

Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier

**MESURE DU RAPPORT $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DE MÉTABOLITES D'ANDROGÈNES ET DE
PREGNÈNOLONE ADMINISTRÉS PAR VOIE ORALE :
UNE ÉTUDE COMPARATIVE INTER LABORATOIRE.**

Par
Isabelle Robillard Frayne

Mémoire présenté
Pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
En Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	M. Jacques de Ceurriz Laboratoire national de dépistage du dopage Châtenay-Malabry, France
Examineur interne	M. Michel Charbonneau INRS- Institut Armand-Frappier
Directrice de recherche	Mme Christiane Ayotte, Ph.D. INRS- Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Le contrôle du dopage sportif par les stéroïdes pouvant potentiellement se retrouver dans le corps humain de façon naturelle est très compliqué. En effet, les concentrations de ces stéroïdes peuvent varier naturellement de façon substantielle d'un individu à l'autre rendant difficile l'utilisation d'une fourchette de valeurs normales à des fins de référence. De plus, la méthode de dépistage par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CG/SM) ne permet pas de différencier l'origine endogène ou exogène d'un stéroïde urinaire. C'est ici qu'entre en jeu la méthode de confirmation par la spectrométrie de masse des rapports isotopiques (CG/C/SMRI). Cette méthode, dont l'utilisation dans le domaine du contrôle de dopage sportif a été proposée en 1994, permet la différenciation des stéroïdes de sources endogène et exogène par l'analyse de leur teneur en carbone 13, isotope naturel du carbone (^{13}C).

Une première partie du projet était de vérifier la possibilité d'analyser des norstéroïdes par CG/C/SMRI. Cette analyse est limitée due aux très petites concentrations des métabolites norandrostérone (NA) et norétiocholanolone (NE) d'origine endogène retrouvées parfois dans les urines. Afin de vérifier la sensibilité de notre méthode, nous avons utilisé les urines recueillies dans le cadre d'une étude d'excrétion réalisée avec une crème à base de norandrostènedione et de norandrostènediol vendue commercialement aux États-Unis. Bien que nous ayons réussi à identifier les pics correspondants à la NA et la NE exogènes, la méthode utilisée ne nous donne pas la sensibilité requise pour l'analyse de traces. Le même problème de sensibilité est rencontré lors des analyses de rapports isotopiques de la testostérone urinaire. Généralement, sa concentration dans l'urine est trop faible pour être analysée directement par CG/C/SMRI. Nous avons comparé différentes méthodes permettant l'isolement et la séparation par chromatographie liquide de la testostérone et de l'épitestostérone, deux épimères non résolus chromatographiquement en l'absence de dérivation chimique. La méthode retenue nous permet une bonne séparation des deux stéroïdes.

Le but principal du projet était de vérifier la validité de la méthode de détection de stéroïdes exogènes en réalisant une étude comparative entre trois laboratoires accrédités par l'AMA. Ces trois laboratoires, situés à Tokyo, Japon, à Cologne, Allemagne, et à Montréal, Canada, ont une longue expérience en contrôle de dopage sportif et ont chacun développé leur propre méthode de préparation des échantillons pour les analyses de rapports isotopiques. Pour réaliser l'étude, les trois laboratoires se sont partagés des échantillons urinaires provenant de diverses études d'excrétion. Les stéroïdes étudiés lors de ces travaux sont la testostérone, la DHEA, l'androstènedione et la pregnènone. Les résultats obtenus par les trois laboratoires sont comparés dans ce rapport non seulement en terme de valeurs absolues, mais surtout en terme de différence entre les valeurs des rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des métabolites et celles des stéroïdes de référence. Ce critère est celui qui a été retenu par l'Agence mondiale antidopage afin de limiter les variations retrouvées entre les laboratoires et les variations interindividuelles. Ainsi, pour toutes les études d'excrétion, les trois laboratoires ont obtenu des résultats concordants malgré les protocoles différents, démontrant ainsi l'application universelle de la CG/C/SMRI à des fins de confirmation de l'administration de testostérone et ses précurseurs.

Les trois buts du projet, l'analyse de norstéroïdes par CG/C/SMRI, la séparation de la testostérone et de l'épitestostérone par CLHP et la validation de la méthode de détection de stéroïdes exogènes par CG/C/SMRI ont été atteints. Le seul bémol à apporter est la sensibilité obtenue pour l'analyse des norstéroïdes qui a dû être améliorée pour en permettre l'utilisation à des faibles concentrations. Par contre, pour la détection des stéroïdes exogènes, la méthode a donné des résultats très satisfaisants et a été validée par les trois laboratoires.



Isabelle Robillard Frayne



Christiane Ayotte

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide précieuse de nombreuses personnes. C'est pourquoi je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée, de près ou de loin, à mener à terme ce projet.

Je tiens à remercier en tout premier lieu ma directrice de recherche, Dr Christiane Ayotte, qui m'a acceptée au sein de son laboratoire. Ses conseils judicieux m'ont permis de me dépasser et de toujours chercher à m'améliorer.

Je tiens aussi à remercier particulièrement Dr Anahid Fakirian qui m'a suivie tout au long de mon projet, qui a répondu à toutes mes interrogations et qui m'a aidée à orienter mes recherches. Son aide a été inestimable.

Je voudrais également remercier tout le personnel du laboratoire, pour leur aide technique et morale, qui m'ont accueillie à bras ouverts. En particulier, Jean-Pierre Couture, Alain Charlebois et Christophe Romiguère.

Également, je ne peux passer sous silence l'aide financière que j'ai reçue, notamment sous forme de bourse de Sport Canada.

Finalement, je voudrais remercier mes parents, qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise et qui m'ont donné de nombreux encouragements et conseils qui m'ont permis de poursuivre mes études.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1.1. Dopage sportif.....	1
1.2. Stéroïdes androgènes.....	2
1.2.1. Dopage par la testostérone et ses précurseurs.....	3
1.2.2. Effets secondaires de la prise de stéroïdes anabolisants androgènes.....	5
1.2.3. Disponibilité des stéroïdes.....	6
1.3. Biotransformation des stéroïdes androgènes.....	6
1.3.1. Réactions de phase I.....	7
1.3.2. Réactions de phase II.....	8
1.3.3. Biotransformation de la testostérone.....	9
1.4. 19-nortestostérone.....	10
1.4.1. Biotransformation de la 19-nortestostérone.....	11
1.4.2. Détection de la norandrostérone par CG/C/SMRI.....	12
1.5. Appauvrissement en ¹³ C des stéroïdes synthétiques.....	12
1.5.1. Synthèse de la testostérone à partir des plantes.....	12
1.5.2. Fixation du CO ₂ par les plantes et discrimination du ¹³ C.....	14
1.6. Contrôle du dopage à la testostérone et ses précurseurs :	
combinaison CG/SM et CG/C/SMRI.....	16
1.6.1. Dépistage par CG/SM.....	16

