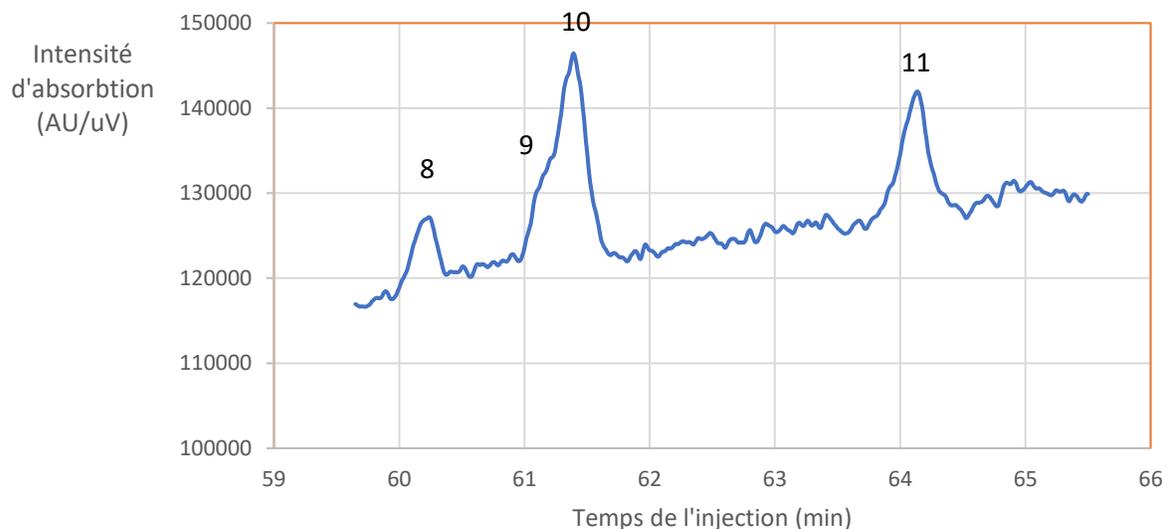


Figure 3-1 : Graphique de l'unité d'absorbance UV en fonction du temps obtenu à 192 nm a) des stéroïdes contenus lors de l'injection du Mix HPLC non collecté, b) de la zone contenant les stéroïdes d'intérêts. Pics 1 : E, 2 : A, 3 : Pd, 4 : 16-énoï, 5 : Testostérone, 6 : DHEA, 7 : ET, 8 : 5 β -Adiol, 9 : 5 α -Adiol, 10 : 19-NE, 11 : 19-NA.

Avec les temps de chargement obtenus lors de la détection du 2^e mix non collecté (tableau 3-3) et insérés dans le collecteur de fraction, le mix collecté est alors injecté et récolté. Ce mix collecté servira à détecter si la méthode de purification CLHP produit un fractionnement isotopique puisque les stéroïdes contenus dans cette solution possèdent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ certifiées. Une déviation de la valeur $\delta^{13}\text{C}$ obtenue lors de l'analyse SMRI pourrait alors signifier un problème lors de la purification, par exemple, si l'entièreté du pic n'a pas été récoltée.

Par la suite, les échantillons peuvent être injectés en utilisant les temps de collecte relevés ci-haut. La quantité d'échantillons injectée est de 20 μL sur l'appareil de CLHP (Agilent 1100). La première dimension est composée d'une colonne ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl, 0,46 cm x 250 mm, 5 μm d'Agilent. Elle est contenue dans un four à température constante de 40 $^{\circ}\text{C}$. La deuxième dimension est composée de deux colonnes en série soit des SunFire C-18, 0,46 cm x 250 mm, 5 μm de Waters. Les conditions des solvants de la première dimension sont présentées dans le tableau 3-6. Les stéroïdes sont analysés à l'aide d'un détecteur UV réglé à 192 nm et 254 nm. Le collecteur de fractions réglé selon les temps de collecte prédéfinis à l'aide des mix HPLC est un Agilent de modèle 1260 Infinity II. Le logiciel d'acquisition de données du CLHP est Chemstation for LC systems Rev.

Tableau 3-5 : Pourcentage d'utilisation et débit des solvants de la première et deuxième dimension selon le temps d'analyse. A : Eau, B : Acétonitrile, C : Méthanol.

	Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Solvant C (%)	Débit (mL/min)
1^{ère} dimension	0	70	30	0	1
	10	50	50	0	1
	15	12	88	0	1
	16,5	6	94	0	1
	16,6	6	94	0	2
	18	0	50	0	2
	23	0	50	0	2
	26,5	70	30	0	2
	30	70	30	0	2
	30,5	70	30	0	1
2^{ème} dimension	0	60,8	34,2	5	1
	1	60,8	34,2	5	2
	8	60,8	34,2	5	2
	8,2	60,8	34,2	5	1
	19,9	46,8	48,2	5	1
	28	40	55	5	1
	30	0	50	50	1
	32	0	50	50	2

3.6.3 Préparation des fractions pour l'analyse CG-C-SMRI

À la sortie du CLHP, il y a donc neuf tubes pour chaque échantillon injecté. Les tubes sont évaporés à sec sous azote, puis certaines fractions sont combinées à l'aide de MeOH afin de réduire le nombre de tubes. Les fractions sont combinées selon des proportions prédéfinies par les résultats obtenus de l'analyse de dépistage qui prend compte la concentration des analytes. Les nouvelles fractions sont énumérées dans le tableau 3-7.

Tableau 3-6 : Fractions combinées pour l'analyse CG-C-SMRI

Fraction	Composé (s) présent (s) dans la fraction
1 : 19-NA	19-NA
2 : 19-NE	19-NE
3 : T	T

4 : O	5 β -Adiol et Pd
5 : E	E-A et 16En
6 : D	DHEA et ET

Une fois les mixtes effectués, une quantité, prédéfinie encore une fois par l'analyse de dépistage préliminaire, est transférée dans un vial de 2 mL avec un embout de verre ainsi qu'avec une quantité proportionnelle de standard externe (5 α -androstanol). Le tout est évaporé à sec sous jet d'azote puis le vial est reconstitué avec une solution de 20 % d'AcOEt/Hexane.

D'autres vials nécessitent aussi d'être préparés et joints à la séquence qui sera injectée sur le CG-C-SMRI. En effet, un blanc doit se trouver en début de séquence ainsi que des Performs A ou B. Ces derniers peuvent se retrouver à différents endroits dans la séquence y compris au début et à la fin. Ils doivent cependant s'alterner (A-B-A, B-A-B) et contenir un maximum de 25 échantillons entre chaque. Ces Performs contiennent tous les stéroïdes selon une concentration de 50 ng/ μ L dont les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont certifiées (Tableau 3-6). La présence de ces solutions de performance possède plusieurs rôles dont : s'assurer que la séparation chromatographique est effectuée correctement et recueillir les temps de rétention de chacun des stéroïdes, vérifier la sensibilité du signal obtenue du spectromètre de masse, s'assurer de la qualité de la combustion et de la précision de la mesure des $\delta^{13}\text{C}$ en fonction de la valeur certifiée des stéroïdes employés. Leur présence permet d'établir une courbe qui sera utilisée pour effectuer une correction isotopique sur les échantillons encadrés par ces Performs et permet de vérifier que les conditions restent constantes. Suite au premier Perform, il est ajouté à la séquence, une série d'alcane dilués selon quatre différentes concentrations. Ce mélange d'alcane permet de vérifier la constance des deltas sur l'intervalle d'intensité utilisé en spectrométrie de masse en s'assurant de la linéarité du signal. Aussi, un contrôle de qualité extérieur, Perform-Brenna, est inséré dans la séquence. Enfin, le dernier ajout à la séquence est le Std-IRMS-NA puisque les mélanges de stéroïdes contenus dans les Performs ne contiennent pas de 19-NA/19-NE. Ce dernier a été préparé en prélevant 15 μ L de la solution mère de 19-NA/19-NE utilisée à l'étape 3.6.2, qui est évaporée puis reconstituée avec 50 μ L d'AcOEt/Hexane.

Tableau 3-7 : Stéroïdes contenus dans les solutions Performs A et B et du standard 19-NA/19-NE ainsi que la valeur certifiée du $\delta^{13}\text{C}$ de chacun

	Substance	Valeur $\delta^{13}\text{C}$ certifiée (‰)
Perform A	3 β -Androstanol	-31,4
	5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol	-29,1
	DHEA	-33,4

	5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	-30,9
	T	-27,7
	Pd	-16,7
	Cholestérol	-25,1
Perform B	5 α -Androst-16-en-3 α -ol	-31,9
	3 β -Androstanol	-31,1
	E	-22,4
	A	-21,2
	ET	-29,6
	Pd	-18,7
Std NA/NE	19-NA	-27,9
	19-NE	-30,4

3.7 Analyse CG-C-SMRI

3.7.1 Méthode

L'appareil CG-C-SMRI dont le modèle du CG est *Agilent Technologies 7890A* couplé à un appareillage pour la combustion et le SMRI est un *Isoprime GC5 Mk1*. Il est initialement soumis aux étapes de préparation afin de s'assurer d'un apport d'oxygène suffisant, d'une combustion efficace et de la stabilité de l'appareil comme présentées par Ouellet et *al.* (2013). Ensuite, les standards et échantillons sont analysés. L'injection utilise des volumes pouvant aller de 0,5 μ L à 3,5 μ L, soit de 10 à 70 % du 5 μ L total de la seringue selon les quantités dictées par la feuille d'analyse. Ces quantités établies avec les concentrations d'analytes mesurées lors de l'analyse de dépistage préliminaire et qui ont aussi servi à combiner les fractions du CLHP. L'injection se fait en mode débit non partagé pulsé durant 1 minute à une pression de 40 psi. La température à l'injecteur est de 270 °C. La colonne chromatographique employée dans le CG est une DB 5MS d'Agilent (25m x 0,20 mm x 0.33 μ m). La température initiale du four contenant la colonne chromatographique est de 80 °C pour une durée de 1 minute. Ensuite, la température est élevée selon un taux de 15°C/min jusqu'à l'atteinte de 250°C, puis selon un taux de 5°C/min pour atteindre 275°C et enfin avec une vitesse de 20°C/min pour atteindre la température finale de 320°C qui est maintenue durant 5 minutes pour une durée totale de 24,6 minutes. Le gaz vecteur utilisé pour la séparation chromatographique est l'hélium selon un débit constant de 1,2 mL/min. Le four à combustion est composé d'une colonne en quartz possédant un diamètre interne de 0,6 mm et remplie de granules d'oxyde de cuivre (CuO). Le CO₂ produit lors de la combustion des

stéroïdes dans le four est séché à l'aide d'une membrane de Nafion pour ensuite être envoyé au SMRI. Le logiciel d'acquisition de données utilisé est IonVantage for Isoprime tandis que le logiciel de traitement de données est Continuous Flow Data Processing.

4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Diagnostique de l'analyse en SMRI pour la population d'échantillons.

Les échantillons possédant une concentration en 19-NA estimée entre 2 ng/mL et 15 ng/mL lors des procédures de dépistage préliminaires ont tous été soumis à l'analyse en SMRI. Autres que la concentration en 19-NA, d'autres facteurs ont dû être pris en compte avant d'effectuer l'analyse, notamment la quantité d'urine disponible. L'analyse en SMRI nécessite une quantité d'urine assez élevée (jusqu'à 25 mL d'urine) qui n'est parfois plus disponible suite aux analyses précédemment effectuées lors de la réception initiale de l'échantillon. Aussi, lorsque la concentration en 19-NA est trop faible, la quantité requise pour une analyse SMRI efficace est trop grande et l'analyse SMRI est alors impossible. Certains échantillons possèdent donc déjà un diagnostic SMRI établie il y a quelques années. Si la quantité d'urine le permet, pour les échantillons datant d'avant 2013, le processus est effectué une seconde fois avec la méthode actuelle dans le cadre de cette étude. Le nouveau diagnostic sert donc de double confirmation. Si la quantité d'urine n'est pas suffisante, on utilise tout de même l'ancien diagnostic puisque les mesures en SMRI sont fiables. La figure 4-1 suivante situe les valeurs du $\delta^{13}\text{C}$ de la 19-NA présente dans les échantillons en fonction du $\delta^{13}\text{C}$ du CER, soit le pregnandiol, présent de façon endogène dans les échantillons.

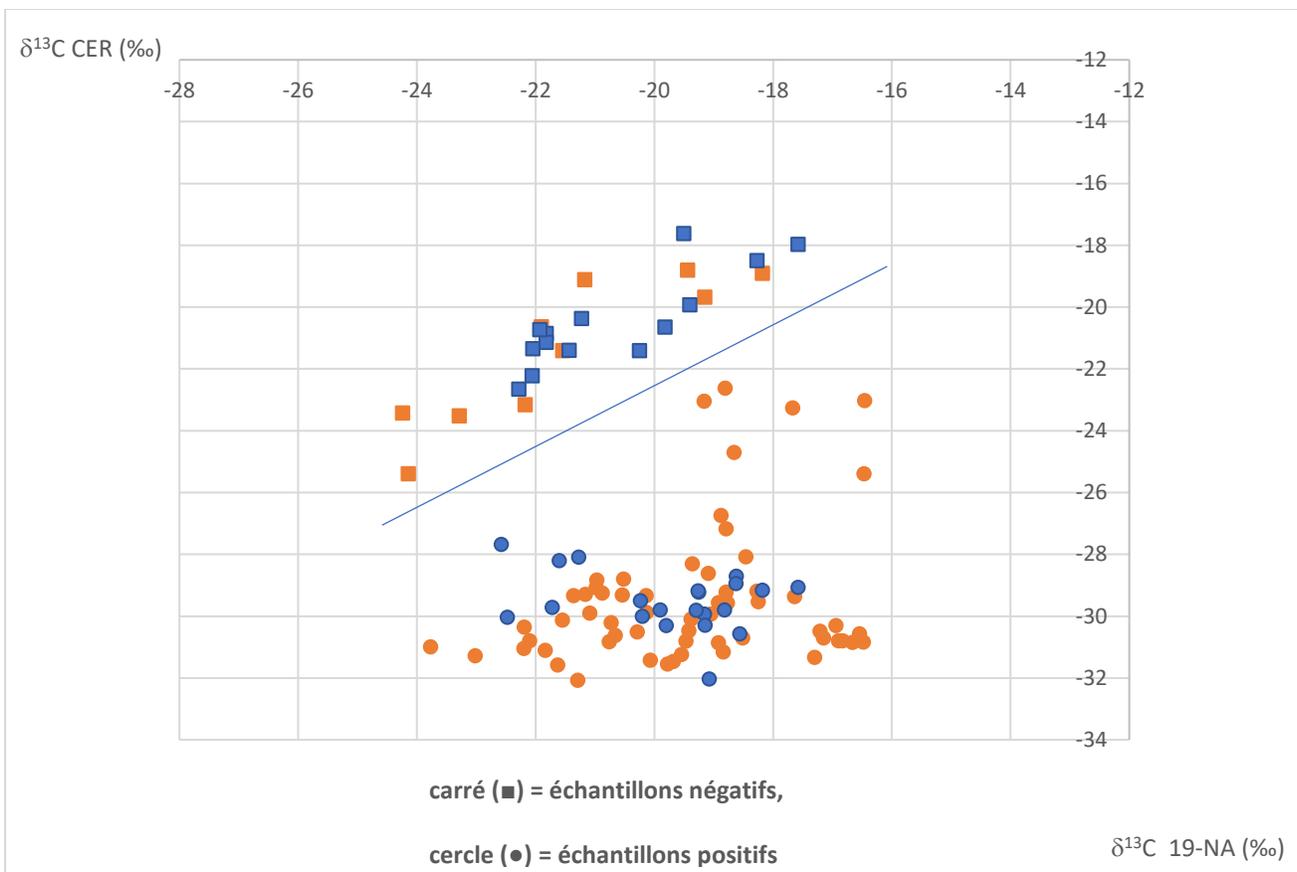


Figure 4-1 : $\delta^{13}\text{C}$ du métabolite 19-NA en fonction du $\delta^{13}\text{C}$ du composé endogène de référence (pregnandiol) des échantillons dont l'analyse SMRI a été reprise (bleu) et les échantillons possédant un diagnostic SMRI ultérieur (orange).

L'analyse SMRI sert à faire la distinction entre les échantillons positifs, ceux pour lesquels la 19-NA est exogène, et les échantillons négatifs, ceux dont la 19-NA est d'origine endogène. Ils sont séparés par le trait oblique bleu ci-dessus. En effet, les échantillons positifs sont ceux dont la signature de la 19-NA est aux alentours de -30‰ . Les échantillons négatifs sont plutôt ceux dont la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ 19-NA est entre -16‰ et -22‰ . Il est possible de remarquer que, pour les échantillons négatifs, la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ 19-NA a tendance à suivre celle du $\delta^{13}\text{C}$ CER tandis que, pour les échantillons positifs, le $\delta^{13}\text{C}$ 19-NA reste autour de -30‰ indépendamment du $\delta^{13}\text{C}$ du CER. Comme mentionné auparavant, le CER est un composé endogène choisit de par sa nature semblable aux composés à l'étude et mesuré dans les procédures analytiques puisque son $\delta^{13}\text{C}$ n'est généralement pas influencé par la prise de SAA. Ainsi, sa signature isotopique est plutôt dictée par le sujet lui-même qui, selon ses habitudes alimentaires, produit des stéroïdes possédant une signature isotopique dérivés des molécules présentes dans son alimentation. Un pregnanediol et une 19-NA d'origine endogène sont issus de processus métaboliques à partir de molécules substrat provenant d'une origine semblable. C'est aussi le cas lors de la déméthylation

microbienne qui se fait sur A endogène pour former la 19-NA avec une signature isotopique semblable au CER de l'individu. Dans le cas des échantillons positifs, la 19-NA est issue du métabolisme de la NT administrée de façon exogène et sa signature isotopique est donc appauvrie telle que les molécules substrats utilisées lors de la synthèse chimique.

Une certaine ambiguïté demeure pour les échantillons se situant entre -22 ‰ et -26 ‰ dans la zone centrale du graphique. En effet, des préparations génériques possédant des signatures isotopiques dites « pseudo-endogènes » ou similaires à celles normalement observées chez les humains dans certains pays ont fait leur apparition ces dernières années, réduisant le potentiel diagnostique de l'IRMS (Brailsford et al, 2018). Les échantillons positifs issus de prise de ces préparations de 19-NT pseudo-exogènes ont donc des signatures isotopiques dans cette même plage et sont différenciables des échantillons négatifs seulement si la différence entre la 19-NA et le CER est plus de 3 ‰ (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2021b). Dans l'ANNEXE V se trouve toutes les valeurs numériques des $\delta^{13}\text{C}$ du CER et de la 19-NA en plus des valeurs du $\Delta \delta^{13}\text{C}$ calculés en fonction des deux premières valeurs. Les concentrations en 19-NA des échantillons sont aussi représentées pour chacun des échantillons.

4.2 Classification de la population d'échantillons

Avec les analyses de dépistage préliminaires où la concentration de la 19-NA avait été estimée et les analyses de confirmations en SMRI effectuées, qu'elles aient été performées précédemment ou dans le cadre de cette étude, cela a permis de classer les échantillons selon différents statuts propres à cette étude, soit négatifs, positifs ou non concluants. La figure 4-2 est une représentation graphique globale de la population d'échantillons composée de 189 échantillons au total.

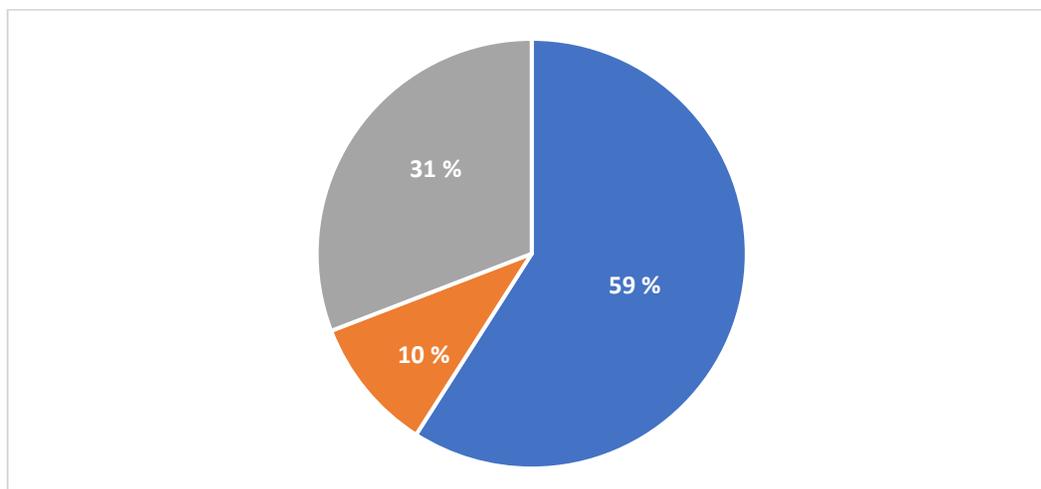


Figure 4-2 : Diagramme à secteur représentant le pourcentage d'échantillons dans chaque classe d'échantillons, soit négatifs (■), positifs (■) et non concluants (■).

De ce diagramme à secteur, on constate que 10 % des échantillons sont négatifs. C'est-à-dire que l'analyse SMRI a témoigné d'une 19-NA endogène. Ces échantillons négatifs comprennent les échantillons décrits comme étant actifs puisque l'analyse en SMRI de la 19-NA et 19-NE donne vraisemblablement une origine endogène étant donné qu'ils sont issus de la déméthylation d'origine microbienne des androgènes, A et E, présents naturellement dans l'urine. L'échantillon d'une donneuse enceinte est aussi compris dans ce groupe.

Ensuite, 59 % des échantillons sont positifs, c'est-à-dire que l'analyse SMRI a révélé une 19-NA exogène ou bien que la concentration en 19-NA mesurée est au-dessus de 15 ng/mL. Et 31 % des échantillons sont classés comme non-concluant. Ces échantillons sont ceux dont l'analyse SMRI n'a pu être effectuée par manque d'urine et/ou dont la concentration en 19-NA est en dessous de 1,5 ng/mL. Il est donc impossible de s'assurer de l'origine endogène ou exogène de la 19-NA.

4.3 Ratio 19-NA/19-NE et ratio normalisé

Le ratio des concentrations de la 19-NA sur la 19-NE a été calculé pour tous les échantillons avec les concentrations de 19-NA et 19-NE mesurées à l'aide de la nouvelle méthode CG-SM/SM. La figure 4-3 montre le ratio obtenu pour les échantillons positifs et négatifs. La barre d'erreur représente l'écart type mesuré associé à chacun des types d'échantillons. L'ANNEXE VI présente les concentrations pour ces métabolites ainsi que le ratio 19-NA/19-NE calculés par le logiciel Chroméléon pour chaque échantillon selon les aires sous la courbe du signal associé de chacun des métabolites.

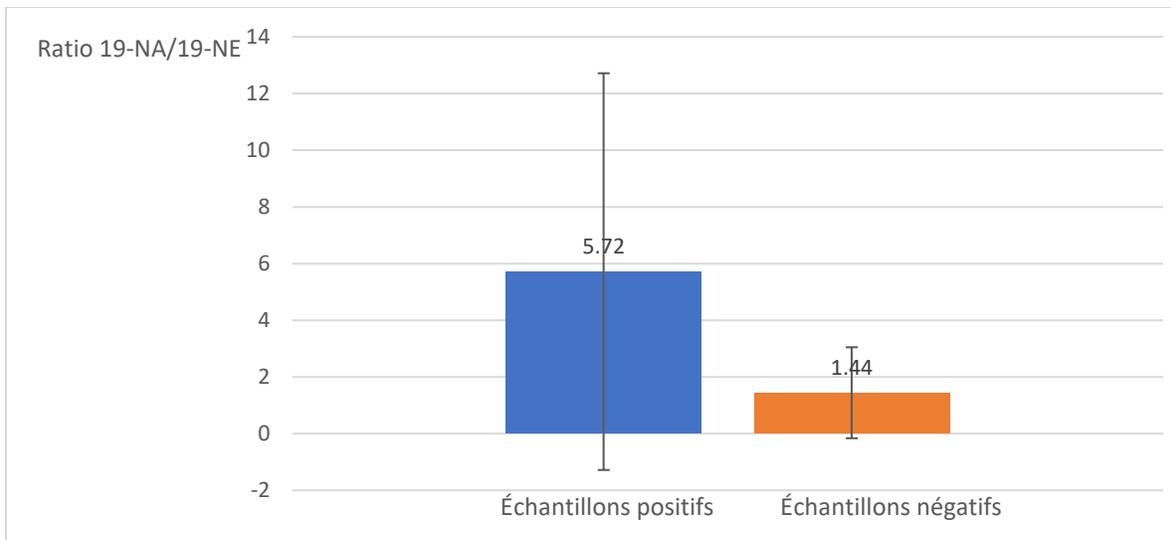


Figure 4-3 : Ratio 19-NA/19-NE pour les échantillons positifs (■) et les échantillons négatifs (■).

Il est possible de remarquer que le ratio moyen des échantillons positifs est environ 3,5 fois plus élevé que le ratio moyen des échantillons négatifs. L'écart type associé aux échantillons positifs témoigne de la grande variabilité du ratio pour ces échantillons. Cette valeur dépassant la valeur de sa moyenne. Quant à l'écart type associé aux échantillons négatifs, celui-ci est moins élevé et ne dépasse pas la valeur de la moyenne. Bien que le ratio des échantillons négatifs semble plus stable, on ne peut pas exclure qu'un faible ratio puisse appartenir à l'un ou l'autre des types d'échantillons. Cependant, un ratio élevé témoignerait vraisemblablement de la présence d'échantillon positif. En ce sens, cela soutient l'utilisation d'un ratio de 3 pour signaler la présence d'un échantillon atypique selon les critères établis dans le TD2021NA par l'AMA (Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA, 2021b).

La figure 4-4 ci-dessous représente la valeur du ratio 19-NA/19-NE en fonction de la concentration en 19-NA mesurée pour tous les échantillons. Cette façon de présenter les résultats pourrait permettre de faire ressortir des tendances entre le ratio observé et la concentration de la 19-NA mesurée. Certaines données extrêmes (très hautes concentrations de 19-NA dans les échantillons positifs) ont été retirées de cette représentation afin d'avoir une meilleure observation de la majorité des échantillons. Selon cette représentation, on remarque bien la variation à laquelle est sujet le ratio 19-NA/19-NE des échantillons positifs représentés par les points bleus. Lesquels sont étendus sur l'ensemble du graphique. Il est donc difficile de faire ressortir de tendance entre le ratio et la concentration. C'est-à-dire qu'une concentration élevée en 19-NA ne veut pas nécessairement signifier un ratio plus élevé, tout comme une faible concentration en 19-NA ne signifie pas un ratio plus faibles. Pour les échantillons négatifs, représentés par les points

orange, la variation plus faible est bien représentée par l'amas de valeurs situées dans le coin inférieur gauche du graphique. La majorité des ratios se trouvent sous un ratio de 3, et ce, peu importe la concentration en 19-NA mesurée, qui est, par définition, généralement plus faible pour les échantillons négatifs. Cependant, des exceptions sont observées témoignant de la prudence avec laquelle doit être interprété ce ratio. Ce ratio serait donc utile pour alerter de la présence d'un échantillon atypique, bien qu'il soit connu que les rapports diminuent avec le temps en fin d'excrétion de norstéroïdes.

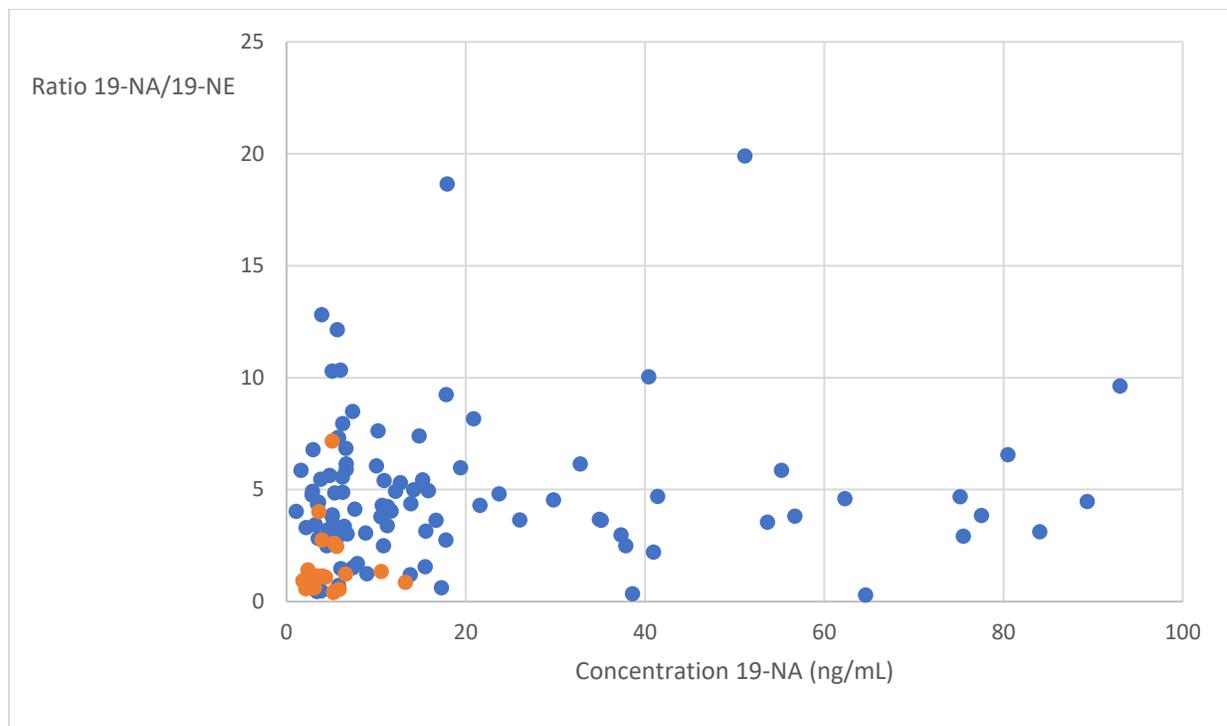


Figure 4-4 : Graphique des ratios 19-NA/19-NE en fonction de la concentration en 19-NA des échantillons positifs (●) et négatifs (●).

Une autre façon de comparer les ratios a été effectuée, mais cette fois-ci en normalisant à la concentration de A et E. Le ratio mesuré est donc $(19\text{-NA}/A) / (19\text{-NE}/E)$ dont les valeurs moyennes sont présentées dans la figure 4-5 ainsi que toutes les valeurs de A et E dans l'Annexe VI. Cette façon de calculer le ratio permet de lier la 19-NA et la 19-NE à son homologue méthylé respectif et de réduire la variabilité de ce ratio dans les échantillons actifs. En effet, la 19-NA et 19-NE dans les échantillons négatifs (actifs) sont directement obtenues de la déméthylation des substrats A et E donc le rapport de concentration de la 19-NA et de la 19-NE dépend entièrement du rapport de concentrations de A et E ainsi que l'affinité des enzymes déméthylantes pour chacun des substrats. Un ratio de 0,64, pour les échantillons négatifs va dans le même sens que la théorie, puisque, comme mentionné dans la revue de littérature, la déméthylation microbienne

de E est favorisée par rapport à A, ce qui est démontré par un ratio plus petit que 1 (Grosse, 2005). Dans les échantillons positifs, le ratio est plus élevé que 1, ce qui est logique puisque le métabolisme de la 19-NT favorise généralement la formation de la 19-NA plutôt que la 19-NE sauf dans certains cas en fin d'excrétion (Ayotte, 2006).

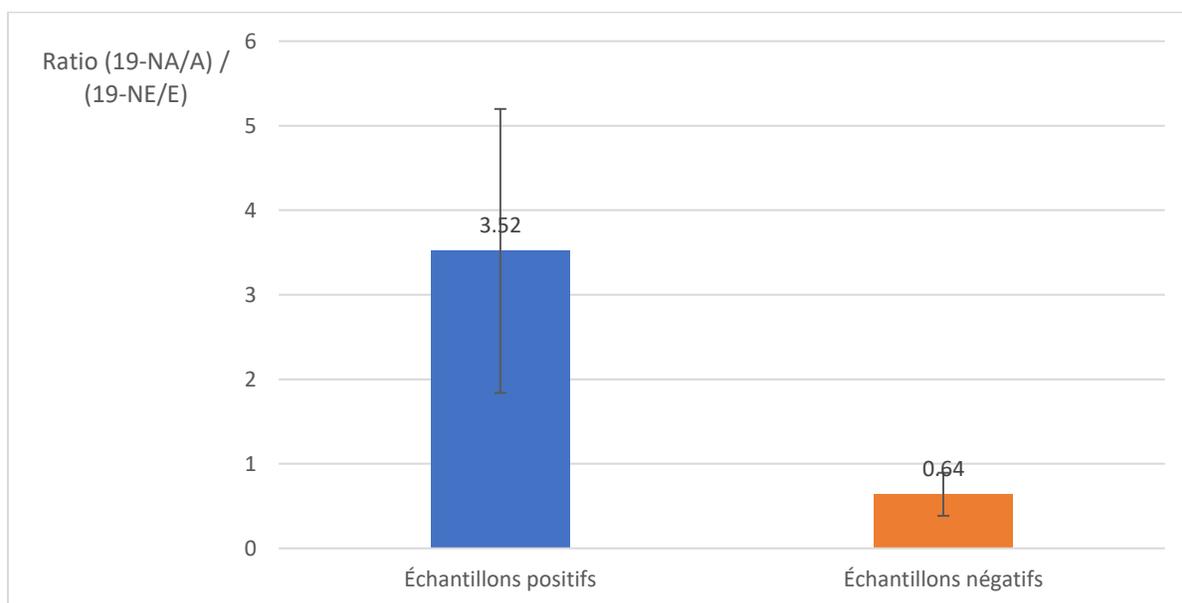


Figure 4-5 : Ratio 19-NA/A / 19-NE/E des échantillons positifs (●) et négatifs (●).

Un ratio calculé de cette façon serait donc utile pour différencier les échantillons positifs des négatifs puisque les valeurs sont significativement différentes et même les écarts types utilisés comme barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

4.4 Dénombrement des métabolites

L'analyse qualitative de la population d'échantillons à l'étude comprend de relever le nombre de métabolites dans les échantillons afin de déterminer s'il s'agit d'un indicateur du statut de l'échantillon. La figure 4-6 suivante est une représentation graphique du nombre de métabolites selon le statut des échantillons, mais aussi, selon la phase traitée, soit la phase glucuroconjuguée ou sulfoconjuguée. La 19-NA glucuronide n'est pas incluse dans le nombre de métabolites observés puisque sa présence est un prérequis pour l'analyse des échantillons dans le contexte de ce projet.

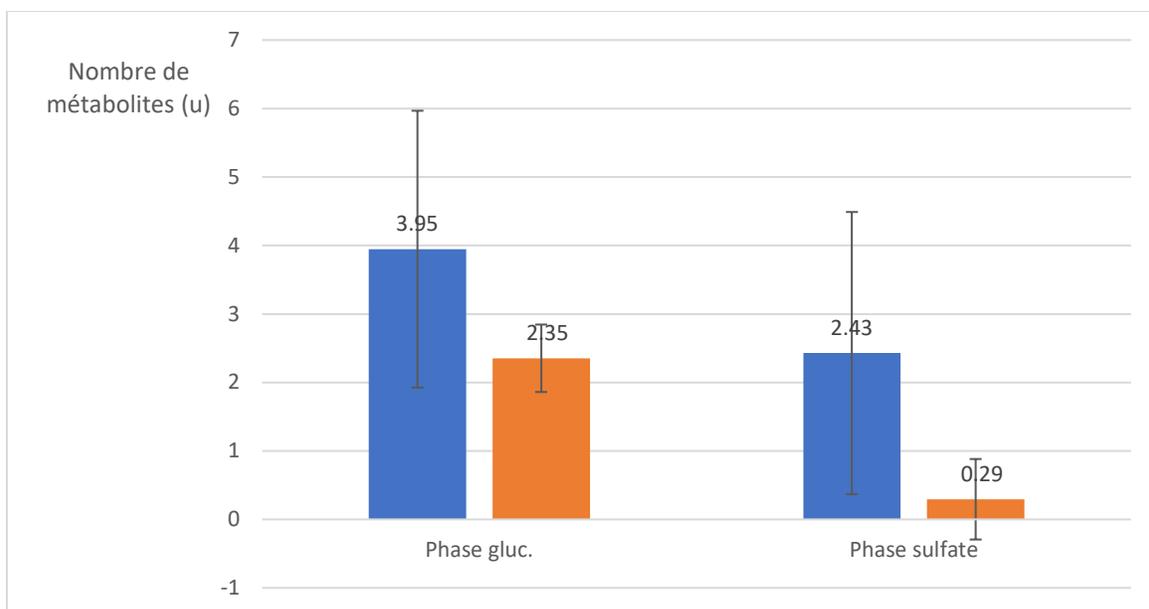


Figure 4-6 : Nombre de métabolites dans les échantillons selon leur statut positif (■) ou négatif (■) et selon la phase analysée

Le nombre de métabolites relevés est plus élevé du côté de la phase glucuroconjuguée. Cela témoigne que la glucuronidation s'agit du processus de phase II privilégié lors de l'excrétion des stéroïdes, qu'ils soient endogènes ou exogènes. Aussi, dans chacune des phases, les échantillons positifs ont le plus grand nombre de métabolites. Cela peut témoigner de la plus grande variabilité du métabolisme des stéroïdes provenant du dopage qui peut être influencé par les différentes formes sous lesquelles un stéroïde peut être consommé, les différentes voies d'absorption ainsi que la quantité ingérée. Chacun des métabolites observés dans les échantillons positifs contribue à élucider les processus métaboliques subis par un stéroïde exogène. Tandis que les molécules détectées dans les échantillons négatifs sont produites par déméthylation microbienne des androgènes directement dans les échantillons récoltés ou selon des routes métaboliques endogènes connues, à partir d'organes sources connus et selon des doses physiologiques souvent minimes comparativement à ce que peut s'injecter un athlète qui se dope.

Du côté de la phase glucuroconjuguée, la variation, représentée par les barres d'erreur, entre les types d'échantillons est plus élevée dans la phase glucuroconjuguée où elle représente environ la moitié du nombre moyen de métabolites tandis que la variation est moins grande pour les échantillons négatifs. Aussi, étant donné que les zones de variations de chacun des types d'échantillons se chevauchent, on peut alors constater que le nombre de métabolites dans cette

phase n'est pas nécessairement un critère discriminant quant à l'établissement d'un diagnostic, surtout pour des échantillons possédant de 2 à 3 métabolites.

Pour ce qui de la phase sulfoconjuguée, les écarts types sont plus élevés par rapport au nombre moyen de métabolites, allant même jusqu'à dépasser ce nombre dans le cas des échantillons négatifs. La variation du nombre de métabolites dans cette phase est plus importante, mais c'est surtout dû au fait que la moyenne et l'écart type sont effectués sur un nombre très petit d'échantillons comparativement aux autres catégories puisque la majorité des échantillons ne possèdent aucun métabolite.

Dans les deux phases, un nombre élevé de métabolites témoigne vraisemblablement d'un échantillon positif. Cependant, à un nombre de métabolites plus bas, le diagnostic ne favorise pas spécifiquement l'une ou l'autre des sources.

4.5 Nombre de métabolites et concentration de la 19-NA

Les résultats présentés précédemment étaient axés plutôt sur une analyse qualitative. En effet, ils étaient basés sur la présence ou l'absence des signaux de transition de fragmentation des métabolites ayant pu être confirmés selon les critères internes du laboratoire en accord avec les directives de l'AMA. Il est aussi important d'intégrer l'aspect quantitatif pour laquelle une série de standards à différentes concentrations des métabolites étudiés a été élaborée et injectée avec chaque lot. L'aspect quantitatif pourrait alors permettre d'obtenir des précisions quant aux tendances que l'on peut observer et permettre d'évaluer leur pertinence. Dans ce but, l'on a dénombré les métabolites observés dans les échantillons en fonction de la concentration 19-NA mesurée puisque c'est souvent celle-ci qui alerte en premier lieu les possibles cas de dopage à la 19-NT.

Dans la figure 4-6 ci-dessous, les échantillons positifs ont été séparés selon trois niveaux de concentration en 19-NA. La première catégorie, possédant la 19-NA de 0 ng/mL à 15 ng/mL, englobe le plus grand nombre d'échantillons, soit 55 % du total d'échantillons positifs avec 61 échantillons. C'est aussi dans cet intervalle que l'établissement d'un diagnostic nécessite des analyses de confirmation en SMRI donc l'intervalle sur lequel se porte particulièrement notre intérêt. La deuxième catégorie, allant de 15 ng/mL à 100 ng/mL, possède 35 % des échantillons

avec 40 échantillons, tandis que la dernière catégorie d'échantillons à concentrations très élevées englobe seulement 10 % des échantillons positifs avec ses 11 échantillons.

Si on regarde le nombre moyen de métabolites de chaque intervalle selon la phase analysée comme présenté dans la figure 4-7. On observe une fois de plus que la phase glucuroconjuguée possède toujours un nombre de métabolites plus élevé. De plus, le nombre de métabolites augmente aussi en fonction de la concentration en 19-NA. Cela peut témoigner que la quantité de stéroïdes injectée et le moment où le test de dépistage est effectué (début vs fin de cycle d'excrétion) sont importants pour relever un nombre plus élevé de métabolite. Malheureusement, dans les tests de dépistage, il s'agit de facteurs propres à l'athlète qui sont inconnus et impossibles à contrôler par les autorités antidopage. Aussi, même s'il est possible de détecter plus de métabolites à haute concentration, cela n'est pas nécessairement pertinent dans la sélection d'une sonde qui, elle, serait beaucoup plus utile si elle pouvait être détectée à faible concentration de 19-NA, soit dans les cas plus ambigus. De plus, on se rappelle que la 19-NA et la 19-NE sont initialement présentes dans tous les échantillons positifs glucuroconjugués selon des concentrations mesurables. Donc, le nombre moyen de $2,66 \pm 0,79$ métabolites dans la phase glucuroconjuguée et de $1,14 \pm 1,11$ dans la phase sulfoconjuguée, dans l'intervalle 0-15 ng/mL, inclut donc fort probablement ces deux métabolites dont la présence est déjà bien documentée dans cette phase.

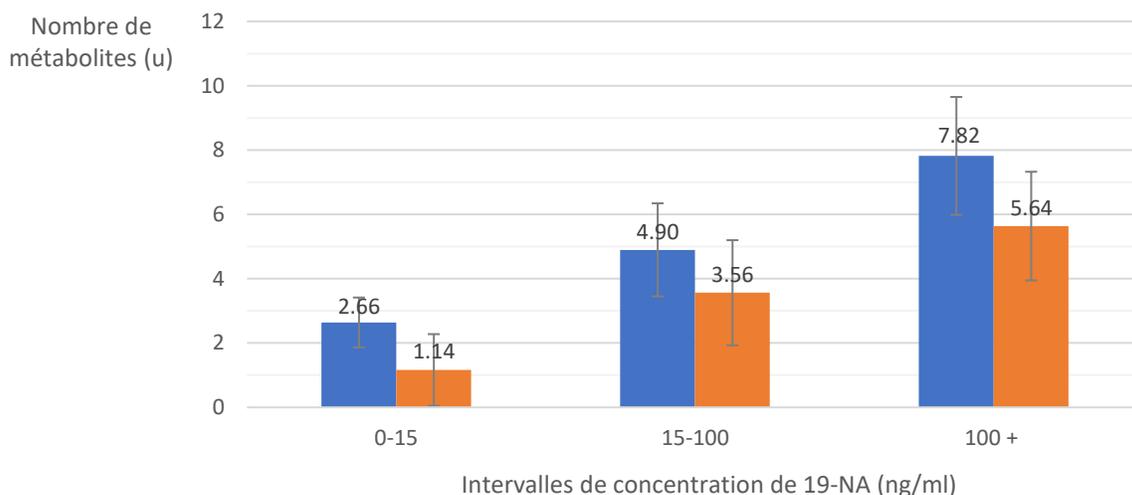


Figure 4-7 : Nombre de métabolites dans la phase glucuroconjuguée (■) et dans la phase sulfoconjuguée (■) dans les échantillons positifs en fonction de la concentration de la 19-NA mesurée dans les échantillons positifs.

Pour ce qui est des échantillons négatifs, présentés dans la figure 4-8 ci-dessous, les intervalles de concentrations en 19-NA sont différents dus au fait que la concentration en 19-NA

des échantillons négatifs est, par définition, moins élevée que pour les échantillons positifs. Ainsi, 16 % des échantillons, soit 3 échantillons, se trouvent dans l'intervalle 0 ng/mL à 2,5 ng/mL, 74 % avec 14 échantillons sont dans le deuxième intervalle de 2,5 ng/mL à 8 ng/mL et 10 % avec seulement 2 échantillons se trouvent dans le dernier intervalle de 8,0 ng/mL et plus. Dans ce dernier intervalle, la concentration la plus élevée est toutefois seulement de 13,3 ng/mL.

Quant au nombre de molécules mesurées dans les différentes phases selon les intervalles, on ne remarque pas une tendance montante comme pour les échantillons positifs. Le nombre de métabolites étant beaucoup moins élevé. En effet, dans la phase sulfoconjuguée, il n'a pas été possible de confirmer la présence de métabolites dans 76 % des échantillons. Ainsi, la moyenne du nombre de métabolites dans les deux premiers intervalles est pratiquement de 0. Du côté de la phase glucuroconjuguée, même en tenant compte de l'écart type du nombre moyen de métabolites dans l'intervalle de concentration le plus élevé, ce nombre dépasse à peine 3 métabolites. Cela n'offre pas une énorme diversité de métabolites pouvant être mesurés en tenant compte que la 19-NA et la 19-NE sont souvent plus communes.

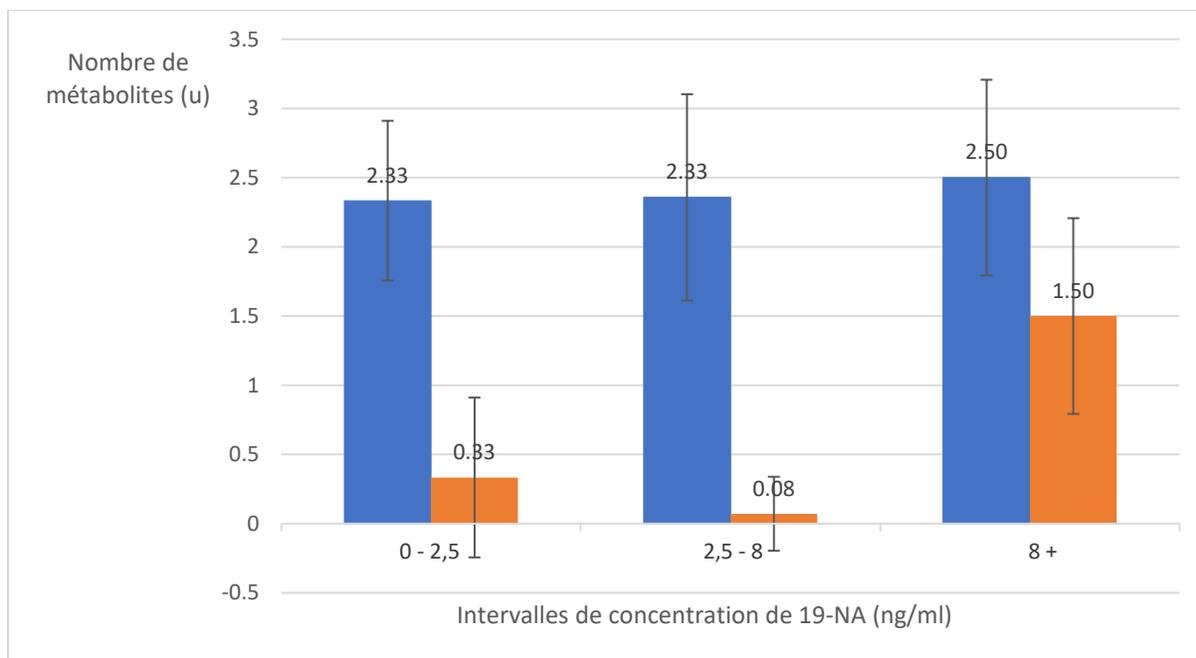


Figure 4-8 : Nombre de métabolites dans la phase glucuroconjuguée (■) et dans la phase sulfoconjuguée (■) des échantillons négatifs en fonction de la concentration de la 19-NA mesurée dans les échantillons positifs.