1.7. Spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone (SMRI).....	17
1.7.1. Fonctionnement de l'instrument.....	18
1.7.2. Sources de carbones	19
1.7.3. Critère de positivité des échantillons analysés par SMRI	20
1.7.4. Pregnènone ; biosynthèse et rôle.....	20
1.7.5. Purification des extraits de stéroïdes urinaires en vue de l'analyse GC/C/SMRI.....	21
1.8. Études antérieures démontrant l'effet de dopage par divers stéroïdes sur les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ retrouvées dans l'urine.....	22
1.8.1. Études antérieures concernant des urines contrôles négatives	22
1.8.2. Études antérieures sur l'effet d'une prise de testostérone, DHEA et androstènedione.....	24
1.9. Objectifs et approche méthodologique.....	24
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	26
2.1. Matériel utilisé pour la préparation des échantillons.....	26
2.1.1. Produits chimiques.....	26
2.1.1.1. Produits utilisés pour l'isolement des stéroïdes glucuroconjugués...	26
2.1.1.2. Produits utilisés pour la formation d'hydrazones (réactif de Girard)	26
2.1.1.3. Étalons de stéroïdes authentiques.....	27
2.1.1.4. Matériel d'étalonnage.....	27
2.1.2. Matériel biologique.....	28
2.1.2.1. Contrôles.....	28
2.1.2.2. Matériel biologique pour l'étude d'extraction de la Norandrostènedione.....	28
2.1.2.3. Matériel biologique pour la comparaison inter-laboratoire : contrôles négatifs.....	28

2.1.2.4.	Matériel biologique pour l'étude d'excrétion de la testostérone, de la DHEA, de la pregnènone et de l'androstènedione pour la comparaison inter-laboratoire.....	29
2.2.	Méthode	31
2.2.1.	Méthode d'isolement des stéroïdes glucuroconjugués de l'urine.....	31
2.2.2.	Extraction sélective par formation d'hydrazones.....	31
2.2.3.	Méthode de purification des métabolites de la norandrostènedione.....	32
2.2.4.	Méthode de séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone.....	32
2.3.	Instrumentation.	33
2.3.1.	Chromatographe en phase gazeuse / four de combustion / spectromètre de masse d'isotope stable (CG/C/SMRI)	33
2.3.1.1.	Instrumentation CG/C/SMRI.....	33
2.3.1.2.	Méthode d'analyse CG/C/SMRI.....	33
2.3.2.	Chromatographe en phase gazeuse / spectrométrie de masse.....	34
2.3.2.1.	Instrumentation CG/SM.....	34
2.3.2.2.	Méthode d'analyse CG/SM.....	34
2.3.3.	Chromatographe en phase liquide (CLHP).....	34
2.3.3.1.	Instrumentation CLHP.....	34
2.3.3.2.	Méthode de séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone.....	34
2.3.3.3.	Méthode d'isolement par CLHP des métabolites NA et NE.....	35
CHAPITRE III : ANALYSE DE NORSTÉROÏDES.....		36
3.1.	Analyse d'un produit commercial à base de norstéroïdes.....	36
3.2.	Étude des échantillons urinaires.....	37
3.3.	Conclusion de l'analyse de norstéroïdes.....	40
CHAPITRE IV : SÉPARATION DE LA TESTOSTÉRONNE ET DE L'ÉPITÉSTOSTÉRONNE.....		41

4.1. Problèmes de détection de la testostérone par SMRI.....	41
4.2. Étude de séparation par CLHP de la testostérone et de l'épitestostérone.....	41
4.2.1. Essai de séparation.....	42
4.2.2. Optimisation de l'extraction liquide-liquide.....	43
4.2.3. Résultats de l'analyse SMRI.....	44
4.3. Conclusion pour la séparation de la testostérone et de l'épitestostérone.....	45

CHAPITRE V : COMPARAISON INTER-LABORATOIRE DE L'ANALYSE DE STÉROÏDES PAR CG/C/SMRI..... 46

5.1. Étalonnage de l'appareil.....	46
5.1.1. Résultats.....	46
5.1.2. Comparaison de l'étalonnage des instruments des laboratoires de Montréal, de Tokyo et de Cologne.....	47
5.2. Standards de stéroïdes authentiques	49
5.2.1. Résultats.....	49
5.2.2. Comparaison inter-laboratoire.....	49
5.3. Contrôles.....	51
5.3.1. Contrôle négatif : stabilité des valeurs mesurées.....	51
5.3.2. Contrôle positif : stabilité des valeurs mesurées.....	51
5.4. Urines contrôles négatives	53
5.4.1. Résultats des rapports isotopiques des urines contrôles négatives	53
5.4.2. Comparaison inter-laboratoire.....	54
5.5. Études d'excrétion de stéroïdes naturels.....	55
5.5.1. Excrétion d'androstènedione	55
5.5.1.1. Résultats	55
5.5.1.2. Comparaison inter-laboratoire.....	56
5.5.2. Excrétion de DHEA.....	57
5.5.2.1. Résultats	57
5.5.2.2. Comparaison inter-laboratoire.....	57

5.5.3. Excrétion de la testostérone	59
5.5.3.1. Résultats	59
5.5.3.2. Comparaison inter-laboratoire.....	60
5.5.4. Excrétion de la pregnènone.....	61
5.5.4.1. Résultats	61
5.5.4.2. Comparaison inter-laboratoire.....	63
5.6. Conclusion de l'étude comparative inter-laboratoire.....	64
CHAPITRE VI : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	65
CHAPITRE VII : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	<u>Seuils de détection de certains stéroïdes naturels en contrôle du dopage sportif</u>	16
Tableau 2.1	<u>Études d'excrétion de produits à base de DHEA, d'androstènedione et de pregnènone</u>	29
Tableau 2.2	<u>Études d'excrétion de produits à base de testostérone et de pregnènone</u>	30
Tableau 2.3	<u>Programmation du CG pour l'analyse chromatographique de stéroïdes</u>	33
Tableau 3.1	<u>Valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites et des stéroïdes de référence des urines recueillies suite à l'administration de norstéroïdes</u>	39
Tableau 4.1	<u>Séparation de la testostérone et de l'épitestostérone par CLHP</u>	42
Tableau 5.1	<u>Résultats pour l'étalonnage du CG/C/SMRI</u>	47
Tableau 5.2	<u>Solution d'alcane - Résultats obtenus par les laboratoires de Cologne, Montréal et Tokyo</u>	48
Tableau 5.3	<u>Standards de stéroïdes authentiques</u>	49
Tableau 5.4	<u>Standards de stéroïdes authentiques - Résultats des trois laboratoires</u>	50
Tableau 5.5	<u>Urines contrôles négatives - Valeurs obtenues par le laboratoire de Montréal</u>	53
Tableau 5.6	<u>Urines contrôles négatives- Comparaison des résultats des laboratoires de Cologne, Montréal et Tokyo</u>	54