De plus, si on compare les deux graphiques et que l'on s'attarde à l'intervalle de concentration d'intérêt quant à l'établissement d'un diagnostic pour les échantillons ambigus. On peut en venir à la conclusion que le nombre de métabolites n'est pas un critère pertinent. Effectivement, dans les échantillons positifs (figure 4-7), le nombre de métabolites dans la phase

glucuroconjuguée est de $2,66 \pm 0,79$ métabolites tandis que, pour les échantillons négatifs (figure 4-8), le nombre de métabolites peut aller jusqu'à $2,5 \pm 0,71$ métabolites. Dans la phase sulfoconjuguée, le nombre de métabolites pour les positifs est de $1,16 \pm 1,11$ et peut aller jusqu'à $1,5 \pm 0,71$ chez les négatifs. Dans les deux cas, les nombres de métabolites sont très rapprochés. Il serait donc impossible de se fier au nombre de métabolites pour discriminer les échantillons.

4.6 Description des métabolites mesurés

4.6.1 Phase glucuroconjuguée

Les métabolites les plus présents de la phase glucuroconjuguée ont été relevés. La figure 4-9 ci-dessous présente ces cinq métabolites majoritaires. L'attention a été portée seulement sur les cinq premiers métabolites puisque, suivant ce nombre, la présence d'autres métabolites est inconstante et quasiment nulle. Aussi, la 19-NA et la 19-NE ne sont pas incluses dans le graphique ci-dessous puisqu'elles ont, à l'origine, servi à cibler les échantillons dans cette étude, ils s'y retrouvent donc systématiquement. Aussi, ils sont assez bien caractérisés et font déjà partie des méthodes analytiques en place. On remarque rapidement sur la figure ci-dessous qu'il y a une différence marquante entre les échantillons positifs et négatifs. En ordre d'apparition, ces cinq métabolites sont donc : 16α -hydroxy-NA, 19-NT, 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol, nordione et la 5α -estran- $3\beta,17\alpha$ -diol.

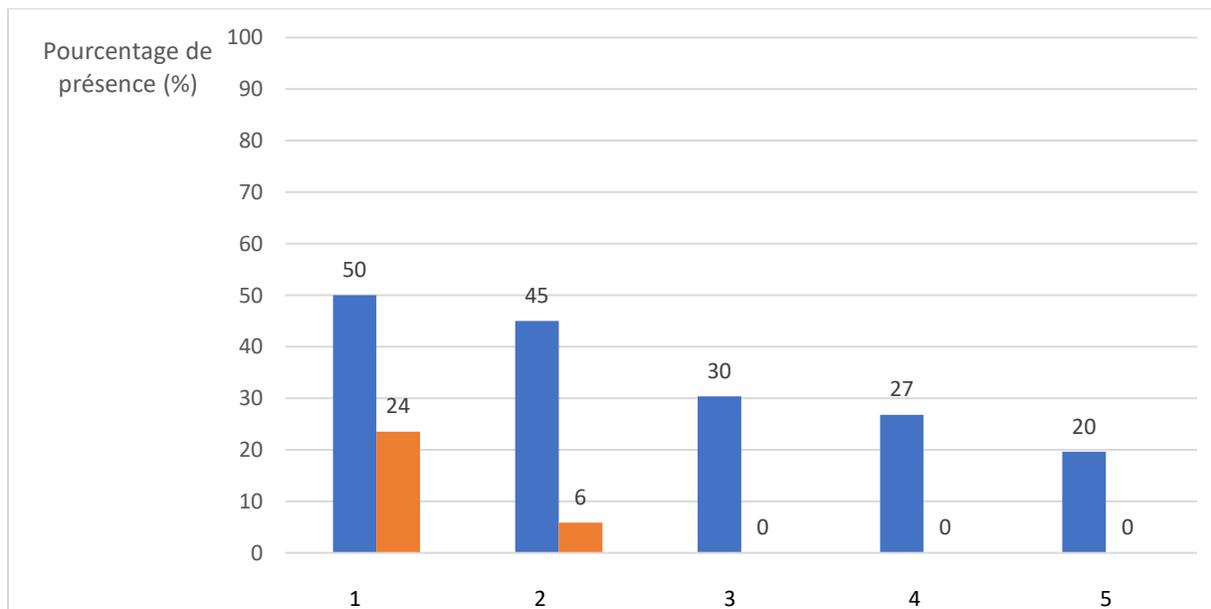


Figure 4-9 : Pourcentage de présence des métabolites les plus présents dans la phase glucuroconjuguée des échantillons positifs (■) et négatifs (■). 1 : 16α -hydroxy-NA, 2 : 19-NT, 3 : 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol, 4 : nordione, 5 : 5α -estran- $3\beta,17\alpha$ -diol

La 5 α -estran-3 α ,16 α -diol-17-one (16 α -hydroxy-NA) (figure 4-10) est retrouvée dans 50 % des échantillons positifs. Sa structure est semblable à celle de la 19-NA avec l'ajout d'un groupement alcool sur le carbone 16. Les réactions d'hydroxylation sont communes dans le métabolisme de phase I afin de créer de composés plus polaires. Il n'est donc pas étonnant de retrouver un tel métabolite hydroxylé. L'hydroxylation en 16 α a été observée chez plusieurs SAA, mais il n'a pas été observé de règle générale quant à l'apparition de l'un ou l'autre des isomères α ou β (Schanzer, 1996). Il a aussi été énoncé que la prise exogène de stéroïdes naturellement présents de façon endogène aurait tendance à saturer les voies métaboliques principales causant ainsi la formation de métabolites minoritaires issus de réactions d'oxydation et d'hydroxylation. La présence de tels métabolites pourrait donc servir de marqueur pour mettre en évidence les cas de dopages (A.T. Cawley *et al.*, 2004, Van Renterghem *et al.*, 2010). La présence de ce métabolite en particulier, la 16 α -hydroxy-NA, lors de l'ingestion de norstéroïdes et du métabolisme qui s'ensuit a été détectée vers la fin des années 1990 (Uralets *et al.*, 1999) et sa structure a été élucidée peu de temps après (Schanzer *et al.*, 2000). La ressemblance avec la structure de la 19-NA et, par conséquent, la position en α de ses groupements peut aussi expliquer pourquoi il est excrété en grande proportion dans la phase glucuroconjuguée.

Pour ce qui est de la part des échantillons négatifs qui seraient issus de la déméthylation des androgènes, donc actifs, la présence de 16 α -hydroxy-NA serait alors dû à la déméthylation de la 16 α -hydroxy-androstérone dont la présence endogène dans l'urine a déjà été établie selon des concentrations moyennes de 92,7 ng/mL chez la femme et 91,6 ng/mL chez l'homme (Van Renterghem *et al.*, 2010). Ce dernier métabolite peut se retrouver dans l'urine suite au métabolisme de la DHEA, hormone stéroïdienne communément présente de façon endogène chez l'humain et précurseurs d'androgènes et d'œstrogènes (Lévesque, 1998). Bien que la déméthylation *in situ* en C10 ait été étudiée seulement pour l'androstérone et l'étiocolanolone, dont les concentrations urinaires sont beaucoup plus élevées que leur homologue 16 α hydroxylé, il se pourrait que le phénomène ne se limite pas qu'à ceux-ci, mais que la concentration de la molécule substrat influence la proportion déméthylée résultante. La conformation du substrat a précédemment été établie comme influençant la déméthylation pour A et E, ce qui pourrait aussi vrai être dans le cas présent, dont le substrat comporte un ajout d'un groupement fonctionnel. Ainsi, la 16 α -hydroxy-androstérone, dont la structure est semblable à l'androstérone, pourrait subir une déméthylation microbienne vers la 16 α -hydroxy-NA expliquant alors sa présence, bien que faible, dans les échantillons négatifs.

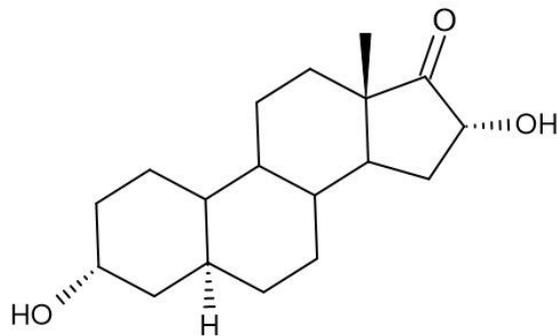


Figure 4-10 : Structure chimique de la 16 α -hydroxy-NA

Le 4-estrèn-3-one-17 β -ol est la 19-NT elle-même (figure 4-11). Sa présence n'est pas surprenante puisqu'il a déjà été mentionné que la molécule mère dans les cas de dopage peut apparaître non métabolisée dans l'urine bien que la majeure partie subisse généralement les réactions du métabolisme (Ozer *et al.*, 1997). Aussi, comme il a été discuté précédemment dans la revue de littérature, la 19-NT peut aussi se retrouver naturellement à des niveaux trace chez l'homme dû à sa présence dans le fluide folliculaire et d'autres tissus riches en aromatasase (Van Eenoo *et al.*, 2001). Toutefois, un aussi faible niveau n'est pas nécessairement dans les limites de confirmation de la présente étude. La 19-NT endogène n'est habituellement pas mesurée dans l'urine, mais plutôt dans le sang. La détection de la 19-NT dans les échantillons négatifs pourrait plutôt être due à la déméthylation par activité microbienne de T présente dans l'urine étant donné la présence endogène de cette dernière à des niveaux pouvant aller jusqu'à 37,4 ng/mL chez l'homme et 12,1 ng/mL chez la femme (Van Renterghem *et al.*, 2010). Ce taux est moins élevé que la 16 α -hydroxy-A, ce qui pourrait possiblement expliquer le pourcentage plus faible de la 19-NT comparativement à la 16 α -hydroxy-NA si la disponibilité du précurseur est le seul critère dictant la déméthylation. Dans la figure 4-9, bien que son apparition dans les échantillons positifs soit moins répandue que pour la 16 α -hydroxy-NA, il pourrait tout de même présenter un certain pouvoir discriminant avec des valeurs de 45 % dans les échantillons positifs et 6 % dans les échantillons négatifs.

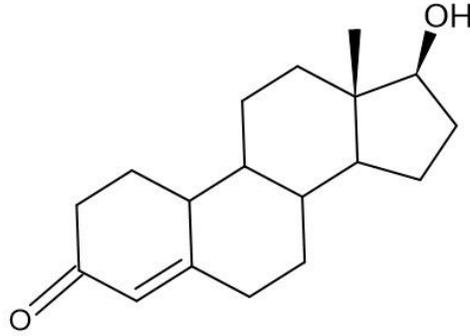


Figure 4-11 : Structure chimique de la 19-NT

Le troisième métabolite est le 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol pour laquelle la structure est présentée dans la figure 4-12 ci-dessous. Comparativement à la 19-NA, elle diffère par l'absence de l'oxydation du groupement β -hydroxyle en 17C pour former une cétone suite à l'action de l'enzyme 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase. Tandis que la réduction en 3C pour former le groupement α -hydroxyle et la réduction de la liaison double 4C-5C sont toutes deux des réactions du métabolisme de la 19-NT pour former la 19-NA. La détection de ces métabolites se fait donc suite à une route métabolique semblable à celle de la 19-NA.

Le 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol est ce qu'on appelle un estranediol par la présence du noyau estrane et des deux groupements alcool en 3C et 17C. La présence des estranediols est fréquemment discutée comme résultant du métabolisme de la 19-NT et de T chez plusieurs espèces animales dont le bétail (Scarath *et al.*, 2009). La réduction de la cétone en 3C et de la liaison double de la 19-NT mène à la formation d'une panoplie d'isomères estranediols chez les animaux. Le mécanisme chez l'humain est différent, la présence des estranediols n'est pas mentionnée pour les cas de dopage à la 19-NT (Dervilly-Pinel *et al.*, 2011). Cependant, la position en α de son groupement 3-hydroxy et de son hydrogène en 5α peuvent expliquer son taux de présence plus élevé dans la phase glucuroconjuguée de la présente étude. Toutefois, bien que son pourcentage d'apparition dans les échantillons positifs ne soit que de 30 %, l'intérêt pour cette molécule vient du fait qu'on ne la retrouve pas dans les échantillons négatifs. Le 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, substrat méthylé en C10, peut être mesuré dans l'urine de façon endogène selon des concentrations moyennes de 50,9 ng/mL pour les hommes et de 20,6 ng/mL pour les femmes (Van Renterghem *et al.*, 2010). Cependant, l'absence du métabolite déméthylé pourrait témoigner que les 5α -Adiol ne sont pas de bons substrats pour la déméthylation microbienne, c'est pourquoi on ne le mesurerait pas dans les échantillons négatifs.

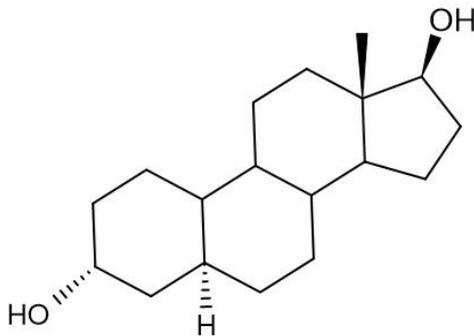


Figure 4-12 : Structure chimique du 5 α -estran-3 α ,17 β -diol

La 4-estrène-3,17-dione (Nordione), représentée sur la figure 4-13, est une prohormone de la 19-NT. Elle peut être obtenue de l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase qui réduit le groupement hydroxyle de la 19-NT, qui est une autre réaction commune du métabolisme de la nandrolone. Toutefois, elle peut aussi être vendue telle quelle en tant que supplément alimentaire. Sa présence dans les échantillons positifs pourrait donc être obtenue suite aux réactions métaboliques de la nandrolone administrée ou au fait qu'il s'agisse de la molécule mère dans certains cas de dopage.

La nordione n'est pas mesurée dans les échantillons négatifs. Des niveaux de trace peuvent être attendus puisque la nordione est aussi un intermédiaire vers les composés œstrogéniques se trouvant naturellement chez l'humain. Elle se retrouve, tout comme la 19-NT dans le liquide folliculaire humain et donc, dans la circulation sanguine. En effet, tout comme la 19-NT est un intermédiaire de la réaction de synthèse de l'œstradiol à partir de la testostérone, la nordione est un intermédiaire de la synthèse de l'œstrone à partir de l'androstènedione. Cette dernière molécule diffère structurellement de la testostérone par la présence d'une cétone en C17 au lieu d'un alcool ; elle peut ainsi être détectée de façon endogène suite à l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase à partir de T (Bricout *et al.*, 2004). La présence d'androstènedione endogène pourrait donc mener ultimement à la formation de nordione à des concentrations urinaires vraisemblablement plus faibles que la limite de détection de notre méthode. La déméthylation microbienne en C10 de l'androstènedione aurait aussi pu être une façon pour laquelle il aurait été mesuré de la nordione dans les négatifs. Cependant, les concentrations urinaires de l'androstènedione sont de 8,19 ng/ml chez les hommes et 8,31 ng/mL chez les femmes (Van Renterghem *et al.*, 2010). Il s'agit donc possiblement de concentrations trop faibles pour mener à la détection du produit déméthylé.

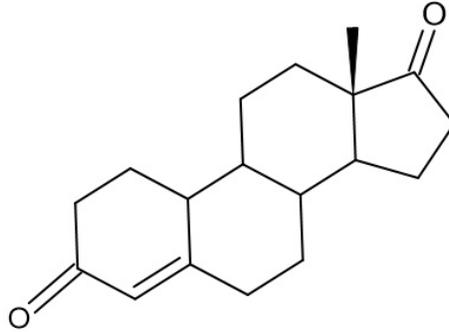


Figure 4-13 : Structure chimique de la nordione

Le 5α -estran- 3β , 17α -diol (figure 4-14), est le métabolite majeur qui a été étudié chez le cheval et les bovins suite à l'ingestion de la nandrolone (Scarth *et al.*, 2009, Yamada *et al.*, 2007). La réduction de la liaison double en C5 et de la cétone en C3 sont des réactions métaboliques typiques du métabolisme de la nandrolone. Toutefois, une particularité du mécanisme serait dans l'inversion du groupement alcool en C17 passant de la conformation β de la 19-NT à la conformation α . Chez les animaux, lors du dopage à la nandrolone, les différentes conformations peuvent être observées pour ce type de métabolites, les estranediols, sont bien connues. Les études pour la détection d'un tel métabolite se sont surtout axées sur les animaux d'élevage (Dervilly-Pinel *et al.*, 2011). Les études en lien avec le cheval ont aussi démontré que ce métabolite était majoritairement conjugué à l'acide glucuronique lors de son excrétion (Roig *et al.*, 2007) probablement dû à la position en α de son hydrogène en C5 et de son groupement alcool en C17. Mais, comme c'est le cas pour le premier estranediol présenté ci-haut, ce qui est intéressant, c'est que ce métabolite ne se retrouve pas dans les échantillons négatifs alors qu'il se retrouve dans 21 % des échantillons positifs. Cette molécule ne possède pas d'analogue méthylé endogène dont les niveaux de concentration ont été établis dans la littérature. Cependant, il est possible de supposer que, tout comme l'estranediol présenté précédemment, il serait peu propice à la déméthylation *in situ*.

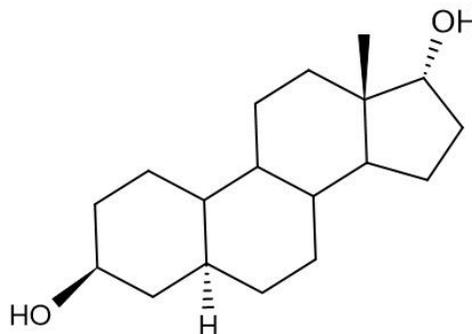


Figure 4-14 : Structure chimique du 5α -estran- 3β , 17α -diol

4.6.2 Phase sulfoconjuguée

Les métabolites les plus présents excrétés dans la phase sulfatée ont aussi été relevés. Dans ce cas, en plus des cinq métabolites les plus fréquents, les données concernant la 19-NA et la 19-NE sulfate ont aussi été relevées puisque les méthodes analytiques concernant le dopage à la 19-NT ne prennent pas en compte la phase sulfatée. Il pourrait donc être intéressant de voir comment ces métabolites se comportent, en plus de déceler si d'autres métabolites pourraient être importants dans cette phase. La figure 4-15 ci-dessous présente donc les 7 métabolites principaux retrouvés dans la phase des métabolites sulfoconjugués : la 19-NA, la 19-NE, la 19-NEA, la 5 α -estran-3 β ,17 β -diol, la 16 α -hydroxy-NA, le 5 α -estran-3 β ,17 α -diol et le 5 α -estran-3 α ,17 β -diol.

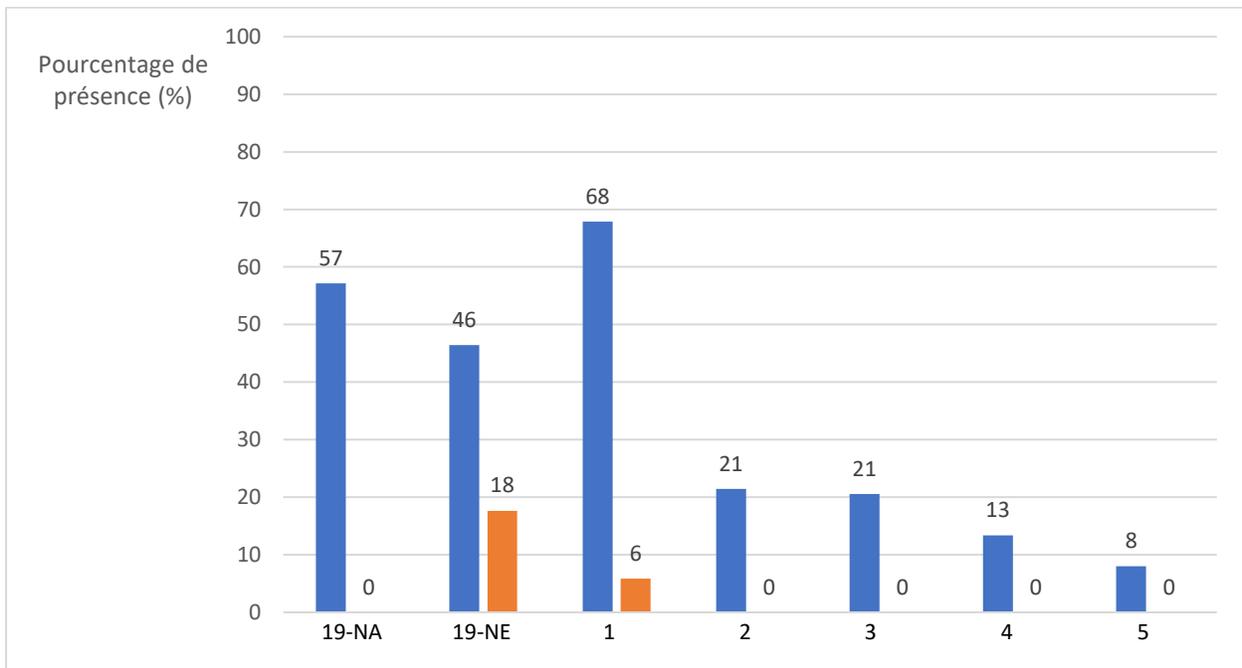


Figure 4-15 : Pourcentage de présence des métabolites les plus présents dans la phase sulfate des échantillons positifs (■) et négatifs (■). 1 : 19-NEA, 2 : 5 α -estran-3 β ,17 β -diol, 3 : 16 α -hydroxy-NA, 4 : 5 α -estran-3 β ,17 α -diol, 5 : 5 α -estran-3 α ,17 β -diol.

La 19-NA présente un ratio d'apparition intéressant qui atteint presque 60 % de présence dans les échantillons positifs versus 0 % dans les échantillons négatifs. Cela ne signifie pas que la 19-NA endogène n'est jamais conjuguée au sulfate, mais plutôt que les quantités sont sous la limite de détection de l'appareil. La plus petite quantité mesurable a été de 0,27 ng/mL (Annexe IV). Quant à la 19-NE, celle-ci est présente selon des proportions moins prononcées, mais tout de même intéressantes, soit environ 46 % versus 18 %. Cela apporte donc un certain intérêt à

analyser la 19-NA et 19-NE, dans la phase sulfatée. L'analyse de la phase sulfatée pourrait donc représenter une alternative plus discriminatoire.

La 5α -estran- 3β -ol-17-one ou 19-NEA (figure 4-16) est la molécule la plus présente dans la phase sulfatée avec un pourcentage de présence de 68 % dans les échantillons positifs. Il s'agit déjà d'un fait établi selon la littérature que cet isomère 3β est excrété exclusivement sous la forme sulfatée lors de l'ingestion de norstéroïdes (Schanzer, 1996). On ne le retrouve effectivement pas assez souvent du côté de la phase glucuroconjuguée pour être présenté dans la sous-section précédente. Du côté des échantillons négatifs, la synthèse de 19-NEA à partir de 19-NT endogène pourrait potentiellement expliquer sa présence dans ces échantillons. Toutefois, il semble plus probable que la présence de 19-NEA vienne plutôt du fait que ces échantillons soient actifs et donc proviennent de la déméthylation microbienne de l'épiandrostérone présente de façon endogène selon des concentrations moyennes de 227 ng/mL chez les femmes et 392 ng/mL chez les hommes dans la fraction sulfate (Esquivel *et al.*, 2018). De plus, son faible taux d'apparition dans les échantillons négatifs, soit seulement 6 %, confère à ce métabolite un certain potentiel d'utilisation en tant que sonde secondaire dans la phase des métabolites sulfoconjuguée.

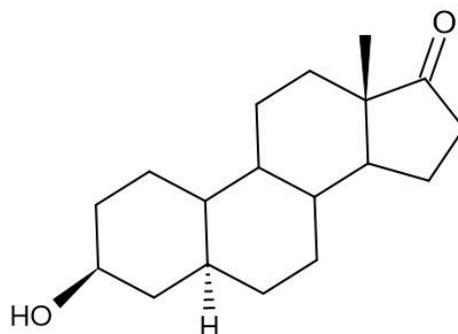


Figure 4-16 : Structure chimique de la 19-NEA

La 2^e molécule la plus présente dans les échantillons positifs est le 5α -estran- 3β , 17β -diol (figure 4-17). Son taux d'apparition est toutefois moins important que la 19-NEA, avec un pourcentage d'environ 21 %, soit le tiers de la 19-NEA. Cette molécule est un isomère du composé majeur excrété chez le cheval, le 5α -estran- 3β , 17α -diol, mentionné précédemment dans la phase glucuroconjuguée. Le fait que le groupement hydroxyle en C17 est en position β peut expliquer que ce métabolite est majoritairement excrété sous sa forme sulfatée, contrairement à l'isomère 17α , ce qui a aussi relevé dans la littérature (Teale *et al.*, 1991). Tout comme les autres estranediols mentionnés précédemment, sa présence n'a pu être décelée dans les échantillons négatifs. La présence du 5α -androstane- 3β , 17β -diol, bien que détectée comme étant endogène

à faible niveau dans l'urine sous la forme sulfatée (Esquivel *et al.*, 2018), n'a pas mené à la formation par déméthylation microbienne du métabolite à l'étude possiblement encore due à sa faible quantité dans l'urine ou encore, cela pourrait témoigner que les 5 α / β -Adiols ne sont pas un bon substrat pour la déméthylation en C10 ou que la proportion qui subit cette déméthylation est sous la limite de détection.

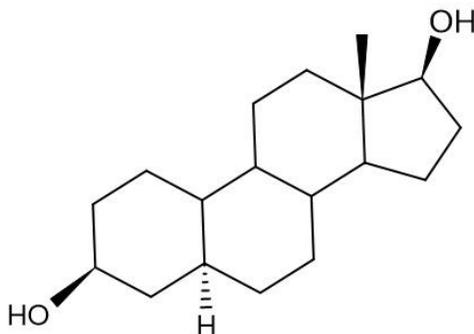


Figure 4-17 : Structure chimique du 5 α -estran-3 β ,17 β -diol

La 3^e molécule est la 16 α -hydroxy-NA (figure 4-10) qui a été mesuré précédemment dans la phase glucuroconjugée. Elle est toutefois mesurée deux fois plus souvent dans la phase glucuroconjugée que dans la phase sulfoconjugée, soit dans seulement 21 % des échantillons positifs. Il peut être logique de la retrouver plus dans l'autre phase puisque la conjugaison à l'acide glucuronique est habituellement favorisée sur les molécules ayant l'hydrogène en position α , comme la 19-NA, bien que la conjugaison au sulfate ne soit pas totalement exclue. Elle n'a pas été mesurée dans les échantillons négatifs, ce qui apporte aussi un intérêt à la surveillance de ce métabolite. La déméthylation microbienne du 16 α -hydroxy-A serait en effet possible bien que faible puisque, tel que démontré par Trudel (2016), la 16 α -hydroxy-A dans la phase sulfatée est typiquement mesurée selon des concentrations endogènes plus élevées dans l'urine que dans la phase glucuroconjugée (Trudel, M-A, 2016). Un autre facteur entre donc en compte dans la détection et la non-détection de ce métabolite par déméthylation microbienne.

Comme 4^e molécule, on observe le 5 α -estran-3 β ,17 α -diol (figure 4-14), métabolite majeur chez le cheval, isomère 17 α précédemment aussi observé dans la phase glucuroconjugée. Pour ce métabolite, les pourcentages de présence dans les échantillons positifs dans l'une ou l'autre des phases se rapprochent, soit 21 % dans la phase glucuroconjugée comparativement à 13 % dans la phase sulfatée. Les conformations α et β des deux groupements alcool pouvant mener à la conjugaison sous les deux formes. Toutefois, dans les deux cas, le métabolite n'a pas été observé dans les échantillons négatifs consolidant alors l'hypothèse que ce métabolite n'est pas obtenu selon des concentrations mesurables dans les voies métaboliques endogènes et/ou que

les 5 α / β -Adiols, en plus de se retrouver en faible quantité dans l'urine, ne seraient pas de bons substrats pour la déméthylation microbienne dans les échantillons actifs.

Enfin, le 5 α -estran-3 α ,17 β -diol (figure 4-12), retrouvée en 3^e position dans la phase glucuroconjuguée avec un pourcentage de 31 %, se retrouve ici dans 8 % des échantillons positifs sulfoconjugués. Une fois de plus, il pourrait être possible d'expliquer cette différence par la position α de son groupement 3-hydroxy qui tend à favoriser l'excrétion liée à l'acide glucuronique, bien que n'incapacite pas la liaison au sulfate. Cet estranediol, comme tous les autres estranediols mentionnés, n'est pas mesuré dans les échantillons négatifs.

Bien entendu, la limite d'identification des molécules de la méthode a influencé la capacité à confirmer la présence des métabolites. Certaines molécules sont plus facilement détectables à faible concentration que d'autres. À l'Annexe IV, se trouvent les concentrations minimales identifiées pour chacun des métabolites. Comme le but de l'étude est de différencier les échantillons actifs des positifs à faible concentration, la sensibilité et la sélectivité de la présente méthode gagneraient à être améliorées. En effet, une évaluation plus précise de la limite d'identification à l'aide de blancs urinaires et de concentrations ascendantes des métabolites cibles serait pertinente. Cela pourrait changer la donne pour quelques molécules qui étaient difficiles à identifier, mais dont de faibles signaux étaient tout de même détectables.

Dans la phase glucuroconjuguée, c'est notamment le cas pour la 19-NT et la nordione pour lesquels de faibles signaux étaient détectés dans la majorité des échantillons qu'ils soient positifs ou négatifs. Des tendances plus représentatives de la réalité pourraient être tirées avec une meilleure détection. À plus petite ampleur, le 5 α -estran-3 α ,17 β -diol démontrait aussi souvent de faibles signaux qui ne pouvaient être confirmés. L'amélioration de la méthode analytique pourrait solidifier l'importance de cette molécule qui, selon les résultats préliminaires, ne se retrouve généralement pas dans les échantillons négatifs. Dans la phase sulfate, c'est surtout la 19-NA et la 19-NT qui étaient plus difficiles à confirmer dû aux signaux faibles.

4.6.3 Urine de femme enceinte

Comme mentionné dans la section 3.3.2, une urine témoin de femme enceinte a été intégrée dans tous les lots d'analyse. Le nombre moyen de métabolites glucuroconjugués détectés dans cette urine est de $3,67 \pm 0,50$. Dans la plupart des lots, la présence de 4 métabolites pouvait être confirmée, ce qui est plus élevé que la moyenne du nombre de métabolites des échantillons négatifs ($2,35 \pm 0,49$ selon la figure 4-6). Lors de cette étude, seulement un autre échantillon était connu comme provenant d'une donneuse enceinte. Le

nombre de métabolites détectés dans cet échantillon est de 4, en accord avec l'échantillon témoin. Quant à la phase sulfoconjuguée de l'échantillon témoin, il y a seulement un métabolite dont la présence a pu être confirmée dans tous les lots et dans seulement un lot, un deuxième métabolite a pu être confirmé. Tandis que, pour l'échantillon venant d'une donneuse enceinte, aucun métabolite n'a pu être mesuré et confirmé dans la phase sulfoconjuguée. La moyenne du nombre de métabolites dans la phase sulfatée est donc semblable à ce que l'on retrouve pour les autres échantillons négatifs (figure 4-6).

Tableau 4-1 : Concentration moyenne (ng/mL) des métabolites retrouvés dans l'échantillon témoin et le sujet enceinte.

	19-NA (ng/mL)	19-NE (ng/mL)	19-NT (ng/mL)	16α- hydroxy-NA (ng/mL)	Nordione (ng/mL)
Témoin	0,88 \pm 0,17	n. d.	0,29 \pm 0,05	0,99 \pm 0,25	1,06 \pm 0,17
Sujet	2,47	0,37	n. d.	0,75	6,11

Les 4 métabolites majoritairement retrouvés du côté de la phase glucuroconjuguée dans l'échantillon témoin sont la 19-NA, la 19-NT, la 16 α -hydroxy-NA et la nordione. Des signaux ont pu être observés pour la 19-NE, mais pas assez intense pour pouvoir confirmer sa présence. Pour ce qui est de l'échantillon faisant partie de l'étude, les 4 métabolites détectés sont la 19-NA, la 19-NE, la 16 α -hydroxy-NA et la nordione. Des signaux ont pu être observés pour la 19-NT, mais pas assez définis pour pouvoir confirmer sa présence. Dans la phase sulfatée, le métabolite dont la présence a pu être confirmée dans tous les lots est la 19-NEA. En accord avec ce que l'on observe généralement dans cette phase.

La moyenne de la concentration en 19-NA mesurée dans la phase glucuroconjuguée pour l'échantillon témoin est de 0,88 \pm 0,17 ng/mL. La présence de 4 métabolites dans un intervalle de concentration en NA aussi faible n'est pas commune pour les échantillons négatifs pour lesquels la moyenne est de 2,33 \pm 0,58 métabolites (figure 4-8). L'échantillon provenant d'une donneuse enceinte, quant à lui, possède une concentration de 19-NA de 2,47 ng/mL. À cette concentration, le nombre moyen de métabolites dans les échantillons négatifs est plutôt de 2,33 \pm 0,58 métabolites. Encore une fois, un nombre de métabolites de 4 est donc plus élevé que ce qui est généralement observé. Comme il a été mentionné dans la section 2.4.2, la 19-NT ainsi que la nordione sont retrouvées en plus grande quantité chez les femmes enceintes dû à la hausse de production des œstrogènes dont ils sont des intermédiaires de réaction (Reznik et al., 1987). Il y a donc une plus grande production endogène de 19-NT et de nordione qui dépend du moment

dans la grossesse et qui explique aussi la différence entre les deux échantillons. Cela pourrait donc expliquer la présence de ceux-ci ainsi que de ses métabolites, la 19-NA et 19-NE, qui ne sont habituellement pas tous détectables dans des échantillons négatifs. Contrairement aux autres échantillons négatifs où les molécules détectées découlent de la déméthylation microbienne, les molécules détectées chez les sujets enceintes sont plutôt tirées de la production endogène. L'origine des molécules – soit la déméthylation ou la production endogène -explique les différences prononcées entre ces deux catégories d'échantillons.

Aussi, bien que la présence de 19-NE n'a pas pu être confirmée malgré la présence de faibles signaux, il serait possible d'estimer que le ratio 19-NA/19-NE est assez élevé. Cela serait contraire à ce qu'on voit habituellement pour les échantillons négatifs provenant de déméthylation microbienne (1,44 selon la figure 4-3) et ressemblerait plutôt à ce que l'on retrouve pour les échantillons positifs (5,72 selon la figure 4-3). Cela pourrait s'expliquer par la hausse de production des norstéroïdes qui découle de l'augmentation de la production d'oestrogènes lors de la grossesse. Lors du métabolisme de la 19-NT, la formation de 19-NA est généralement plus importante que celle de la 19-NE, ce qui pourrait donc aussi transparaître sur le ratio dans le cas des femmes enceintes.

4.7 Présence des métabolites et concentration de la 19-NA

Le nombre de métabolites ne semble pas être un critère discriminatoire pour pouvoir différencier le type d'échantillons. Ainsi, il a été effectué une analyse plus spécifique des métabolites les plus souvent dénombrés présentés dans la section 4.5. Il a été déterminé le pourcentage associé à la présence de chacun de ces métabolites dans un échantillon positif où la 19-NA se trouve dans la zone ambiguë de 0-15 ng/mL afin de vérifier si leur présence est vraiment discriminante lorsqu'associée avec la 19-NA.

Tableau 4-2 : Pourcentage des échantillons positifs pour lesquels les métabolites ont été détectés dans un échantillon où la 19-NA a été mesurée dans l'intervalle d'ambiguïté (0-15 ng/mL) dans la phase glucuroconjuguée

Phase glucuroconjuguée	
Métabolites	Pourcentage des échantillons (%)
16 α -hydroxy-NA	18
19-NT	29
5 α -estran-3 α ,17 β -diol	15
Nordione	37
5 α -estran-3 β ,17 α -diol	0
Phase sulfoconjuguée	
19-NA	30
19-NE	27
19-NEA	35
5 α -estran-3 β ,17 β -diol	0
16 α -hydroxy-NA	48
5 α -estran-3 β ,17 α -diol	0
5 α -estran-3 α ,17 β -diol	0

Dans la phase glucuroconjuguée, la 16 α -hydroxy-NA est le métabolite le plus souvent détecté (50 % des échantillons selon la figure 4-9). Toutefois, seulement 18 % de sa présence est associé à un échantillon où la 19-NA est faible. La 19-NT, 2^e métabolite le plus mesuré selon un pourcentage de 45 % (figure 4-9), présente un pourcentage un peu plus intéressant alors que 29 % de son nombre de présences est associé à des échantillons nécessitant des procédures de confirmation. Quant au 5 α -estran-3 α ,17 β -diol, elle a seulement un pourcentage de 15 % dans le tableau ci-dessus. En revanche, on se rappelle qu'elle n'apparaissait pas du tout dans les échantillons négatifs alors qu'elle est présente dans 30,4 % des échantillons positifs (figure 4-9). C'est la nordione qui possède le plus haut pourcentage de présence dans les échantillons positifs ayant la 19-NA dans l'intervalle de concentrations de 0 à 15 ng/mL. Ce pourcentage est de 37 % et elle n'est pas présente dans les échantillons négatifs. Enfin, bien que sa présence semble intéressante dû au fait qu'elle n'a pas été détectée dans les échantillons négatifs, la présence du 5 α -estran-3 β ,17 α -diol n'est pas du tout associé à des échantillons positifs où la 19-NA est faible.

Dans la phase sulfoconjuguée, la 19-NA présente un pourcentage de 30 % de présence dans des échantillons positifs où la 19-NA du côté de la phase glucuroconjuguée se situe dans l'intervalle de concentration de 0-15 ng/mL. Combiné au fait que sa présence ne pouvait pas être confirmée dans les échantillons négatifs, cela confère un bon pouvoir discriminatoire à la 19-NA. Quant à la 19-NE, son pourcentage de 27 % est intéressant. Cependant, il est moins discriminant

que la 19-NA étant donné qu'il y avait une faible proportion de 19-NE pouvant être mesurée dans les échantillons négatifs (17,6 % des échantillons selon la figure 4-15). La 19-NEA présente un pourcentage de 35 %. Dû à sa faible présence dans les échantillons négatifs (5,9 %), mais à sa grande proportion d'apparitions dans les échantillons positifs (métabolite majoritaire à 68 % selon la figure 4-15), cette molécule pourrait présenter un certain intérêt quant à son utilisation à titre de sonde secondaire. Quant aux trois estranediols retrouvés dans la phase sulfoconjuguée, soit 5 α -estran-3 β ,17 β -diol, 5 α -estran-3 β ,17 α -diol, 5 α -estran-3 α ,17 β -diol, aucun d'entre eux n'a été mesuré dans un échantillon où la 19-NA est dans la zone ambiguë. L'intérêt pour ce type de molécule est donc amoindri. Enfin, la 16 α -hydroxy-NA possède la plus haute proportion du nombre d'échantillons dans lesquels sa présence est confirmée dans des échantillons dont la 19-NA dans la phase glucuroconjuguée est dans l'intervalle de concentration de 0 à 15 ng/mL. Ce pourcentage est de 48 %. Il s'agit donc presque la moitié de son nombre d'apparitions qui est associé à de tels échantillons. De plus, sa proportion de présence dans les échantillons négatifs est nulle. Du côté de la phase glucuroconjuguée, bien qu'elle soit la molécule la plus souvent retrouvée (50 % selon la figure 4-9), son pourcentage associé à des échantillons ambigus est seulement de 15 %. Il semble que, bien que cette molécule soit mesurée dans un moins grand nombre d'échantillons de la phase sulfoconjuguée (21 % des échantillons selon la figure 4-15), elle serait tout de même plus discriminante lorsque retrouvée dans cette phase.

L'équivalence de ces données avec les échantillons négatifs n'a pas été effectuée puisque, comme présenté à la section 4.6, tous les échantillons négatifs sont dans l'intervalle 0-15 ng/mL de 19-NA. La présence des métabolites est donc certainement associée à une faible concentration en 19-NA, ce qui aurait biaisé la comparaison puisqu'il s'agit d'un haut pourcentage d'un nombre très faible d'échantillons.

4.7.1 Ratios de concentration des métabolites

Afin d'aller étudier encore plus en profondeur la détection des métabolites discutés dans les sections précédentes et d'essayer de mettre en relation les concentrations mesurées pour ceux-ci, nous avons calculé selon quelle proportion ces métabolites apparaissent en fonction la concentration de la 19-NA dans la phase glucuroconjuguée. Cette proportion a été calculée en faisant un ratio des concentrations mesurées (mét./19-NA-Gluc x 100). Le tableau 4-3 suivant présente donc les pourcentages des ratios normalisés en fonction de la concentration de la 19-NA mesurée dans tous les échantillons.

Tableau 4-3 : Ratios normalisés en pourcentage de la concentration des métabolites en fonction de la concentration en 19-NA

Métabolites	Phase glucuroconjuguée							
	Échantillons positifs				Échantillons négatifs			
	Ratio min. (%)	Ratio max. (%)	Moyenne (%) [NA] faible [NA] élevée	Nombre d'échantillons (u)	Ratio min. (%)	Ratio max. (%)	Moyenne (%)	Nombre d'échantillons (u)
16 α -hydroxy-NA	0,016	29	6,59 \pm 3,78	10	3,73	14,53	8,28 \pm 4,58	4
			2,17 \pm 3,91	40				
19-NT	0,27	16	7,45 \pm 8,94	15	-	-	6,08	1
			3,47 \pm 4,37	36				
5 α -estran-3 α ,17 β -diol	0,061	45	1,23 \pm 1,00	5	-	-	-	-
			3,29 \pm 10,03	27				
Nordione	0,32	55	19,57 \pm 19,34	10	-	-	-	-
			1,14 \pm 1,97	17				
5 α -estran-3 β ,17 α -diol	0,20	71	-	-	-	-	-	-
			8,00 \pm 19,12	19				
Phase sulfoconjuguée								
19-NEA	1,98	161,83	20,62 \pm 30,79	25	-	-	1,24	1
			19,26 \pm 20,58	43				
5 α -estran-3 β ,17 β -diol	0,044	2,36	-	-	-	-	-	-
			0,72 \pm 0,70	23				
16 α -hydroxy-NA	1,88	173,46	15,70 \pm 15,29	5	-	-	-	-
			34,92 \pm 48,81	9				
5 α -estran-3 β ,17 α -diol	0,071	24,25	-	-	-	-	-	-
			3,70 \pm 6,39	13				
5 α -estran-3 α ,17 β -diol	0,14	2,26	-	-	-	-	-	-
			0,67 \pm 0,59	9				

Il est difficile d'établir des tendances dans les quantités de métabolites en fonction de la 19-NA. Les quantités sont très variables. Une petite concentration d'un métabolite ne signifie pas nécessairement que la 19-NA est aussi présente en petite proportion tout comme une quantité plus élevée de 19-NA ne signifie pas que les métabolites étudiés sont excrétés aussi en plus grande quantité.

Si l'on s'attarde spécifiquement à chacun des métabolites, il est possible de comparer leur comportement dans les différentes situations. En effet, dans les échantillons positifs de la phase glucuroconjuguée, la 16 α -hydroxy-NA, semble être retrouvée selon des proportions plus élevées à faible concentration de 19-NA avec un ratio similaire à celui des échantillons négatifs. Alors que celui à des concentrations plus hautes de 19-NA est légèrement plus faible. Cela pourrait signifier que la production de 19-NA est préférentielle en début d'excrétion, puis au fil du métabolisme, lorsque la production de 19-NA diminue, celle de la 16 α -hydroxy-NA augmente. Ainsi, dans la phase glucuroconjuguée, à faible concentration de 19-NA, il semble impossible de différencier un échantillon positif d'un négatif. La tendance s'inverse dans la phase sulfoconjuguée des échantillons positifs alors que le ratio est plus élevé dans les hautes concentrations de 19-NA. Cela pourrait être dû au fait que du côté des glucuroconjuguées, comme la production de 19-NA est favorisée en début d'excrétion, 16 α -hydroxy-NA aurait tendance à être excrétée initialement surtout en sulfate. Aussi, que ça soit à faible ou haute concentration de 19-NA, la 16 α -hydroxy-NA dans les échantillons positifs est excrété en plus grande proportion du côté des sulfates par rapport à la concentration de 19-NA-gluc. Le métabolisme de norstéroïdes exogènes semble donc favoriser la production de métabolites 16 α sulfocojugués.

Quant à la 19-NT, du côté des positifs dans la phase glucuroconjuguée, les proportions à faible ou haute concentration de 19-NA-gluc sont semblables et assez faibles. Donc, un ratio qui varie peu à haute et faible concentration dans les échantillons positifs pourrait signifier que, peu importe la dose de norstéroïdes, la proportion de ce qui est métabolisé en 19-NA et ce qui reste en 19-NT demeure relativement constante. Aussi, le ratio des positifs versus celui de l'échantillon négatif n'est pas significativement différent. À première vue, il ne serait donc pas possible de différencier les échantillons selon ce ratio. Cependant, plus de données d'échantillons négatifs seraient nécessaires pour bien évaluer cette tendance.

Les résultats sont moins concluants pour les estranediols. Le seul estranediol qui se retrouvent dans des échantillons dont la 19-NA-Gluc est faible, le 5 α -estran-3 α ,17 β -diol dans la phase glucuroconjuguée, ne possède pas un ratio significativement différent de celui à haute concentration de 19-NA vu la grande variation de ce dernier. En général, les proportions sont plus

élevées dans la phase glucuroconjugée que dans la phase sulfoconjugée. On pourrait alors hypothétiser que la formation des estranediols est plus significative dans la voie métabolique menant aux métabolites glucuroconjugées. La conformation en 5α de l'hydrogène, dont sont pourvus tous les estranediols mesurés dans cette étude, pourrait en être la cause puisque, comme on le sait déjà, la 19-NA, qui a aussi une conformation en 5α est majoritairement excrétée dans la phase glucuroconjugée.

La nordione dans la phase glucuroconjugée positive possède 2 ratios assez différents à faible ou haute concentration. En effet, un petit ratio est vraisemblablement associé à une 19-NA élevée alors qu'un plus haut ratio, quoique sujet à plus de variation, semble associé à une concentration en 19-NA faible. Cela pourrait signifier que la nordione serait donc plutôt métabolisé en fin d'excrétion ou à faible dose de 19-NT. Si on compare avec les échantillons de donneuses enceintes, les ratios sont très élevés, soit 120 % et 247 %. Dans ce cas, la nordione provient d'une production endogène et donne un ratio significativement différent de ce que l'on retrouve dans les échantillons positifs. La nordione n'a pas pu être confirmé dans les échantillons actifs, mais il serait intéressant d'analyser le comportement de ce ratio versus celui des donneuses enceintes.

La 19-NEA, seulement retrouvée dans la phase sulfoconjugée, ne possède pas des proportions qui se différencient bien les unes des autres selon les différentes concentrations de 19-NA-gluc et il y a seulement un échantillon négatif où il a pu être mesuré. Il serait donc difficile d'interpréter correctement le ratio bien qu'il semble plus faible dans les échantillons négatifs. Cela pourrait signifier que la déméthylation microbienne produirait la 19-NEA en plus faible proportion que lorsqu'elle est produite par le métabolisme des norstéroïdes.

Bien que le manque de données ne permette pas d'évaluer correctement la situation, le ratio pourrait permettre d'évaluer si le comportement de la déméthylation microbienne est dicté par la quantité du précurseur seulement ou si d'autres facteurs tels que la structure du précurseur jouent aussi un rôle. La 16α -hydroxy-NA possède la proportion la plus élevée ainsi que la quantité endogène du précurseur, 16α -hydroxy-A, la plus élevée aussi. Cependant, le ratio de la 19-NT n'est pas significativement différent avec une concentration endogène de T d'environ la moitié chez les hommes. De plus, la 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol possède une quantité du précurseur plus élevée que la 19-NT et il n'a pas été mesuré dans les échantillons négatifs. La concentration du précurseur ne semble donc pas être le facteur principal qui dicte la présence du produit déméthylé. La présence de groupements fonctionnels pourrait alors aussi être un facteur d'influence. En effet, on remarque que la présence d'au moins un groupement cétone peut

possiblement permette la déméthylation si l'on compare la 16 α -hydroxy-NA et la 19-NT, possédant tout deux une cétone et mesuré dans les échantillons, tandis que le 5 α -estran-3 α ,17 β -diol, dépourvue d'un tel groupement, n'est pas détecté dans les échantillons négatifs. Selon ce critère, il aurait pu être attendu de mesurer aussi la nordione, ce qui n'est pas le cas. Toutefois, la quantité de son précurseur, l'androstènedione, est très faible, ce qui pourrait aussi avoir une influence. Du côté de la phase sulfoconjuguée, bien que la concentration endogène du substrat méthylé est théoriquement assez élevée, soit débutante, près de 0 jusqu'à environ 1000 ng/mL dans une population caucasienne (Esquivel, 2018), le ratio obtenu pour la 19-NEA dans l'échantillon est très faible. En plus du fait qu'aucun autre métabolite n'a pu être mesuré dans les échantillons négatifs. La présence du groupement sulfate pourrait alors être un facteur d'influence sur la déméthylation.

D'autres ratios peuvent être calculés et peuvent guider sur l'interprétation de ces derniers. Dans la phase sulfatée, il a aussi été possible de comparer la proportion de 19-NE excrétée dans les échantillons positifs versus les échantillons négatifs en fonction de la concentration de la 19-NA-gluc. Dans les échantillons positifs à faible concentration de 19-NA-gluc, la valeur est de $31,19 \pm 58,47$ % et à haute concentration, elle est de $8,03 \pm 12,71$ %. Dans les échantillons négatifs, la valeur est de $246,46 \pm 334,20$ %. Tout cela est en accord avec la littérature présentée. D'abord, en début d'excrétion, donc à haute concentration, la formation de 19-NA est favorisée, c'est qui expliquerait la proportion plus faible de 19-NE. Celle-ci augmente au fil du métabolisme, lorsque la concentration en 19-NA-gluc est plus faible (Strahm, 2009). Pour les négatifs, il a aussi déjà été discuté dans la revue de littérature que la déméthylation de E vers la 19-NE est habituellement favorisée. On remarque toutefois que les concentrations normalisées à la 19-NA sont très variables, il serait donc difficile de déterminer dans quelle catégorie un ratio isolé est classé, bien qu'un ratio significativement élevé signifierait un échantillon actif.

5 CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet, de nouveaux métabolites en lien avec le métabolisme de la 19-nortestostérone ont été envisagés afin de faire partie d'une méthode d'analyse en CG-SM/SM. Cette méthode, appliquée à des échantillons urinaires, pourrait permettre de distinguer les échantillons positifs des échantillons négatifs dans le cas où l'analyse CG-C-SMRI s'avèrerait non concluante ou pour guider sur la pertinence d'effectuer une telle procédure. Ces métabolites, au nombre de 15, incluant la 19-NA et la 19-NE, ont été traités autant dans la phase

glucuroconjuguée que sulfoconjuguée. Certains critères ont été variés afin de déceler si le nombre de métabolites détectés dans un échantillon pourrait être un critère de différenciation. Il s'est avéré que le nombre de ces métabolites détectés dans les échantillons n'est jamais un bon indicateur du statut des échantillons. Autant dans le nombre moyen de métabolites totaux que le nombre moyen de métabolites lorsque la 19-NA dans la phase glucuroconjuguée est mesurée dans un intervalle de concentrations de 0 à 15 ng/mL.

En termes de métabolites les plus souvent détectés, du côté de la phase glucuroconjuguée, la 16 α -hydroxy-NA possède une différence d'apparition intéressante entre les échantillons positifs et négatifs. Cependant, dans la phase glucuroconjuguée son taux d'apparition est seulement 18 % dans les échantillons à faible concentration de 19-NA. Son ratio de concentration avec la 19-NA n'est pas non plus significativement différent entre les positifs et les négatifs. Dans la phase des sulfoconjugués, la 16 α -hydroxy-NA présente un pourcentage de presque 50 % dans des échantillons à faible concentration de 19-NA. Donc, bien qu'elle soit détectée moins souvent dans une population d'échantillon sulfate globale, sa présence dans la phase sulfoconjuguée est plus souvent associée à des échantillons faibles en 19-NA-gluc. De plus, elle n'a pas été mesurée dans les échantillons négatifs de la phase sulfate. Ainsi, cette molécule pourrait être mesurée dans cette phase et serait un indicatif du type d'échantillon. Une avenue intéressante pourrait être la détection de la 16 α -hydroxy-NE. Il n'a pas été démontré si ce métabolite peut provenir du métabolisme de norstéroïdes comme l'est la 16 α -hydroxy-NA. Cependant, la 16 α -hydroxy-E, est un composé endogène présent dans l'urine au même titre que la 16 α -hydroxy-A et dans des concentrations semblables. Il pourrait donc être intéressant d'étudier le comportement de ce métabolite.

Les estranediols, 5 α -estran-3 α ,17 β -diol, 5 α -estran-3 β ,17 α -diol et 5 α -estran-3 β ,17 β -diol, sont détectés seulement dans les échantillons positifs autant dans la phase des glucuronides que des sulfates. Et ce, même si des concentrations endogènes de leurs homologues méthylés sont mesurées dans l'urine. La déméthylation microbienne semble donc être moins propice sur des molécules plus polaires sans groupement cétone. Ce fait est intéressant puisque ce type de métabolite n'est jamais monitoré chez les humains, seulement chez les animaux. Toutefois, si l'on fait ressortir spécifiquement le pourcentage d'échantillons pour lesquels les métabolites principaux sont détectés dans un échantillon dont la 19-NA se situe dans l'intervalle de concentration de 0-15 ng/mL, ces estranediols n'y sont pas détectés. Une méthode plus spécifique et sensible à ce type de molécule pourrait permettre de faire ressortir une meilleure tendance dans leur ratio d'apparition.

La 19-NT a été souvent mesurée dans les échantillons positifs de la phase des glucuronides comparativement aux négatifs. Combiné au fait que 29 % de ces apparitions sont dans des échantillons où la 19-NA est dans l'intervalle de 0-15 ng/mL, cela fait de cette molécule, un choix possiblement assez discriminant. Il serait intéressant de mettre de l'effort sur la détection de cette molécule pour mieux l'identifier et la quantifier afin d'étudier plus en profondeur son comportement, surtout dans les échantillons négatifs.

La nordione, dont la présence a été seulement confirmée dans les échantillons positifs de la phase glucuroconjugée. De plus, 37 % étaient détectés dans des échantillons à faible 19-NA, ce qui représente un potentiel discriminant.

Enfin, de par la grandeur de la population analysée dans l'étude, il a été mis à profit la détection de la 19-NA et la 19-NE afin de préciser le caractère ségréatif du ratio 19-NA/19-NE. Cette étude a renforcé l'utilisation d'un ratio de 3/1 afin de mettre en évidence les échantillons atypiques. Mais, il reste qu'un ratio élevé ne peut à lui seul déterminer l'origine de la 19-NA dans les échantillons urinaires due aux fortes variations de ce ratio dans les échantillons positifs et négatifs. L'ajout de A et E dans le calcul de ce ratio s'est toutefois révélé utile pour différencier les types d'échantillons. Le ratio $19\text{-NA/A} / 19\text{-NE/E}$ est beaucoup plus stable est significativement différent d'un type d'échantillon à l'autre. A et E sont mesurés dans les analyses de dépistage, facilitant leur inclusion dans le calcul d'un ratio lorsqu'un échantillon atypique est détecté.

La déméthylation microbienne s'est aussi révélée comme étant un phénomène important qui affecte possiblement une multitude de métabolites présents dans l'urine. Une étude plus poussée du comportement d'un tel phénomène serait pertinente. De prime abord, cette étude pourrait fournir quelques points de départ et hypothèses relatives à ce phénomène. Il a en effet été évalué que le groupement sulfate pourrait influencer la déméthylation comparativement aux glucuronides. Il serait intéressant d'étudier plus de molécules dans la phase sulfatée afin de confirmer ou d'infirmer une telle hypothèse. Une autre hypothèse quant au comportement de la déméthylation serait qu'elle est influencée par la présence ou l'absence des groupements fonctionnels tel que les groupements cétones et alcools. Une molécule constituée seulement de fonction hydroxy serait un moins bon substrat à la déméthylation qu'une molécule possédant au moins un groupement cétone. Dans cette optique, la 11β -hydroxy-Androstérone et la 11β -hydroxy-Étiocholanolone seraient de bons sujets puisqu'ils se retrouvent dans l'urine selon des concentrations assez élevées (Van Renterghem et al, 2010). Il pourrait être attendu, dû à la présence de fonctions hydroxy et cétone, qu'ils se comportent de la même façon que la 16α -

hydroxy-A et forment leur homologue déméthylé. Il pourrait être évalué, dans de futurs projets, s'il est possible de prédire la concentration des norstéroïdes à partir de leurs précurseurs dans l'urine en considérant que l'activité déméthylante microbienne pour un substrat est constante d'un échantillon à l'autre ou si d'autres facteurs l'influencent.

Finalement, ces résultats témoignent de la pertinence de l'analyse de la phase sulfatée lors des tests antidopage, qui avait jusqu'alors, souvent été mise de côté au profit de la phase glucuroconjuguée. L'augmentation de la sensibilité et de la sélectivité de la méthode d'analyse permettrait d'avoir une vue encore plus précise sur le comportement des métabolites choisis et pourrait même mener à la découverte d'autres métabolites importants. Une meilleure compréhension des voies métaboliques et non métaboliques des norstéroïdes est toujours pertinente et d'actualité dans le monde du contrôle du dopage.

6 BIBLIOGRAPHIE

Agence Mondiale Anti-Dopage (À propos. <https://www.wada-ama.org/fr/a-propos> (Consulté le 2020)

Agence mondiale antidopage (2019) Chiffres relatifs aux tests anti-dopage. *Rapport annuel*.

Agilent Technologies (2009) Agilent Triple Quadrupole GC-MS Techniques and Operation. *Course Number 1718A Volume 1, Student Manual*.

Amireault C (2019) Revue des procédés de déconjugaison des stéroïdes urinaires et optimisation d'une méthode de solvolysé des sulfates. Maître ès sciences (Msc) en sciences expérimentales de la santé (Université du Québec, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie).

Ayotte C (2006) Significance of 19-norandrosterone in athletes' urine samples. *British Journal of Sports Medicine* 40 Suppl 1:i25-29.

Ayotte C (2010) Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. *Doping in Sports*, Thieme D & Hemmersbach P (Édit.) Springer, Vol 195. p 77.

Ayotte C, Goudreault D & Charlebois A (1996) Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 687(1):3-25.

Basaria S, Wahlstrom JT & Dobs AS (2001) Clinical review 138: Anabolic-androgenic Steroid Therapy in the Treatment of Chronic Diseases. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(11):5108-5117.

Birch AJ (1950) Hydroaromatic steroid hormones Part 1. 10-nortestosterone. *Journal of the Chemical Society* 92:367-368.

Brailsford AD, Majidin WNM, Wojek N, Cowna DA & Walker C (2018) IRMS delta values ($\delta^{13}C$) of nandrolone and testosterone products available in the UK: Implications for anti-doping. *Drug Test Anal* 10:1722-1727.

Bricout V & Wright F (2004) Update on nandrolone and norsteroids: how endogenous or xenobiotic are these substances? *European Journal of Applied Physiology* 92(1-2):1-12.

Burger HG & Davis SR (2002) The role of androgen therapy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 16(3):383-393.

Burstein S & Lieberman S (1958) Kinetics and Mechanisms of Solvolysis of Steroids Hydrogen Sulfates. *Journal of The American Chemical Society* 80(19):5235-5239.

Cawley AT & Flenker U (2008) The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *Journal of Mass Spectrometry* 43(7):854-864.

Cawley AT, Hine ER, Trout GJ, George AV & Kazlauskas R (2004) Searching for new markers of endogenous steroid administration in athletes: "looking outside the metabolic box". *Forensic Science International* 143(2-3):103-114.

Cawley AT, Trout GJ, Kazlauskas R, Howe CJ & George AV (2009) Carbon isotope ratio ($\delta^{13}C$) values of urinary steroids for doping control in sport. *Steroids* 74(3):379-392.

Courtot D, Guyot JL & Benoit E (1984) Demonstration of urinary excretion of 19-nortestosterone of endogenous origin in the male horse. *Compte Rendus de l'Académie des Sciences - Séries III* 299(6):139-141.

- Couture M (2019) Rapport de validation de la procédure P442 : Solvolysé de stéroïdes sulfoconjugués dans l'urine humaine. *Laboratoire de contrôle du dopage* (non publié).
- de Boer D, de Jong E, van Rossum JM & Maes RAA (1988) The problem of oral contraceptives in dope control of anabolic steroids. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 17(2):127-128.
- de Mondenard J-P (2000) Historique et évolution du dopage. *Annales de Toxicologie Analytique* 12(1):5-18.
- Debruyckere G, Van Peteghem C, De Brabander HF & Debackere M (1990) Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of 19-nortestosterone in the urine of untreated boars-effect of the administration of Leurabolin. *Veterinary Quarterly* 12(4):246-250.
- Dehennin L, Bonnaire Y & Plou P (1999a) Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 721(2):301-307.
- Dehennin L, Bonnaire Y & Plou P (1999b) Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences Applications* 721(2):301-307.
- Deicher R & Horl WH (2005) Hormonal adjuvants for the treatment of renal anaemia. *European Journal of Clinical Investigation* 53(3):75-84.
- Dervilly-Pinel G, Rambaud L, Sitthisack P, Monteau F, Hewitt SA, Kennedy DG & Le Bizec B (2011) 5alpha-Estrane-3beta,17beta-diol and 5beta-estrane-3alpha,17beta-diol: definitive screening biomarkers to sign nandrolone abuse in cattle? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 126(3-5):65-71
- Engel LL, Alexander J & Wheeler M (1958) Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone. *Journal of Biological Chemistry* 231(1):159-164.
- Esquivel A, Alechaga É, Monfort N & Ventura R (2018) Direct quantitation of endogenous steroid sulfates in human urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 10:1734-1743.
- Fallon A, Booth RFG & Bell LD (1987) Instrumentation. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Applications of HPLC in Biochemistry*, Burdon RH & Van Knippenberg PH (Édit.) Elsevier, 1st Ed Vol 17.
- Flenker U, Guntner U & Schanzer W (2008) Delta13C-Values of endogenous urinary steroids. *Steroids* 73(4):408-416.
- Geusens P (1995) Nandrolone Decanoate: Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Osteoporosis. *Clinical Rheumatology* 14 Suppl 3:32-39.
- Gomes RL, Meredith W, Snape CE & Sephton MA (2009) Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49(5):1133-1140.
- Graham MR, Davies B, Grace FM, Kicman A & Baker JS (2008) Anabolic Steroid Use: Patterns of Use and Detection of Doping. *Sports Medicine* 38(6):505-525.
- Gross JH (2006) *Mass spectrometry - A textbook*. Springer Science & Business Media, 2 ed. 518 p

Grosse J, Anielski P, Hemmersbach P, Lund H, Mueller RK, Rautenberg C & Thieme D (2005) Formation of 19-norsteroids by in situ demethylation of endogenous steroids in stored urine samples. *Steroids* 70(8):499-506.

Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA (2015) Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes in *TD2015IDCR* (Agence Mondiale Anti-Dopage).

Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA (2019a) Detection of Synthetic Forms of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids by GC/C/IRMS. *Documents techniques de l'AMA* TD2019IRMS.

Groupe d'experts de laboratoire de l'AMA (2021b) Harmonization of analysis and reporting of 19-norsteroids related to nandrolone. *Documents techniques de l'AMA* TD2021NA.

Guay C, Goudreault D, Schanzer W, Flenker U & Ayotte C (2009) Excretion of norsteroids' phase II metabolites of different origin in human. *Steroids* 74(3):350-358.

Hartgens F & Kuipers H (2004) Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sports Medicine* 34(8):513-554.

Hemmersbach P (2008) History of mass spectrometry at the Olympic Games *Journal of Mass Spectrometry* 43:839-853.

Hemmersbach P & Grobe J (2010) Nandrolone: A multi-faceted doping agent. *Doping in Sports*, Thieme D & Hemmersbach P (Édit.) Springer, Vol 195.

Hemmersbach P, Hagensen Jetne AH & Lund HS (2006) Determination of urinary norandrosterone excretion in females during one menstrual cycle by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 20(8):710-717.

Hoffmann E & Stroobant V (2007) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons Ltd., Third Edition. 502 p

Hoffmann U (2002) Anabolic steroids - a problem in popular sports. *T + K* 69(3):136-142.

Jin Y & Penning TM (2001) Steroid 5 α -reductases and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 15(1):79-94.

Kadi F, Eriksson A, Holmner S & Thornell LE (1999) Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 31(11):1528-1534.

Karasek FW (1988) *Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques*. Elsevier. 201 p

Kasal A, Budesinsky M & Griffiths WJ (2010) Spectroscopic Methods of Steroid Analysis. *Steroid Analysis*, Makin HLJ & Gower DB (Édit.) Springer. p 27-161.

Kicman AT (2008) Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology* 154(3):502-521.

Kioussi MK, Angelis YS, Cawley AT, Koupparis M, Kazlauskas R, Brenna JT & Georgakopoulos CG (2011) External calibration in gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry measurements of endogenous androgenic anabolic steroids in sports doping control. *Journal of Chromatography A* 1218(33):5675-5682.

Kuuranne T (2010) Phase-II Metabolism of Androgens and its Relevance for Doping Control Analysis. *Doping in sports*, Thieme D & Hemmersbach P (Édit.) Springer, Vol 195.

- Lalonde K, Barber A & Ayotte C (2021) Two-dimensional high performance liquid chromatography purification of underivatized urinary testosterone and metabolites for compound-specific stable carbon isotope analysis. *Drug Test Anal* 13:558-570.
- Lalonde K, LeBerre N, Ouellet A, Séguin F & Ayotte C (s.d.) Two-dimensional HPLC purification of urine extracts for Carbon Isotope Ratio determination of 19-norandrosterone origin in urine samples. (Laboratoire de contrôle du dopage, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie).
- Le Bizec B, Bryand F, Gaudin I, Monteau F, Poulain F & Andre F (2002) Endogenous nandrolone metabolites in human urine. Two-year monitoring of male professional soccer players. *Journal of Analytical Toxicology* 26(1):43-47.
- Le Bizec B, Gaudin I, Monteau F, Andre F, Impens S, De Wasch K & De Brabander H (2000) Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites. I. Mass spectrometric detection and quantification of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 14(12):1058-1065.
- Le Bizec B, Monteau F, Gaudin I & Andre F (1999) Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *Journal of Chromatography B* 723(1-2):157-172.
- Lévesque J-F (1998) *L'importance clinique de l'excrétion urinaire des stéroïdes sulfoconjugués lors de contrôles antidopage*. Maître ès sciences (Msc) en sciences expérimentales de la santé (Université du Québec, INRS-Institut Armand Frappier). 136 p
- Ljungqvist A (2017) Brief History of Anti-Doping. *Medicine and Sports Science* 62:1-10.
- Makin HLJ, Honour JW, Shackleton CHL & Griffiths WJ (2010) General Methods for the Extraction, Purification and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. *Steroid Analysis* Makin HLJ & Gower DB (Édit.) Springer, Second Ed. p 1224.
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M & Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicology Letters* 158(3):167-175.
- Meyer HH (2001) Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica* 109(1):1-8.
- Morfin R (2010) Introduction. *Les stéroïdes naturels de A à Z*, Tec & Doc (Édit.) Lavoisier. p 1-11.
- Moss GP (1989) Nomenclature of steroids. *Pure & Applied Chemistry* 61(10):1783-1822.
- Mottram DR & George AJ (2000) Anabolic steroids. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 14(1):55-69.
- Müller RK (2010) History of Doping and Doping Control. *Doping in Sports*, Thieme D & Hemmersbach P (Édit.) Springer, Vol 195.
- O'Leary M (1988) Carbon Isotopes in Photosynthesis. *BioScience* 38(5):328-336.
- Osborne CP & Beerling DJ (2006) Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C4 plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361(1465):173-194.
- Ozer D & Temizer A (1997) The determination of nandrolone and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 22(4):421-425.
- Parssinen M & Seppala T (2002) Steroid Use and Long-Term Health Risks in Former Athletes. *Sports Medicine* 32(2):83-94.

Payne AH & Hales DB (2004) Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews* 25(6):947-970.

Piper T, Emery C & Saugy M (2011) Recent developments in the use of isotope ratio mass spectrometry in sports drug testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401(2):433-447.

Piper T, Mareck U, Geyer H, Flenker U, Thevis M, Platen P & Schanzer W (2008) Determination of ¹³C/¹²C ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 22(14):2161-2175.

Reznik Y, Herrou M, Dehennin L, Lemaire M & Leymarie P (1987) Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy: determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 64(5):1086-1088.

Roig M, Segura J & Ventura R (2007) Quantitation of 17β-nandrolone metabolites in boar and horse urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 586(1-2):184-195.

Sattler FR, Jaque SV, Schroeder ET, Olson C, Dube MP, Martinez C, Briggs W, Horton R & Azen S (1999) Effects of Pharmacological Doses of Nandrolone Decanoate and Progressive Resistance Training in Immunodeficient Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84(4):1268-1276.

Scarth J, Akre C, van Ginkel L, Le Bizec B, De Brabander H, Korth W, Points J, Teale P & Kay J (2009) Presence and metabolism of endogenous androgenic-anabolic steroid hormones in meat-producing animals: a review. *Food Additives and Contaminants* 26(5):640-671.

Schanzer W (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry* 42(7):1001-1020.

Schanzer W, Breidbach A, Geyer H, Kuk CV, Nolteernsting E & Thevis M (2000) Metabolism of Nortestosterone, Norandrostenedione and Norandrostenediol: Identification of 3α-hydroxyestr-4-en-17-one glucuronide and 3α,16α-hydroxy-5α-estran-17-one glucuronide. *Recent advances in doping analysis*, Schanzer W, Geyer H, Gotzmann A & Mareck U (Édit.) Sport und Buch Straub, Köln, Vol 8. p 155-174.

Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL & Störbeck K-H (2019) Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 194(105439).

Schmitt N, Flament MM, Goubault C, Legros P, Grenier-Loustalot MF & Denjean A (2002) Nandrolone excretion is not increased by exhaustive exercise in trained athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 34(9):1436-1439.

Shackleton CH, Phillips A, Chang T & Li Y (1997) Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstane diols. *Steroids* 62(4):379-387.

Short RV (1960) Identification of 19-Norandrostenedione in Follicular Fluid. *Nature* 188:232.

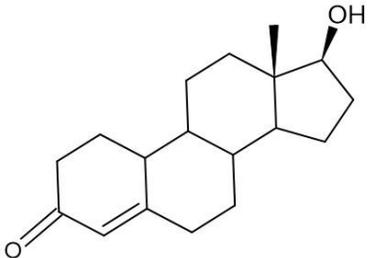
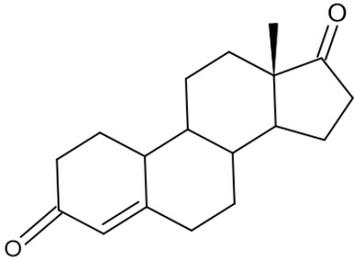
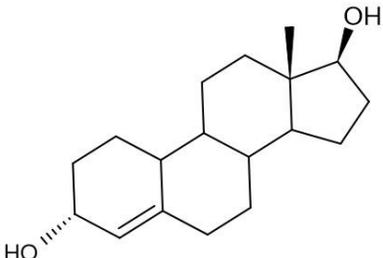
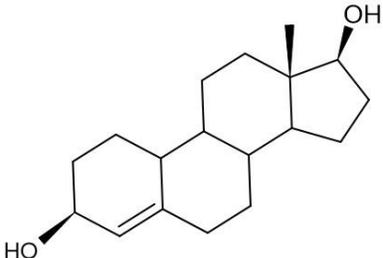
Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR & Bulun SE (1994) Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocrine Reviews* 15(3):342-355.

Skoog D, West D, Holler FJ & Crouch S (2012) *Chimie analytique*. De Boeck, 8e édition. 1066 p

- Smith BN & Epstein S (1971) Two Categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios for Higher Plants. *Plant Physiology* 47(3):380-384.
- Sterk S, Herbold H, Blokland M, van Rossum H, van Ginkel L & Stephany R (1998) Nortestosterone: endogenous in urine of goats, sheep and mares? *The Analyst* 123(12):2633-2636.
- Stojanović E & Radovanović D (2017) Historical Development of Analytical Methods for Anti-Doping Control. *Physical Education and Sport Through the Centuries* 4(1):15-23.
- 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.
- Teale P & Houghton E (1991) The Development of a Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Screening Procedure to Detect the Administration of Anabolic Steroids to the Horse. *Biological Mass Spectrometry* 20(3):109-114.
- Torrado S, Roig M, Farre M, Segura J & Ventura R (2008) Urinary metabolic profile of 19-norsteroids in humans: glucuronide and sulphate conjugates after oral administration of 19-nor-4-androstenediol. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(19):3035-3042.
- Trudel M-A (2016) Étude de l'influence de précurseurs de la testostérone sur l'excrétion et la signature isotopique de ses métabolites de phase II. Maître ès sciences (Msc) en sciences expérimentales de la santé (Université du Québec, INRS- Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie)
- Tseng YL, Sun CY & Kuo FH (2006) Detection and quantification of glucuro- and sulfoconjugated metabolites in human urine following oral administration of xenobiotic 19-norsteroids. *Steroids* 71(9):817-827.
- Ueki M, Takao Y, Okano M, Ikekita A & Sato M (2001) Differentiation of Endogenous and Exogenous Steroids in Urine by Means of Isotope Ratio Mass Spectrometry. In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke (eds) *Recent advances in doping analysis (9)*. Sport und Buch Strau, Köln:145-154.
- Uralets VP & Gillette PA (1999) Over-the-counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 β ,17 β -diol; and 19-nor-4-androsten-3,17-dione: excretion studies in men. *Journal of Analytical Toxicology* 23(5):357-366.
- Van Eenoo P & Delbeke FT (2006) Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control-New steroids and new insights. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 101(4-5):161-178.
- Van Eenoo P, Delbeke FT, de Jong FH & De Backer P (2001) Endogenous origin of norandrosterone in female urine: indirect evidence for the production of 19-norsteroids as by-products in the conversion from androgen to estrogen. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 78(4):351-357.
- Van Renterghem P, Van Eenoo P, Geyer H, Schänzer W & Delbeke FT (2010) Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes *Steroids* 75:154-163.
- Yamada M, Kinoshita K, Kurosawa M, Saito K & Nakazawa H (2007) Analysis of exogenous nandrolone metabolite in horse urine by gas chromatography/combustion/carbon isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45(4):654-658.

Yavari A (2009) Abuse of anabolic androgenic steroids. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 5(3):22-32.

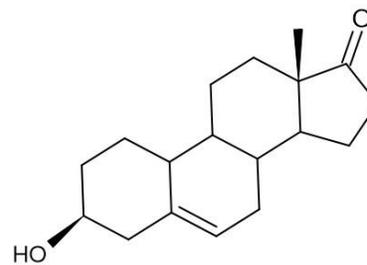
ANNEXE I : NOMS ET STRUCTURES DES MOLÉCULES

Nom trivial	Nom systématique	Abréviation	Structure chimique
Nandrolone 19-nortestostérone	4-estrèn-3-one-17 β -ol	19-NT	
Norandrostènedione	4-estrène-3,17-dione	Nordione	
3 α - dihydronandrolone 3 α ,17 β -dihydroxy-4-estrène	4-estrène-3 α ,17 β -diol	4Een3 α 17 β	
Norandrostènediol Bolandiol	4-estrène-3 β ,17 β -diol	Nordioli	

Nordéhydroépiandrosterone

4-estrèn-3 β -ol-17-one

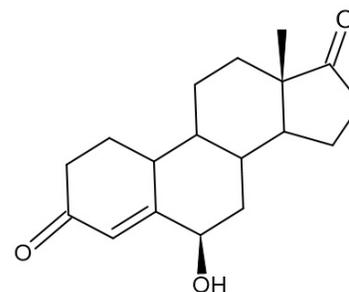
*nor*DHEA



6 β -hydroxy-19-Norandrostènedione

4-estrèn-6 β -ol-3,17-dione

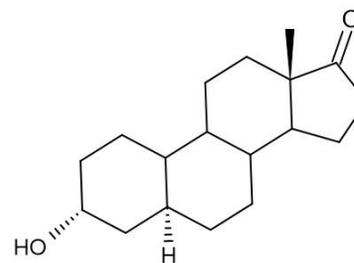
4Een6 β



Norandrostérone

5 α -estran-3 α -ol-17-one

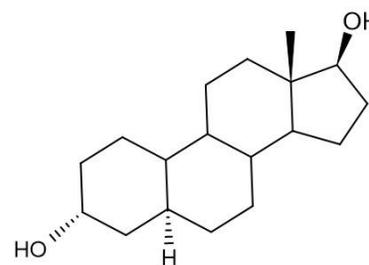
19-NA



N.E.

5 α -estran-3 α ,17 β -diol

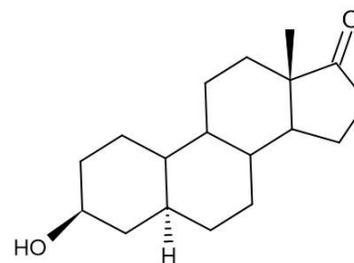
5 α Ean3 α 17 β

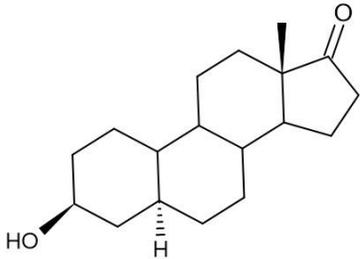
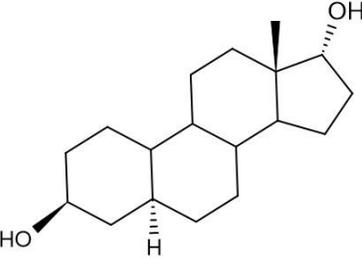
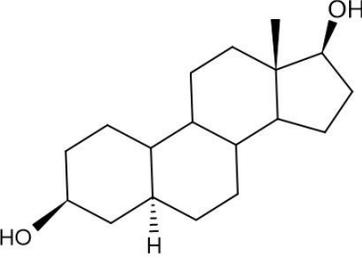
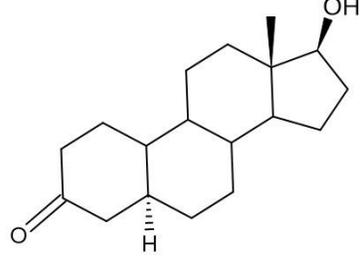
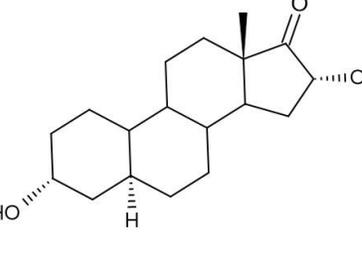


5 α -dihydroandrostènedione

5 α -estran-3,17-dione

5 α Ean

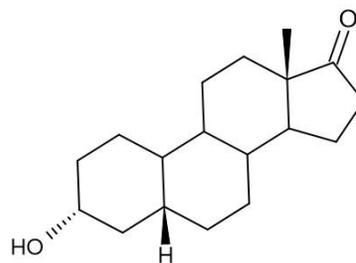


Norépiandrostérone	5 α -estran-3 β - ol-17-one	19-NEA	
N.E.	5 α -estran- 3 β ,17 α -diol	5 α Ean3 β 17 α	
Tétrahydronandrolone	5 α -estran- 3 β ,17 β -diol	5 α Ean3 β 17 β	
5 α -Dihydronandrolone	5 α -estran-3- one-17 β -ol	5 α Ean17 β	
16 α -hydroxy- norandrostérone	5 α -estran- 3 α ,16 α -diol- 17-one	16 α - hydroxy-NA	

Norétiocholanolone

5 β -estran-3 α -
ol-17-one

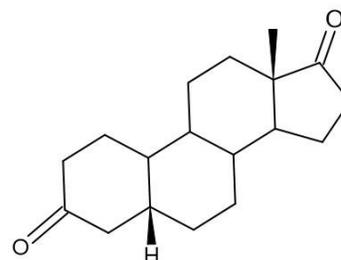
19-NE



5 β -dihydro-19-
Norandrostènedione

5 β -estran-
3,17-dione

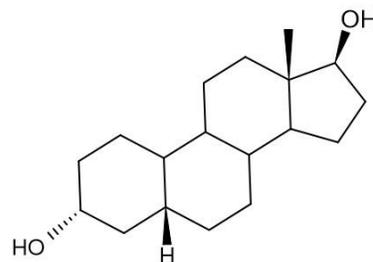
5 β Ean



N.E.

5 β -estran-
3 α ,17 β -diol

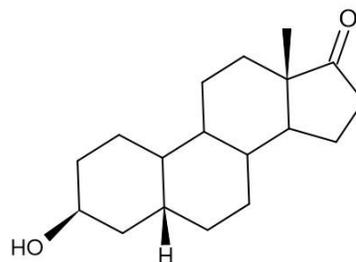
5 β Ean3 α 17
 β



Norépiétiocholanolone

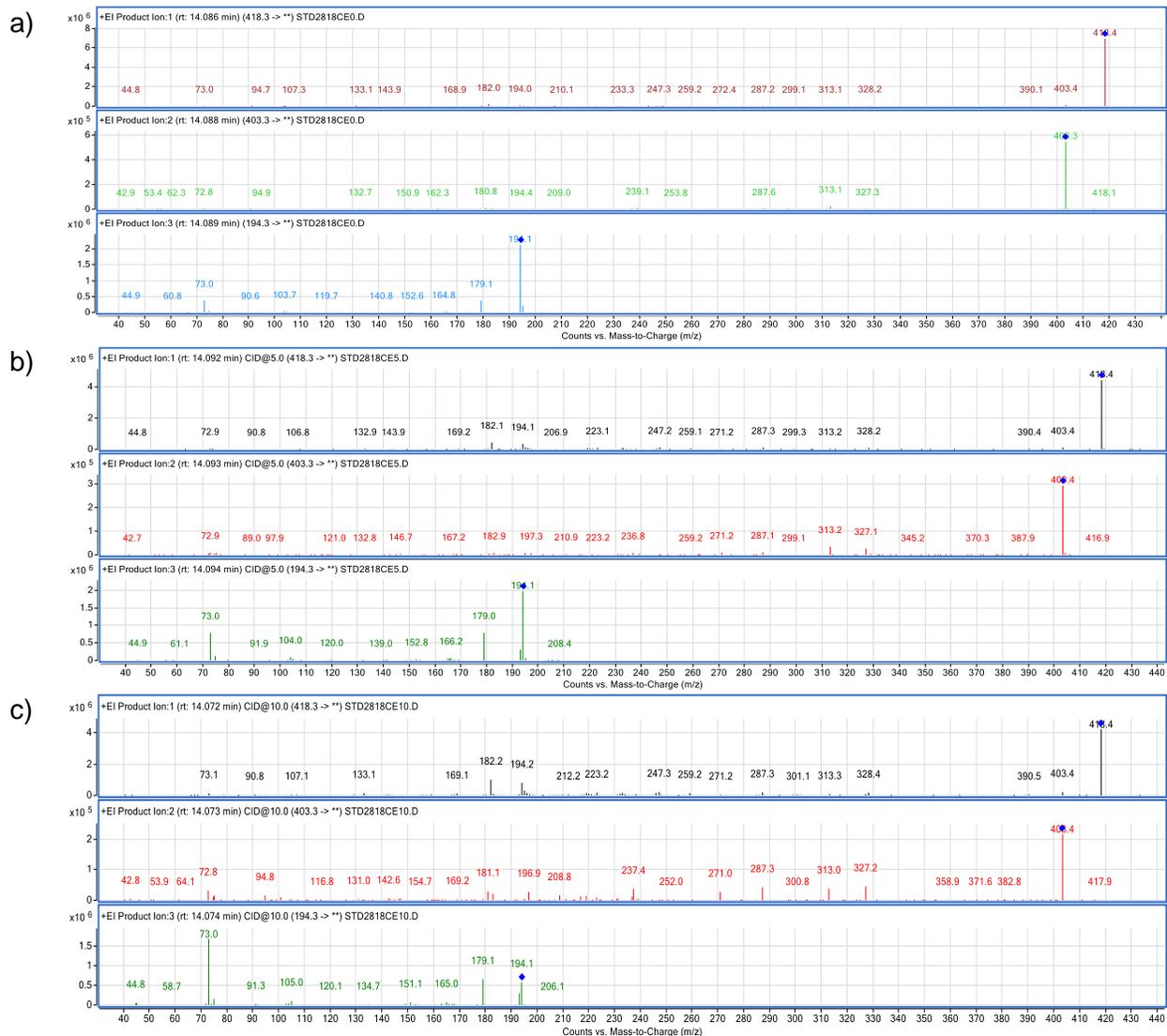
5 β -estran-3 β -
ol-17-one

19-NEE



ANNEXE II : SPECTRES DE MASSE OBTENUS DE L'ANALYSE EN MODE SPECTRE D'ION FRAGMENT DES MÉTABOLITES À L'ÉTUDE

Figure A-1 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés de la 19-NT aux énergies de collision suivantes : a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



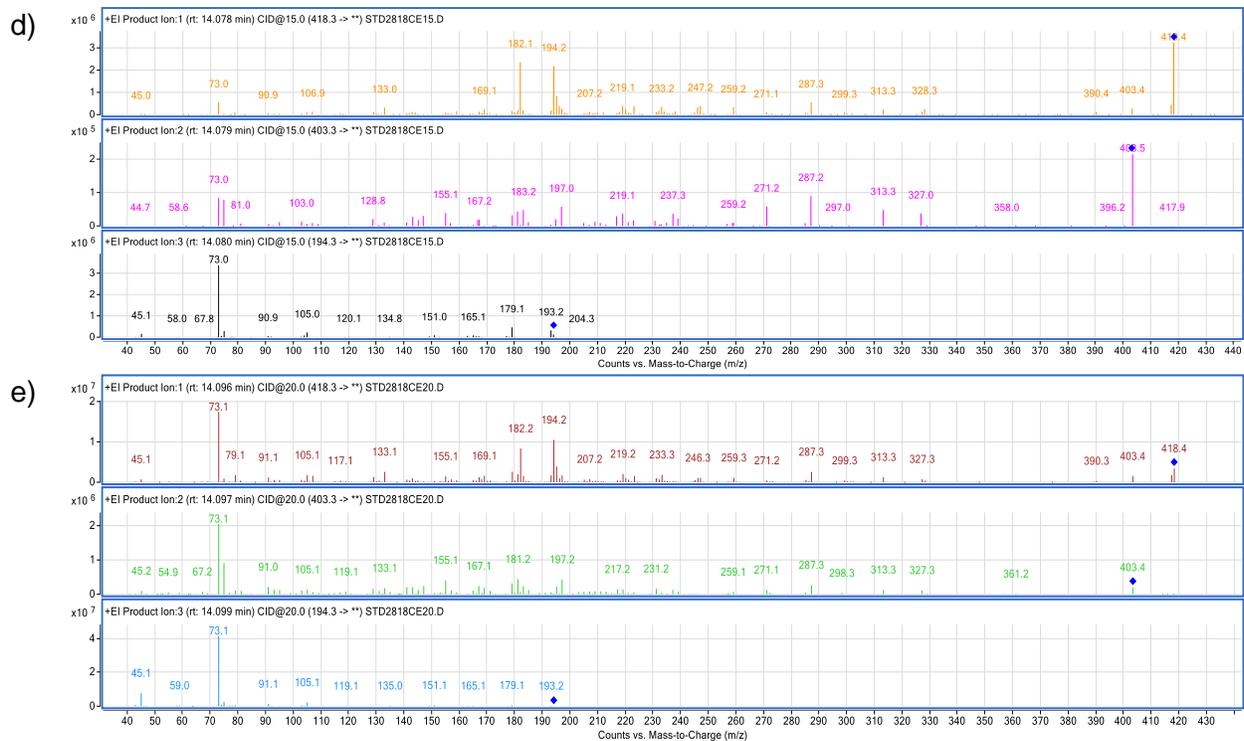
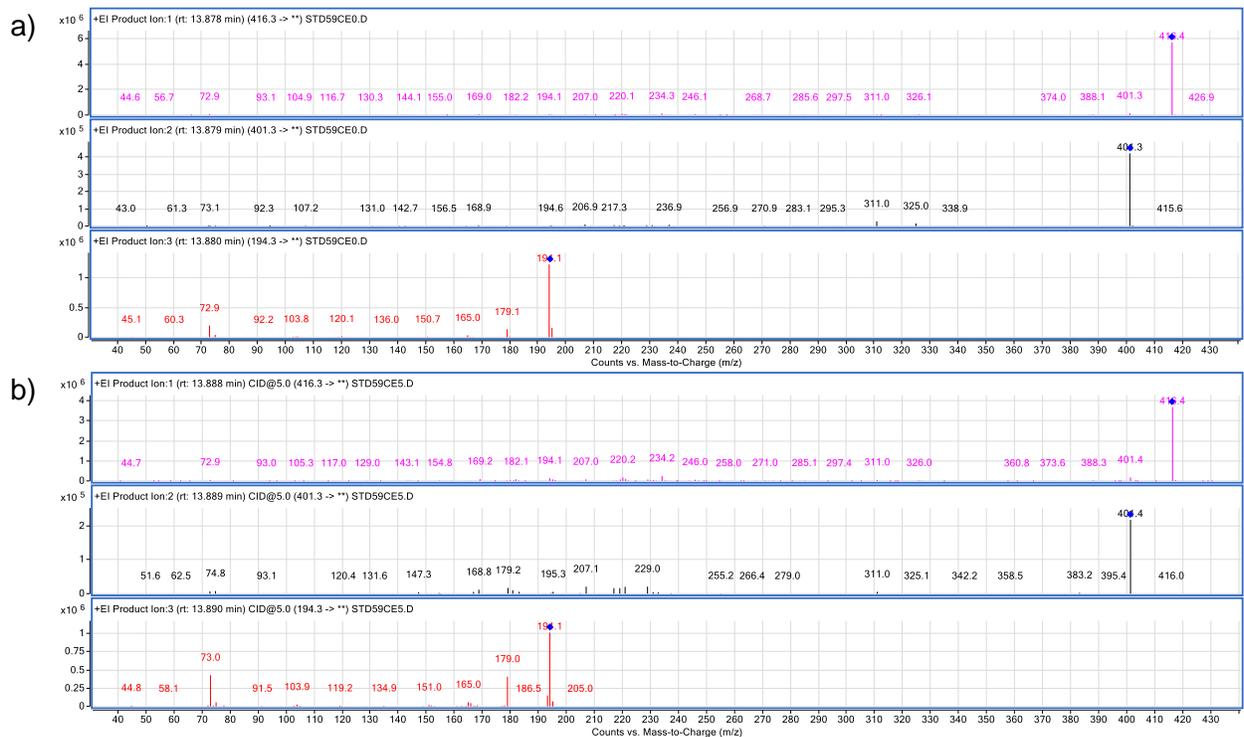


Figure A-2 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du nordione aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



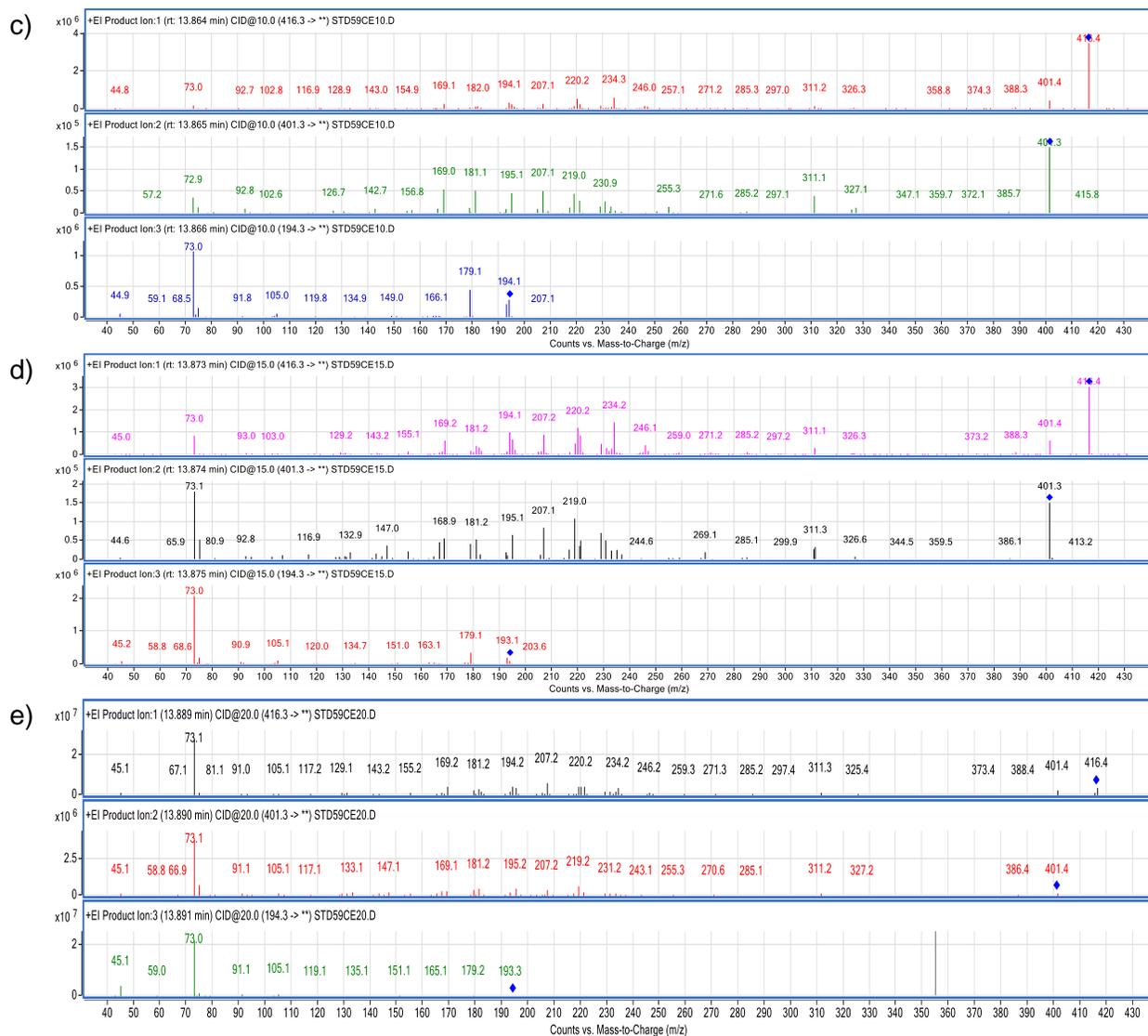
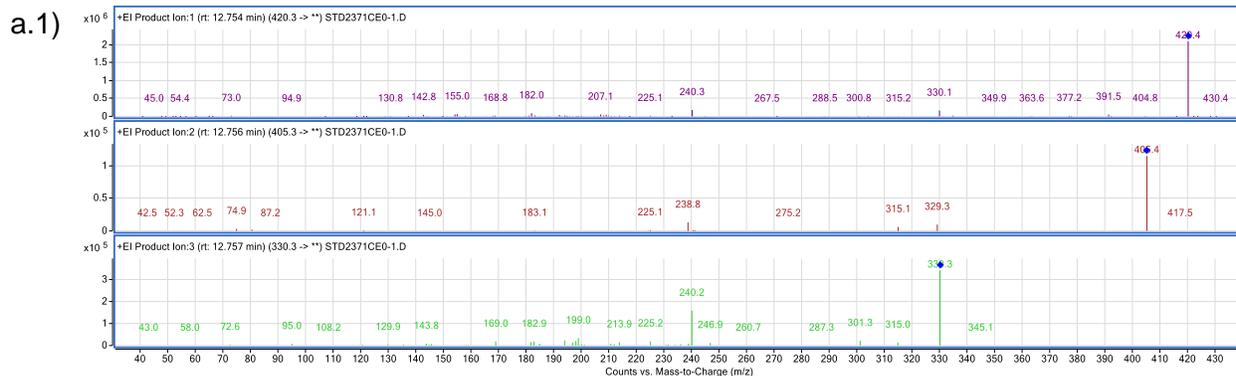
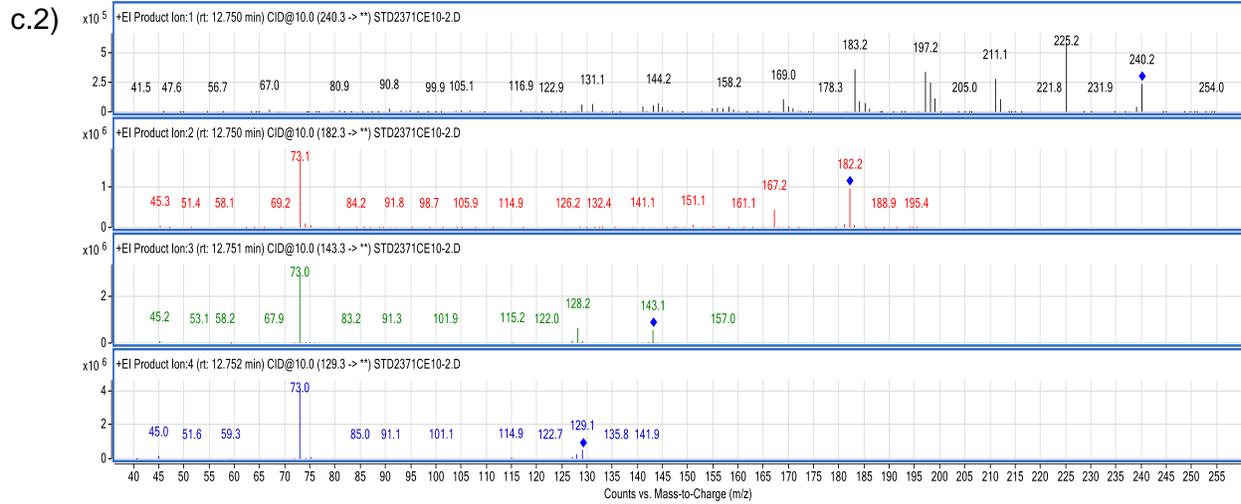
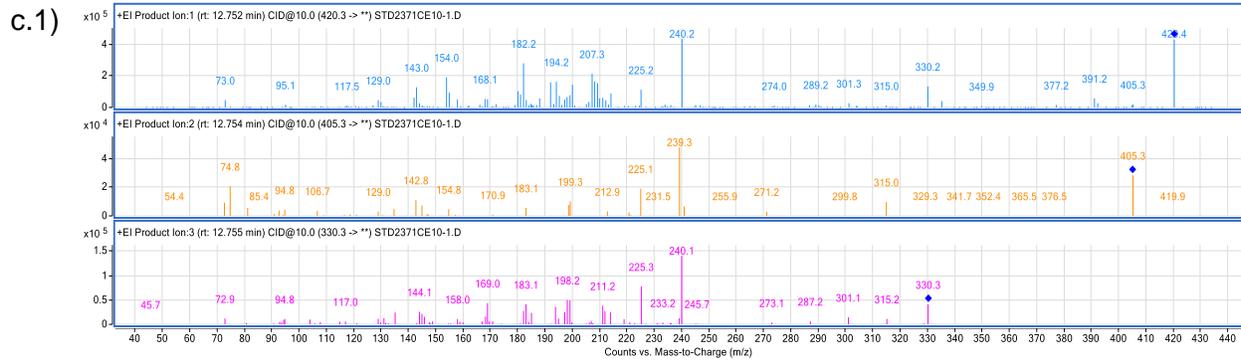
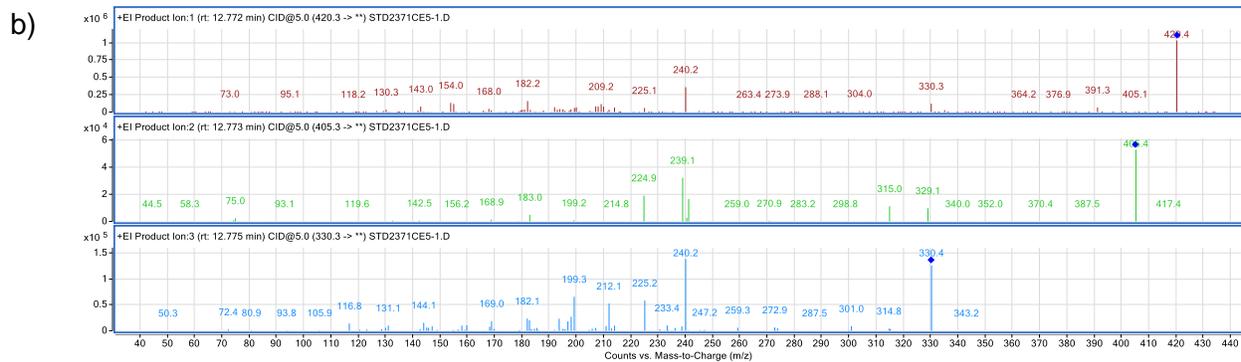
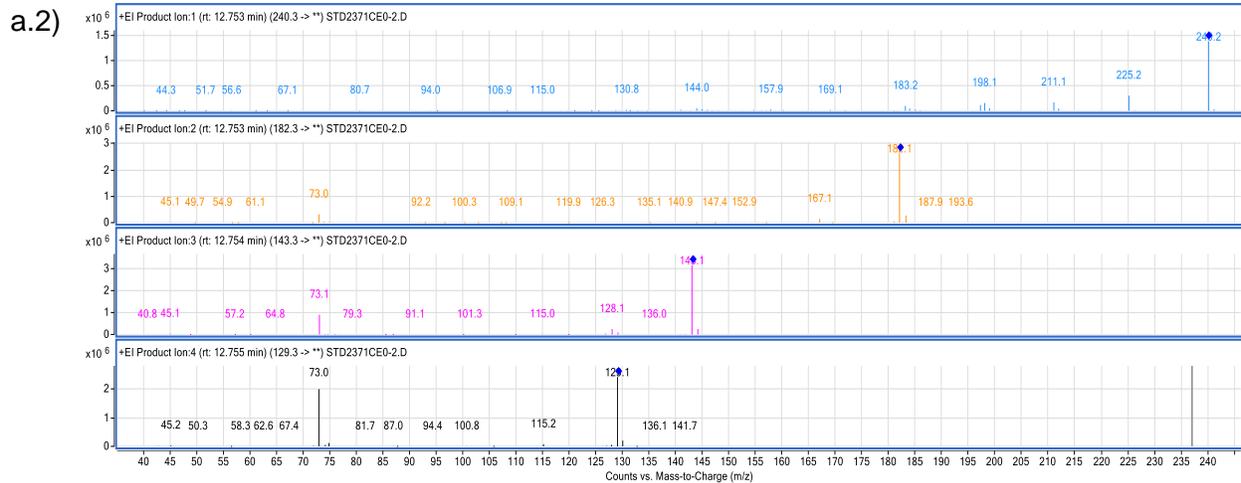


Figure A-3 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 4-estrène-3 α ,17 β -diol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.