Tableau 5.7	<u>Étude d'excrétion de produits à base d'androstènedione- Profil isotopique des stéroïdes.....</u>	55
Tableau 5.8	<u>Étude d'excrétion de produits à base d'androstènedione- Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires.....</u>	56
Tableau 5.9	<u>Étude d'excrétion de produits à base de DHEA- Profil isotopique des stéroïdes.....</u>	57
Tableau 5.10	<u>Étude d'excrétion de produits à base de DHEA- Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires.....</u>	58
Tableau 5.11	<u>Étude d'excrétion de produits à base de testostérone- Profil isotopique des stéroïdes.....</u>	59
Tableau 5.12	<u>Étude d'excrétion de produits à base de testostérone- Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires.....</u>	60
Tableau 5.13	<u>Étude d'excrétion de produits à base de pregnènone (Échantillons de Montréal)-Profil isotopique des stéroïdes</u>	61
Tableau 5.14	<u>Étude d'excrétion de produits à base de pregnènone (Échantillons de Tokyo)-Profil isotopique des stéroïdes</u>	62
Tableau 5.15	<u>Étude d'excrétion de produits à base de pregnènone- Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires.....</u>	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	<u>Structure de la testostérone et squelette des stéroïdes</u>	3
Figure 1.2	<u>Conversion de la DHEA en androgènes</u>	5
Figure 1.3	<u>Réactions de phase I des stéroïdes androgènes: réductions</u>	7
Figure 1.4	<u>Réactions de phase-II : glucuro- et sulfoconjugaison</u>	8
Figure 1.5	<u>Biotransformation simplifiée de la testostérone</u>	9
Figure 1.6	<u>Biotransformation de la 19-nortestostérone et des prohormones 19-norandrostènedione et 19-norandrostènediol</u>	11
Figure 1.7	<u>Structure chimique de la diosgénine et du stigmastérol</u>	13
Figure 1.8	<u>Préparation de la progestérone à partir de la diosgénine</u>	13
Figure 1.9	<u>Biotransformation de la progestérone en androstènedione</u>	14
Figure 1.10	<u>Fixation du CO₂ atmosphérique par les plantes en C₃</u>	15
Figure 1.11	<u>Fixation du CO₂ atmosphérique par les plantes en C₄</u>	15
Figure 1.12	<u>Schéma de l'appareil CG/C/SMRI</u>	18
Figure 1.13	<u>Relation entre le pourcentage de ¹³C et δ¹³C ‰ selon les sources de carbone</u>	19
Figure 1.14	<u>Formation d'hydrazone : réaction de Girard</u>	22

Figure 3.1	<u>Variation dans le temps des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites NA et NE suite à l'application d'une crème contenant de la norandrostènedione. Résultats sans et avec séparation par CLHP.</u>	37
Figure 4.1	<u>Chromatogrammes CG/SM de standards authentiques de testostérone et d'épitéstostérone purifiés par une double extraction liquide-liquide à l'éther</u>	44
Figure 4.2	<u>Chromatogramme CG/C/SMRI de la fraction de testostérone du contrôle négatif après séparation par CLHP</u>	45
Figure 5.1	<u>Résultats pour le contrôle négatif : valeurs à travers le temps</u>	52
Figure 5.2	<u>Résultats pour le contrôle positif: valeurs à travers le temps</u>	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : Androstérone

Adiol : Androstanediol

AMA : Agence mondiale antidopage

CG : Chromatographe en phase gazeuse

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DIF : Détecteur à ionisation de flamme

DMT : Désoxyméthyltestostérone

E : Etiocholanolone

ESTD : Etalon externe

ET : Epitestostérone

ISTD : Etalon interne

NA : 19-norandrostérone

NE : 19-norétiocholanolone

PD : Pregnanediol

PDB : Pee Dee Belemnite

PT : Pregnanetriol

SM : Spectromètre de masse

SMRI : Spectrométrie de masse de rapports isotopiques

T : Testostérone

TBME : *tert*-butylméthyléther

THG : Tétrahydrogestrinone

UV : Ultraviolet

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. DOPAGE SPORTIF

L'usage de médicaments et de drogues est banni dans le monde sportif. Les trois raisons principales pour interdire une substance sont sa nocivité pour la santé de l'utilisateur, sa capacité à améliorer les performances sportives ainsi que l'atteinte à l'esprit du sport. L'Agence mondiale antidopage (AMA), qui régit la liste des interdictions, les classe en catégories : les stimulants, les analgésiques narcotiques, les diurétiques, les hormones peptidiques et glycoprotéiniques, les agents masquants, les anti-oestrogènes et inhibiteurs d'aromatase et les agents anabolisants (AMA, 2005). Dans cette dernière classe, on retrouve les stéroïdes androgènes anabolisants qui peuvent être exogènes ou endogènes. Un stéroïde endogène est synthétisé par le corps humain à partir du cholestérol. Les stéroïdes exogènes, ou synthétiques, sont quant à eux synthétisés en laboratoire. Ce peut être des stéroïdes qui sont retrouvés naturellement dans le corps humain, telle la testostérone, ou ce peut être des stéroïdes qui sont semblables en structure aux stéroïdes endogènes mais qui présentent quelques différences, telles l'ajout d'un groupement méthyle en position C-17 (Schänzer, 1996). La détection de l'utilisation de ces stéroïdes non naturels est faite principalement à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Dès qu'il y a détection et confirmation de la présence d'une de ces substances, de ses marqueurs ou métabolites dans le profil stéroïdien urinaire, l'échantillon est considéré positif.

Le contrôle du dopage par les stéroïdes naturels demande des tests plus poussés que la simple détection de présence par CG/SM, cette technique ne permettant pas de différencier entre les stéroïdes naturels endogènes ou exogènes. Suite à l'établissement de fourchettes de référence établies après l'analyse de milliers d'échantillons, l'AMA a fixé des seuils pour les métabolites

de ces stéroïdes. Il existe cependant quelques cas, notamment avec la sonde développée pour la détection de l'utilisation de la testostérone, où des analyses de suivi plus poussées sont nécessaires, certains athlètes présentant des valeurs de T/E (rapport testostérone/épitestostérone) normalement et systématiquement avoisinant le seuil. Le contraire est également rencontré ; chez certains individus la prise de testostérone et de ses précurseurs n'entraînera pas le dépassement du seuil (*Oftebro, 1992 ; Raynaud et al., 1992 ; Shackleton, 1997*).