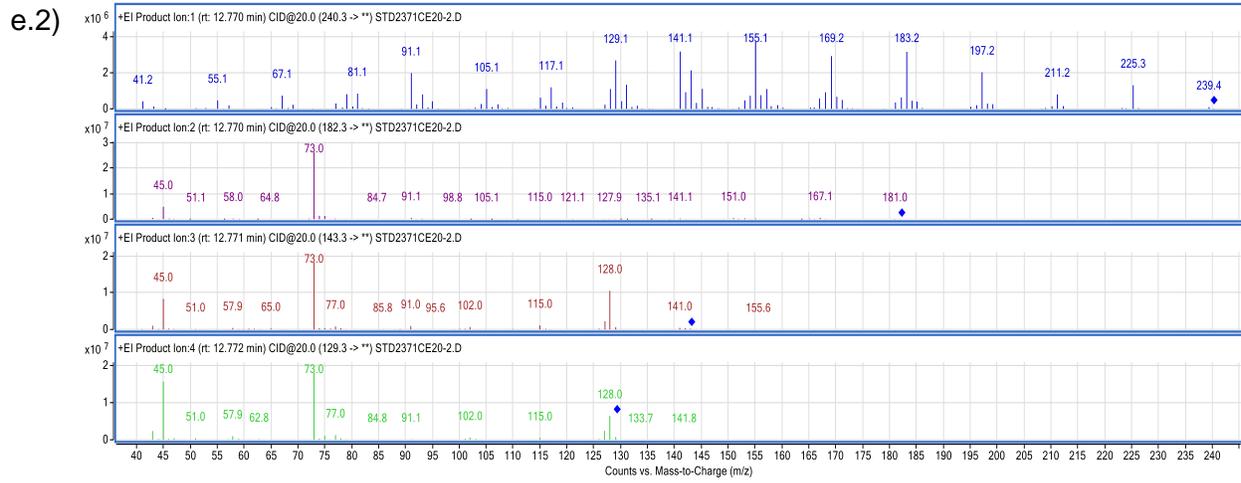
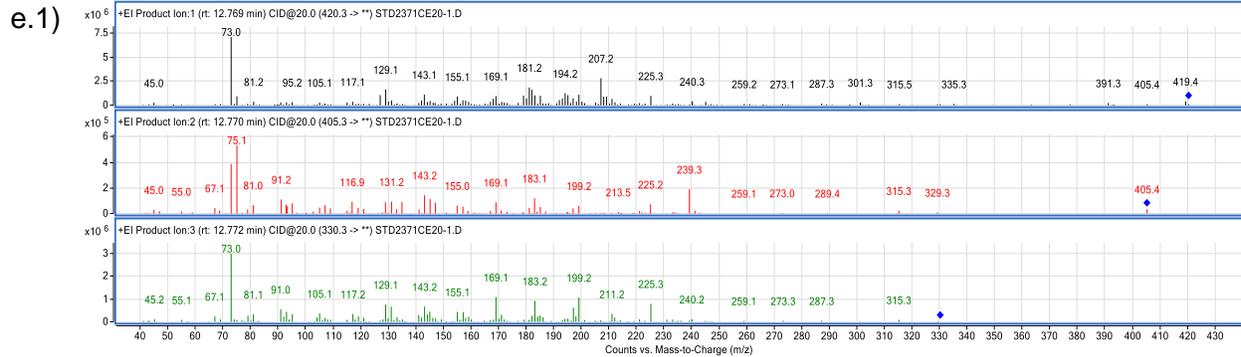
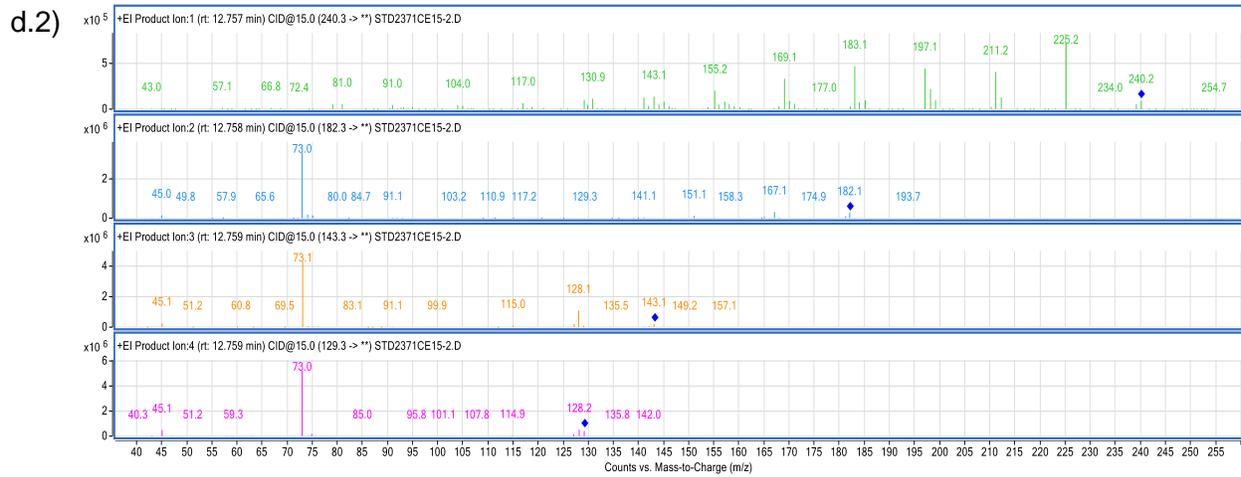
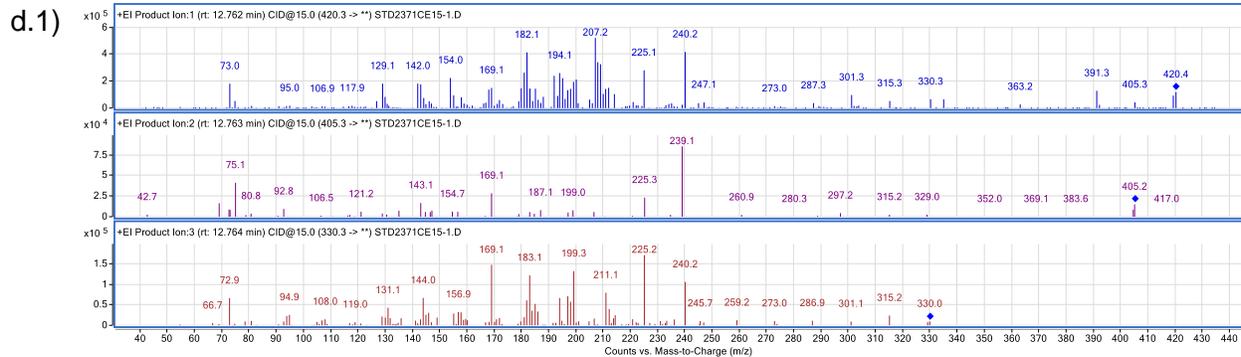
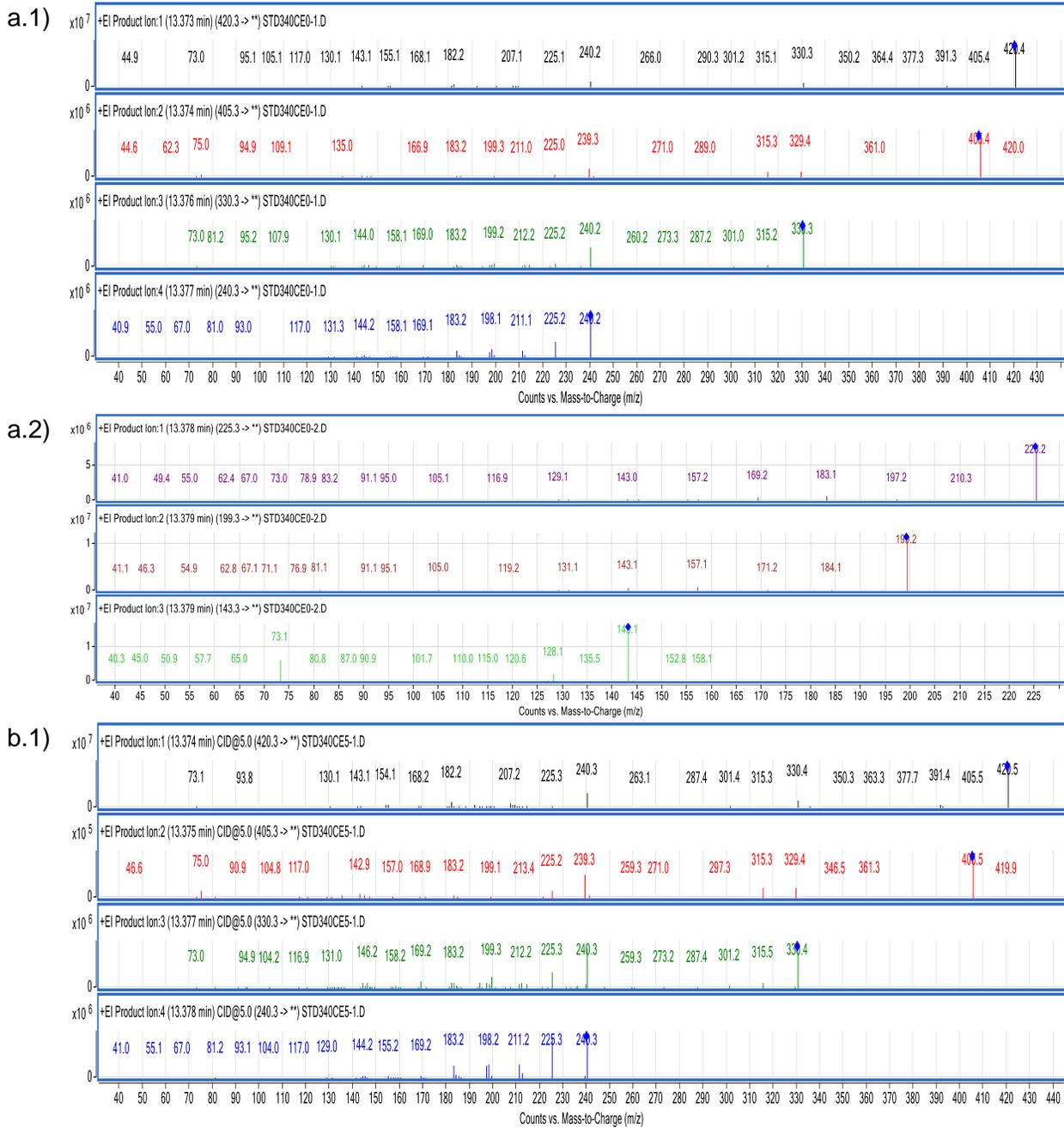
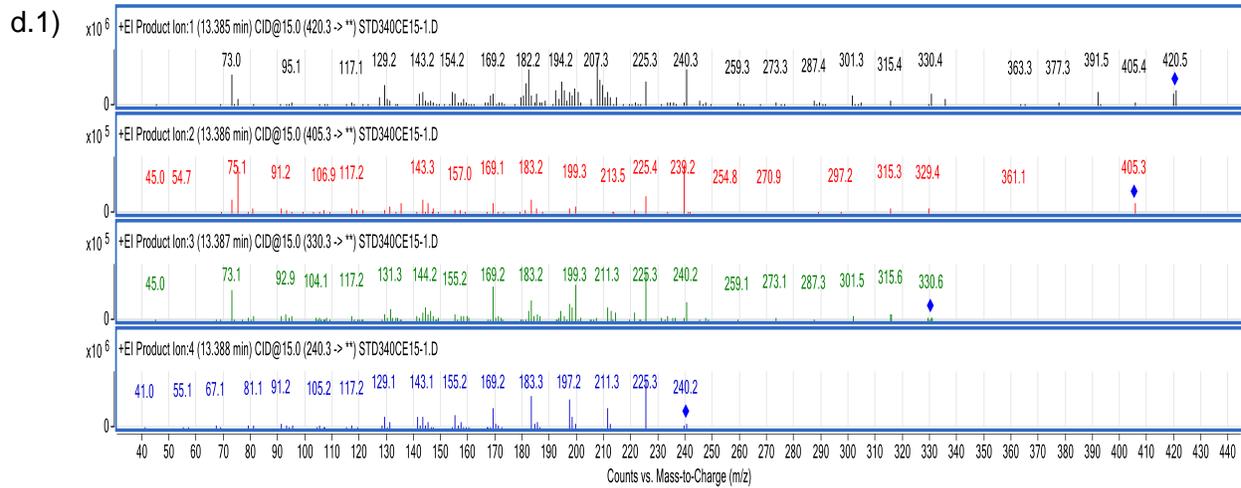
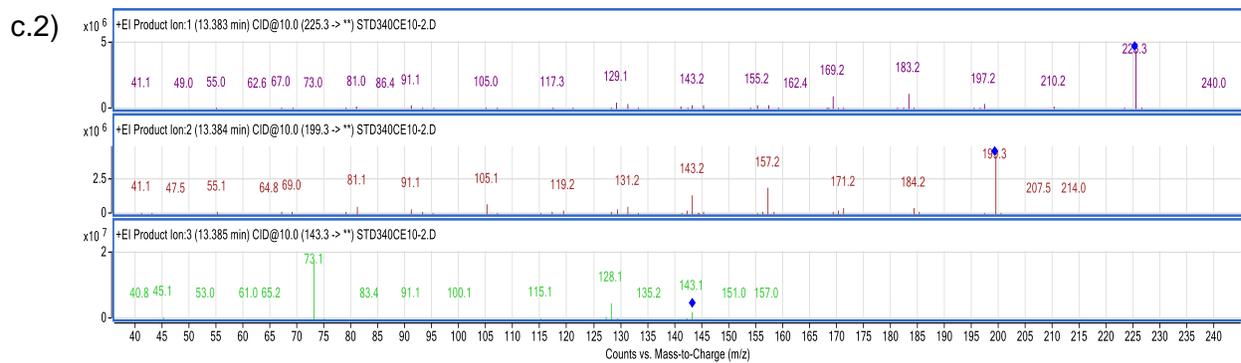
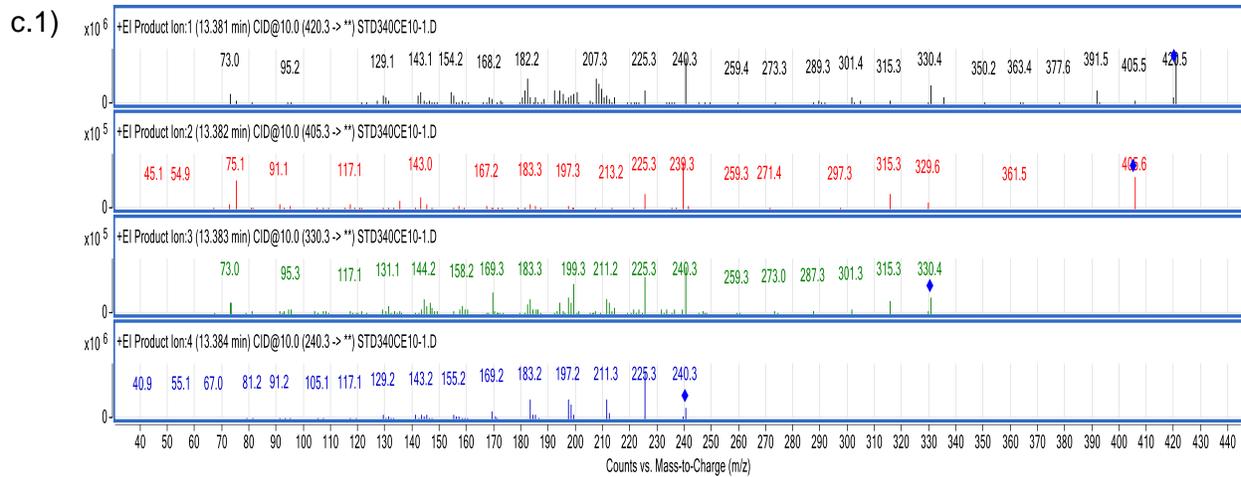
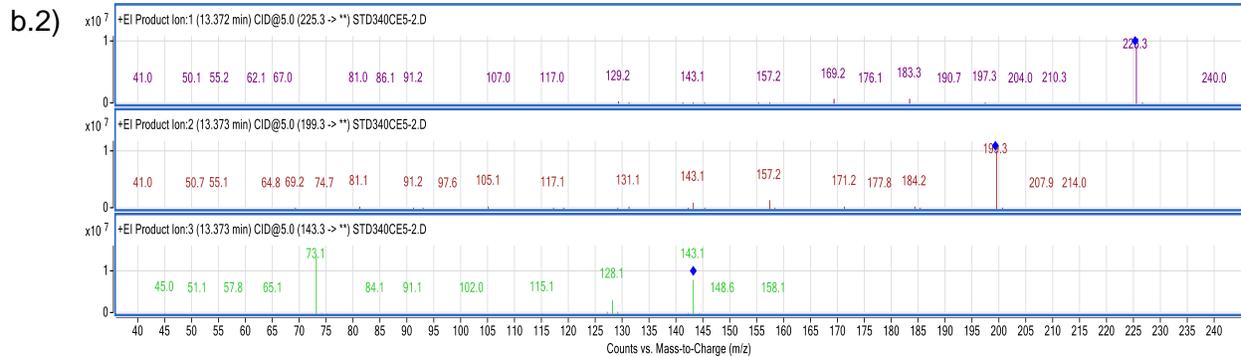


Figure A-4 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du nordiol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.





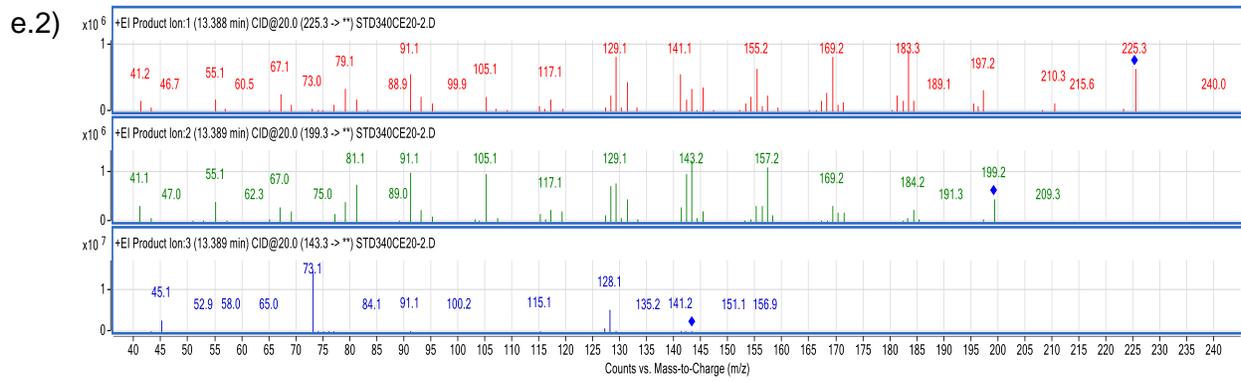
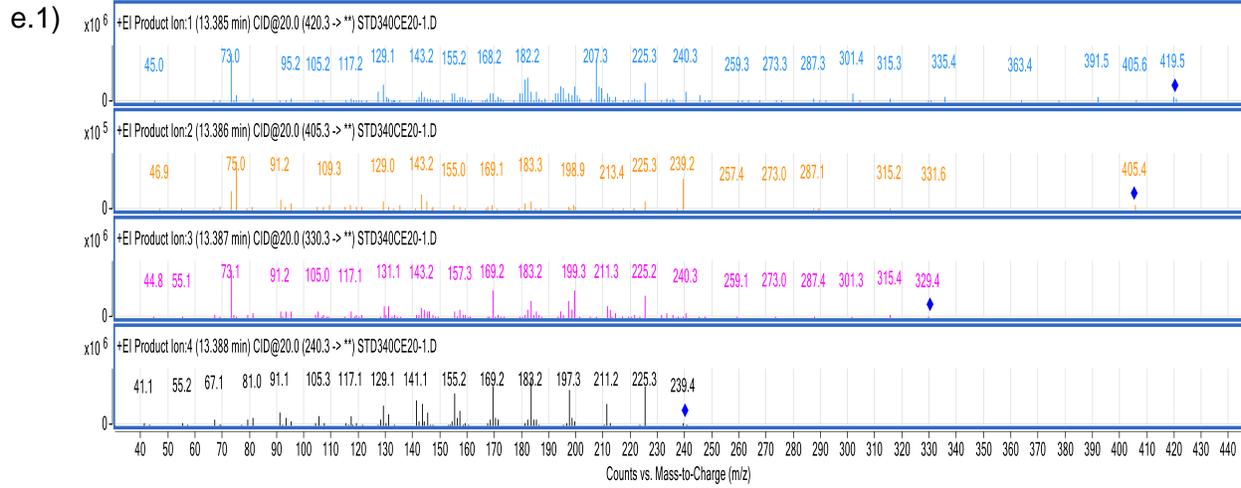
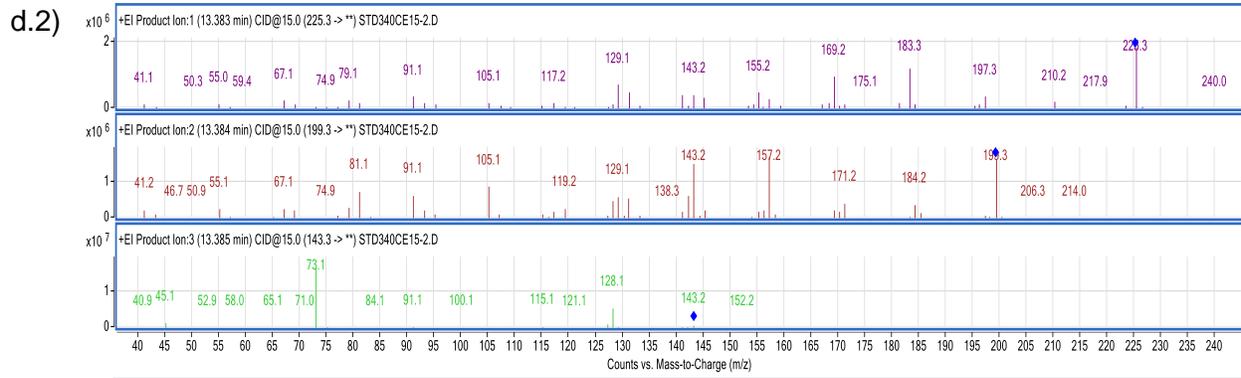
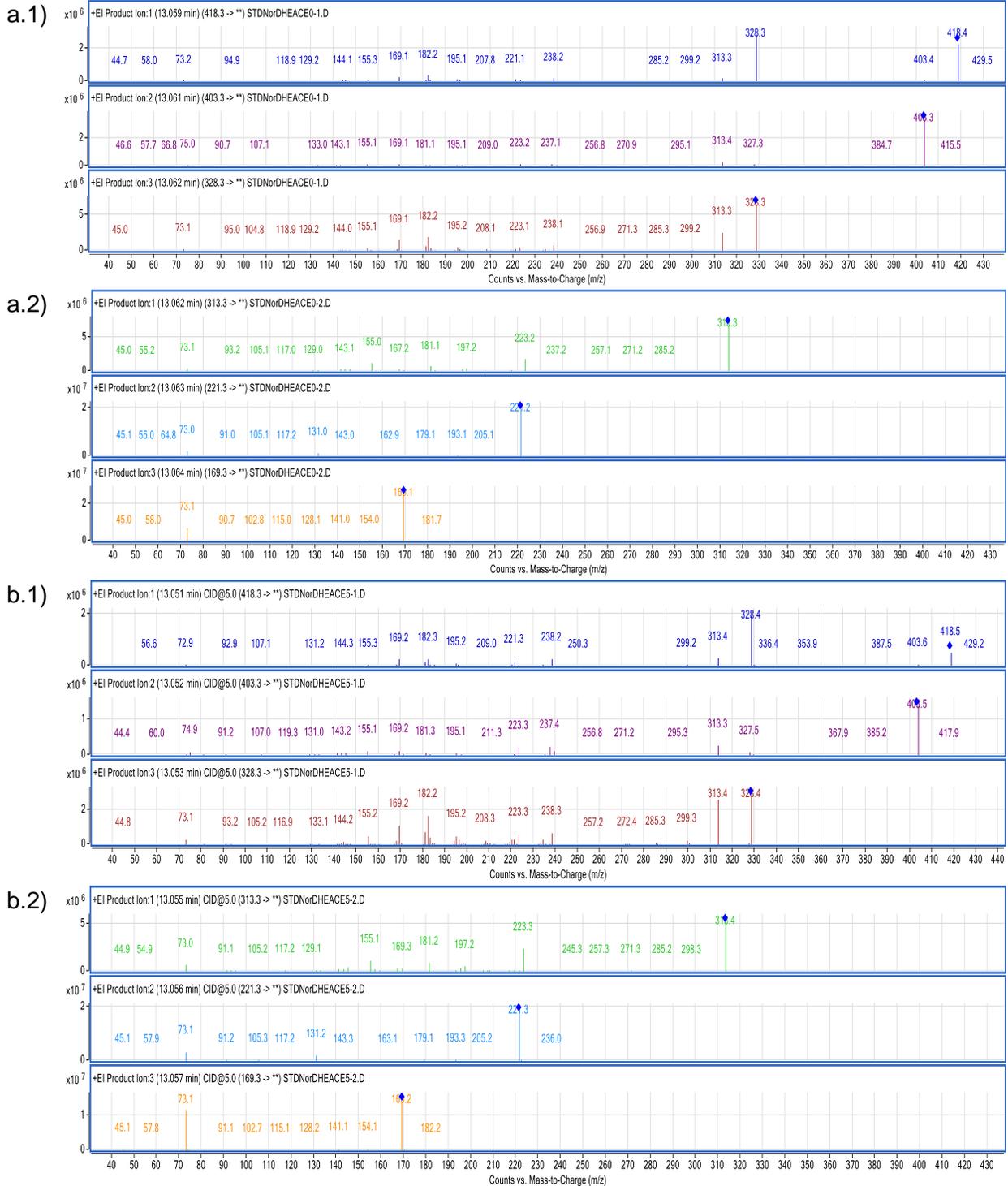
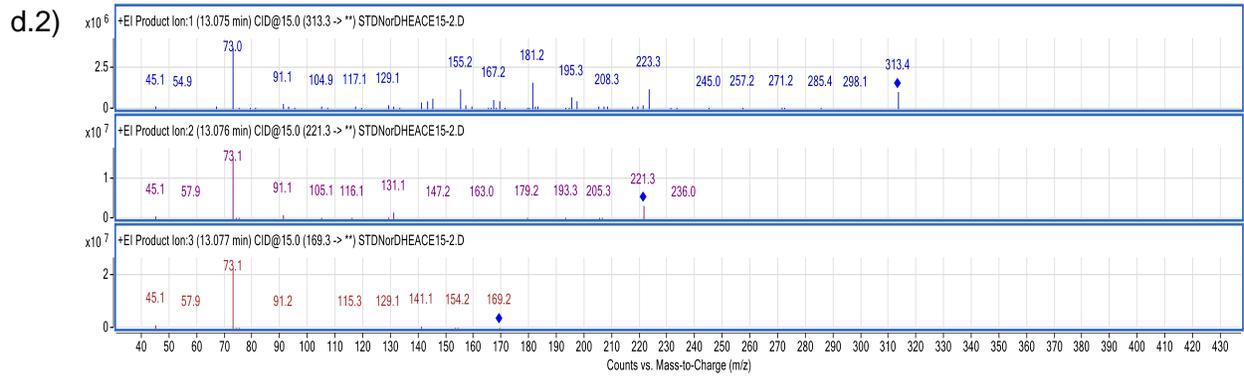
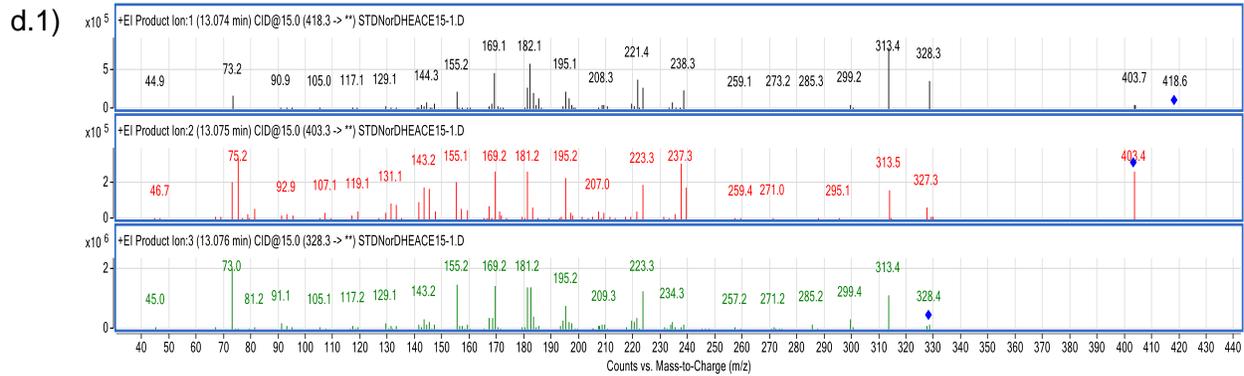
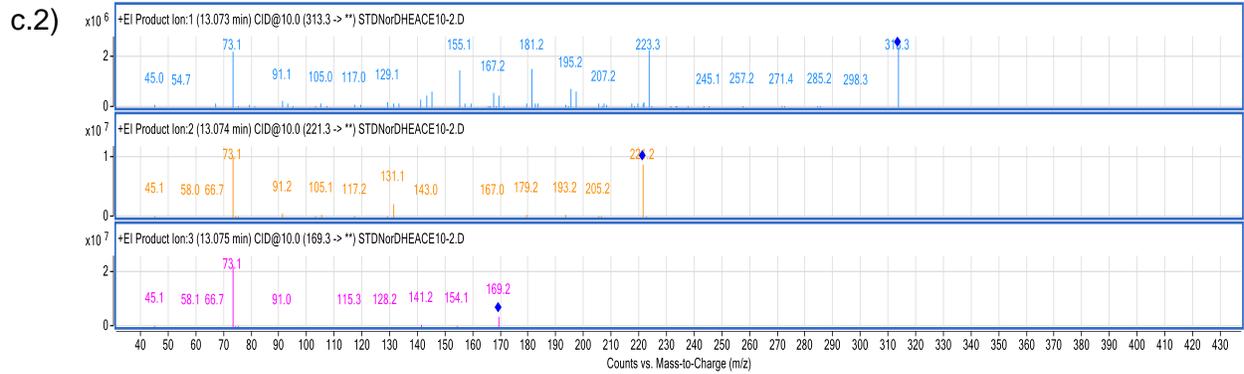
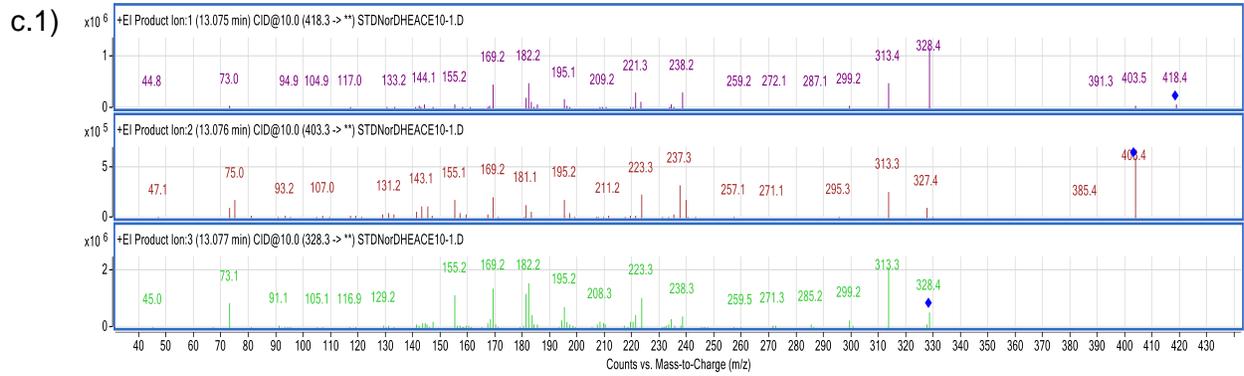


Figure A-5 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du *nor*DHEA aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.





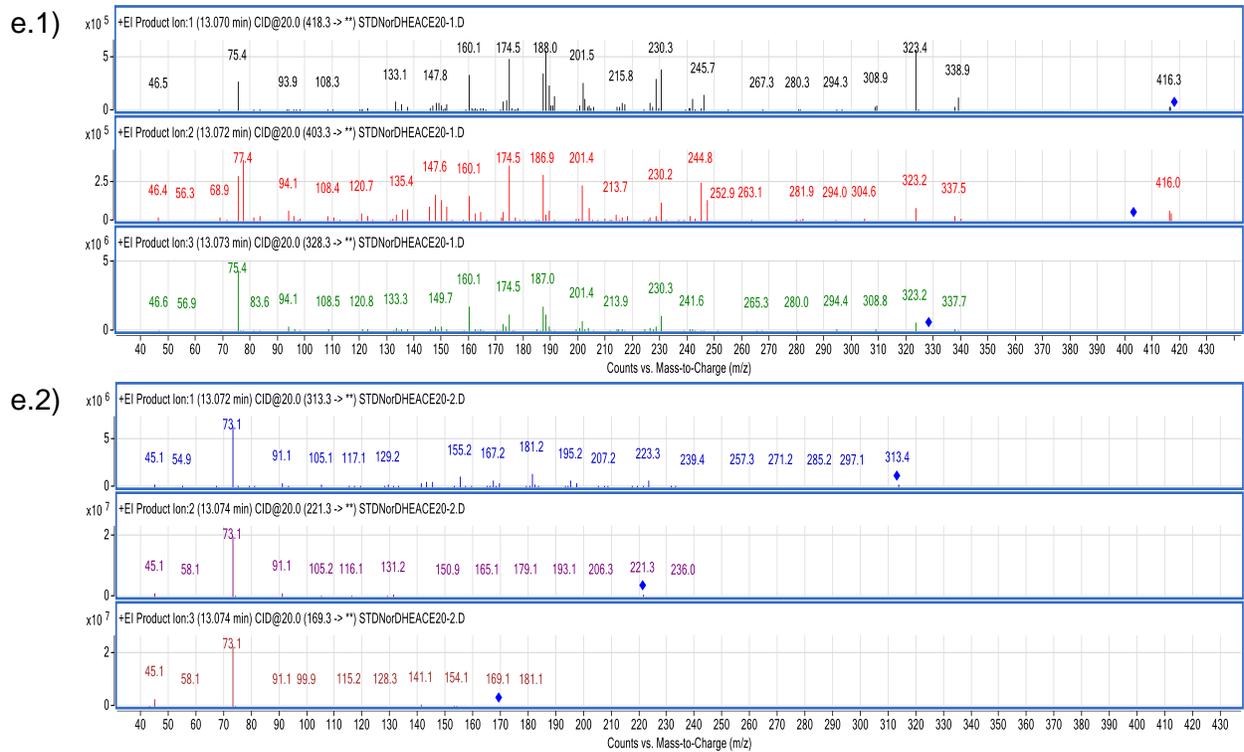


Figure A-6 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés de la 4-estrèn-6 β -ol-3,17-dione aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



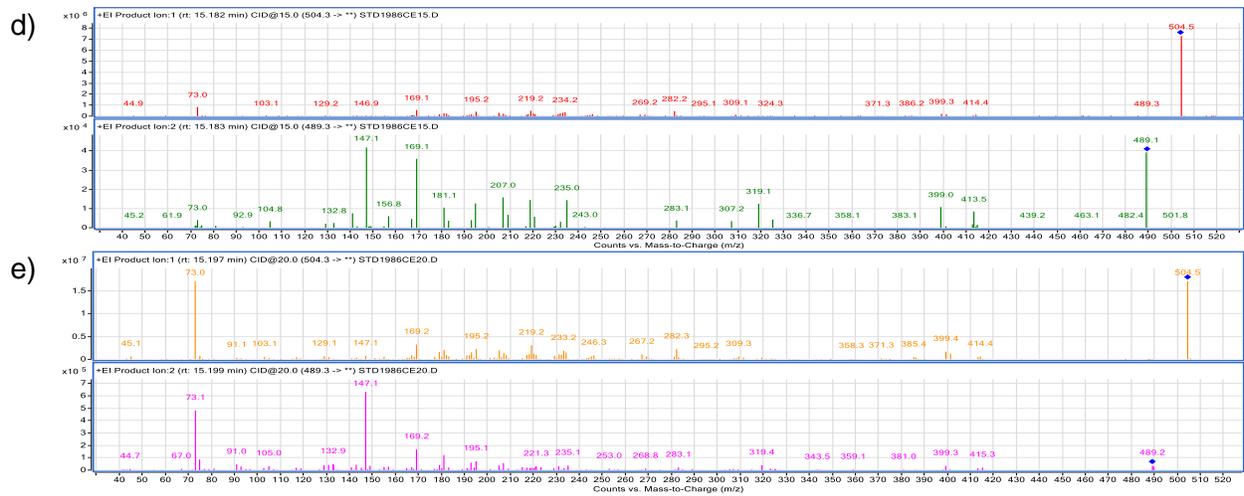
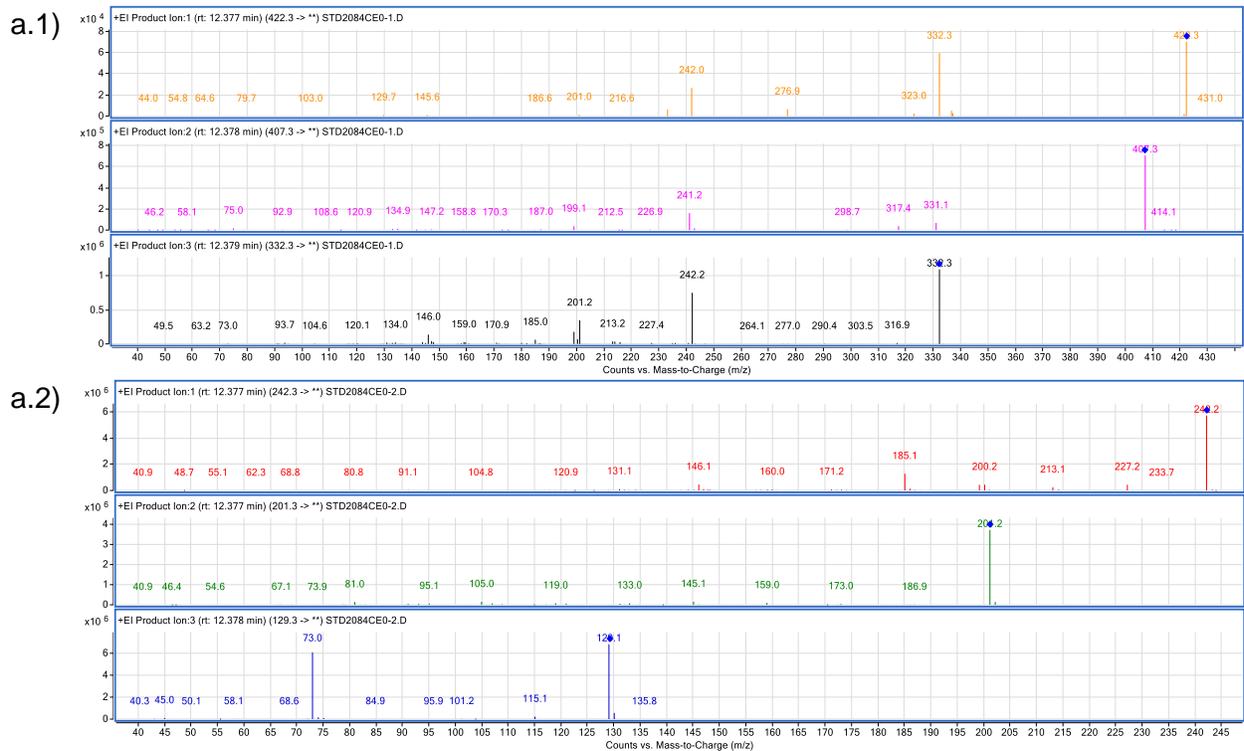
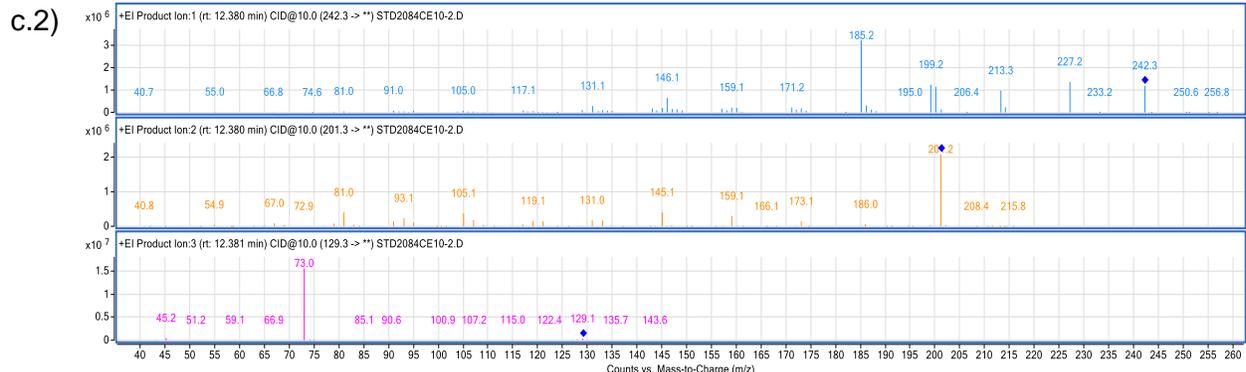
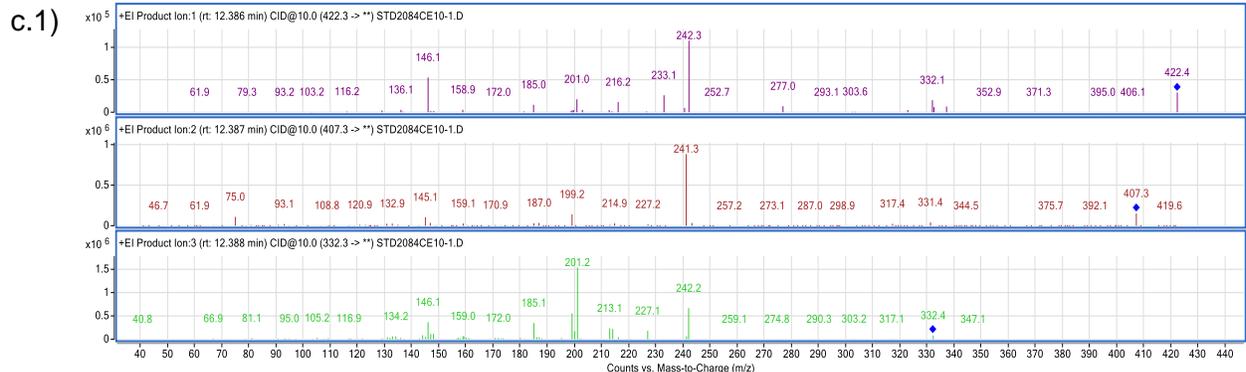
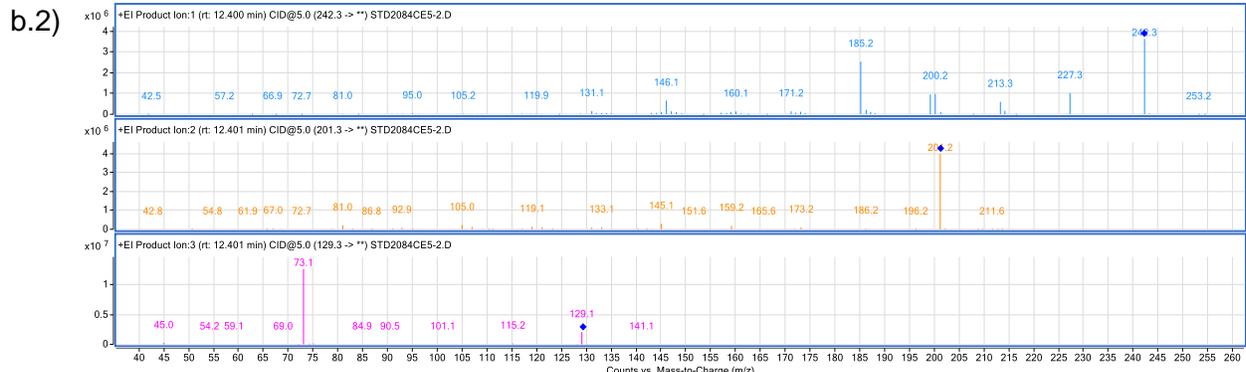
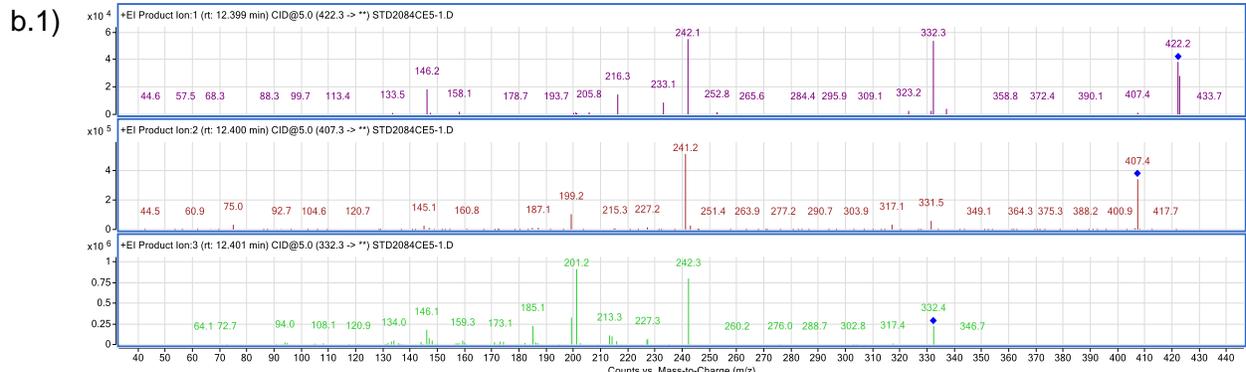


Figure A-7 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.





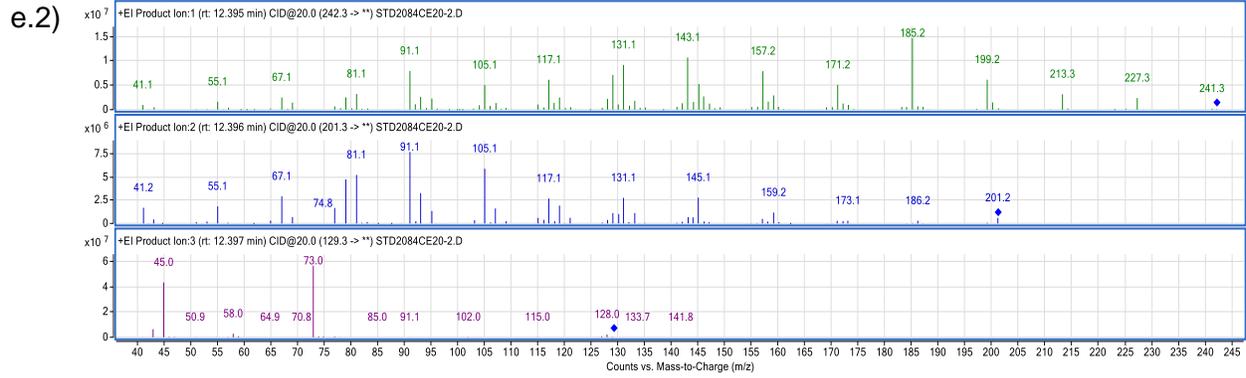
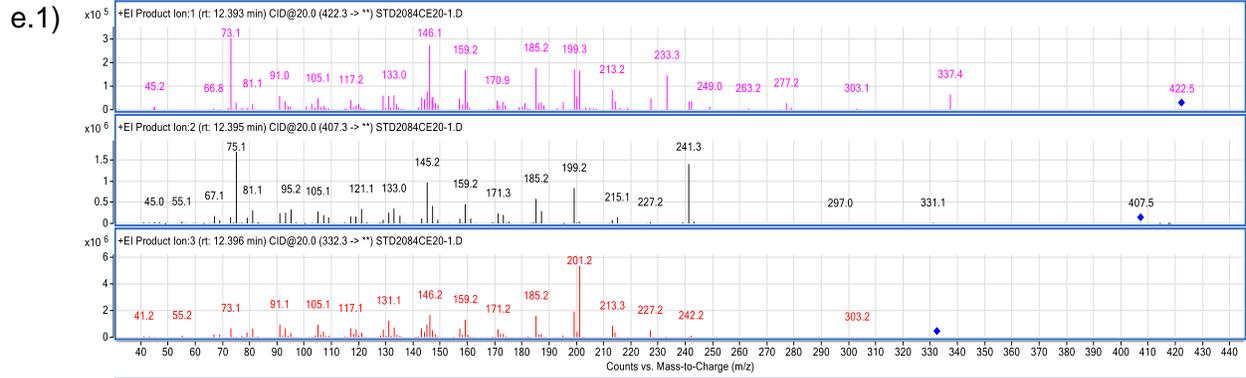
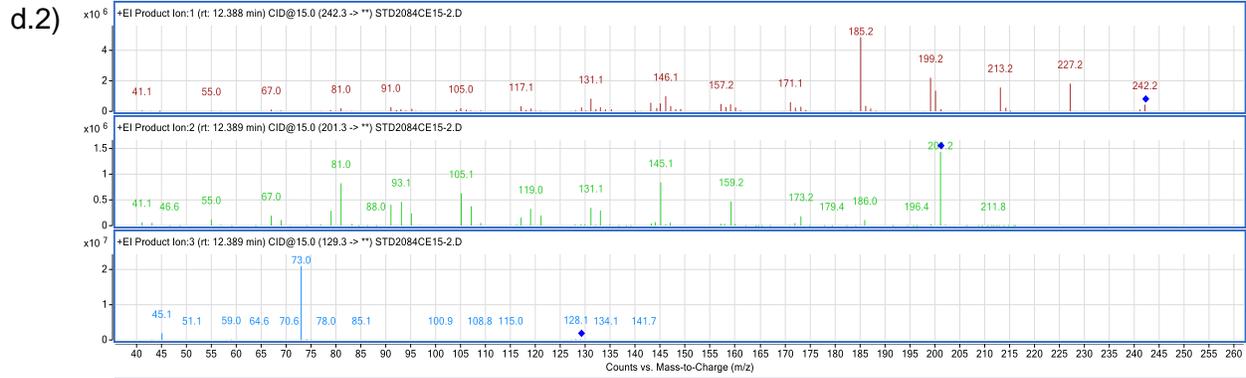
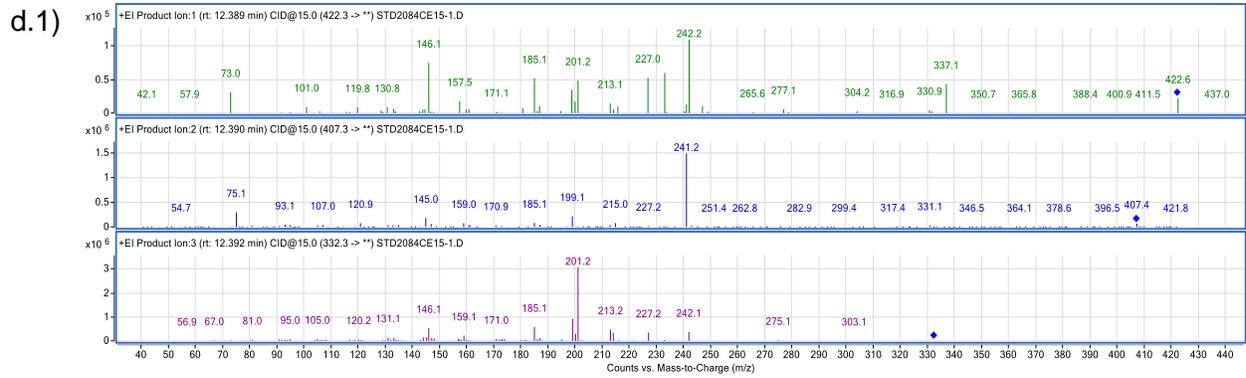
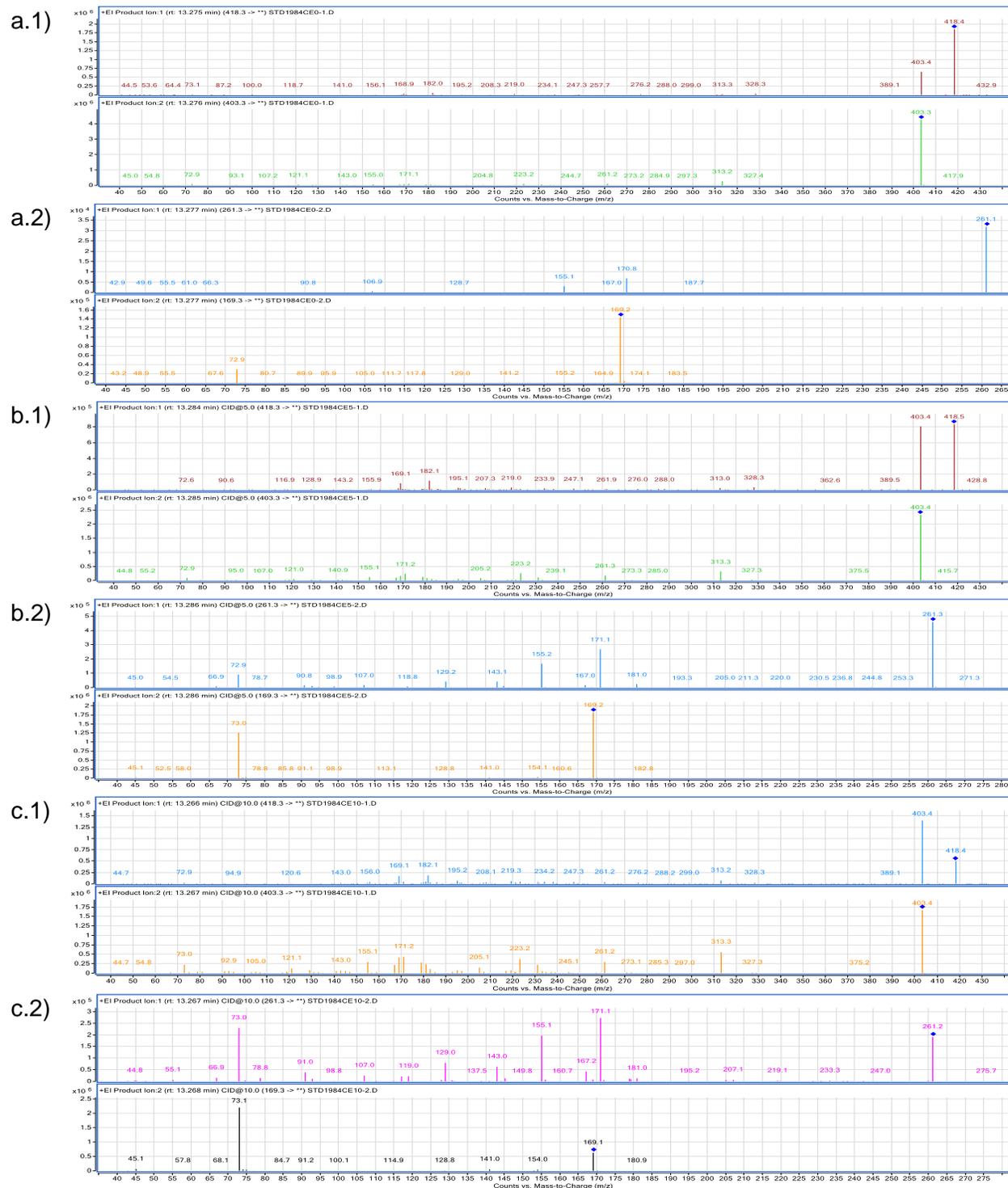


Figure A- 8 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés de la 5 α -estran-3,17-dione aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



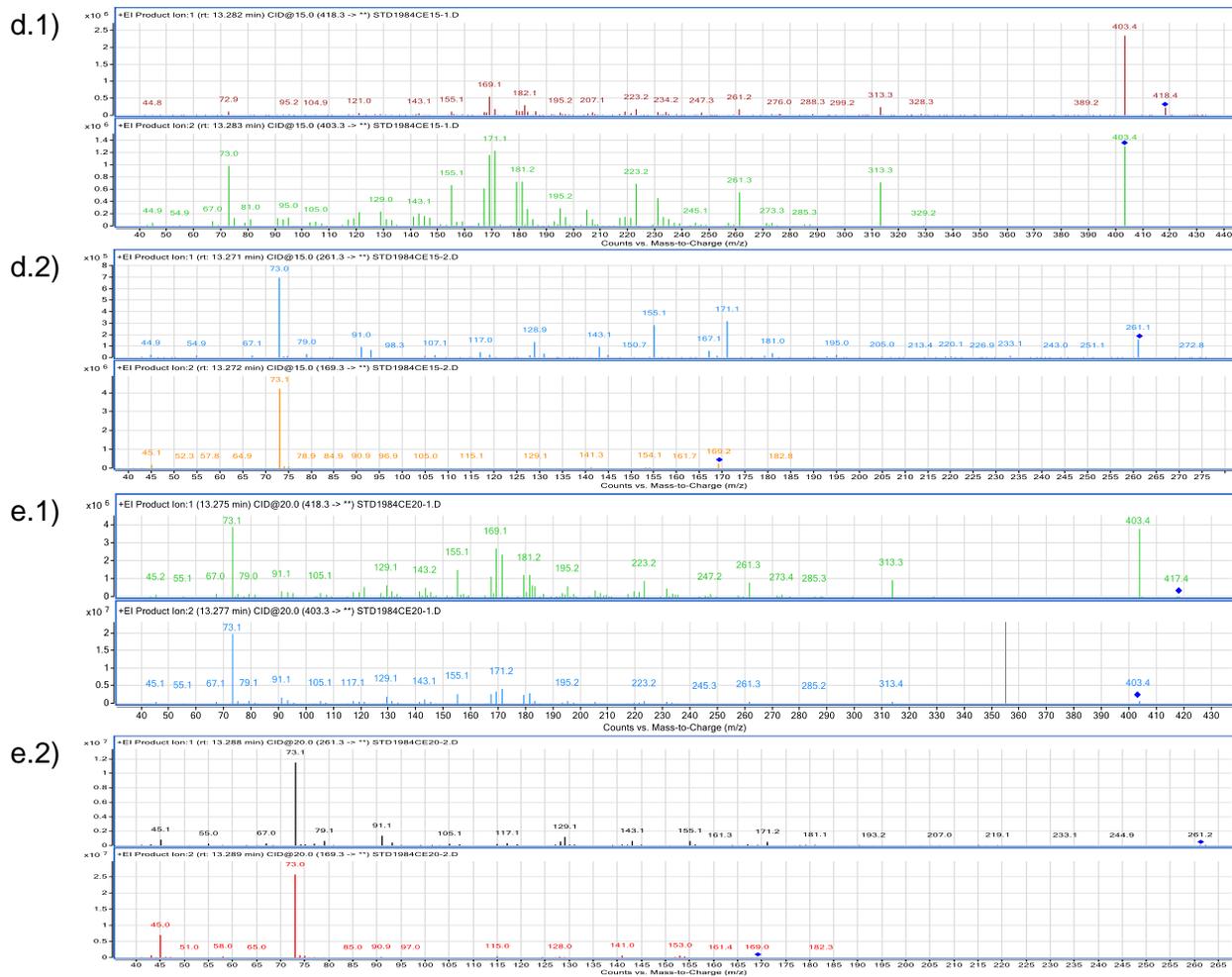
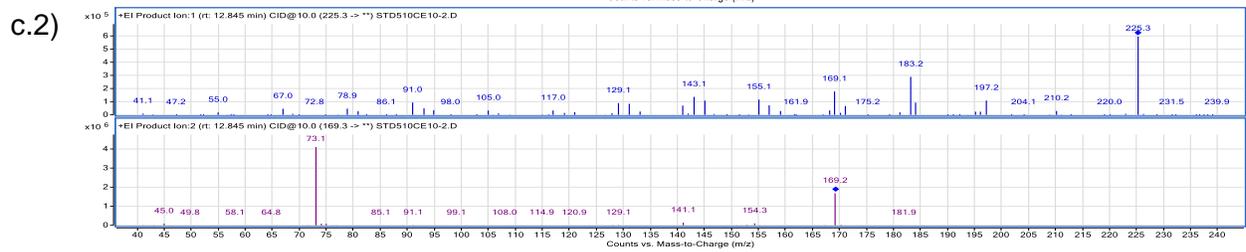
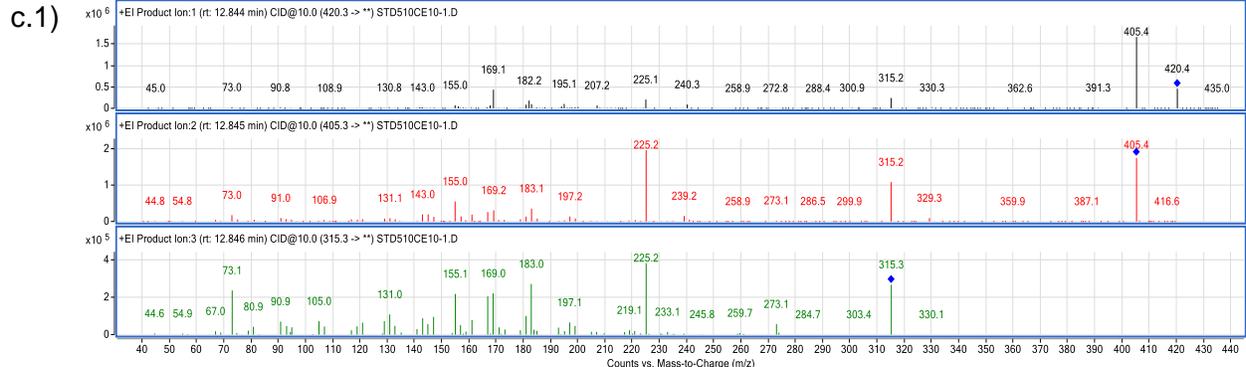
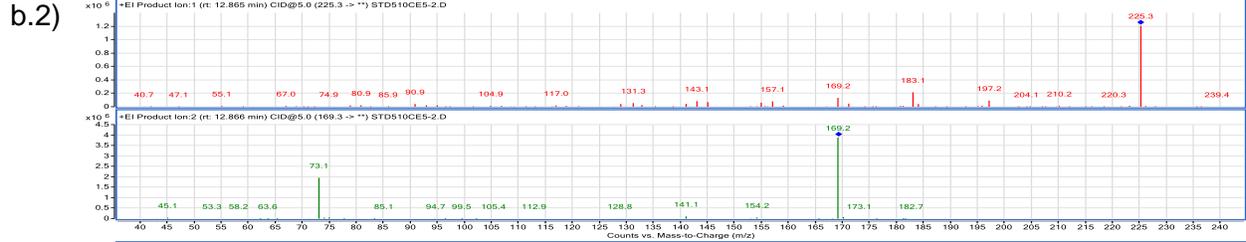
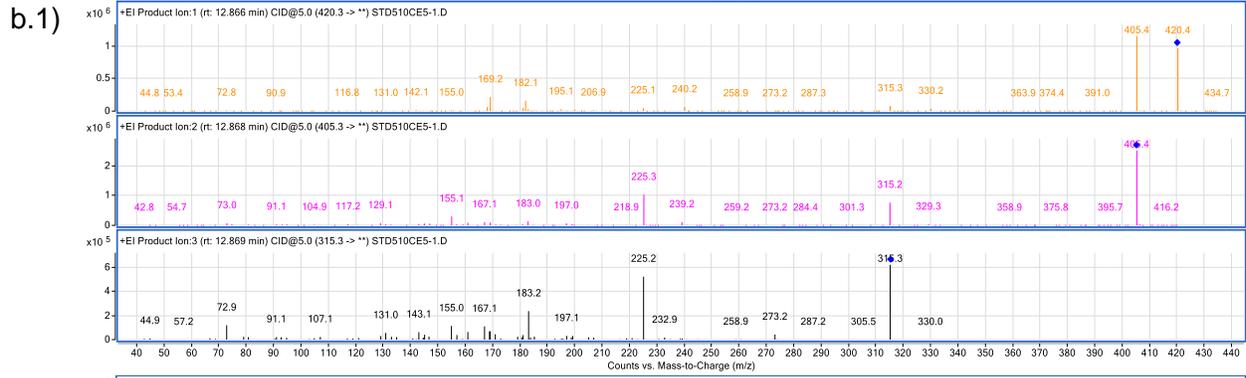
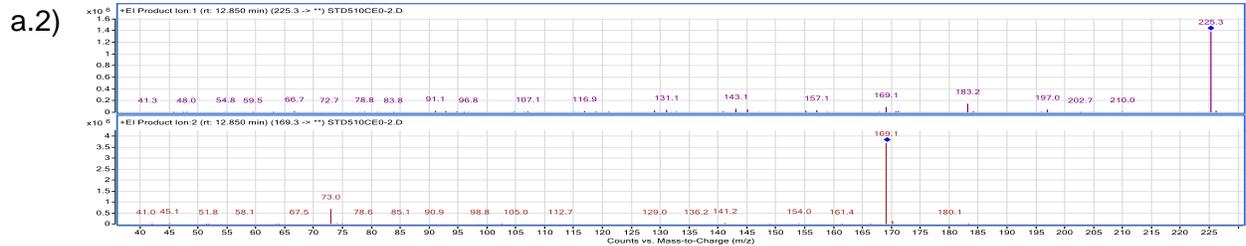


Figure A- 9 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 19-NEA aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



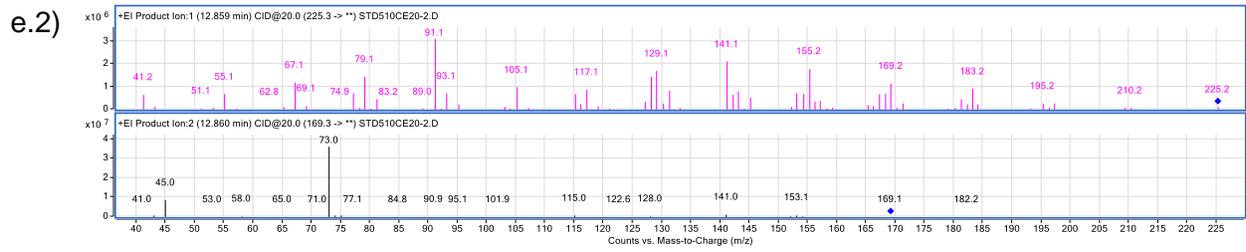
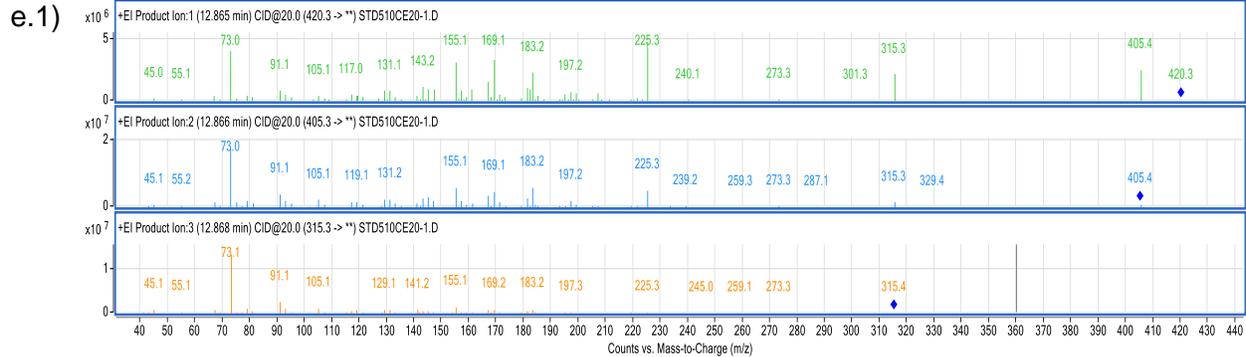
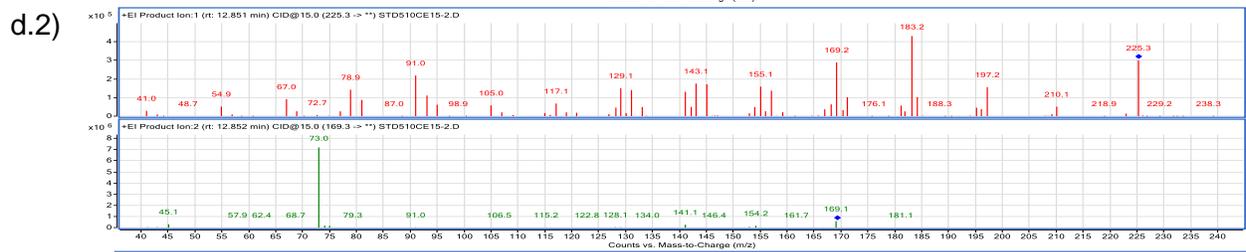
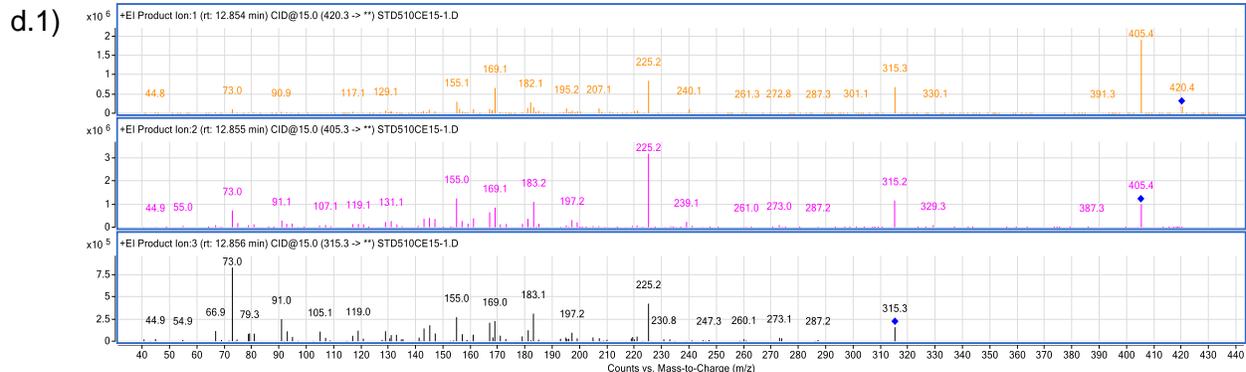
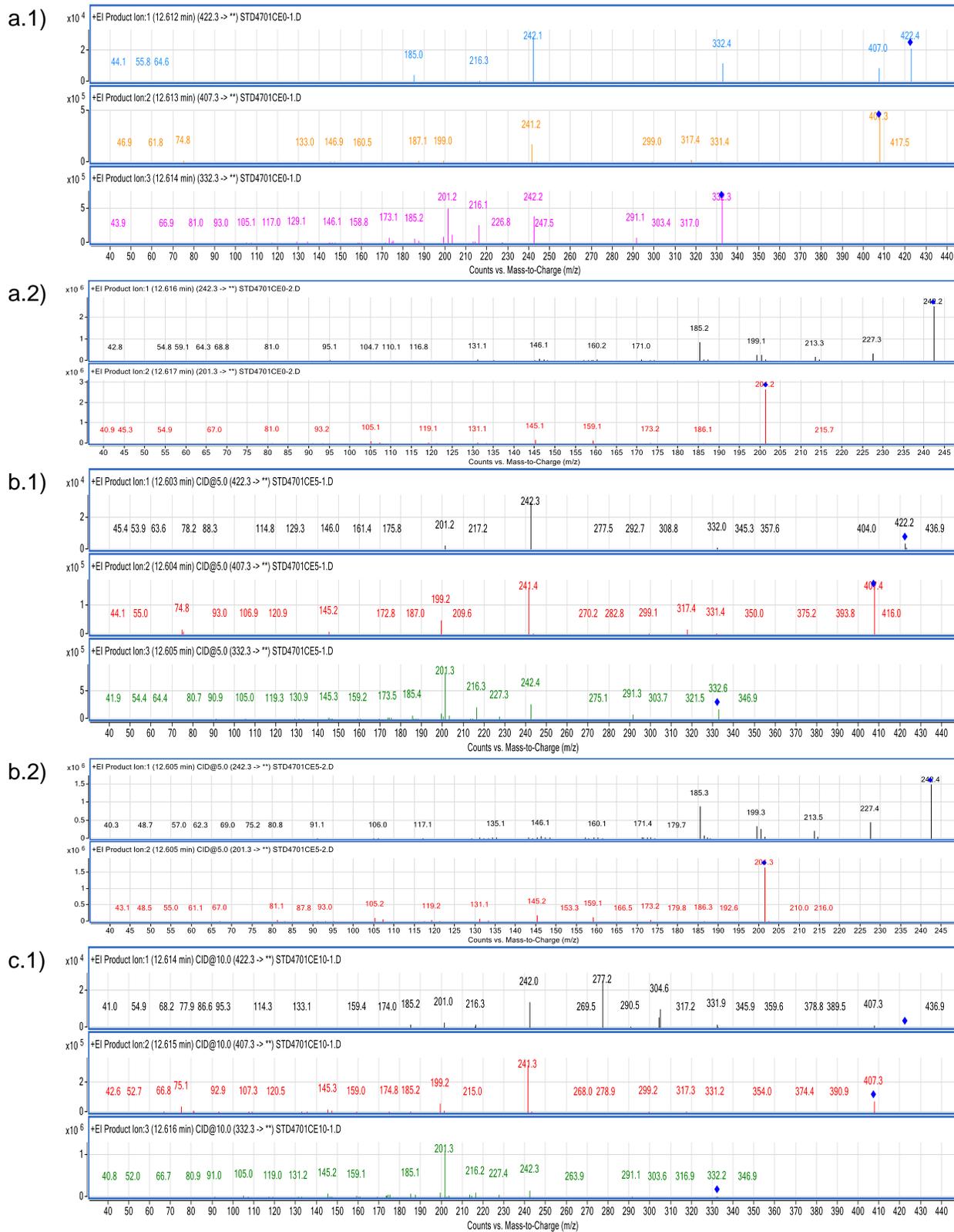


Figure A- 10 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 5 α -estran-3 β ,17 α -diol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



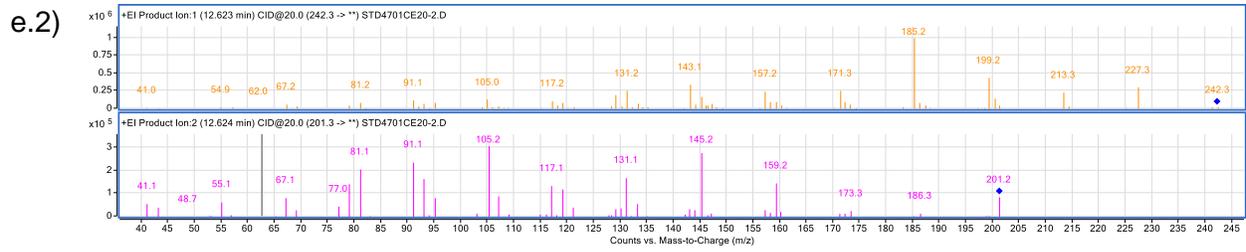
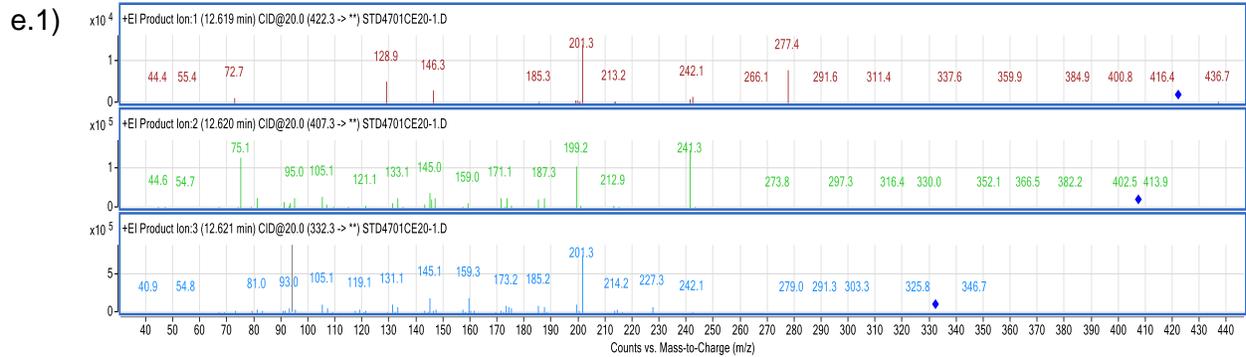
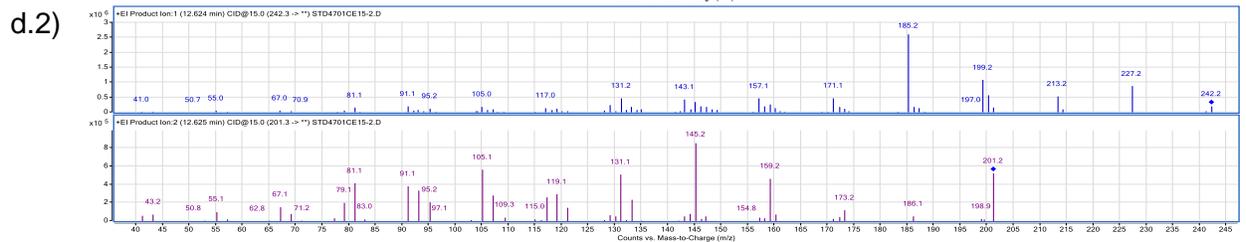
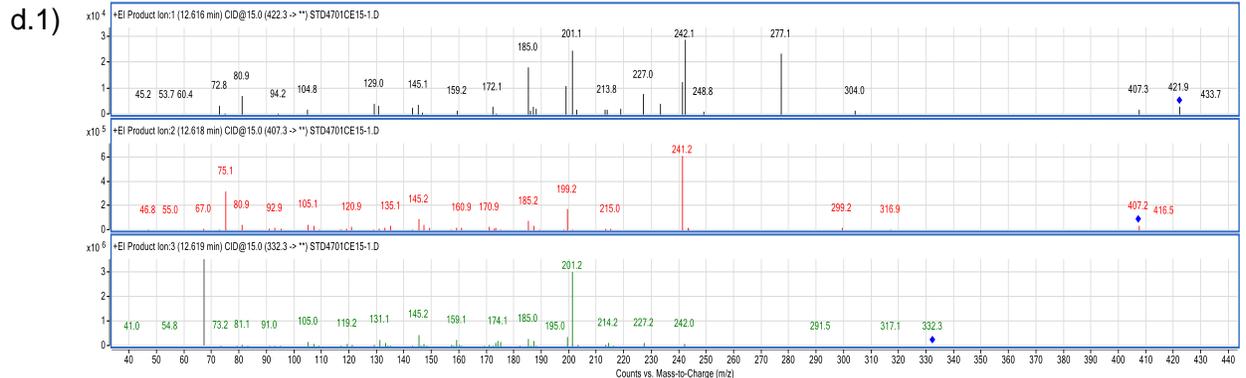
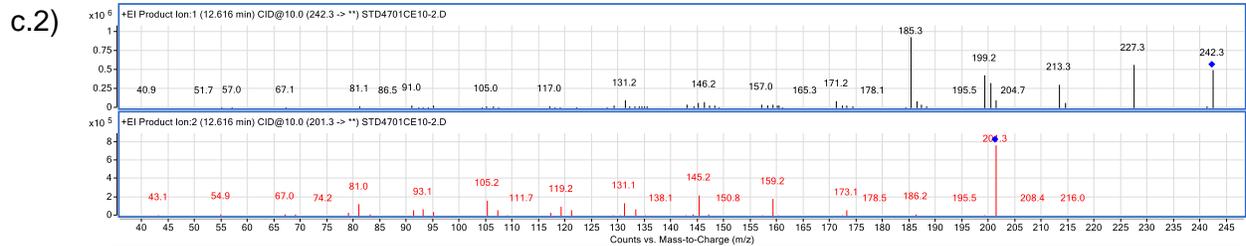
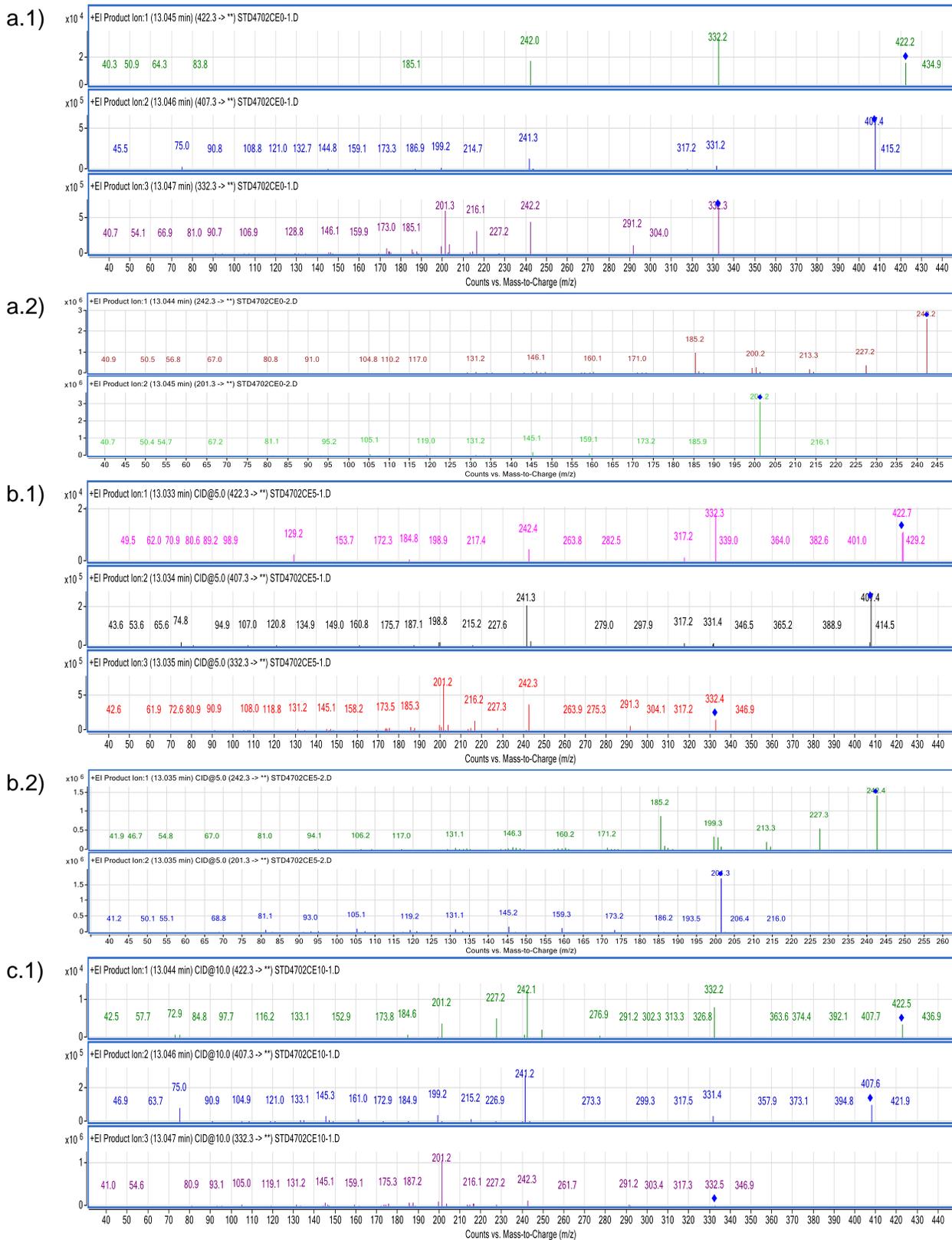


Figure A- 11 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 5 α -estran-3 β ,17 β -diol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