L'utilisation de la spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone quant à elle permet la différenciation entre les substances potentiellement endogènes d'origine naturelle et synthétique en déterminant le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du stéroïde. Cette méthode combine la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse de rapports isotopiques (CG/C/SMRI). Elle a été proposée par trois groupes indépendants en 1997 comme une technique complémentaire à la profilisation des stéroïdes urinaires par CG/SM et est maintenant recommandée comme méthode d'identification formelle par l'Agence mondiale antidopage (*Aguilera et al., 1996 ; Horning et al, 1996 ; Shackleton et al, 1997*). Les laboratoires effectuant les analyses CG/C/SMRI ont des instruments différents, ainsi que des approches d'isolement et d'analyse différentes. Afin de vérifier et d'assurer l'uniformité des conclusions, nous avons, dans ce projet, comparé les résultats obtenus dans trois laboratoires différents.

1.2. STÉROÏDES ANDROGÈNES

La structure de base des stéroïdes est formée de quatre cycles désignés par les lettres A, B, C et D avec une numérotation particulière telle que présentée à la figure 1.1 ci-dessous.

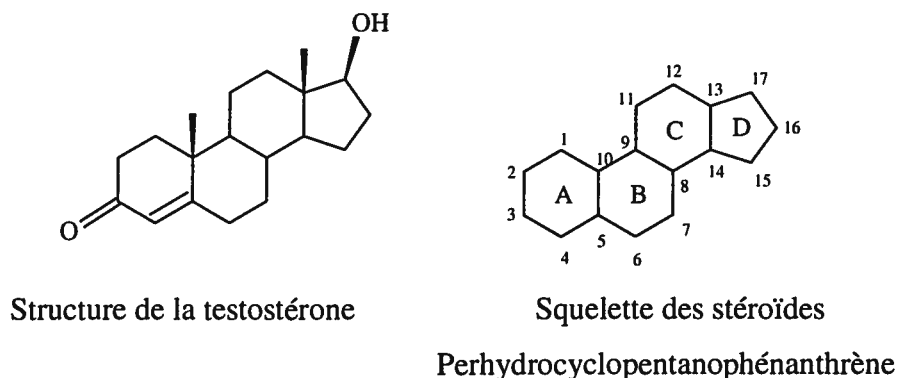


Figure 1.1 Structure de la testostérone et squelette des stéroïdes

Les stéroïdes androgènes sont les hormones sexuelles mâles qui sont responsables entre autres de la différenciation sexuelle, du développement du système reproducteur chez l'homme à la puberté, puis de la fertilité masculine. L'action des divers membres de ce groupe est semblable à celle du stéroïde androgène principal, la testostérone, qui est retrouvée naturellement chez l'humain. Ils agissent à plusieurs niveaux dont les os, le foie, le cerveau, les muscles et les reins (*Wu, 1997*).

1.2.1. Dopage par la testostérone et ses précurseurs

Les premiers tests effectués par l'équipe de M. Donike en 1980 sur les échantillons recueillis lors des Jeux Olympiques de Moscou ont laissé suspecter l'utilisation de la testostérone. Depuis une quinzaine d'années, il semble même que cette attitude aie très peu changé puisqu'il a été enregistré que le plus grand nombre de cas positifs aux anabolisants ces dernières années étaient ceux liés à la prise de testostérone et de ses précurseurs. Les marqueurs d'administration de la 19-nortestostérone, communément appelée la nandrolone, ainsi que ses précurseurs viennent au deuxième rang (*AMA, 2003*).

Le groupe de David (*David et al, 1935*) a découvert l'existence de la testostérone en 1935 en l'isolant de testicules de taureaux sans toutefois en identifier la structure. Celle-ci fut élucidée la même année par deux groupes de chercheurs indépendants, celui de Butenandt et Hanish ainsi que celui de Ruzicka (*Butenandt et Hanisch, 1935 ; Ruzicka, Goldberg et Rosenberg, 1935*). Chez l'homme, la testostérone est produite principalement dans les cellules de Leydig tandis que chez la femme, elle est produite par les ovaires, quoiqu'en quantité plus faible. Elle est également produite chez tous par la glande surrénale par une conversion de la DHEA dans les tissus périphériques (*Labrie et al., 1998 ; Mangat et Feiger, 1999*).

La testostérone est l'hormone dite masculinisante puisque l'un de ses effets est la discrimination sexuelle due au développement des caractéristiques sexuelles secondaires mâles telles que l'apparition des poils faciaux et la baisse du ton de la voix. La testostérone est responsable de la rétention d'azote qui est à la base de ses propriétés anaboliques, telles l'augmentation de la

synthèse des protéines, la diminution de leur catabolisme et l'accroissement de la résistance à l'effort qui peuvent résulter en la croissance de la masse musculaire (*Celotti et Cesi, 1992*). Ce sont ces effets qui sont recherchés chez les athlètes désirant augmenter leurs performances sportives. Par contre, jusqu'à ce jour, aucun stéroïde synthétisé n'est purement anabolisant. Il reste toujours une fonction androgène qui mène à certains effets secondaires indésirables présentés dans la section 1.2.2. En plus de ces actions directes sur l'organisme, la testostérone jouerait un rôle important en tant que prohormone, se convertissant en d'autres hormones plus actives (*Wu, 1997 ; Mottram et George, 2000*).

La testostérone telle quelle est inactive lorsque prise oralement ou par injection puisqu'elle est métabolisée et inactivée tout de suite dans le foie par effet de premier passage. C'est pourquoi les préparations pharmaceutiques contiennent plutôt des esters de testostérone tels l'énanthate et le propionate de testostérone qui resteront plus longtemps dans le corps afin de produire leurs effets (*Mottram et George, 2000 ; de la Torre et al, 2001*).

Les précurseurs, tant de la testostérone que de la nandrolone, sont des prohormones ayant été distribuées commercialement aux États-Unis (jusqu'en janvier 2005) et via internet. Les deux précurseurs principaux de la testostérone, présentés à la figure 1.2, sont la DHEA et l'androstènedione. Elles sont produites par les glandes surrénales ainsi que par les testicules dans le cas de l'androstènedione. Notons que la DHEA est toujours disponible commercialement aux États-Unis.