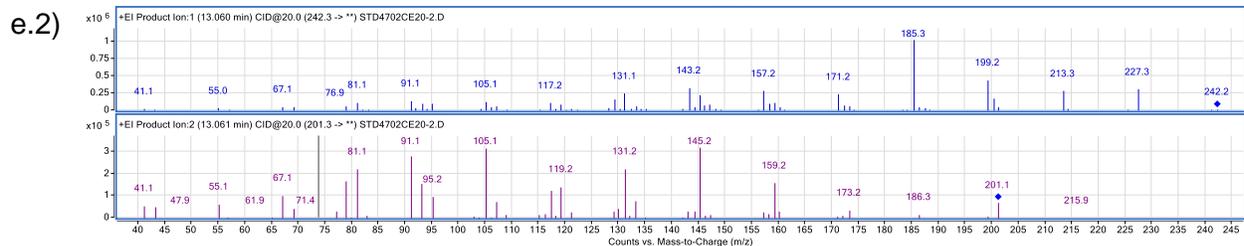
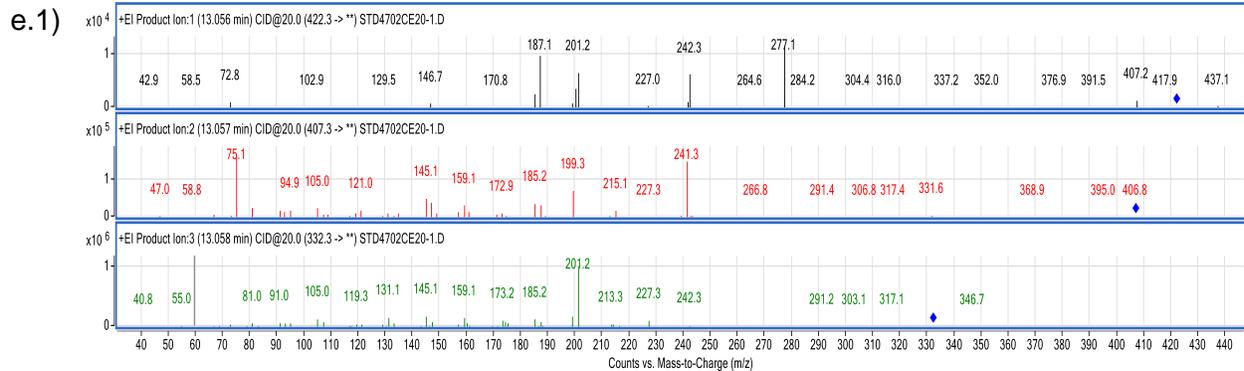
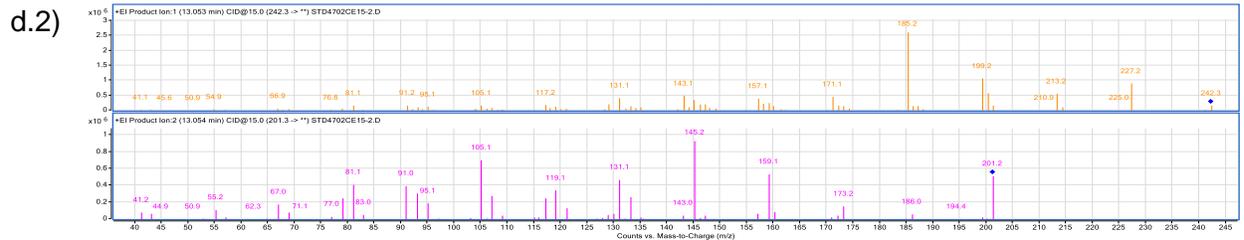
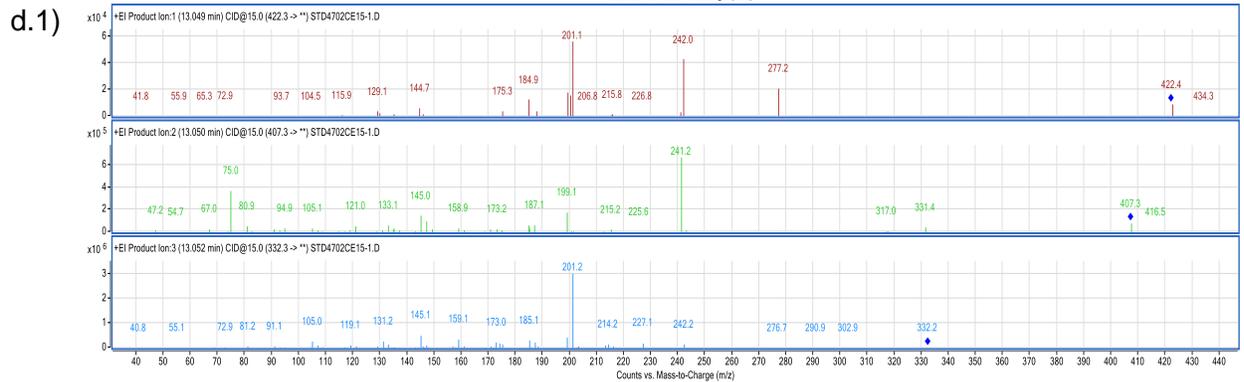
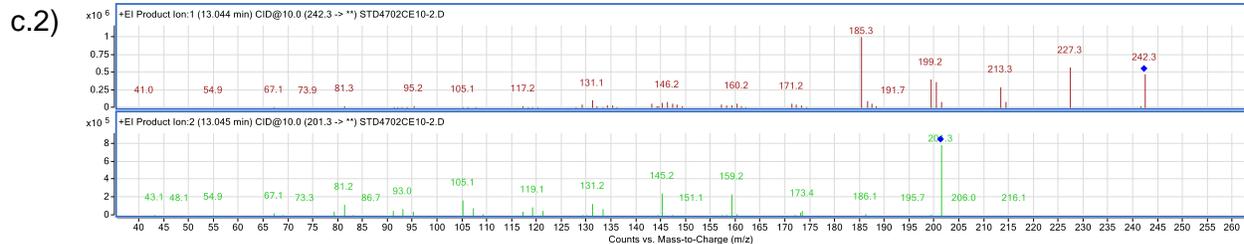
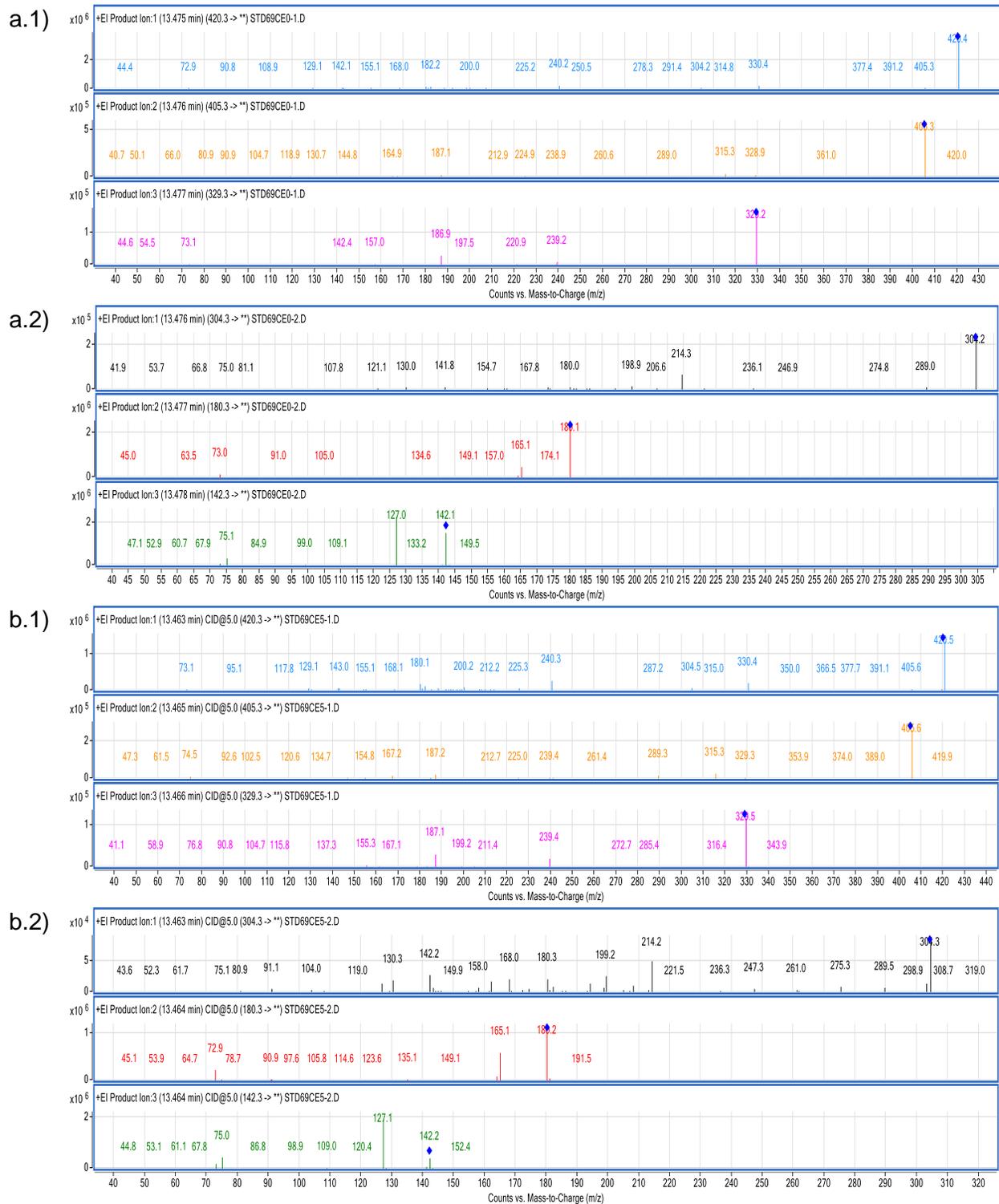
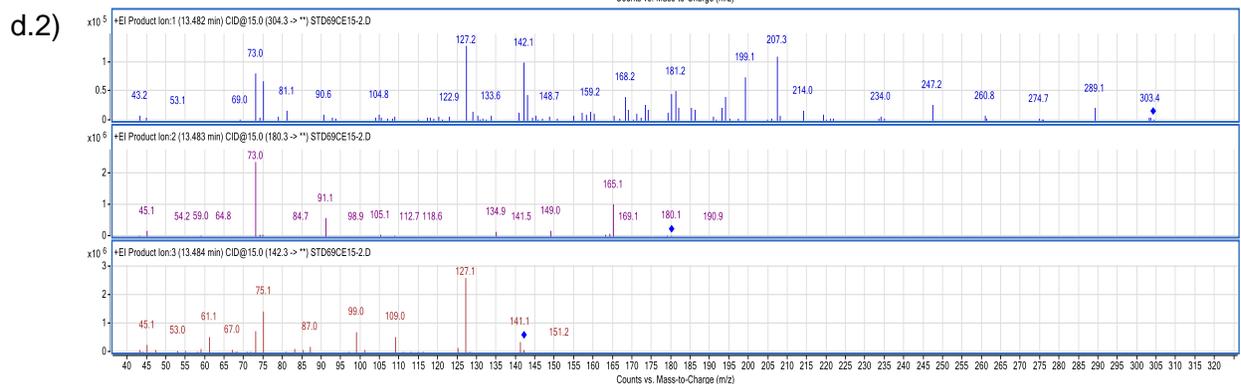
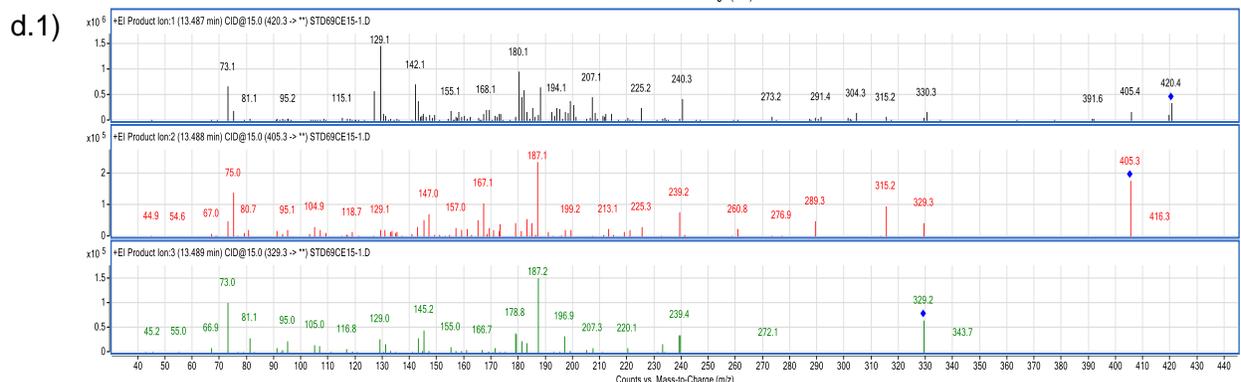
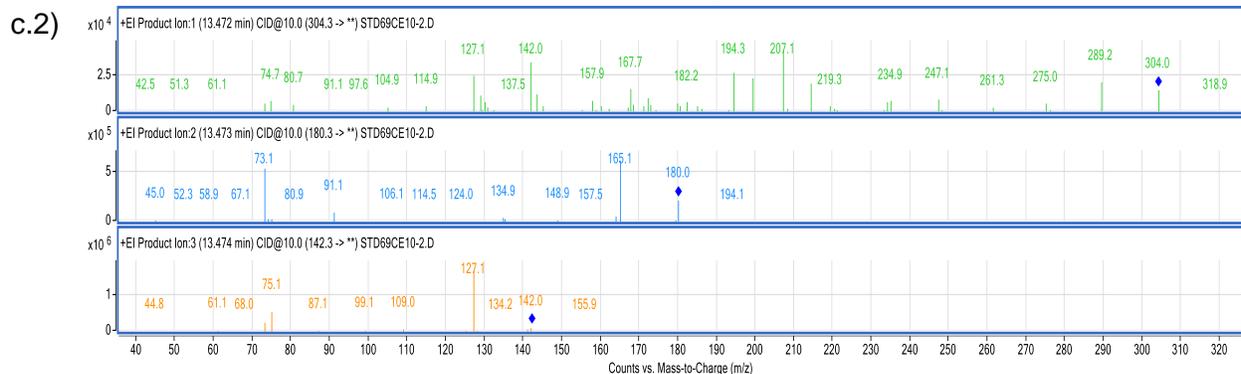
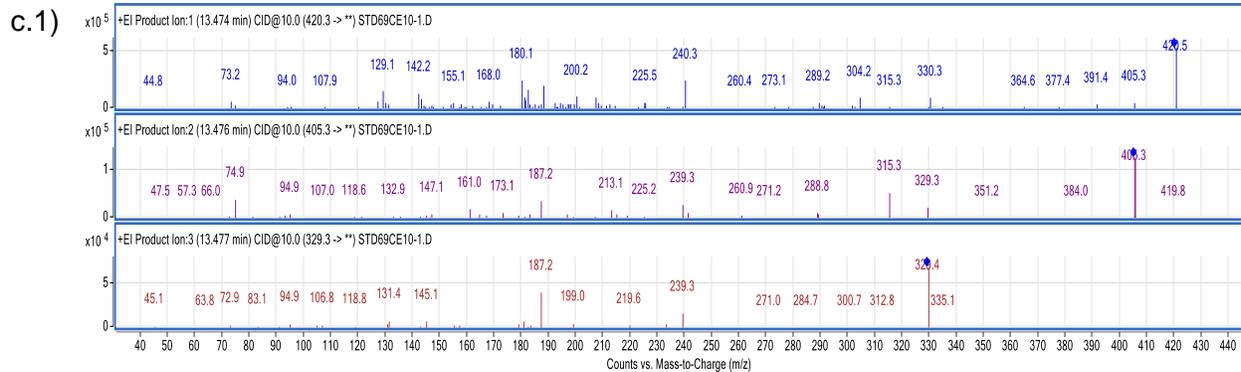


Figure A- 12 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 5 α -estran-3-one-17 β -ol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.





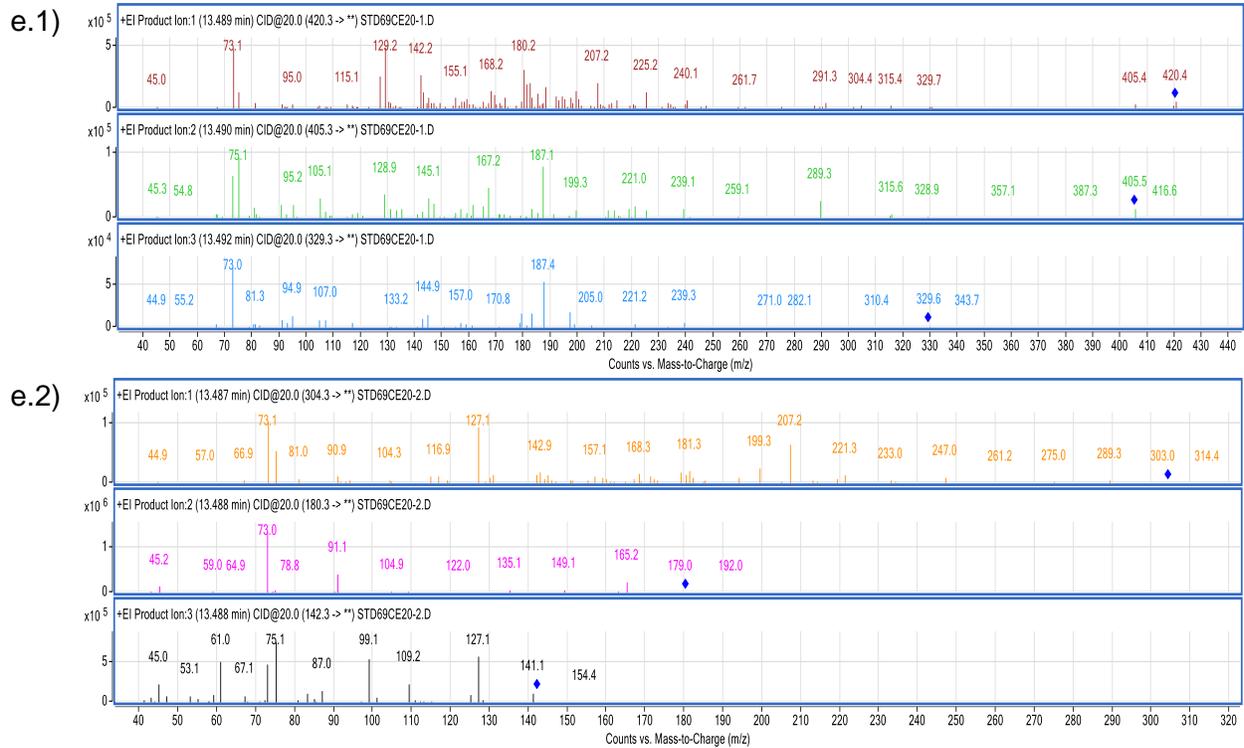
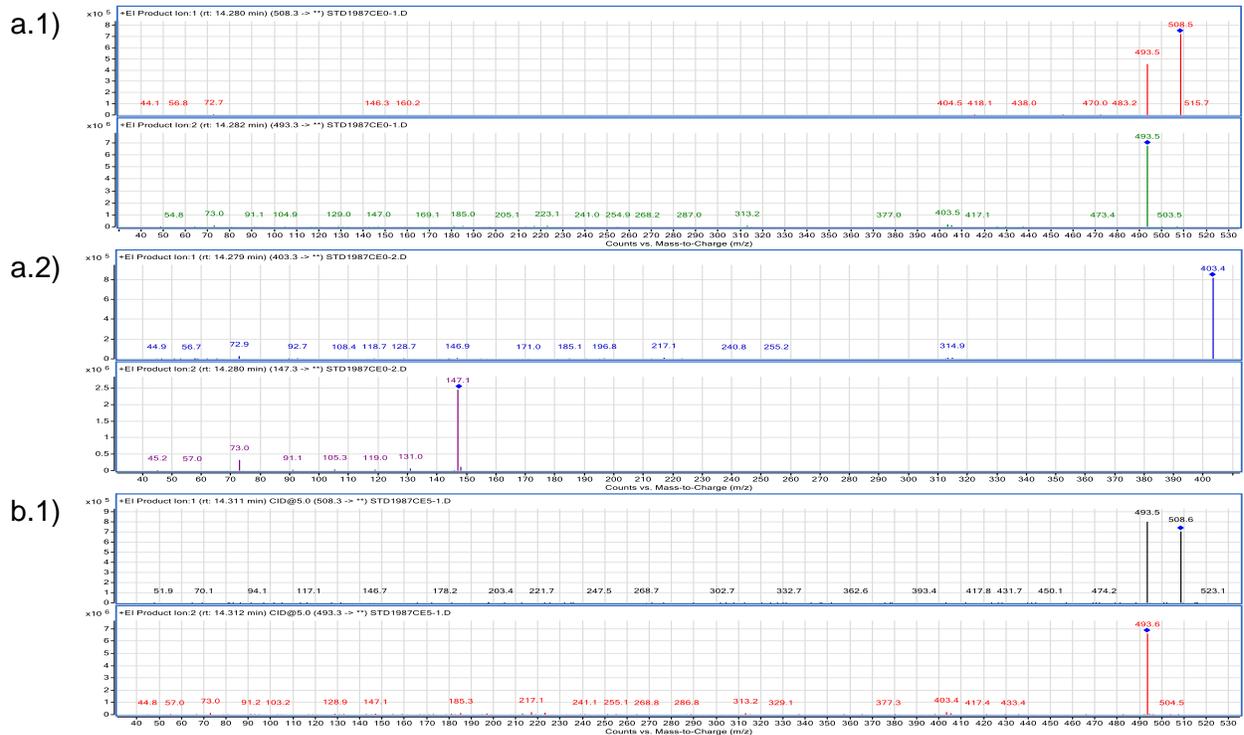


Figure A-13 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 16 α -hydroxy-NA aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



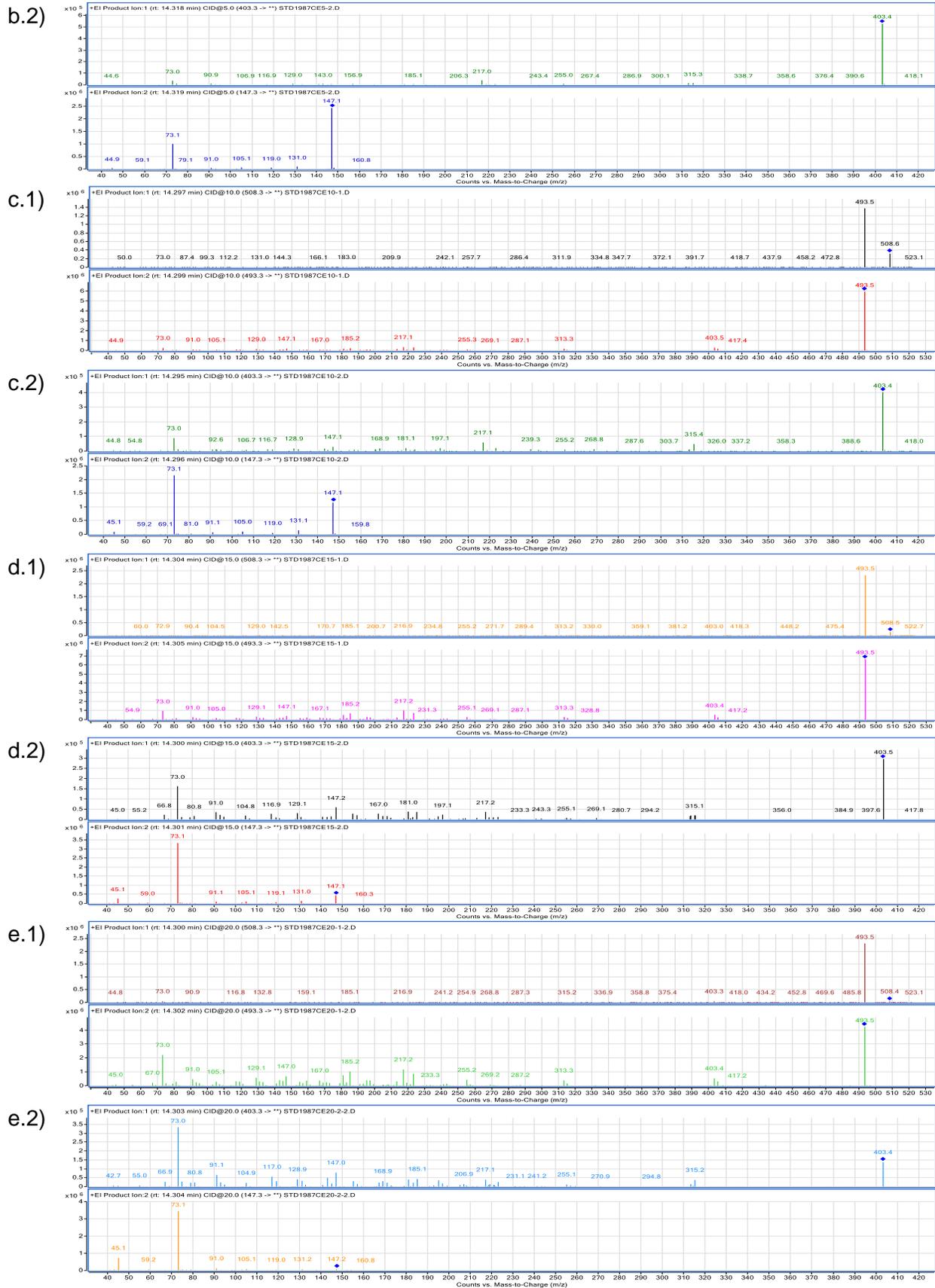
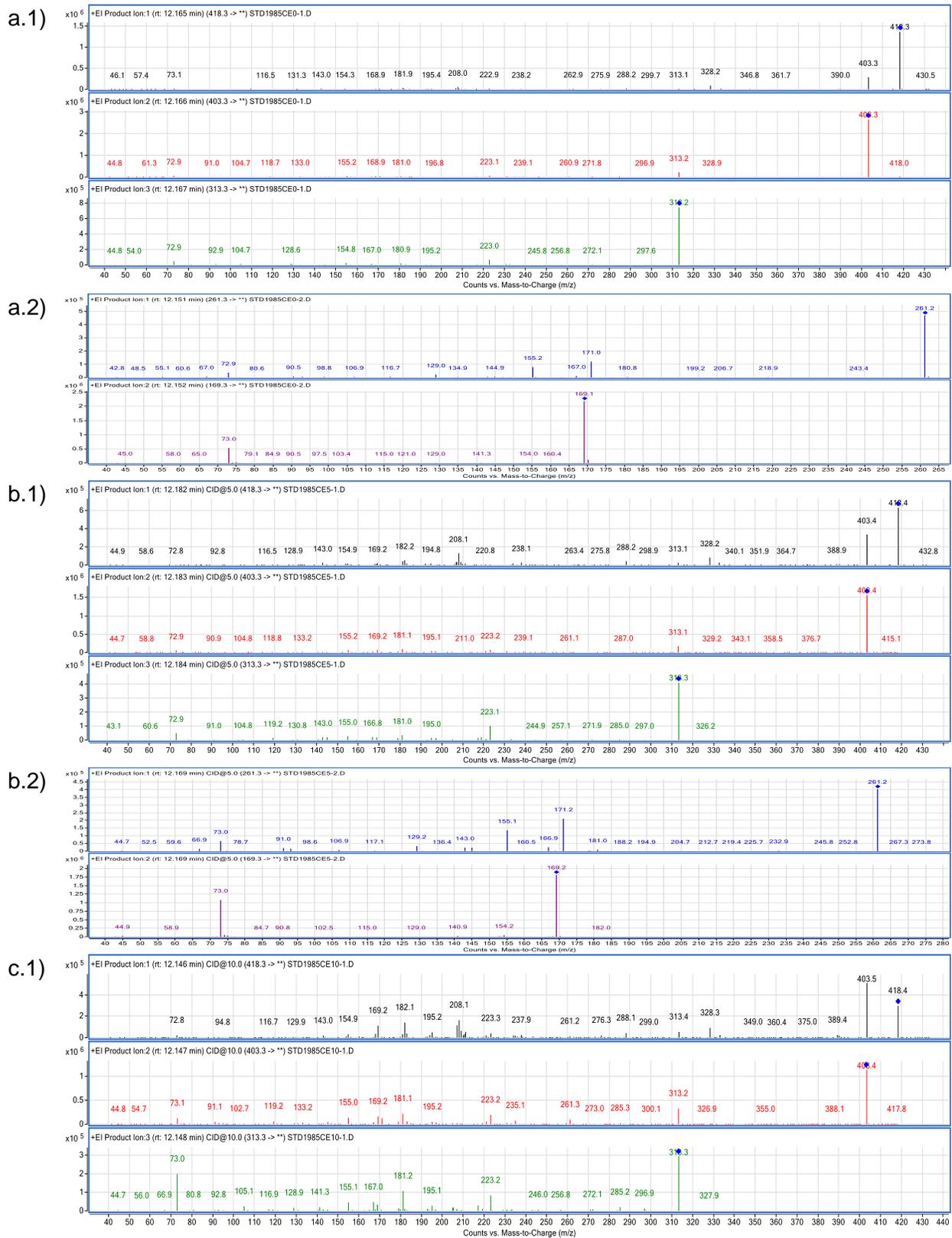


Figure A- 14 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés de la 5 β -estran-3,17-dione aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.



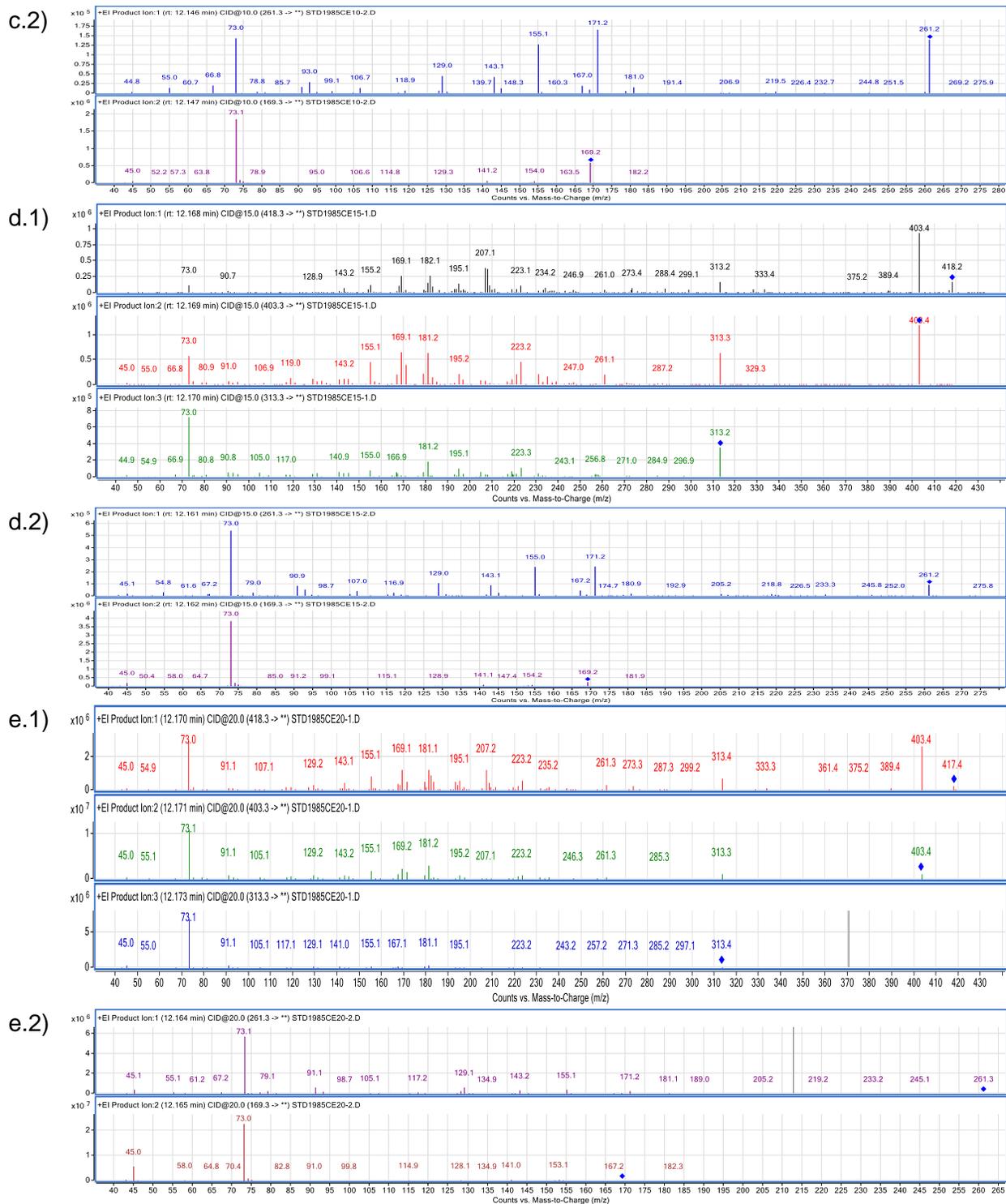
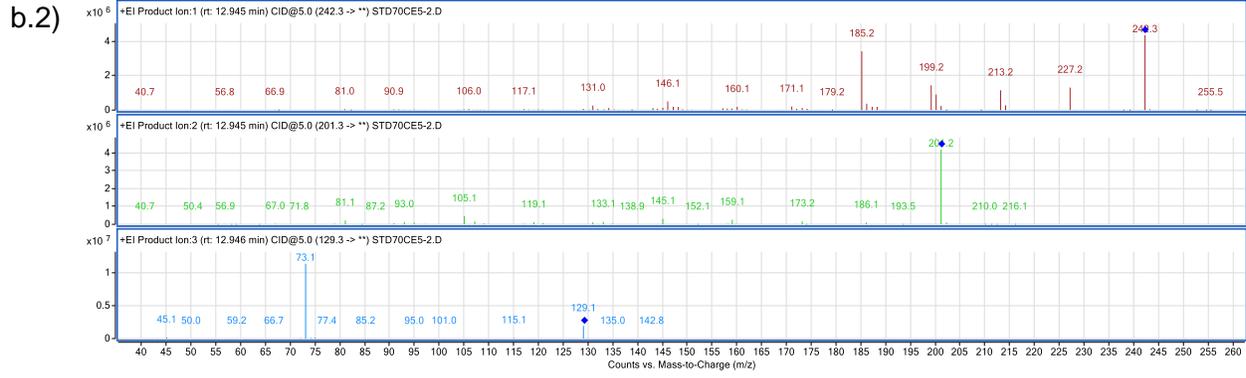
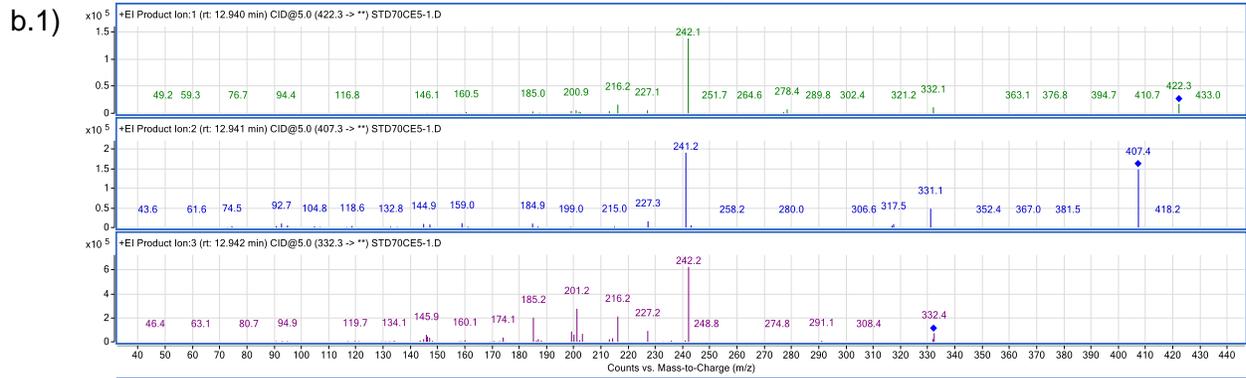
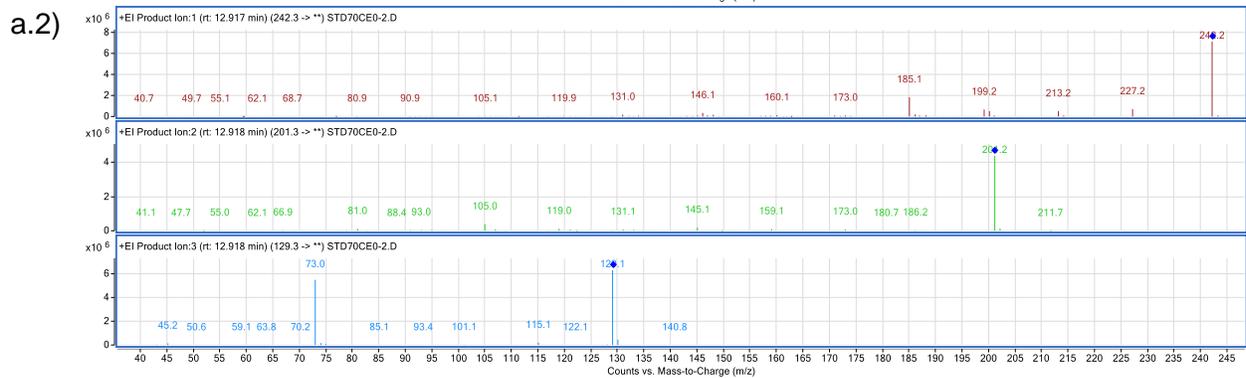
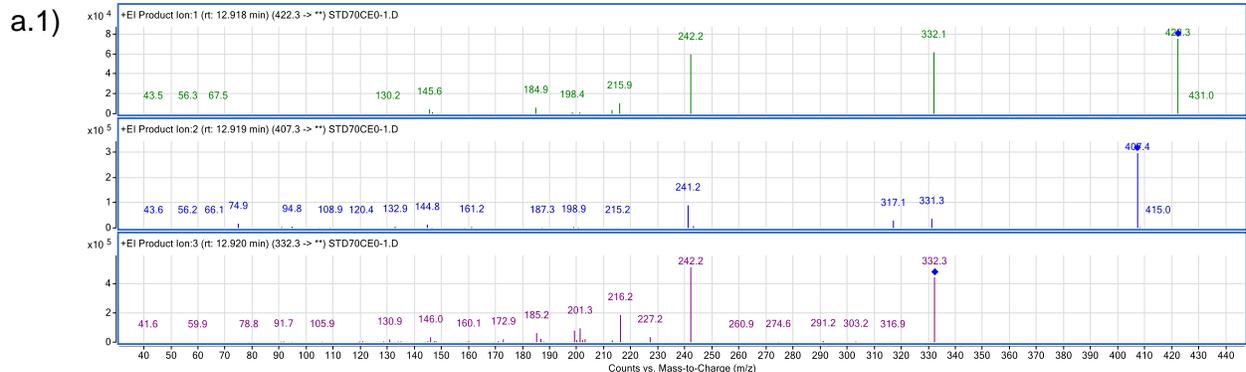
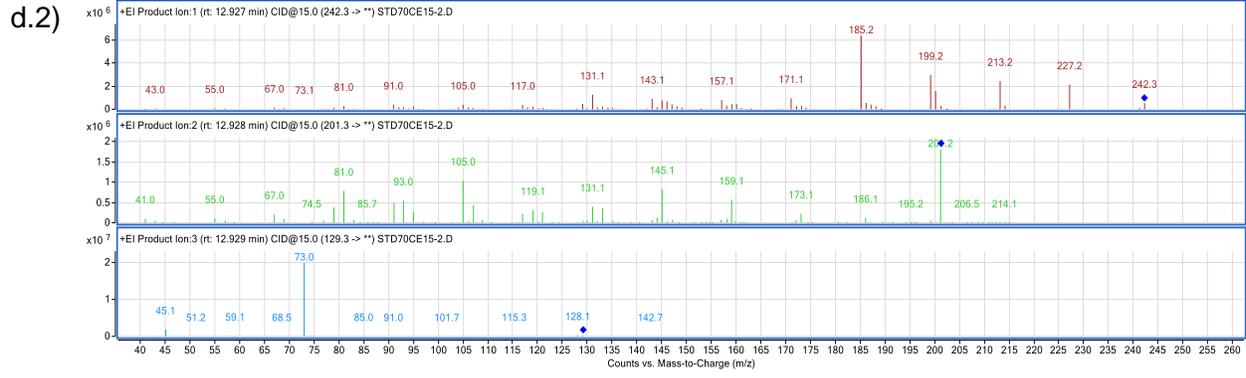
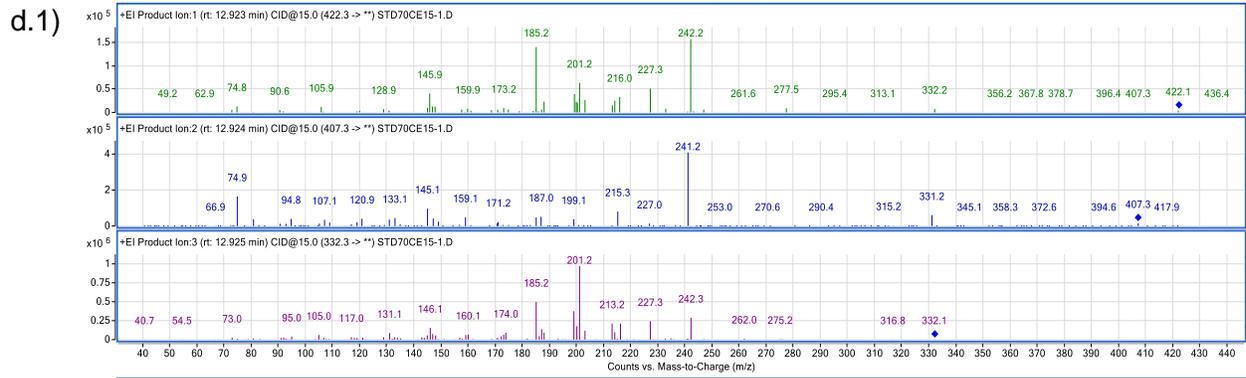
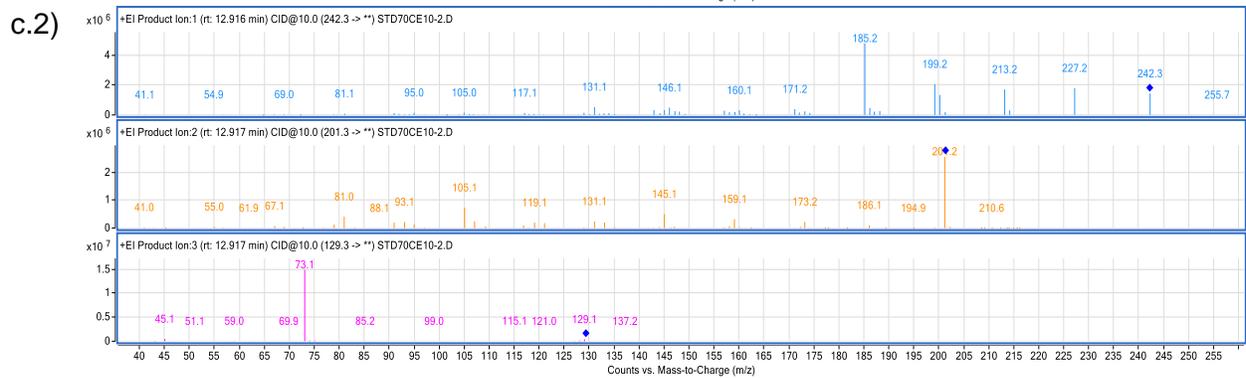
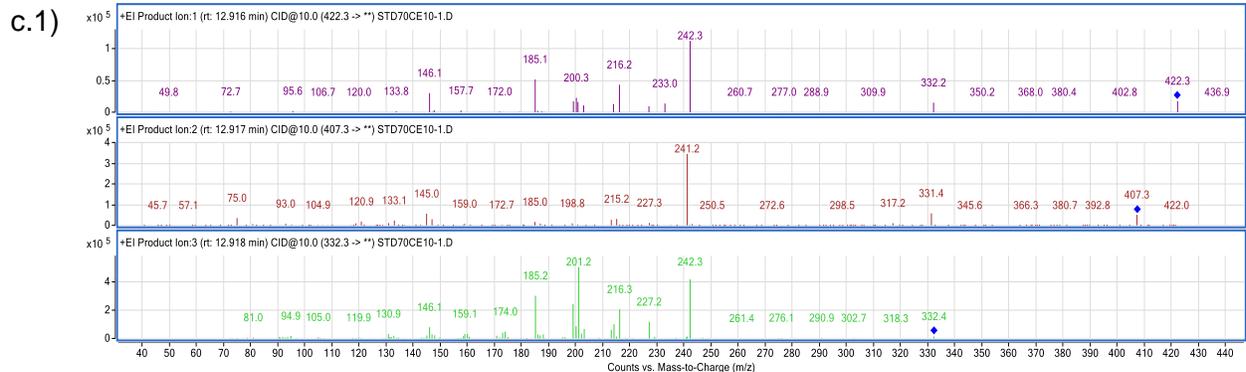


Figure A- 15 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 5 β -estrane-3 α ,17 β -diol aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.





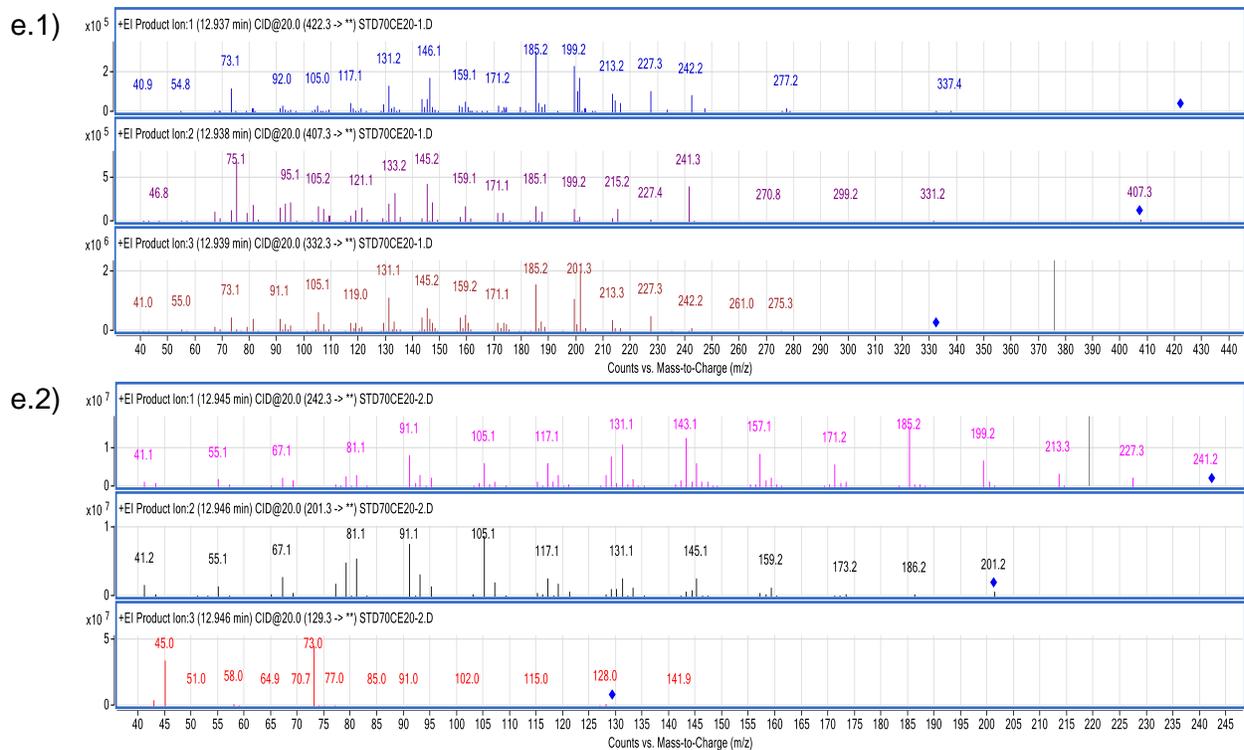
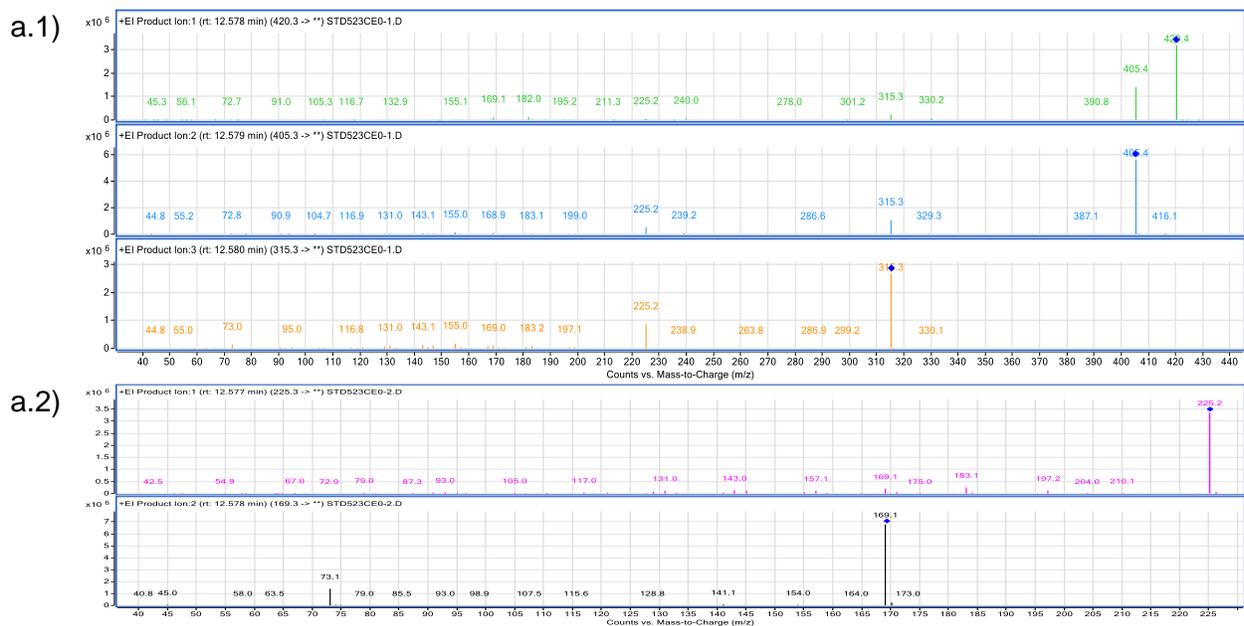
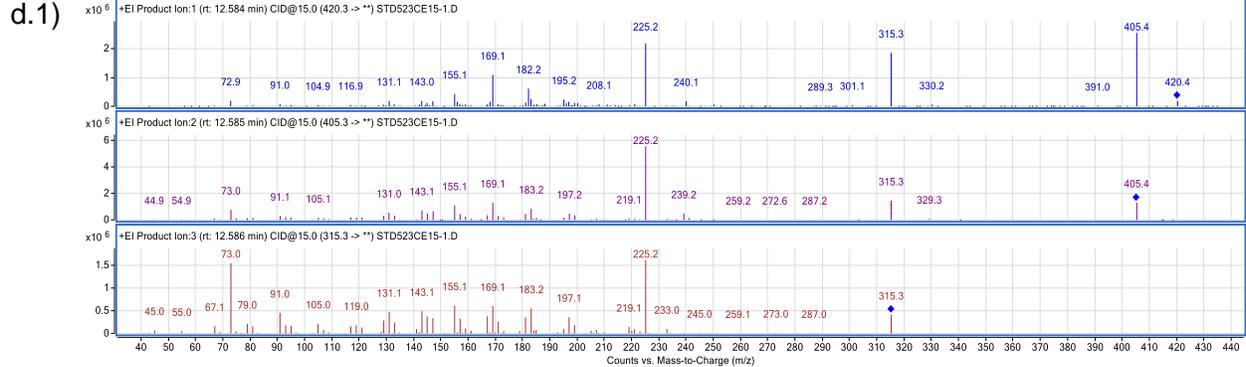
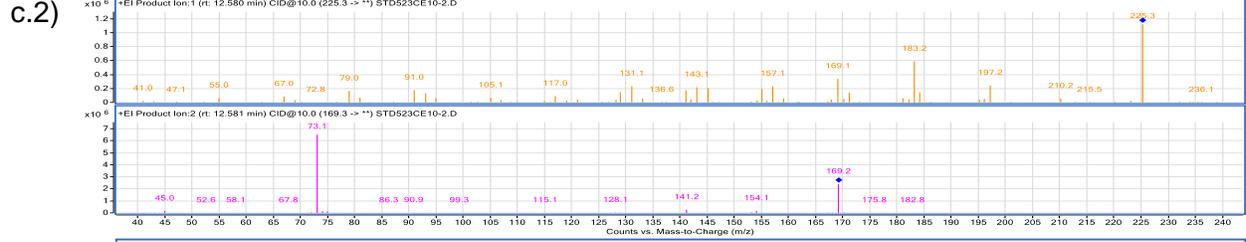
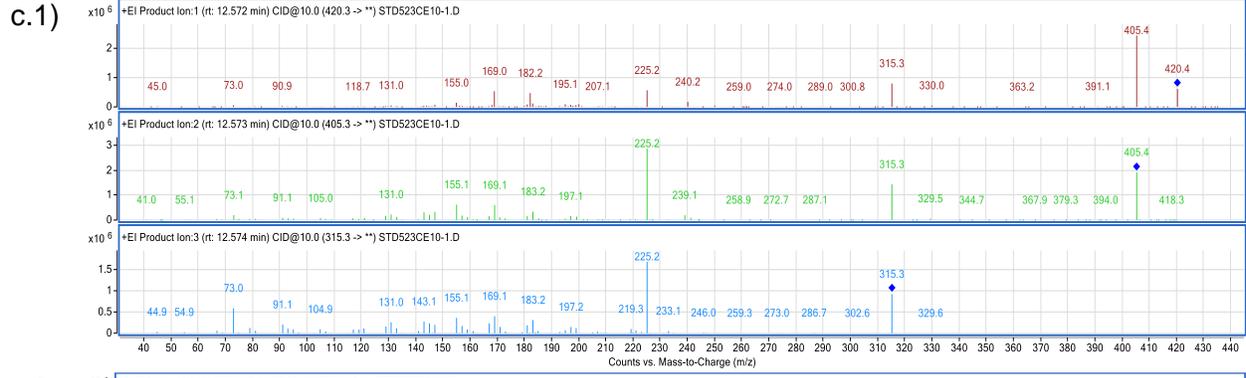
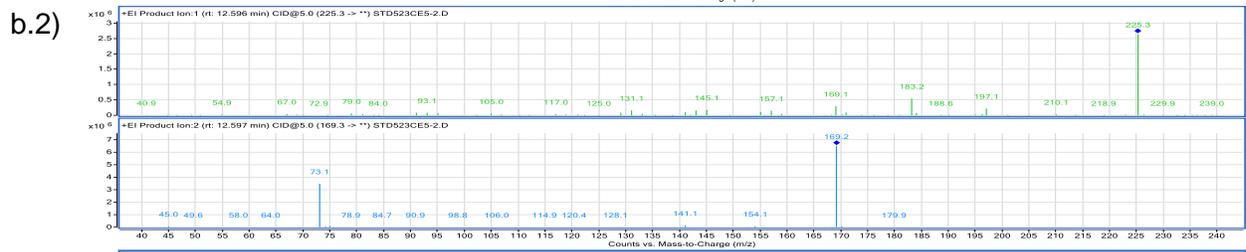
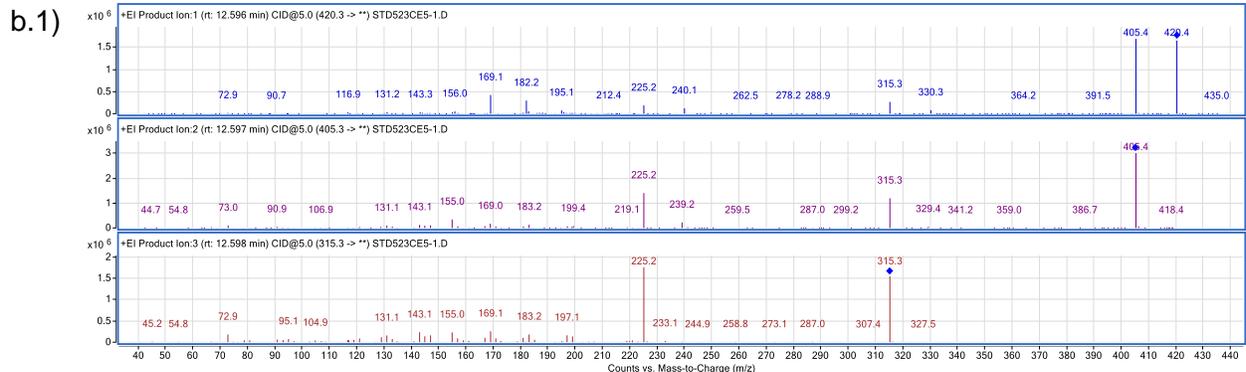
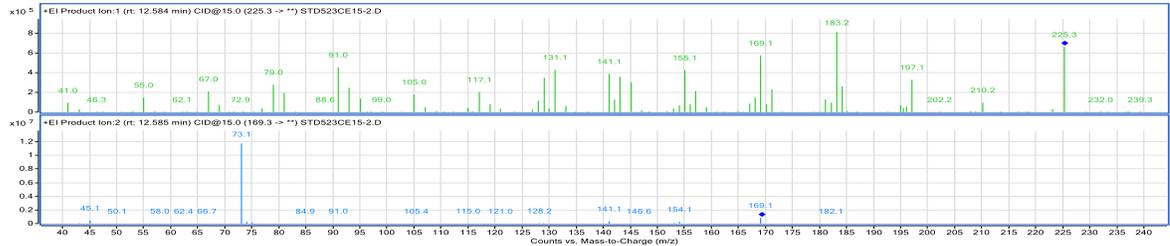


Figure A-16 : Spectres de masse des différents ions précurseurs sélectionnés du 19-NEE aux énergies de collision suivantes a) 0 eV, b) 5 eV, c) 10 eV, d) 15 eV, e) 20 eV.