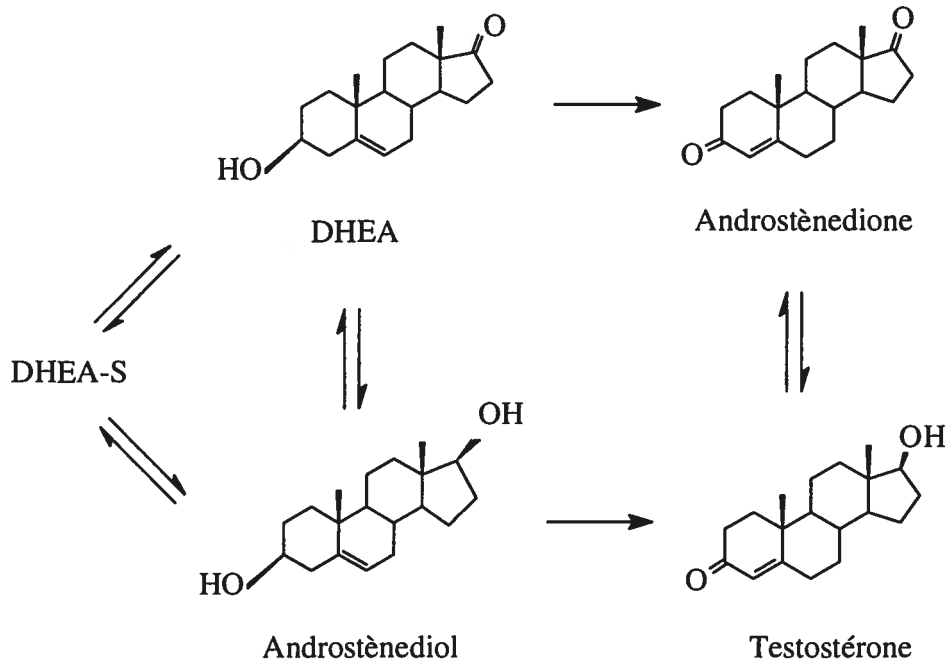


Figure 1.2 Conversion de la DHEA en androgènes (tiré de *Labrie et al., 1998*)

1.2.2. Effets secondaires de la prise de stéroïdes anabolisants androgènes

Les effets secondaires liés à l'abus de testostérone et autres stéroïdes anabolisants androgènes sont nombreux et bien répertoriés. On rapporte des effets, réversibles ou non à l'arrêt, relativement mineurs ou importants dépendant du stéroïde, des doses utilisées, de la fréquence d'utilisation (durée des cycles), des combinaisons et de la susceptibilité individuelle. Ces effets sont notés principalement au niveau cardiovasculaire, au niveau du foie, sur le système reproducteur et finalement sur le comportement. La plupart de ces effets découlent de l'action androgène des stéroïdes comme par exemple la masculinisation chez les femmes, qui est irréversible. Chez les deux sexes, un abus de stéroïdes peut aussi mener à l'infertilité, mais de façon réversible. Les effets toxiques, généralement plus graves pour la santé, peuvent entraîner des désordres hépatiques, principalement lors des dopages par les dérivés possédant un groupement alkyle en C-17, dont entre autres la jaunisse, une hypertrophie possible du cœur, pouvant entraîner un arrêt cardiaque, ou d'autres problèmes qui leur sont reliés (*Mangat, 1999 ; Mottram et George, 2000 ; Wu, 1997*).

1.2.3. Disponibilité des stéroïdes

Les stéroïdes anabolisants androgènes sont importés et vendus clandestinement, incluant les préparations vétérinaires. Bannis dans le monde sportif, certains stéroïdes étaient jusqu'à tout récemment disponibles commercialement aux États-Unis et via Internet pour administration autonome par voie orale, comme compléments alimentaires. De multiples précurseurs de la testostérone, dont l'androstènedione, l'androstènediol et autres ont envahi rapidement le marché du supplément hormonal sportif. La vente de tous ces produits, à l'exception de la DHEA, est interdite depuis janvier 2005. La testostérone et la nandrolone sont, quant à elles, disponibles sous forme de préparations pharmaceutiques pour administration orale ou pour injection intramusculaire. Par contre, l'épitéstostérone n'est pas disponible en préparation pharmaceutique mais a été retrouvée dans des préparations clandestines offertes aux athlètes.

De plus, de nouveaux stéroïdes dits de « structure modifiée » ont fait leur apparition dans le monde sportif. La tétrahydrogestrinone (THG), qui a été distribuée par les laboratoires Balco aux États-Unis, est un dérivé provenant de la réduction de la gestrinone et n'a pour but que de déjouer les contrôles de dopage sportif tout en exerçant un effet anabolisant. Son existence a été connue par la communauté scientifique après l'alerte donnée par un entraîneur. Il en est de même pour la désoxyméthyltestostérone (DMT) dont l'existence a été découverte en février 2005 après sa saisie aux douanes canadiennes.

1.3. BIOTRANSFORMATION DES STÉROÏDES ANDROGÈNES

La transformation de la testostérone en métabolites plus polaires se fait principalement au niveau du foie afin de permettre une excrétion plus rapide par les reins. Cette biotransformation se fait en deux grandes étapes, soit les réactions de phase I et les réactions de phase II. Les stéroïdes androgènes anabolisants ont un métabolisme semblable à celui de la testostérone tel que revu par Schänzer (*Schänzer, 1996*).

1.3.1. Réactions de phase I

Les réactions de biotransformation dites de phase I servent à désactiver les stéroïdes par des réactions enzymatiques telles l'oxydation, la réduction ou l'hydroxylation. Ces réactions diminuent la lipophilicité des stéroïdes et les convertissent en molécules plus polaires. Les enzymes requises pour les diverses réactions vont varier selon le stéroïde. Les réactions d'oxydation ont toujours lieu mais ne sont pas nécessairement visibles dans la structure chimique du produit final et sont souvent catalysées par la famille d'isoenzymes du cytochrome P-450 (Allain, 1996).

Pour la testostérone, les réactions de phase I les plus importantes sont celles de réduction en C-3 et C-4 et d'oxydation en C-17. La première réduction est celle de la double liaison retrouvée en position C-4,5 qui est catalysée par les enzymes 5α - et 5β -réductase qui se situent dans le foie et qui nécessitent la NADPH comme co-facteur. Ensuite, on retrouve la réduction du groupement carbonyle situé en position C-3 par l'enzyme 3α - ou 3β -hydroxystéroïde-déshydrogénase (3-HSD). Ces deux réductions successives sont représentées à la figure 1.3. Sous l'action de la 17β -hydroxydéshydrogénase, la fonction hydroxyle en C-17 est convertie en cétone. Les métabolites majeurs excrétés sont ainsi les androstanediols, l'androstérone et l'étiocolanolone.

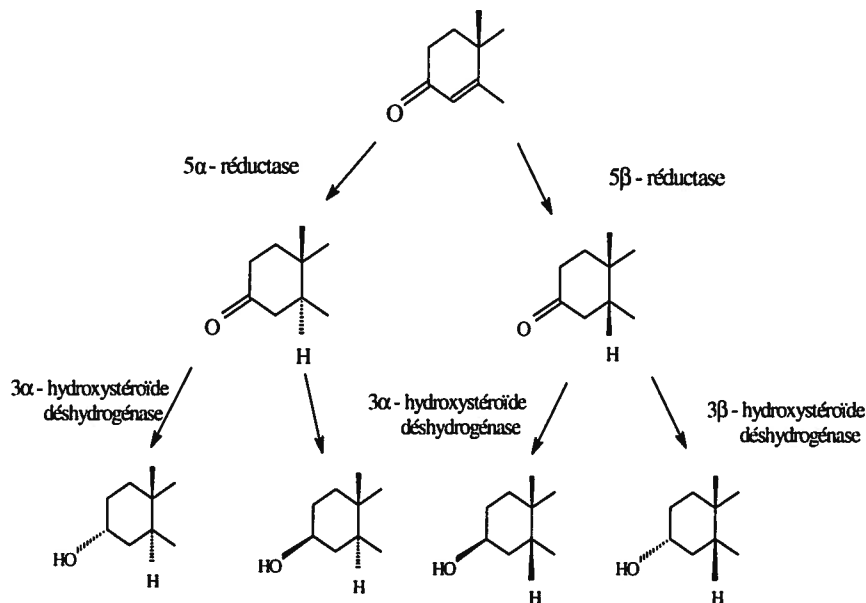


Figure 1.3 Réactions de phase I des stéroïdes androgènes: réductions

(Tiré de Schänzer, 1996)

1.3.2. Réactions de phase II

Les réactions de phase II telles qu'illustrées à la figure 1.4 permettent la conjugaison des stéroïdes ou de leurs métabolites à l'acide glucuronique ou à l'ion sulfate. Ainsi conjugués, ils seront éliminés plus facilement du corps. Les deux réactions de conjugaison dont nous traiterons, la glucuroconjugaison et la sulfatation, sont catalysées par des enzymes, la UDP-glucuronyltransférase (UDPGT) et la 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (3'PA 5' PS) respectivement (*Allain, 1996; Schänzer, 1996*).

La glucuroconjugaison, qui est la formation d'un lien O-glucuronide, se fait notamment sur les hydroxyles en position C-3 α . Les métabolites majoritaires de la testostérone (androstérone et étiocolanolone et androstandiols) sont excrétés surtout sous forme glucuroconjuguée tout comme deux des métabolites de la nandrolone, la 19-norandrostérone (3 α , 5 α) et la 19-norétiocolanolone (3 α , 5 β). Quant aux isomères 3 β -OH, ils sont principalement sulfoconjugués (épiandrostérone, épinorandrostérone) (*Lautala, 2000 ; Schänzer, 1996*).

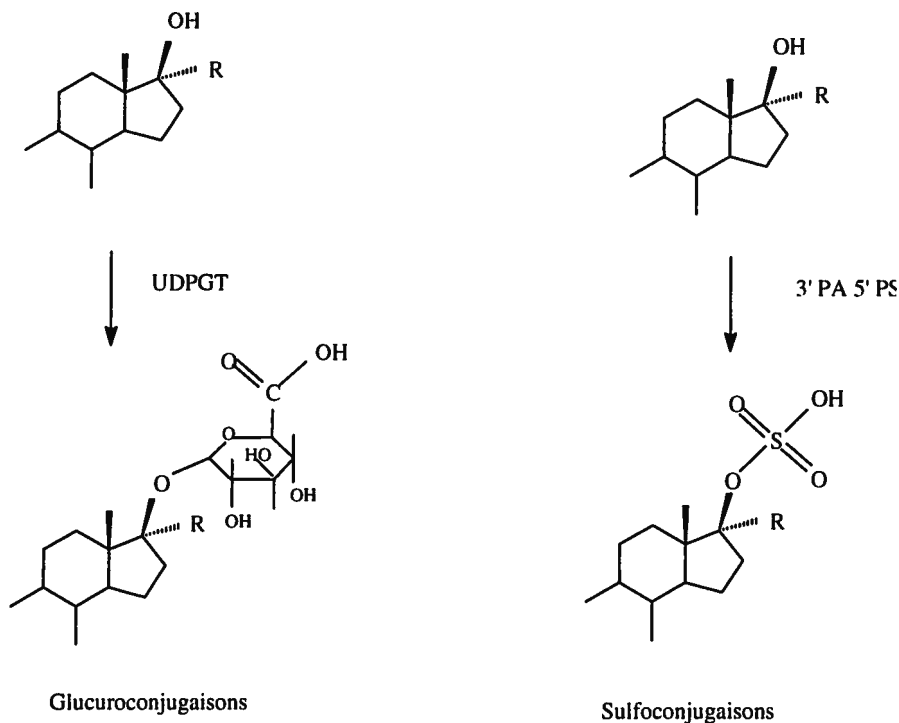


Figure 1.4 Réactions de phase II : glucuro- et sulfoconjugaison (Tiré de *Schänzer, 1996*)

1.3.3. Biotransformation de la testostérone

La biotransformation de la testostérone et de ses précurseurs ainsi que la biotransformation de la pregnénolone sont représentées à la figure 1.5. En fin de chaîne, on retrouve les métabolites principaux de la testostérone et de ses précurseurs : l'androstérone, l'étiocolanolone, et les deux androstanediols.