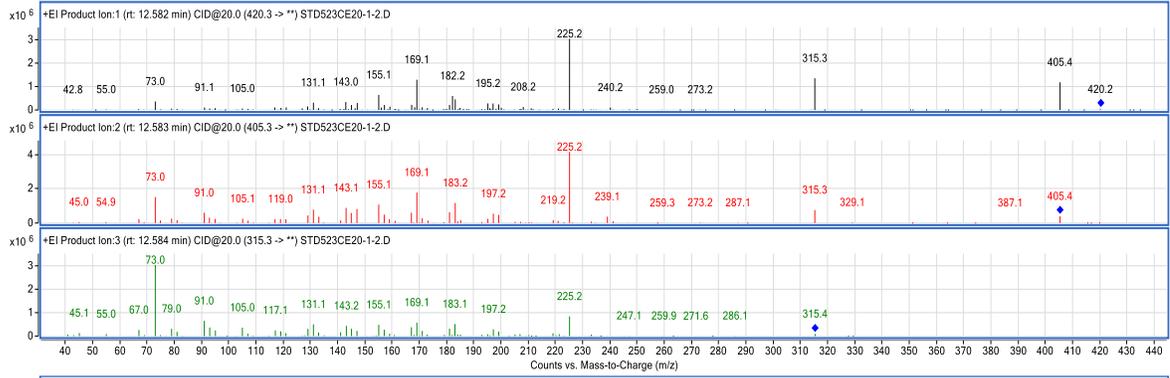




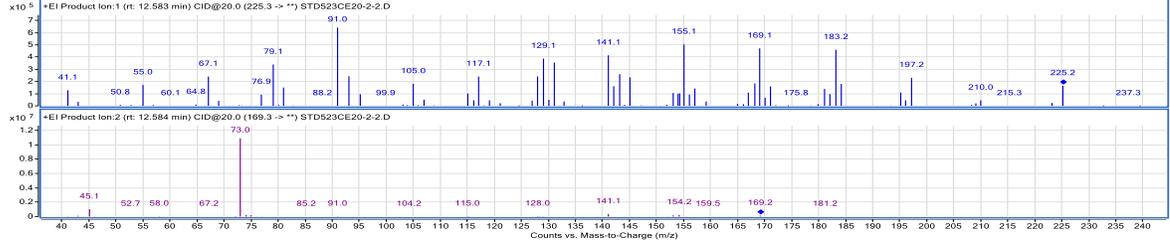
d.2)



e.1)



e.2)



ANNEXE III : GRAPHIQUES DE L'ABONDANCE DES ION FRAGMENTS EN FONCTION DE L'ÉNERGIE DE COLLISION APPLIQUÉE POUR FRAGMENTER LES MÉTABOLITES

Figure A-17 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 19-NT : a) 418 → 287, b) 418 → 194, c) 418 → 182, d) 403 → 327, e) 403 → 313, f) 403 → 287, g) 403 → 271 du 4-estrène-3-one-17β-ol.

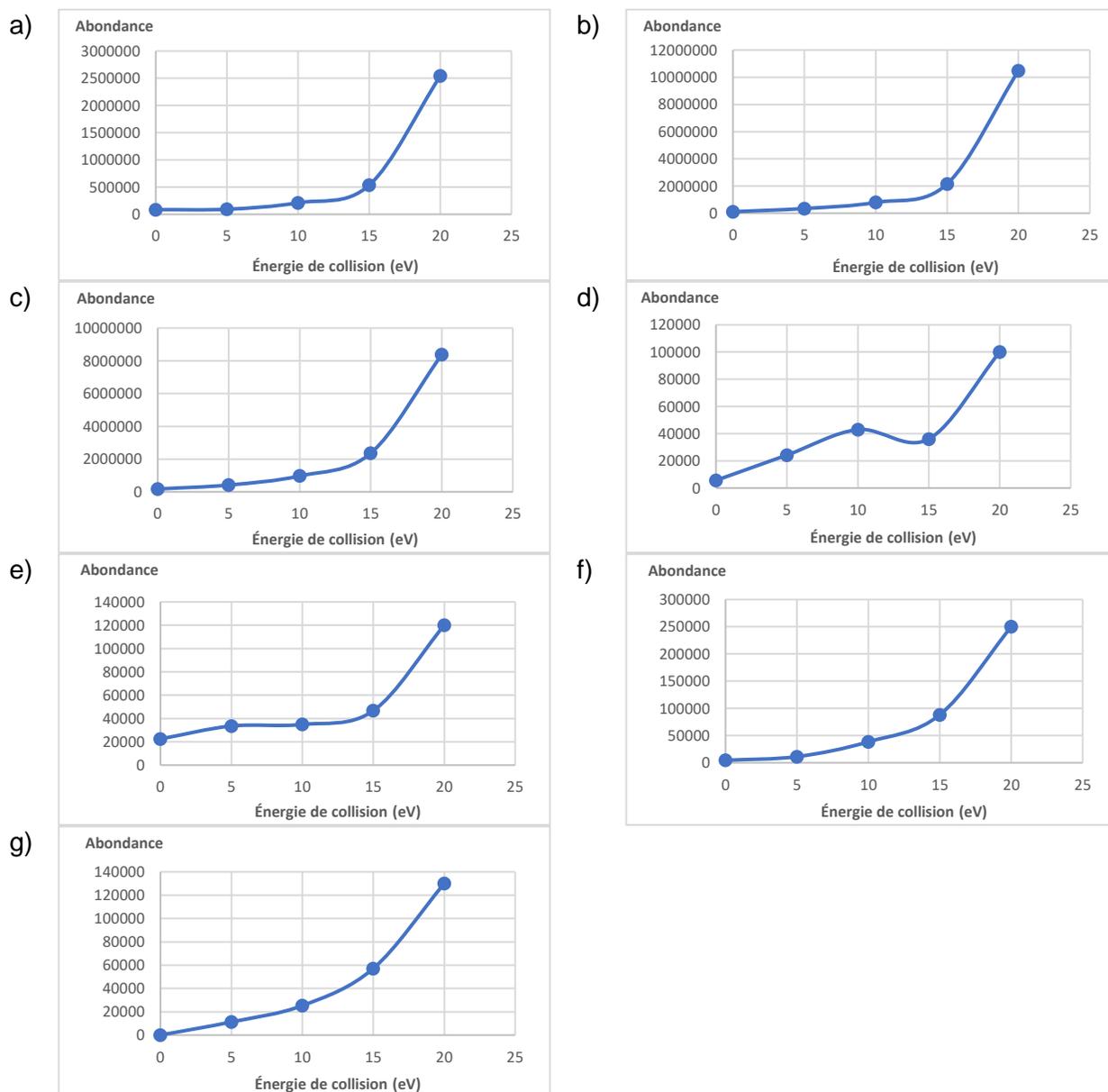


Figure A-18 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du nordione : a) 416 → 401, b) 416 → 234, c) 416 → 220, d) 401 → 311, e) 401 → 219, f) 401 → 207, g) 194 → 179.

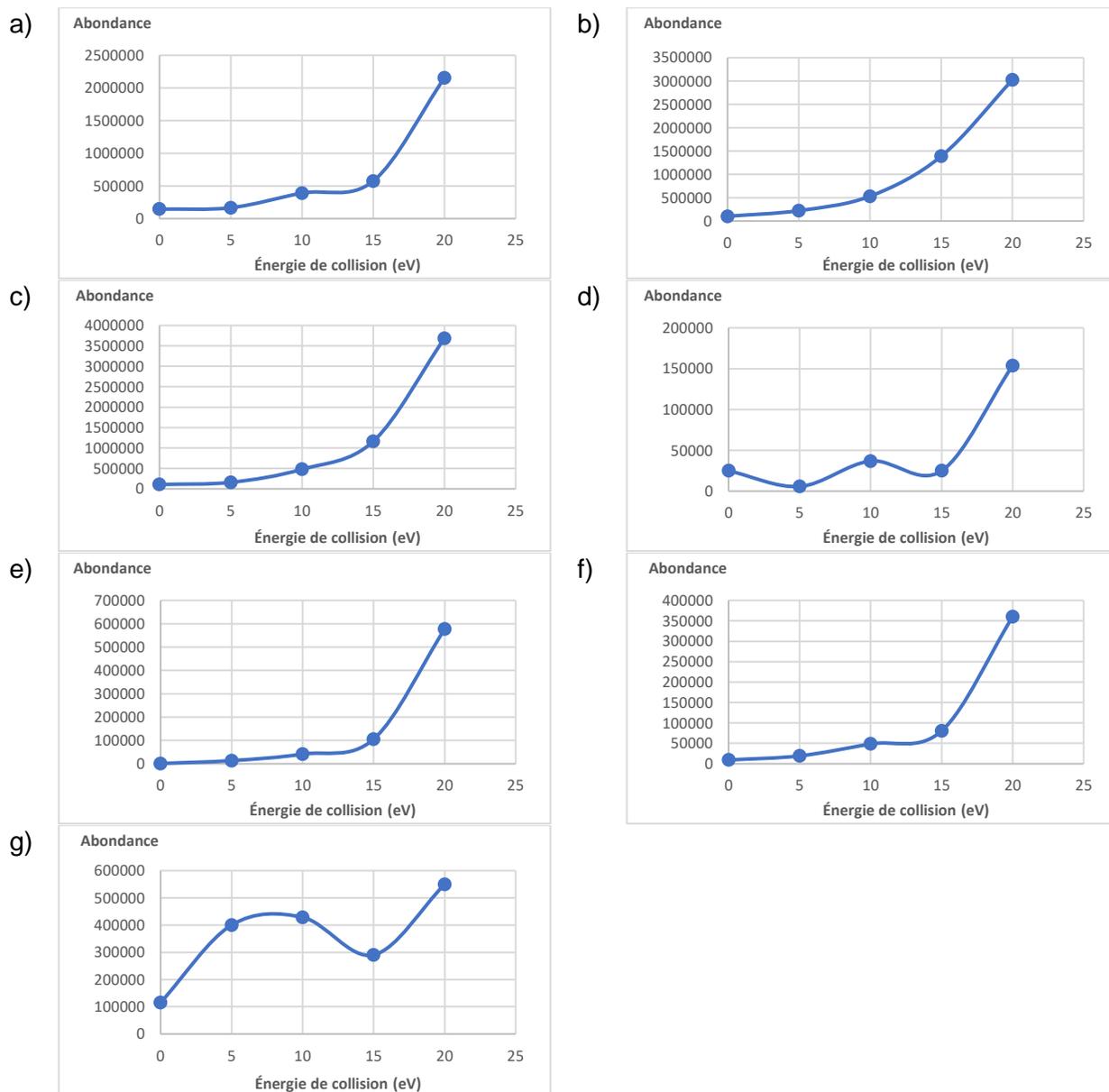


Figure A-19 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 4-estrène-3 α ,17 β -diol : a) 419 \rightarrow 391, b) 419 \rightarrow 330, c) 419 \rightarrow 240, d) 419 \rightarrow 182, e) 405 \rightarrow 239, f) 330 \rightarrow 240.

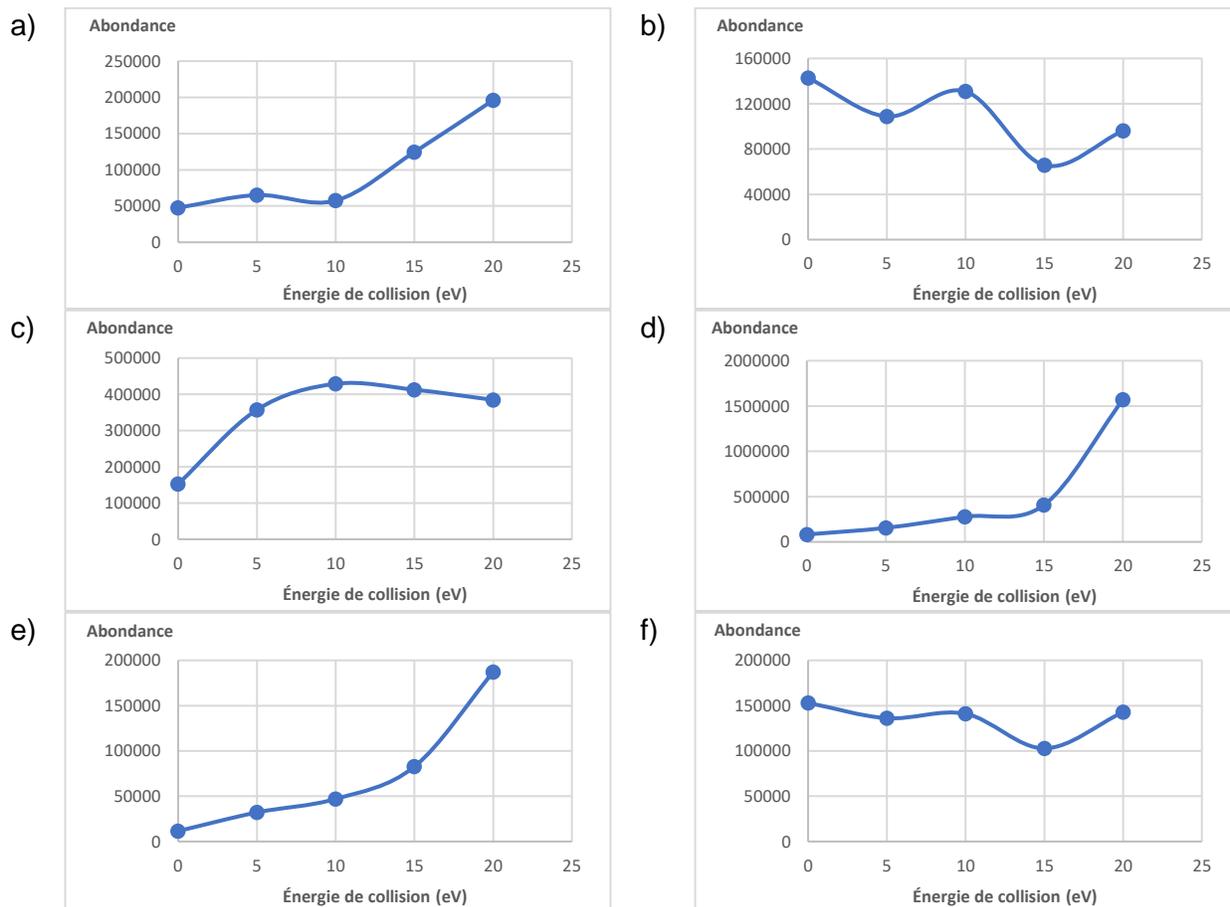
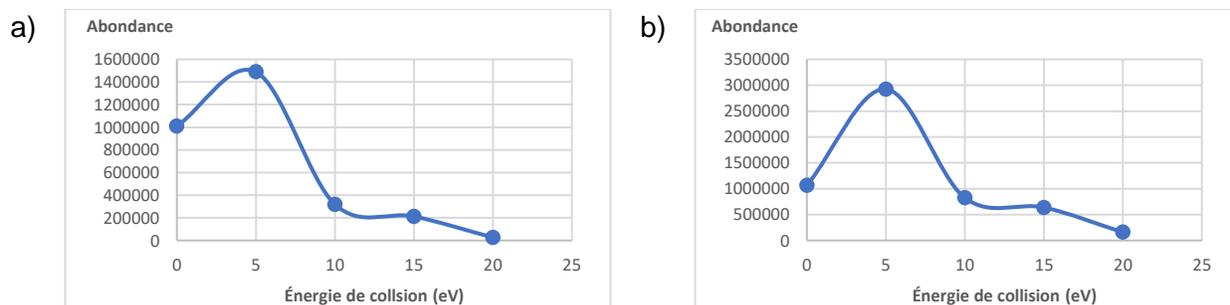


Figure A-20 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 4-estrène-3 β ,17 β -diol : a) 420 \rightarrow 330, b) 420 \rightarrow 240, c) 420 \rightarrow 207, d) 420 \rightarrow 182, e) 405 \rightarrow 239, f) 405 \rightarrow 225, g) 330 \rightarrow 225, h) 330 \rightarrow 199.



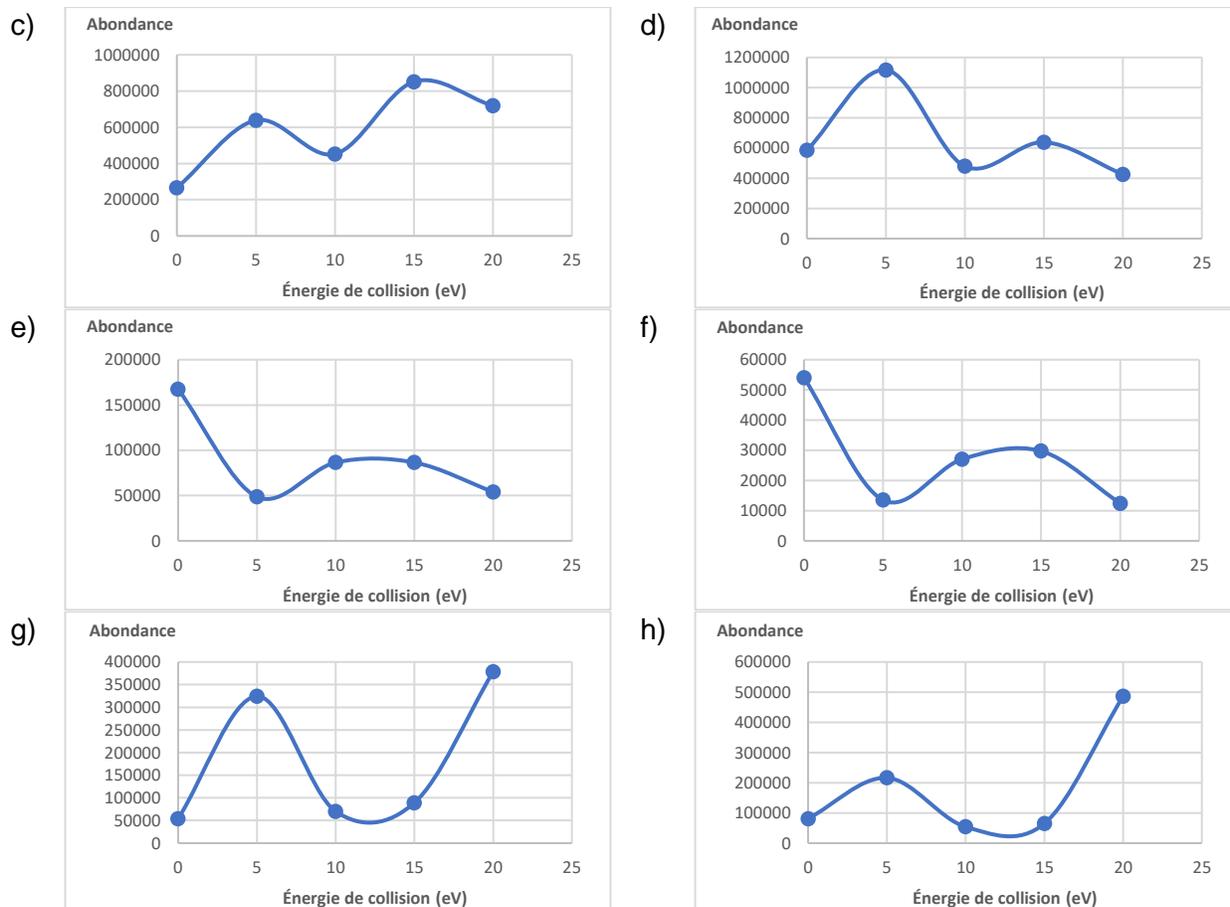
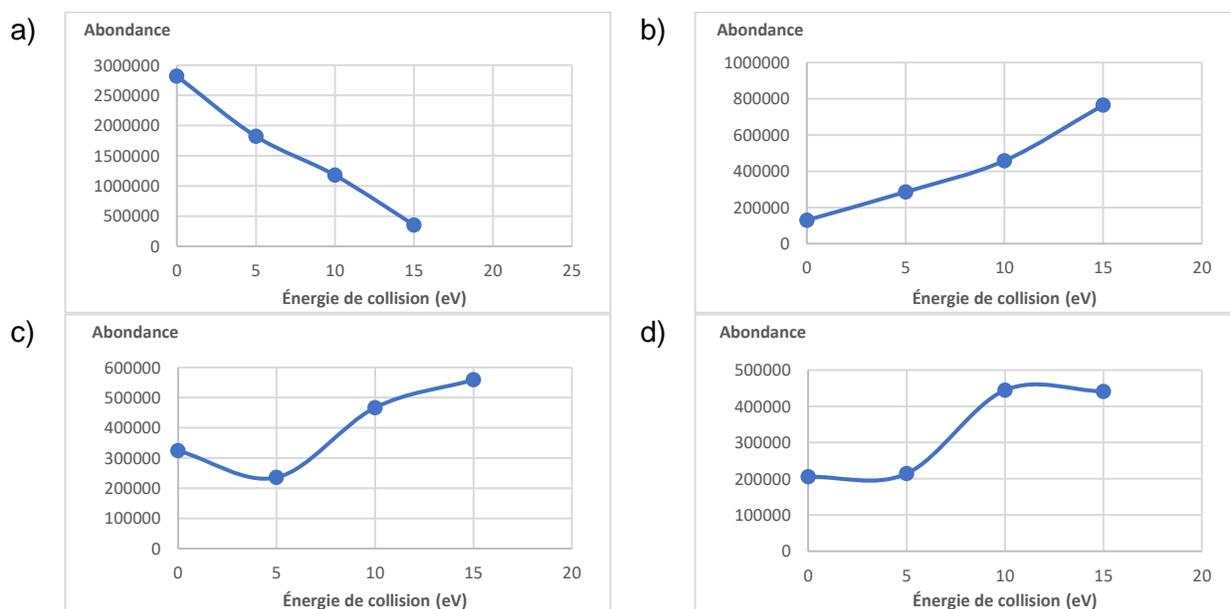


Figure A-21 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du norDHEA : a) 418 → 328, b) 418 → 313, c) 418 → 182, d) 418 → 169, e) 403 → 237, f) 403 → 223.



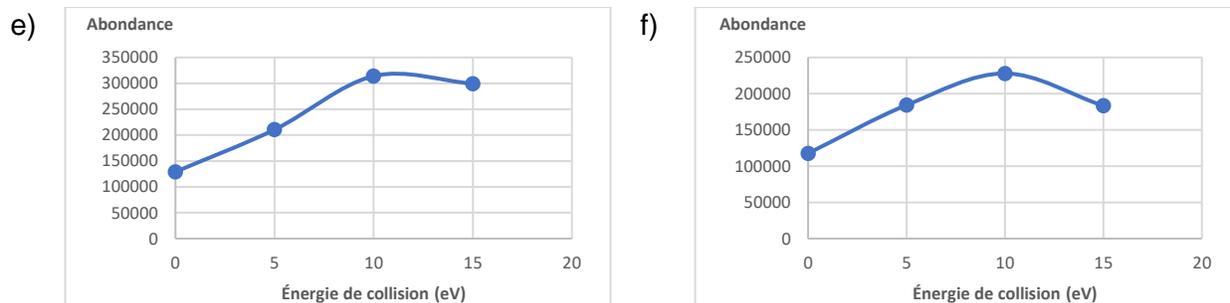


Figure A-22 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation de la 4-estrén-6 β -ol-3,17-dione: a) 489 \rightarrow 399, b) 489 \rightarrow 206, c) 489 \rightarrow 147, d) 489 \rightarrow 169.

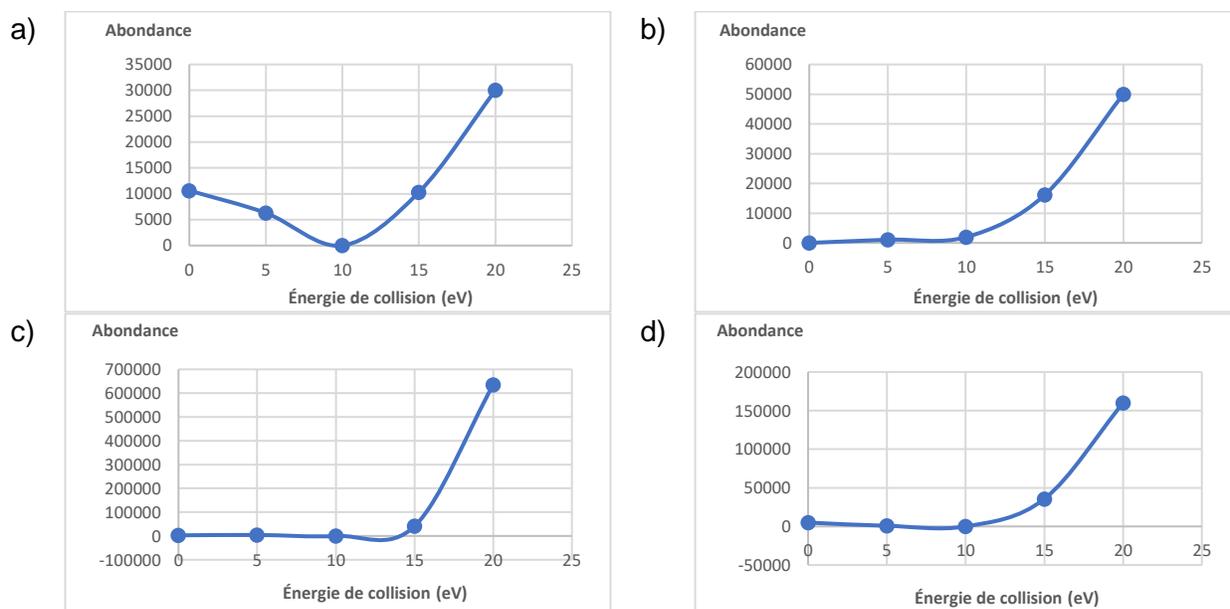
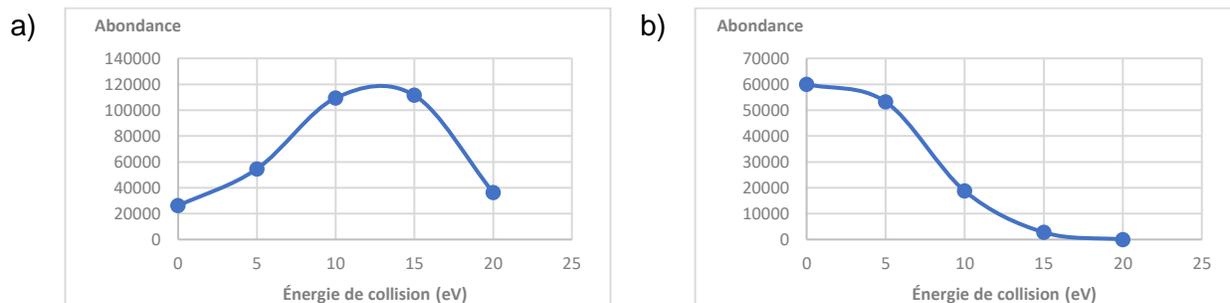


Figure A-23 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 5 α -estran-3 α ,17 β -diol : a) 422 \rightarrow 337, b) 422 \rightarrow 332, c) 422 \rightarrow 242, d) 422 \rightarrow 146, e) 407 \rightarrow 241, f) 407 \rightarrow 199, g) 332 \rightarrow 201, h) 332 \rightarrow 242.



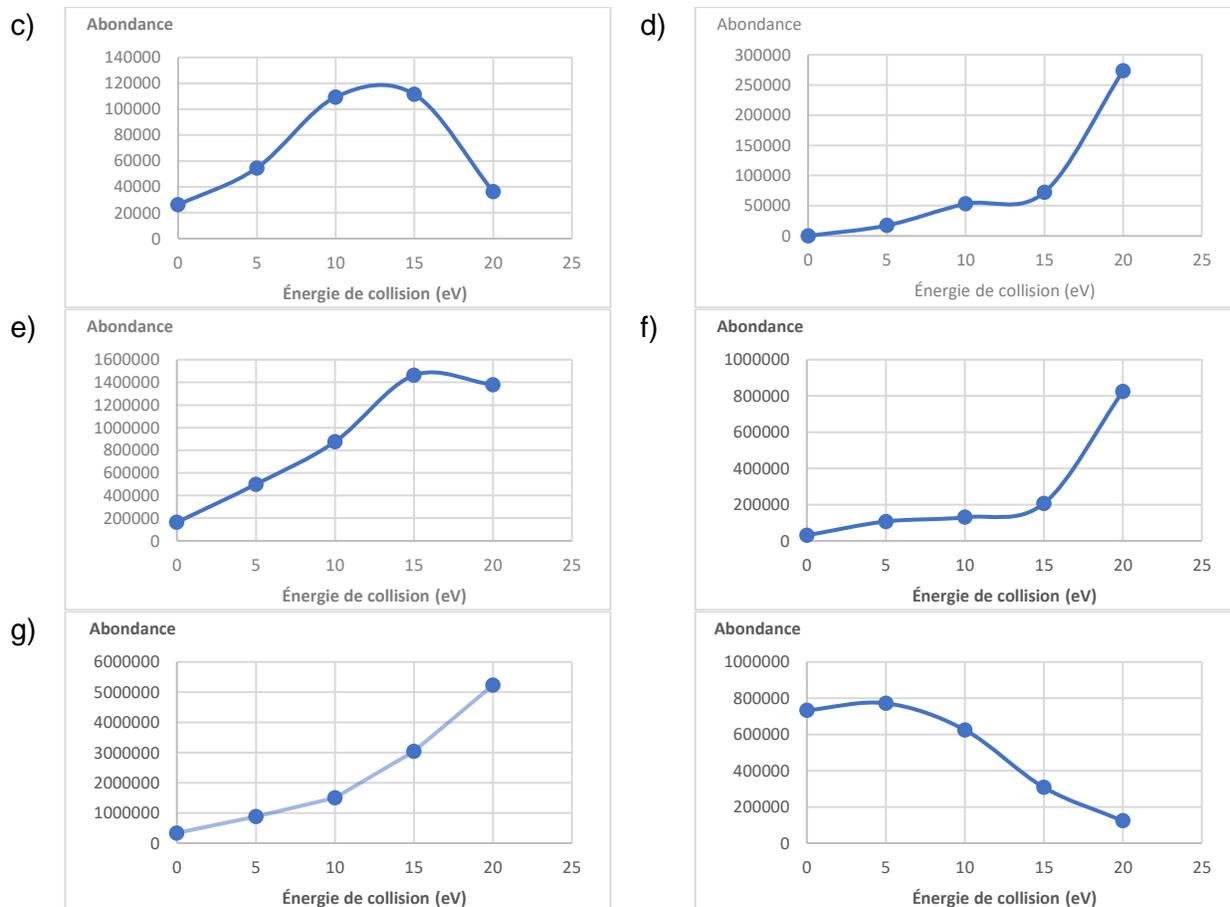
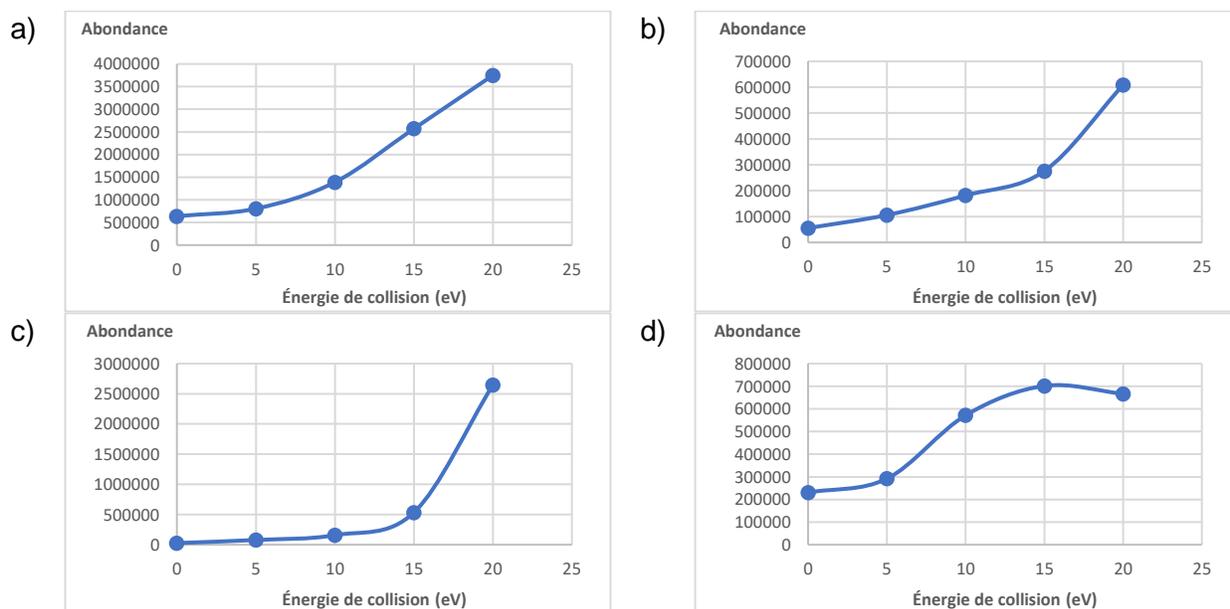


Figure A-24 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation de la 5 α -estran-3,17-dione : a) 418 → 403, b) 418 → 182, c) 418 → 169, d) 403 → 313, e) 403 → 261, f) 403 → 223, g) 403 → 171, h) 261 → 171, i) 261 → 155.



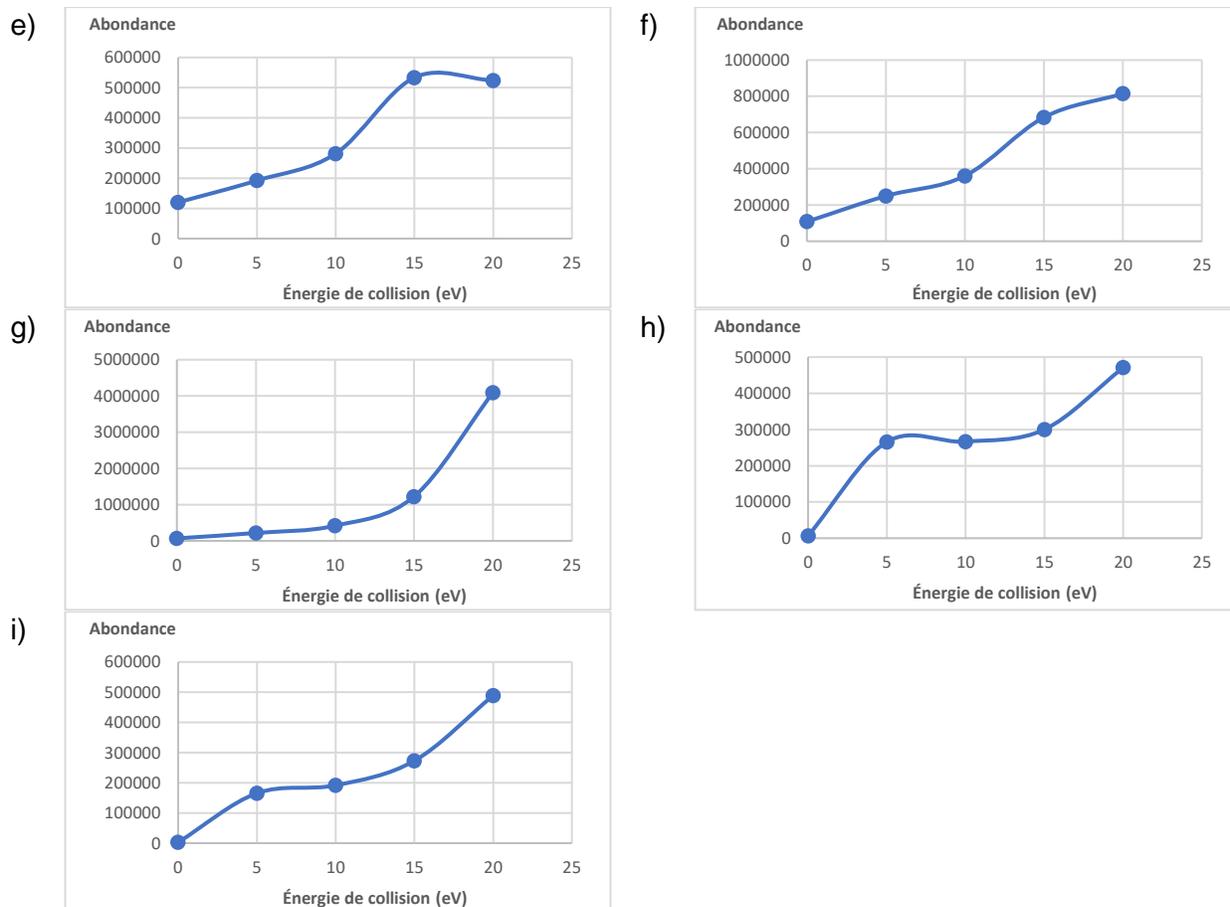
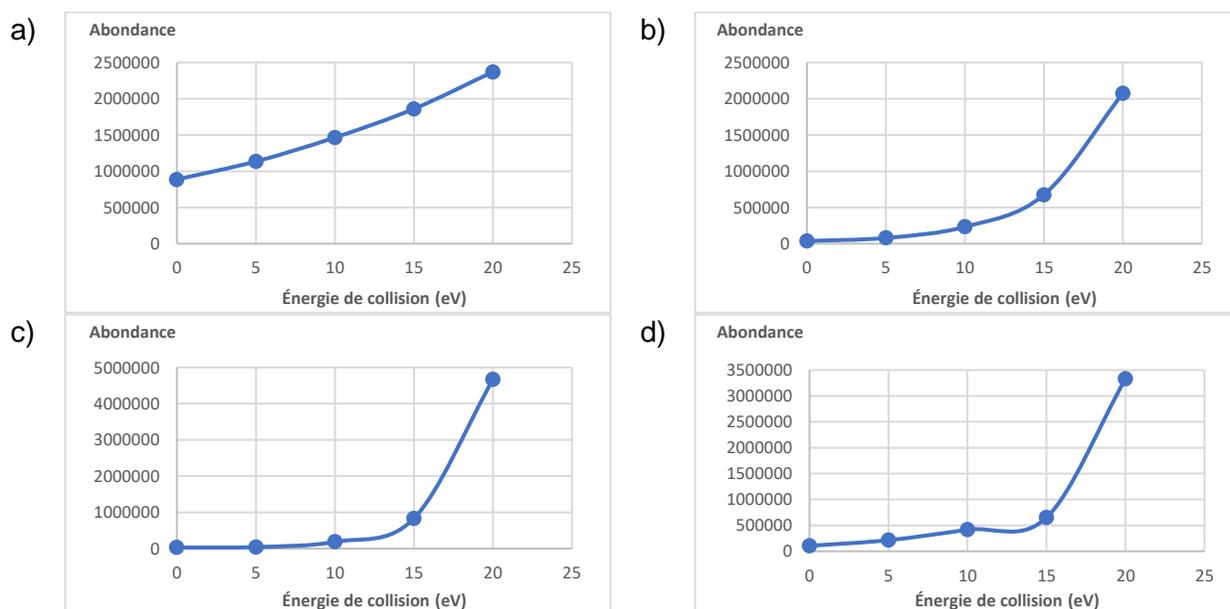


Figure A-25 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 19-NEA : a) 420 → 405, b) 420 → 315, c) 420 → 225, d) 420 → 169, e) 405 → 315, f) 405 → 225, g) 405 → 155.



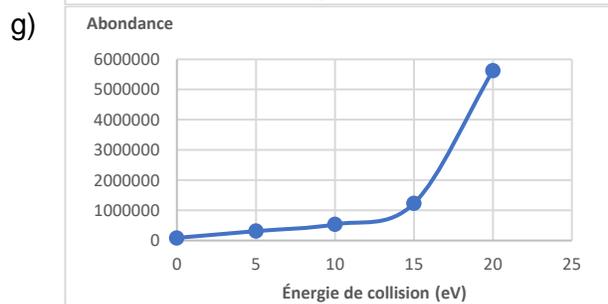
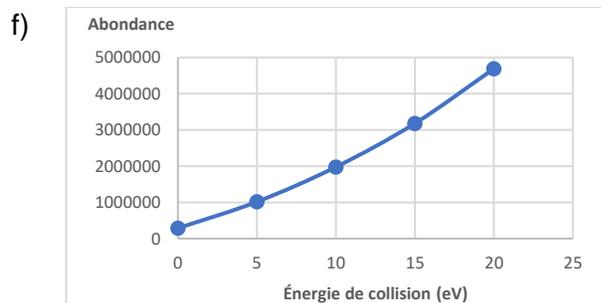
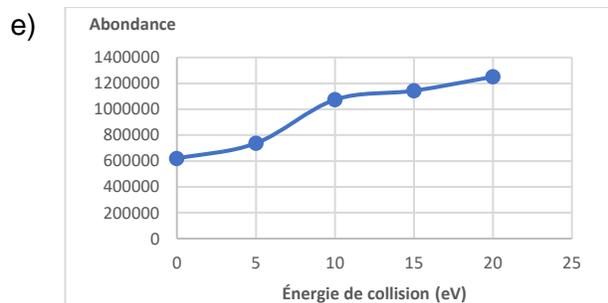
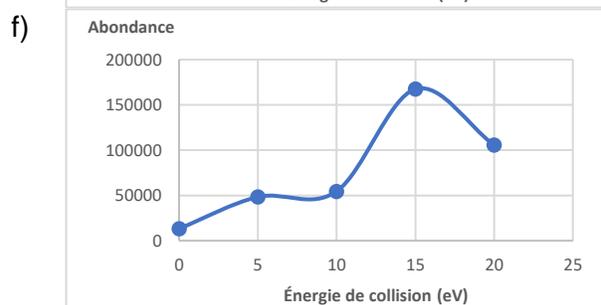
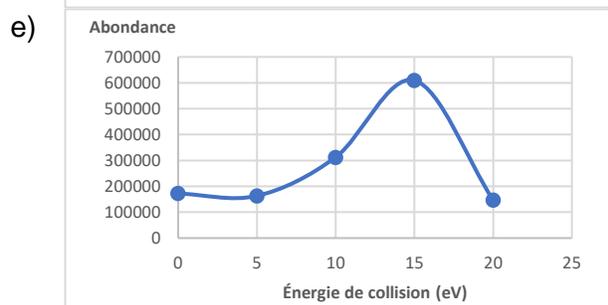
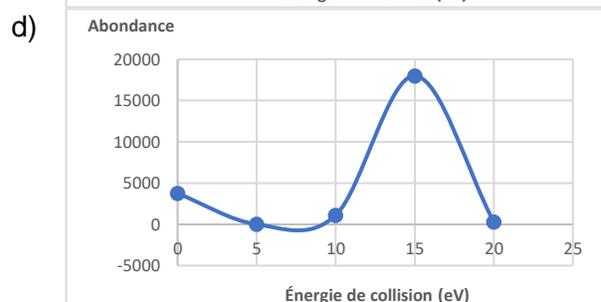
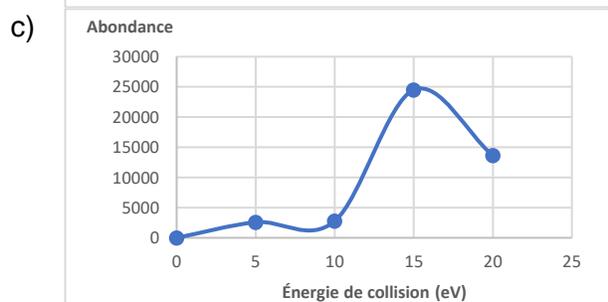
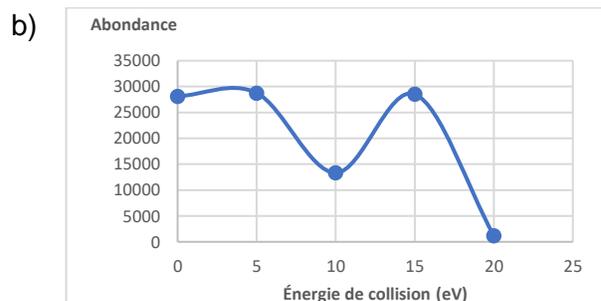
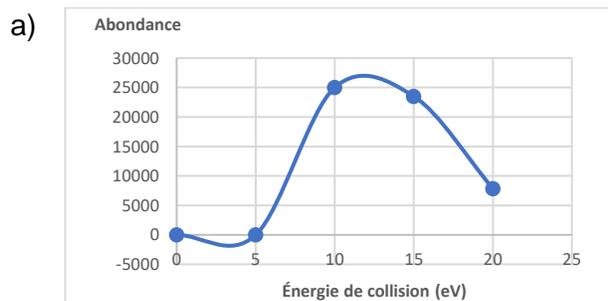


Figure A-26 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 5 α -estran-3 β ,17 α -diol : a) 421 \rightarrow 277, b) 421 \rightarrow 242, c) 421 \rightarrow 201, d) 421 \rightarrow 185, e) 407 \rightarrow 241, f) 407 \rightarrow 199, g) 332 \rightarrow 221.



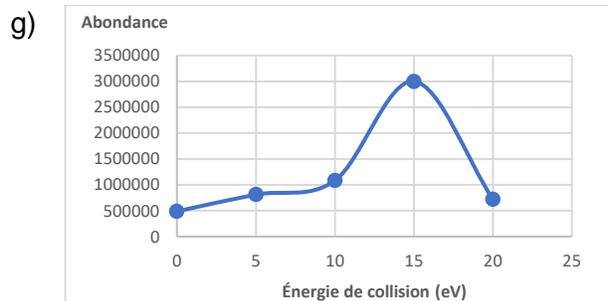


Figure A-27 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 5 α -estran-3 β ,17 β -diol : a) 422 \rightarrow 277, b) 422 \rightarrow 242, c) 422 \rightarrow 201, d) 407 \rightarrow 241, e) 407 \rightarrow 199, f) 332 \rightarrow 201.