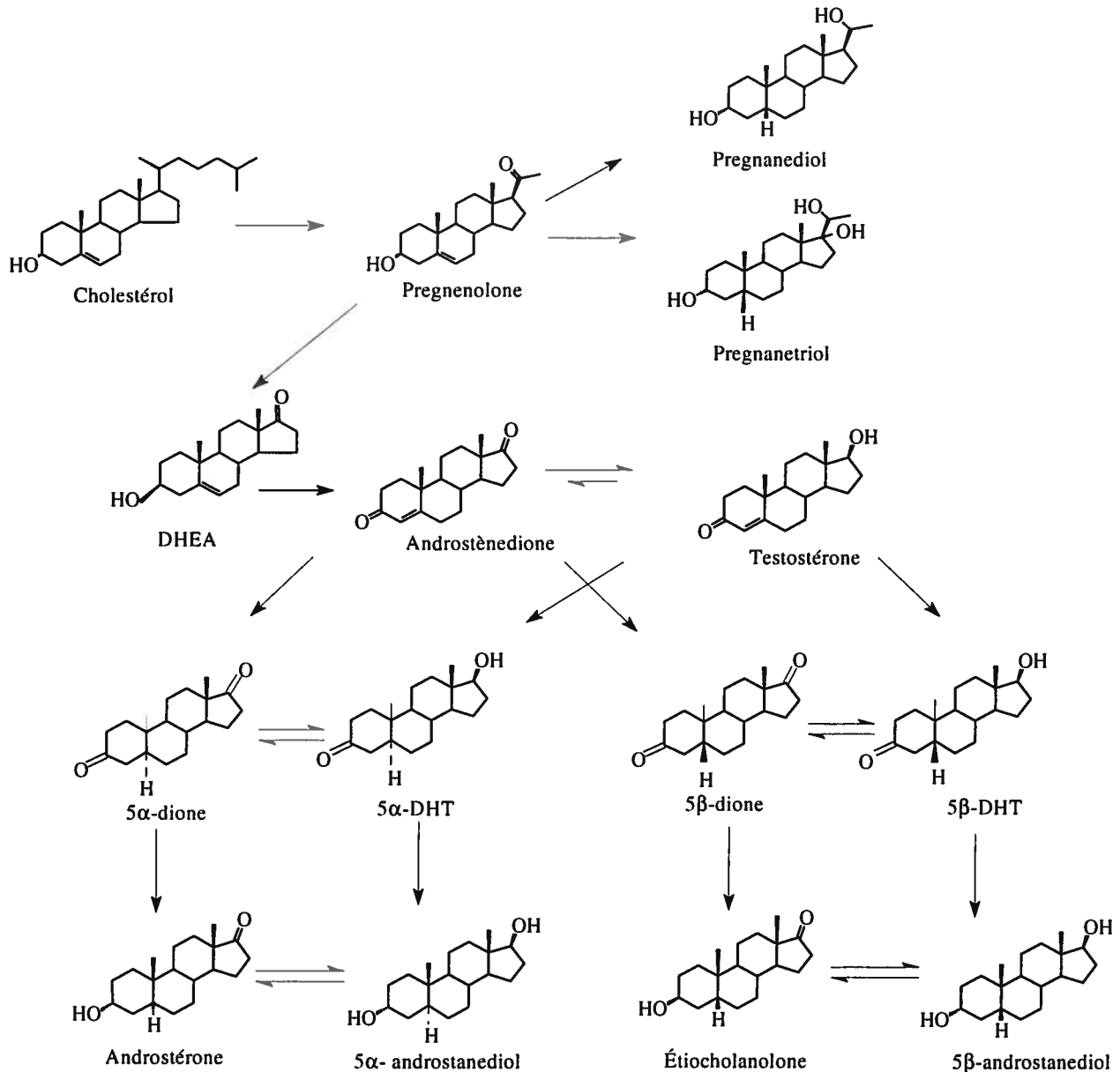


Figure 1.5 Biotransformation simplifiée de la testostérone

(Tiré de Schänzer, 1997; Uralets et Gillette, 1999)

1.4. LA 19-NORTESTOSTÉRONNE

Bien que sa structure soit presque identique à celle de la testostérone (absence du méthyle en position C-19), l'action de la 19-nortestostérone serait surtout anabolisante plutôt qu'androgène, limitant certains effets négatifs que son utilisation entraînerait. Bien que de très faibles concentrations du métabolite urinaire principal de la nortestostérone, la norandrostérone, soient retrouvées normalement dans les urines, excluant lors de la grossesse où on retrouve ce métabolite, il n'est pas encore tout à fait clair si ce stéroïde est synthétisé chez l'humain, et, si oui, à quelle concentration et dans quel organe. Certains auteurs ont avancé la théorie que la perte du méthyle en position 19 serait faite au niveau de la testostérone ou de l'androstènedione lors de l'aromatisation de ces androgènes en estrogènes. Cette transformation se fait chez les femmes enceintes ou lors de l'ovulation. Les 19-norstéroïdes en seraient des intermédiaires (*Short, 1960 ; Townsley et al., 1967*). De très petites concentrations (de l'ordre du pg/mL) de 19-nortestostérone ont été retrouvées dans le fluide folliculaire ovarien et dans le placenta durant la grossesse (*Dehennin, Jondet et Scholler, 1987 ; Reznik et al., 1987*). La norandrostérone, métabolite principalement glucuroconjugué, est excrétée tout au long de la grossesse en concentration pouvant atteindre 20 ng/mL (*Mathurin et al., 2001*). Chez l'homme et la femme, les plus fortes concentrations mesurées normalement par CG/SM ne dépassent pas 1 ng/mL.

L'Agence mondiale antidopage impose un seuil de 2 ng/mL pour rapporter un résultat anormal (positif) de norandrostérone. Ces résultats peuvent cependant provenir de l'administration de compléments alimentaires contenant des norstéroïdes non mentionnés à l'étiquette ou suite à l'ingestion d'une quantité non négligeable d'abats de porcs non castrés chez lequel la nortestostérone est endogène (*Desroches et al., 2002*). De 1988 à 2001, les laboratoires accrédités par le comité international olympique (CIO), ont trouvé en moyenne 0,25% de cas positifs à la nandrolone parmi tous les échantillons analysés. Une étude réalisée par Ayotte et al. (*2002*) chez des athlètes féminins, entre 1994 et 2001, a trouvé 0,1% des échantillons positifs à la nandrolone. Les concentrations de norandrostérone se situaient entre 7 et 75 ng/mL.

1.4.1. Biotransformation de la 19-nortestostérone

La biotransformation de la 19-nortestostérone, telle que représentée dans la figure 1.6, a été étudiée par Engel et al., en 1958. Les métabolites principaux sont la 19-norétiocholanolone et la 19-norandrostérone qui sont excrétés sous forme glucuroconjuguée. Il y a également un troisième métabolite, un isomère en 3β , excrété sous forme sulfatée, le 3β -hydroxy-5 α -estran-17-one (*Massé et al., 1985*).