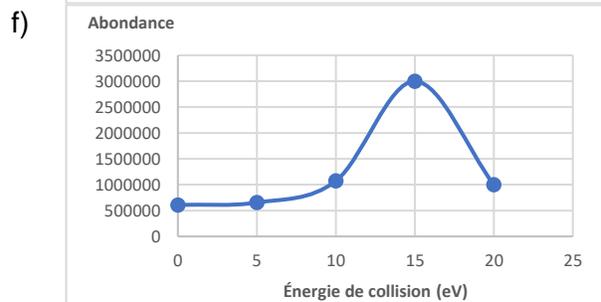
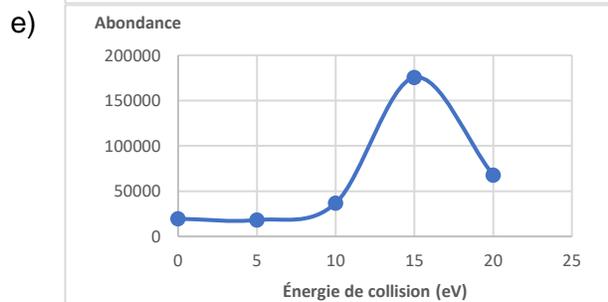
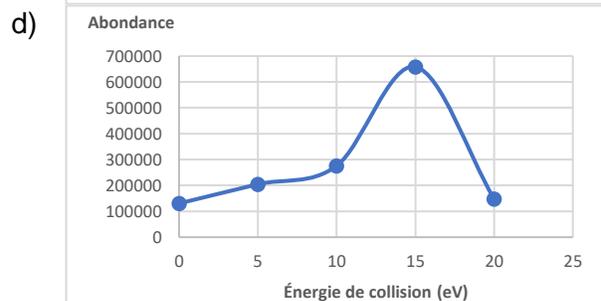
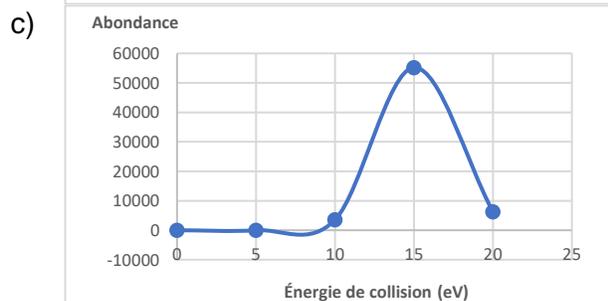
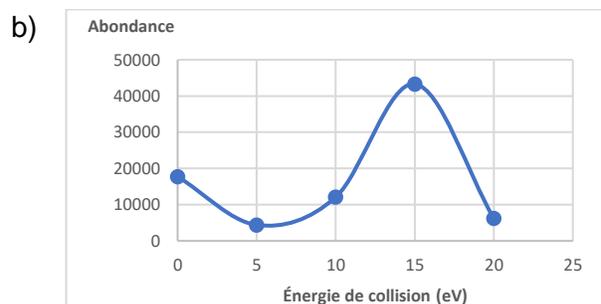
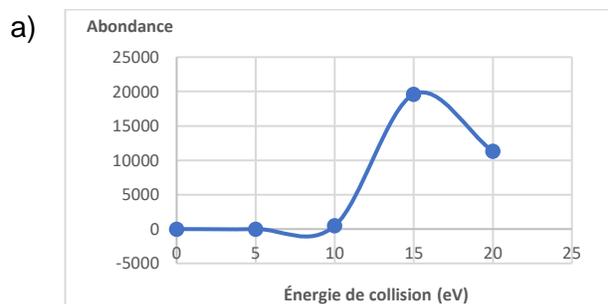


Figure A-28 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 5 α -estran-3-one-17 β -ol: a) 420 \rightarrow 240, b) 420 \rightarrow 330, c) 420 \rightarrow 180, d) 420 \rightarrow 129, e) 405 \rightarrow 315, f) 405 \rightarrow 187, g) 329 \rightarrow 187.

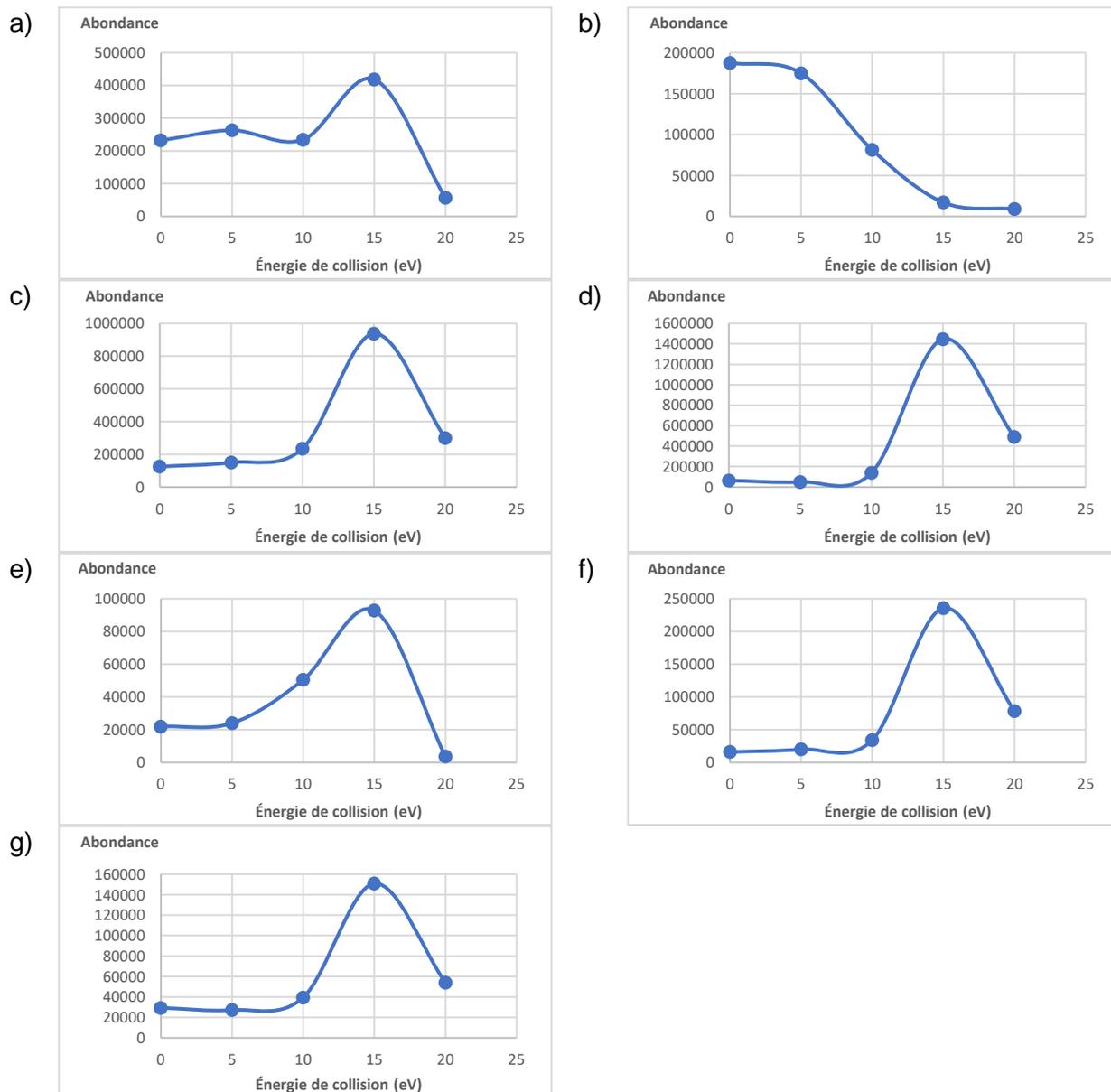


Figure A-29 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 16 α -hydroxy-NA : a) 508 \rightarrow 493, b) 493 \rightarrow 403, c) 493 \rightarrow 217, d) 493 \rightarrow 185, e) 403 \rightarrow 315, f) 403 \rightarrow 217, g) 403 \rightarrow 147.

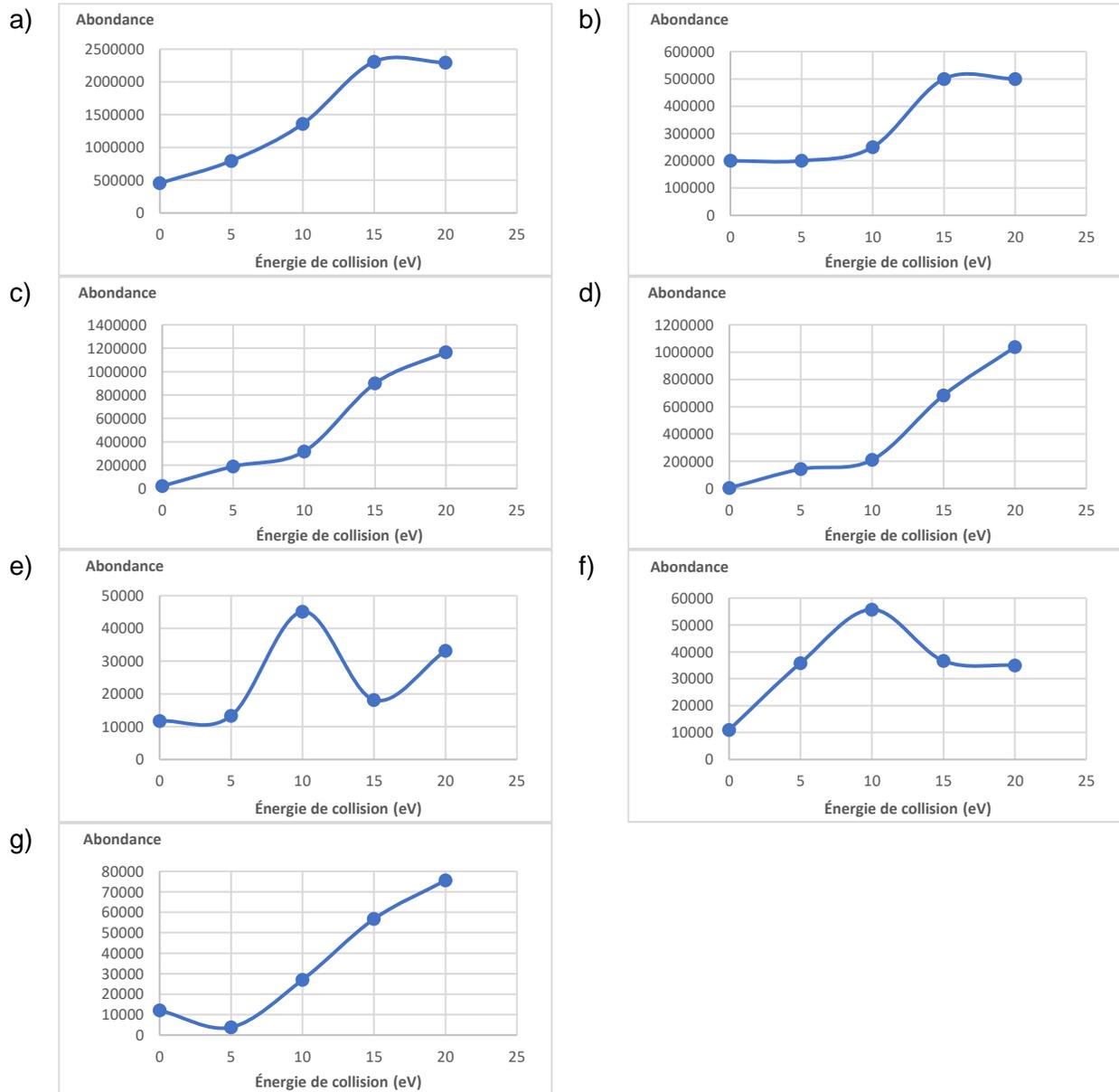


Figure A-30 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation de la 5 β -estran-3,17-dione : a) 418 \rightarrow 403, b) 418 \rightarrow 208, c) 403 \rightarrow 313, d) 403 \rightarrow 223, e) 403 \rightarrow 181, f) 403 \rightarrow 169, g) 261 \rightarrow 171, h) 261 \rightarrow 155.

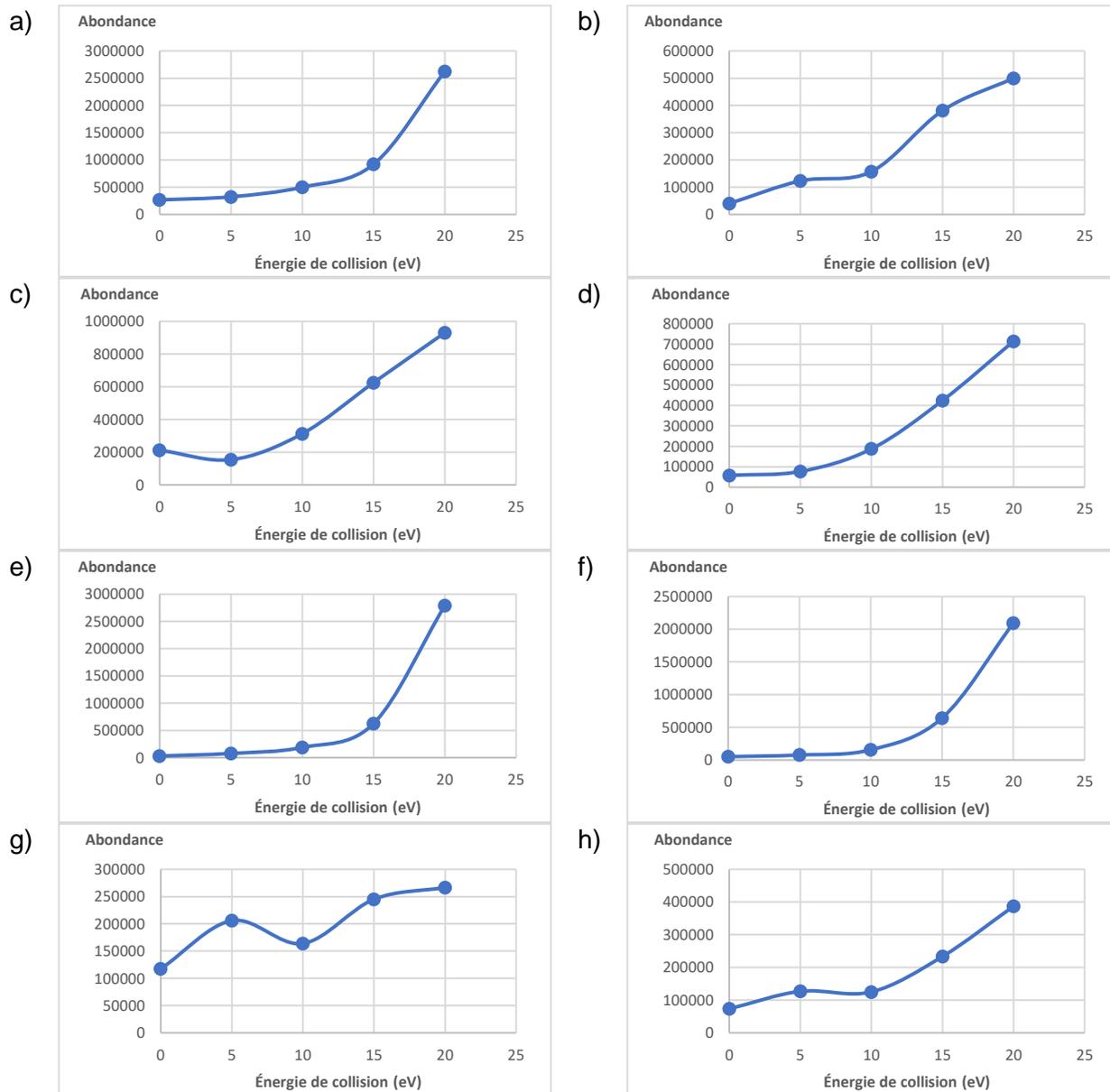


Figure A-31 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 5 β -estran-3 α ,17 β -diol : a) 422 \rightarrow 332, b) 422 \rightarrow 242, c) 422 \rightarrow 216, d) 422 \rightarrow 185, e) 422 \rightarrow 146, f) 407 \rightarrow 331, g) 407 \rightarrow 241, h) 332 \rightarrow 242, i) 332 \rightarrow 201.

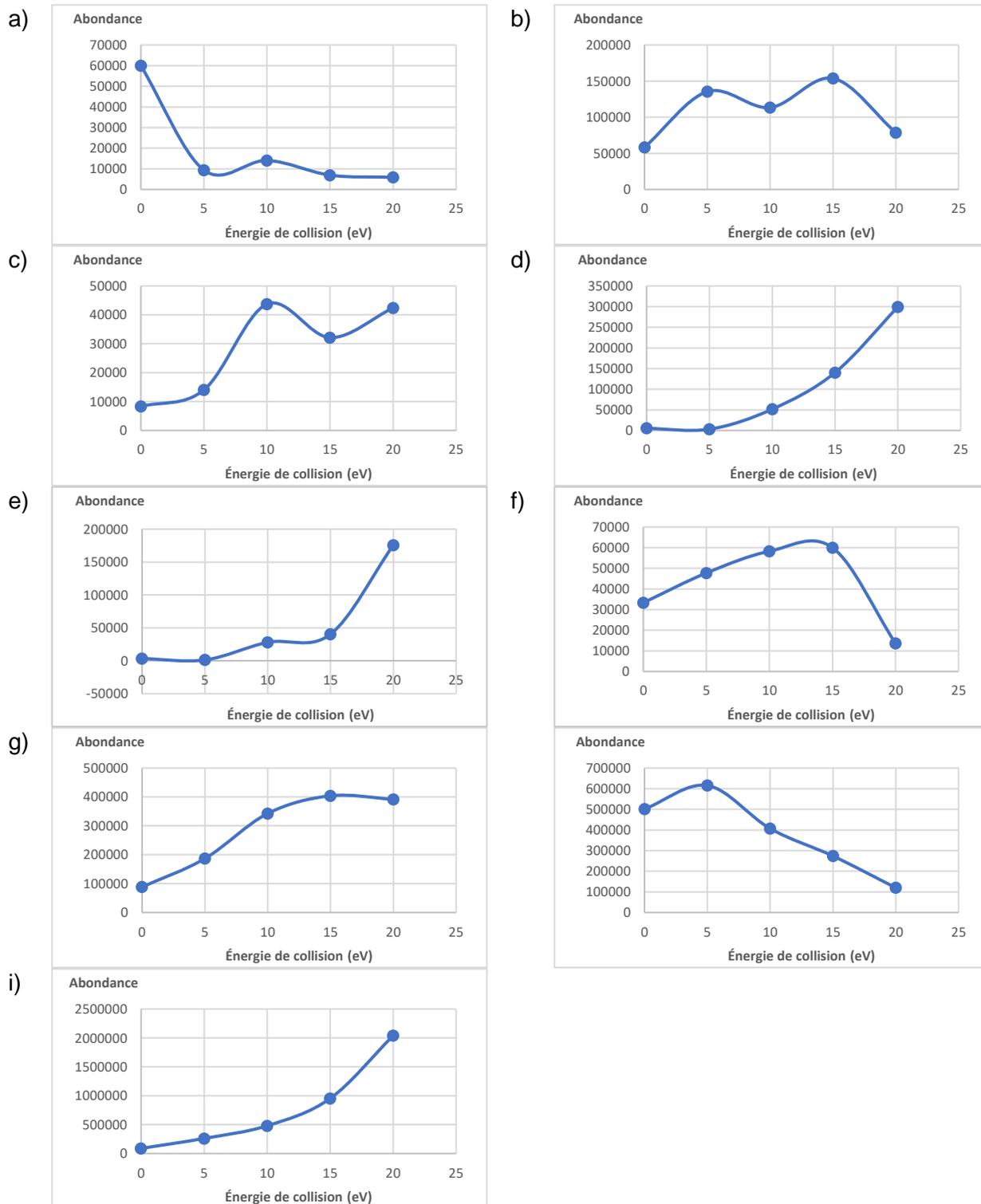


Figure A-32 : Graphiques de l'abondance de l'ion fragment en fonction de l'énergie de collision employée pour chaque transition de fragmentation du 19-NEE : a) 420 → 405, b) 420 → 315, c) 420 → 225, d) 420 → 169, e) 405 → 315, f) 405 → 225.

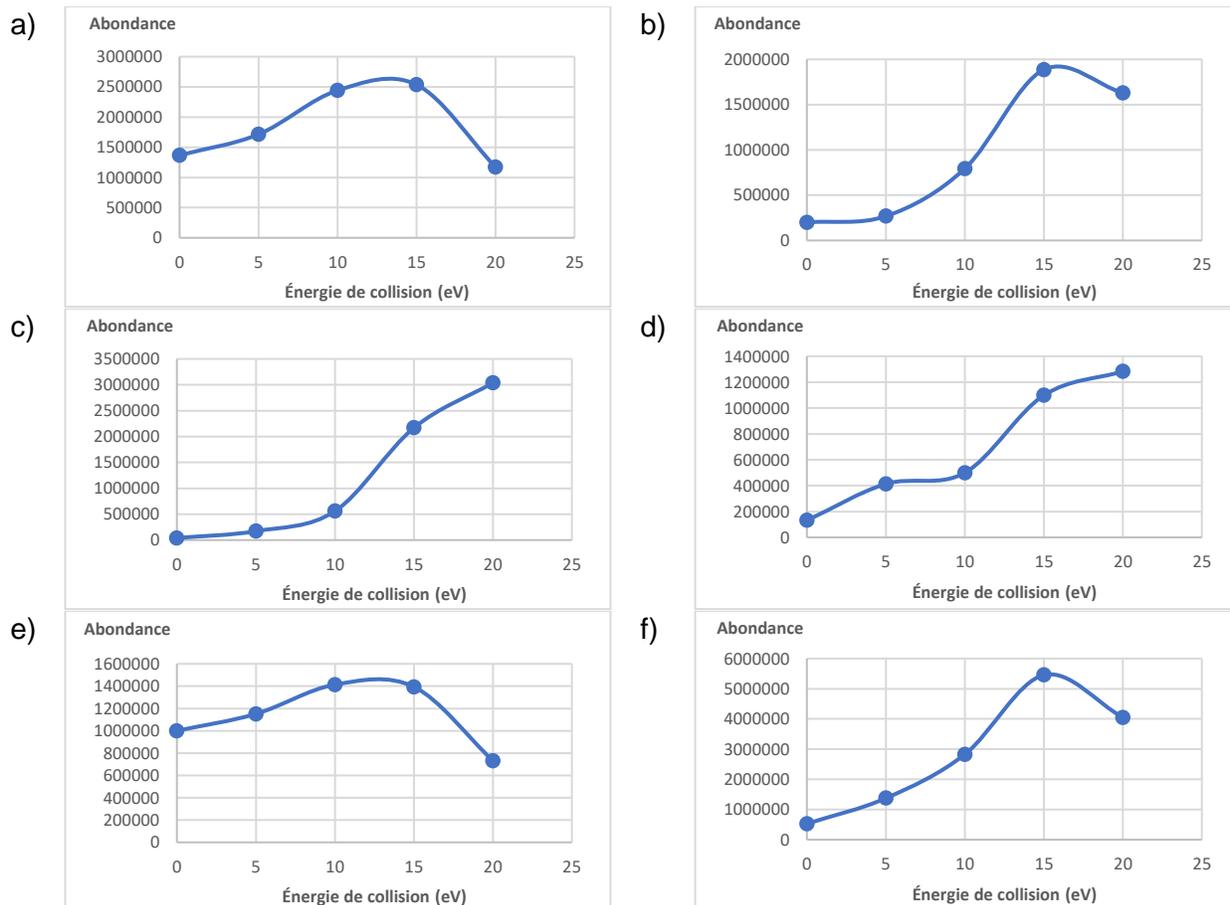


Tableau A- 2 : Concentrations minimales (ng/mL) à laquelle il a pu être identifié les différents stéroïdes détectés dans la portion sulfoconjuguée de tous les lots.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8
19-NA	1,3309	2,6841	1,0705	0,272	0,317	3,1824	3,2492	1,6416
19-NE	0,1382	0,2242	0,7563	0,1659	0,0929	0,4347	0,4244	0,3943
Nordione	n. d.							
19-NT	n. d.							
16α-hydroxy-NA	0,1256	n. d.	3,5032	7,4071				
5αEan3α17β	n. d.	0,373	0,704	0,2416				
19-NEA	0,416	0,1072	0,0641	0,2456	0,0583	0,6787	0,7972	1,7596
5αEan3β17α	n. d.	1,1169	0,1196	0,048				
5αEan3β17β	n. d.	0,1171	0,0182	0,252				
19-NEE	0,2903	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,2282	0,5176	0,528
Nordioli	n. d.							
5αEan	n. d.	12,792						
5αEan17β	n. d.							
4Ean3α17β	n. d.							

Tableau A- 3 : Valeurs de la pente, de l'ordonnée à l'origine et du coefficient de détermination des courbes étalon des métabolites pour lesquels une courbe d'étalonnage à plusieurs concentrations a été préparée.

		Phase glucuroconjuguée			Phase sulfoconjuguée		
		Pente (m)	Ordonnée à l'origine (b)	Coefficient de détermination R ²	Pente (m)	Ordonnée à l'origine (b)	Coefficient de détermination R ²
L o t 1	19-NA	9654,56804	-9766,068	0,98980745	8149,80985	-530,46348	0,99468076
	19-NE	9451,70451	-4825,3677	0,99378189	21644,2063	-5972,04	0,99783812
	19-NT	6242,19213	-1292,8688	0,99454045	16476,0065	438,154219	0,99796945
	19-NEA	7586,49393	2472,81923	0,98686376	13447,9194	5128,40338	0,99731189
	19-NEE	10119,2809	-1639,6972	0,99408804	23309,4717	-951,14592	0,99791041
L o t 2	19-NA	13385,0253	-9104,2678	0,99671215	6490,96505	2254,64445	0,99863822
	19-NE	13867,1479	-4408,3988	0,99763656	17526,32	-1987,7949	0,99902552
	19-NT	7609,5763	-1194,7335	0,99801896	13468,7895	649,726422	0,99894068
	19-NEA	9910,0291	4266,36294	0,99700366	11430,3041	4028,00275	0,99846528
	19-NEE	10793,4887	-981,19778	0,99764703	18621,7981	-218,90511	0,99906251
L o t 3	19-NA	12448,3493	-278,22334	0,9799768	5883,80564	953,496935	0,99909455
	19-NE	12812,2093	1391,39694	0,98313898	15868,9967	4629,9527	0,9994886
	19-NT	7342,49325	-1147,0653	0,98600945	11444,6903	1902,23221	0,99944968
	19-NEA	7914,96622	7838,74882	0,9536915	10226,6815	5107,44392	0,99891675
	19-NEE	9892,17121	59,8840345	0,98345478	16266,6829	766,212148	0,99956546
L o t 4	19-NA	37686,8636	-4356,955	0,99896245	5410,48245	145,432956	0,99934283
	19-NE	38480,595	3593,19391	0,99969199	13102,5267	3408,62423	0,99927083
	19-NT	22028,5686	-1629,5681	0,99975986	11852,0418	952,919008	0,99924763
	19-NEA	21187,6245	13028,8173	0,99935965	10087,2864	5664,84878	0,99876279
	19-NEE	30941,0444	309,183125	0,99973526	16737,8319	-550,06156	0,99935173
L o t 5	19-NA	29522,4667	-6518,8227	0,99970761	5083,59939	-1068,2664	0,99744688
	19-NE	29748,058	784,565505	0,99973834	12482,9641	607,182383	0,99827641
	19-NT	17309,9647	-1228,1832	0,99977606	10628,4316	889,940527	0,99809847
	19-NEA	17041,4444	9394,36892	0,99959462	10225,0534	3516,7575	0,99760885
	19-NEE	24705,6973	-910,5374	0,99975965	15662,3471	-954,29556	0,99848219
L o	19-NA	19550,8947	-3424,5834	0,99932464	4994,19978	-255,88399	0,999345
	19-NE	19714,6759	49,1125213	0,99944702	12491,4732	1233,27054	0,99983866
	19-NT	12782,1602	-1163,4114	0,99953393	10496,8356	877,880432	0,99979001

t 6	19-NEA	13202,711	4571,47263	0,99538495	9833,03865	3605,015	0,99966789
	19-NEE	18964,2954	141,921053	0,99953343	15514,1932	-1403,3206	0,99986388
L o t 7	19-NA	52899,0209	-8076,9718	0,99742771	9288,06025	-3303,7282	0,99744427
	19-NE	52337,4256	1742,51305	0,99932427	22403,3863	-6295,5025	0,99751922
	19-NT	36654,0056	-2420,3833	0,99936114	21084,7803	-5563,6523	0,99796917
	19-NEA	35426,3132	10148,5211	0,99912075	17359,6159	1324,4161	0,99743895
	19-NEE	57315,75	-335,8408	0,99931879	28600,6856	-5508,3233	0,99768141
L o t 8	19-NA	53731,3162	-7762,0283	0,99947421	7664,66002	-1157,6986	0,98529526
	19-NE	53489,1373	1414,36578	0,99955808	18057,3205	-1557,7924	0,98809889
	19-NT	36540,9796	-3437,2645	0,99962229	17177,9553	-4063,8863	0,99030068
	19-NEA	35704,7483	9171,02661	0,99946751	13852,1006	2937,81189	0,97044794
	19-NEE	58627,9941	-1613,9635	0,99958288	23413,8929	-3826,868	0,98872962

**ANNEXE V : VALEURS DES $\delta^{13}\text{C}$ DE LA 19-NA ET DU CER, $\Delta \delta^{13}\text{C}$
CALCULÉES ET CONCENTRATION EN 19-NA ASSOCIÉE À
CHAQUE ÉCHANTILLON.**

Tableau A- 4 : Valeurs des $\delta^{13}\text{C}$ du CER et de la 19-NA ainsi que des $\Delta \delta^{13}\text{C}$ calculées entre ces deux valeurs pour chacun des échantillons dont l'analyse SMRI a été reprise et concentration de la 19-NA associée à ces échantillons.

# échantillon	$\delta^{13}\text{C}$ CER (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ 19-NA (‰)	$\Delta \delta^{13}\text{C}$ (‰)	[19-NA] (ng/mL)
BT010	-18,3	-18,5	-0,20	6,6
BT013	-19,9	-29,8	-9,90	6,4
B025	-19,8	-30,3	-10,5	10,7
B026	-20,2	-30,0	-9,80	2,9
B027	-21,6	-28,2	-6,60	2,9
BT029	-21,4	-21,4	0	3,1
BT030	-19,8	-20,7	-0,90	13,3
BT034	-20,3	-21,4	-1,10	5,6
BT035	-22,5	-30,0	-7,50	9,0
BT036	-21,7	-29,7	-8,00	10,8
BT038	-17,6	-18,0	-0,40	3,4
BT039	-17,6	-29,1	-11,5	8,9
BT040	-18,6	-30,6	-12,0	7,9
BT041	-19,2	-29,9	-10,7	5,5
BT042	-18,8	-29,8	-11,0	3,4
BT044	-19,1	-30,3	-11,2	6,1
BT045	-20,2	-29,5	-9,30	6,7
BT046	-19,1	-32,0	-12,9	--
BT049	-21,8	-20,9	0,96	2,4
BT053	-22,0	-21,3	0,69	2,2
BT050	-22,1	-22,2	-0,17	2,8
BT054	-18,6	-28,7	-10,09	5,1
BT058	-21,8	-21,1	0,67	4,4
B060	-21,3	-28,1	-6,82	5,8
B067	-22,3	-22,7	-0,38	5,9
B068	-19,5	-17,6	1,88	1,8
BT073	-22,6	-27,7	-5,10	3,8
BT074	-19,3	-29,2	-9,97	4,0
BT079	-19,3	-29,2	-9,92	13,8
BT083	-21,9	-20,7	-1,20	4,8
BT087	-21,2	-20,4	0,86	4,0
BT095	18,6	-28,9	-10,32	11,7
BT090	-18,2	-29,2	-10,99	14,8
BT118	-19,3	-29,8	-10,51	4,8

Tableau A- 5 : Valeurs des $\delta^{13}\text{C}$ du CER et de la 19-NA ainsi que des $\Delta\delta^{13}\text{C}$ calculées entre ces deux valeurs pour chacun des échantillons obtenues de l'analyse SMRI originale et concentration de la 19-NA associée à ces échantillons.

# échantillon	$\delta^{13}\text{C}$ CER (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ NA (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰)	[NA] (ng/mL)
BT087	-21,2	-19,1	2,10	4,0
BT088	-19,3	-23,0	-3,70	4,0
BT091	-22,2	-23,2	-1,00	5,3
BT092	-23,3	-23,5	-0,20	5,3
BT093	-21,5	-21,4	0,10	5,2
BT083	-21,9	-20,6	1,30	10,6
BT085	-21,3	-32,1	-10,8	32,8
BT089	-18,9	-29,6	-10,7	14,2
BT094	-21,2	-29,3	-8,10	34,9
BT118	-19,4	-28,3	-8,90	4,8
BT119	-20,5	-29,3	-8,80	11,3
BT120	-16,7	-30,8	-14,1	5,4
BT121	-18,5	-30,7	-12,2	11,3
BT122	--	-31,1	--	6,8
BT124	-19,1	-28,6	-9,50	5,8
BT125	-18,5	-28,1	-9,60	3,6
BT126	-21,0	-29,1	-8,10	13,9
BT127	-19,4	-18,8	0,60	5,1
BT128	-22,2	-30,4	-8,20	6,7
BT129	-18,9	-26,7	-7,80	5,8
BT130	-16,8	-30,8	-14,0	10,5
BT131	-19,5	-31,2	-11,7	16,7
BT132	-19,4	-30,5	-11,1	5,7
BT135	-19,5	-30,8	-11,3	6,7
BT136	-23,0	-31,3	-8,3	12,7
BT137	-22,2	-31,0	-8,80	5,7
BT138	-16,5	-30,6	-14,1	4,7
BT139	-19,8	-31,6	-11,8	10,9
BT141	-18,8	-29,6	-10,8	7,7
BT143	-18,8	-29,5	-10,7	5,7
BT144	-17,3	-31,3	-14,0	3,9
BT145	-18,8	-31,2	-12,4	10,1
BT146	-21,6	-31,6	-10,0	5,1
BT147	-20,7	-30,2	-9,50	3,5
BT149	-18,8	-27,2	-8,40	7,4
BT150	-20,3	-30,5	-10,2	--
BT151	-19,4	-30,1	-10,7	--
BT152	-20,1	-29,9	-9,80	--
BT153	-18,9	-30,9	-12,0	--
BT154	-18,8	-22,6	-3,80	--

BT155	-19,7	-31,5	-11,8	--
BT156	-20,1	-31,4	-11,4	--
BT157	-18,3	-29,5	-11,2	6,0
BT158	-17,2	-30,7	-13,5	6,3
BT161	-19,1	-29,9	-10,8	12,2
BT163	-20,1	-29,3	-9,20	1,6
BT165	-18,2	-18,9	-0,70	3,6
B166	-19,2	-19,7	-0,50	--
BT167	-20,8	-30,8	-10,0	4,7
BT168	-21,8	-31,1	-9,30	8,8
B169	-23,8	-31,0	-7,20	3,3
T201	-24,1	-25,4	-1,30	4,0
T202	-24,2	-23,4	0,80	3,0
T203	-17,6	-29,4	-11,8	7,4
T204	-17,2	-30,5	-13,3	5,0
T205	-18,7	-24,7	-6,00	10,0
T206	-19,2	-23,1	-3,80	2,7
T207	-18,8	-29,2	-10,4	4,1
T208	-20,7	-30,6	-9,90	4,0
T209	-20,5	-28,8	-8,30	3,6
T210	-21,6	-30,1	-8,50	6,3
T211	-21,1	-29,9	-8,80	6,3
T212	-21,0	-28,8	-7,80	2,4
T213	-21,4	-29,3	-7,90	5,1
T216	-16,9	-30,3	-13,4	2,7
T217	-16,5	-23,0	-6,50	9,5
T218	-16,5	-30,8	-14,3	4,5
T220	-16,5	-25,4	-8,90	5,0
T221	-18,3	-29,2	-10,9	4,4
T222	-22,1	-30,8	-8,70	4,0
T225	-17,7	-23,3	-5,60	6,8
T230	-20,9	-29,3	-8,40	3,3

ANNEXE VI : CONCENTRATIONS DE 19-NA, 19-NE, A ET E ET RATIOS RESPECTIFS.

Tableau A- 6 : Concentrations de la 19-NA et de la 19-NE des échantillons positifs et ratios 19-NA/19-NE associés

# échantillon	[19-NA] (ng/mL)	[19-NE] (ng/mL)	Ratio 19-NA/19-NE
BT001	89,3656	20,2268	4,4638
BT003	15,56	4,9651	3,1473
BT004	53,6736	15,1188	3,536
BT005	17,8249	1,9049	9,2483
BT006	20,8844	2,5544	8,1643
BT007	15,4981	9,9656	1,5602
BT012	75,1948	16,062	4,6859
BT013	6,4499	1,9501	3,3597
B023	21,596	4,4676	4,3029
B025	10,6827	2,539	4,3004
B026	2,9091	0,6077	4,9277
B027	2,8848	0,6067	4,7577
BT028	17,2912	26,938	0,6094
BT031	64,6224	190,6096	0,2856
BT032	93,0144	9,3508	9,6307
BT035	8,9987	7,1415	1,2393
BT036	10,826	4,3991	2,4976
BT037	38,6084	96,4756	0,3509
BT039	8,8582	2,9476	3,0578
BT040	7,9179	4,6418	1,6941
BT041	5,5145	1,7818	3,116
BT042	3,4154	6,8313	0,4383
BT043	26,0476	7,0966	3,6448
BT044	6,0827	4,072	1,4659
BT045	6,695	1,135	6,1437
BT048	17,7912	6,5207	2,7479
BT052	56,7304	14,8412	3,8062
BT054	5,1303	1,4245	3,782
BT056	37,3268	12,7266	2,9686
B057	34,2456	0,0976	62,2939
B060	5,8432	0,7508	7,3098
BT069	62,3072	13,4612	4,5902
BT071	40,9722	18,81	2,212
BT073	3,8399	0,6398	5,4646

BT074	3,9571	0,2366	12,8052
BT079	13,8071	--	--
BT080	35,1412	9,741	3,633
BT084	15,1986	2,8084	5,4356
BT085	32,781	5,2082	6,1423
BT086	15,8403	3,2167	4,9541
BT088	3.9964	1.381	2.7504
BT089	14,2121	2,8229	4,9944
BT090	14,8046	1,9957	7,4004
BT094	34,917	9,5658	3,6751
BT095	11,6968	3,0026	4,0428
BT117	84,0524	27,3556	3,1204
BT118	4,8261	0,7602	5,6389
BT119	11,2511	3,3055	3,3869
BT120	5,4065	1,0234	4,8452
BT121	11,2927	2,6362	4,2332
BT122	6,7708	2,1792	3,0124
BT123	37,8798	15,4192	2,4922
BT124	5,7828	1,8971	2,922
BT125	3,5603	1,1508	2,8249
BT126	13,8981	3,1687	4,3683
BT128	6,6542	0,8932	6,8463
BT129	5,8263	7,8157	0,7079
BT130	10,5418	2,7416	3,7897
BT131	16,6906	4,6298	3,6312
BT132	5,694	0,3664	12,1441
BT134	75,5352	26,2636	2,9161
BT135	6,6962	1,0465	5,9044
BT136	12,7368	2,3653	5,3112
BT137	5,6533	1,6343	3,29
BT138	4,7339	1,4354	3,0944
BT139	10,9091	1,965	5,4009
BT141	7,6512	1,7907	4,1226
BT143	5,7407	0,6858	7,3267
BT144	3,8574	7,4832	0,468
BT145	10,0517	1,5972	6,0579
BT146	5,1317	1,2157	3,8671
BT147	3,4823	0,6908	4,3534
BT149	7,409	4,8988	1,505
BT157	6,0316	0,4593	10,3303
BT158	6,3019	1,2174	4,8747
BT161	12,1824	2,4923	4,9234

BT163	1,6341	0,1235	5,8628
BT167	4,6775	1,373	3,2198
T182	23,7319	4,9915	4,8139
T183	29,8162	6,505	4,5355
T185	41,4128	8,875	4,6928
T187	80,526	12,1072	6,562
T197	55,2516	9,0952	5,8612
BT200	5,1829	0,4846	3,2198
T203	7,3779	1,6148	8,4911
T209	3,5912	0,5215	4,4318
T210	6,2574	0,6762	5,5673
T211	6,3027	0,4895	7,9525
T213	5,1317	0,749	10,3
T214	19,4255	2,9429	5,9683
T216	3,0022	1,0836	6,7834
T218	4,5192	1,7442	2,4877
T230	3,2508	0,8351	3,4305
SA54-38	51,1504	1,7864	19,8947
SA54-40	17,9347	0,9196	18,6554
SA63-8	10,2496	1,303	7,6265
SA63-15	2,2153	0,5874	3,2959
SA65-14	1,1012	0,1859	4,0288
T181	40,4418	4,0882	10,0424
T186	78,6452	2,0604	35,355
BT133	77,5668	20,6904	3,8367
BT148	106,5084	25,8204	4,2474
BT002	173,9328	45,6824	3,905
BT051	1273,8224	845,536	1,5164
BT140	464,0352	39,2512	12,1166
BT081	534,584	136,916	3,9611
BT082	578,788	744,62	0,7335
SA54-16	4664,104	1139,268	4,2633
B072	862,716	201,088	4,404
BT033	2687,776	348,176	7,832
BT075	4214,88	1987,408	2,1542
B070	4977,584	287,392	17,6048
	Moyenne		5,7161
	Écart type		6,9991

Tableau A- 7 : Concentrations de la 19-NA et de la 19-NE des échantillons négatifs et ratios 19-NA/19-NE associés

# échantillon	[19-NA] (ng/mL)	[19-NE] (ng/mL)	Ratio 19-NA/19-NE
BT010	6,5915	5,1265	1,2295
BT029	3,1387	4,4304	0,6101
BT030	13,2866	15,0588	0,8525
BT034	5,6267	2,2857	2,4582
BT038	3,3979	2,8346	1,1369
BT049	2,4219	1,5636	1,4064
BT050	2,7726	4,0671	0,6065
BT053	2,1507	3,2347	0,5704
BT058	4,3713	3,809	1,0862
B067	5,8969	9,7751	0,5456
B068	1,8331	1,7833	0,9269
BT083	10,5867	7,7342	1,3405
BT087	4,037	3,3849	1,1366
BT088	3,9964	1,381	2,7504
BT091	5,3441	10,1528	0,4382
BT092	5,3254	2,0666	2,6114
BT093	5,2459	10,724	0,399
BT127	5,1021	0,7625	7,1674
BT165	3,636	0,7975	4,0092
	Moyenne		1.4425
	Écart type		1,6049

Tableau A- 8 : Concentrations de A et de E des échantillons positifs et ratios 19-NA/A / 19-NE/E associés

# échantillon	[A] (ng/mL)	[E] (ng/mL)	Ratio
BT001	n.d.	n.d.	n.d.
BT003	n.d.	n.d.	n.d.
BT004	n.d.	n.d.	n.d.
BT005	n.d.	n.d.	n.d.
BT006	1176	410	2.850425
BT007	1420	2529	2.769718
BT012	3605	2106	2.734899
BT013	869	1083	4.12197
B023	2676	2110	3.811495
B025	2407	2348	4.104312
B026	3107	1631	2.51294
B027	2365	2137	4.296503
BT028	2826	2743	0.623036

BT031	164	455	0.940602
BT032	690	322	4.642033
BT035	1004	1371	1.720656
BT036	3210	2790	2.138963
BT037	1253	1468	0.468856
BT039	231	309	4.019976
BT040	806	1387	2.935385
BT041	3047	3204	3.254372
BT042	903	293	0.162225
BT043	3347	2078	2.278805
BT044	72	128	2.655621
BT045	1924	1299	3.982528
BT048	1695	1700	2.736467
BT052	270	387	5.478908
BT054	3248	1608	1.782996
BT056	354	498	4.12605
B057	2943	1414	168.5831
B060	7562	5767	5.93526
BT069	301	513	7.888698
BT071	526	641	2.654439
BT073	1544	1465	5.694636
BT074	4167	1795	7.20449
BT079	56689	54802	n.d.
BT080	699	512	2.642444
BT084	926	706	4.126087
BT085	4174	2242	3.380786
BT086	1853	1526	4.055384
BT088	3292	4020	3.533796
BT089	2773	1157	2.100614
BT090	4056	1938	3.544518
BT094	2126	1513	2.597714
BT095	769	651	3.297799
BT117	2463	1985	2.476281
BT118	3058	1383	2.871132
BT119	1484	1251	2.869335
BT120	3582	2060	3.038173
BT121	3053	2181	3.060189
BT122	1830	1983	3.366778
BT123	3209	3966	3.036189
BT124	n.d.	n.d.	n.d.
BT125	n.d.	n.d.	n.d.
BT126	506	379	3.285209
BT128	8151	4300	3.93011
BT129	7367	6317	0.639212

BT130	n.d.	n.d.	n.d.
BT131	519	588	4.084319
BT132	4743	2076	6.801994
BT134	3505	4995	4.098667
BT135	n.d.	n.d.	n.d.
BT136	n.d.	n.d.	n.d.
BT137	n.d.	n.d.	n.d.
BT138	1519	1803	3.91457
BT139-rx	n.d.	n.d.	n.d.
BT141	1276	830	2.779292
BT143	n.d.	n.d.	n.d.
BT144	n.d.	n.d.	n.d.
BT145	n.d.	n.d.	n.d.
BT146	n.d.	n.d.	n.d.
BT147	5714	3888	3.430045
BT149	n.d.	n.d.	n.d.
BT157	n.d.	n.d.	n.d.
BT158	n.d.	n.d.	n.d.
BT161	1458	881	2.953595
BT163	4693	3186	8.9827
BT167	1102	1005	3.106903
T182	n.d.	n.d.	n.d.
T183	n.d.	n.d.	n.d.
T185	n.d.	n.d.	n.d.
T187	n.d.	n.d.	n.d.
T197	1125	562	3.034704
BT200	n.d.	n.d.	n.d.
T203	900	758	3.84805
T209	5502	4957	6.204169
T210	5007	3135	5.794003
T211	4377	2354	6.924746
T213	5863	2604	3.04299
T214	4542	1524	2.2148
T216	116	118	2.818348
T218	2233	2214	2.568941
T230	1420	1801	4.937159
SA54-38	n.d.	n.d.	n.d.
SA54-40	n.d.	n.d.	n.d.
SA63-8	n.d.	n.d.	n.d.
SA63-15	n.d.	n.d.	n.d.
SA65-14	n.d.	n.d.	n.d.
T181	n.d.	n.d.	n.d.
T186	n.d.	n.d.	n.d.
BT133	1564	1328	3.183232

BT148	3208	2594	3.335466
BT002	n.d.	n.d.	n.d.
BT051	2246	4181	2.804447
BT140	2065	518	2.965567
BT081	2333	1177	1.969806
BT082	330	1385	3.262276
SA54-16	n.d.	n.d.	n.d.
B072	10003	7176	3.077754
BT033	2778	1150	3.195655
BT075	3616	4009	2.351288
B070	738	357	8.378297
		Moyenne	3.518497
		Écart type	1.680209

Tableau A- 9 : Concentration de A et de E des échantillons négatifs et ratios 19-NA/A /19-NE/E associés

# échantillon	[A] (ng/mL)	[E] (ng/mL)	Ratio
BT010	2630	1379	0.674174
BT029	3226	2231	0.489939
BT030	7851	4754	0.534266
BT034	12497	3087	0.608087
BT038	5604	2153	0.460537
BT049	6511	2392	0.569042
BT050	12130	12309	0.691774
BT053	3104	2577	0.551999
BT058	6431	2928	0.522507
B067	8657	11121	0.774959
B068	5436	4156	0.785883
BT083	9312	3226	0.474206
BT087	10835	6241	0.686971
BT091	7287	7266	0.52485
BT092	21440	4026	0.483888
BT093	10951	10920	0.487789
BT127	10341	2380	1.54001
		Moyenne	0,6389
		Écart type	0,2546