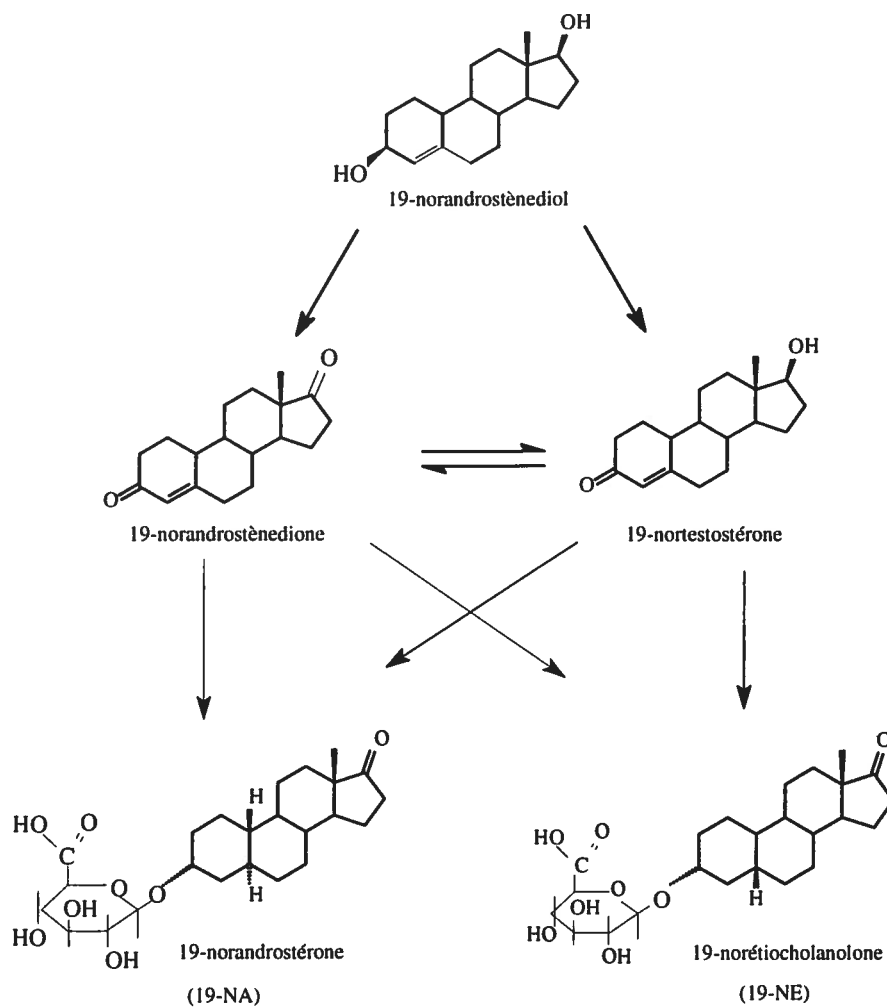


Figure 1.6 Biotransformation de la 19-nortestostérone et des prohormones 19-norandrostènedione et 19-norandrostènediol

1.4.2. Détection de la norandrostérone par CG/C/SMRI

La spectrométrie de masse de rapports isotopiques demande des pics de composition homogène sinon le rapport isotopique du produit d'intérêt sera altéré par le contaminant. De plus, il doit y avoir une quantité injectée d'au moins 20 ng, pour une intensité minimale du pic de 0,5 nA avec l'appareil utilisé lors de cette étude, soit le PDZ Europa (1997). Ainsi, la détection de la norandrostérone endogène, le métabolite le plus important, est très difficile par CG/C/SMRI puisque les concentrations retrouvées sont bien en deçà de la limite de détection de l'instrument (*Cléroux, 2002*). La sensibilité de l'instrument est donc difficilement compatible avec l'analyse de la norandrostérone urinaire naturelle.

Afin d'améliorer la détection de la norandrostérone par CG/C/SMRI, nous avons choisi de purifier des échantillons par isolement des métabolites par chromatographie en phase liquide, CLHP.

1.5. APPAUVRISSEMENT EN ¹³C DES STÉROÏDES SYNTHÉTIQUES

1.5.1. Synthèse de la testostérone à partir des plantes

La synthèse des hormones synthétiques commence à partir d'un composé que l'on retrouve dans les « yams », la diosgénine, ou à partir du stigmastérol qui lui est présent dans le soya (*Aguilera et al., 2001*). Leur structure moléculaire comporte les quatre anneaux qui forment la structure de base des stéroïdes androgènes anabolisants (figure 1.7).

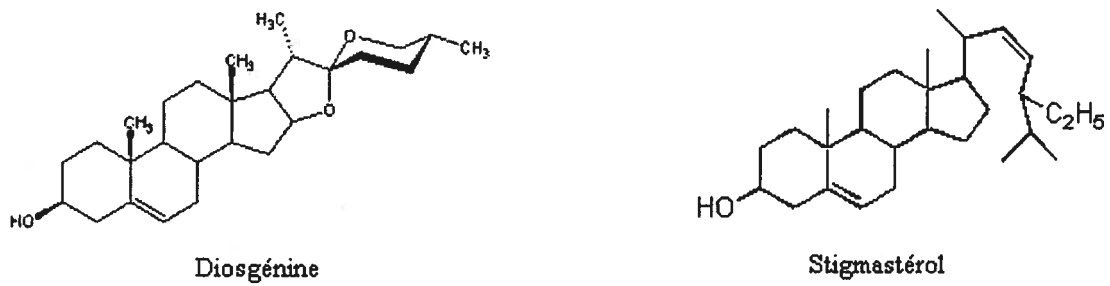


Figure 1.7 Structure chimique de la diosgénine et du stigmastérol

La transformation de la diosgénine en progestérone se fait selon le mécanisme présenté à la figure 1.8 :

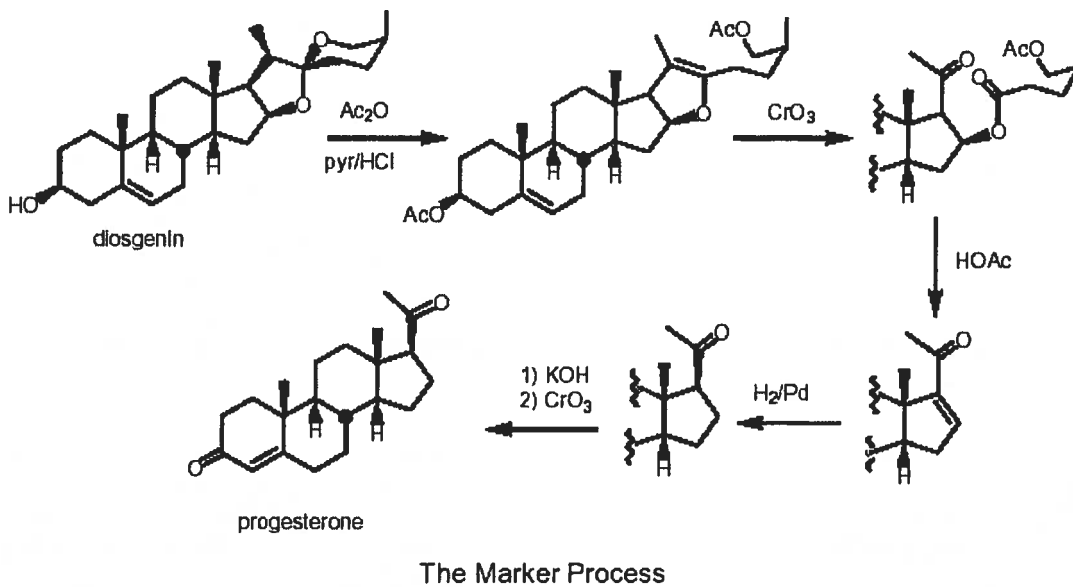


Figure 1.8 Préparation de la progestérone à partir de la diosgénine (Tiré de *Snedden, 2005*)

À partir de la progestérone, il est possible de synthétiser l'androstènedione par l'intermédiaire de la 17 α -progestérone. Le lien contenant la fonction cétone en C-18 est scindé, menant à une fonction cétone en C-17 tel que présenté à la figure 1.9.

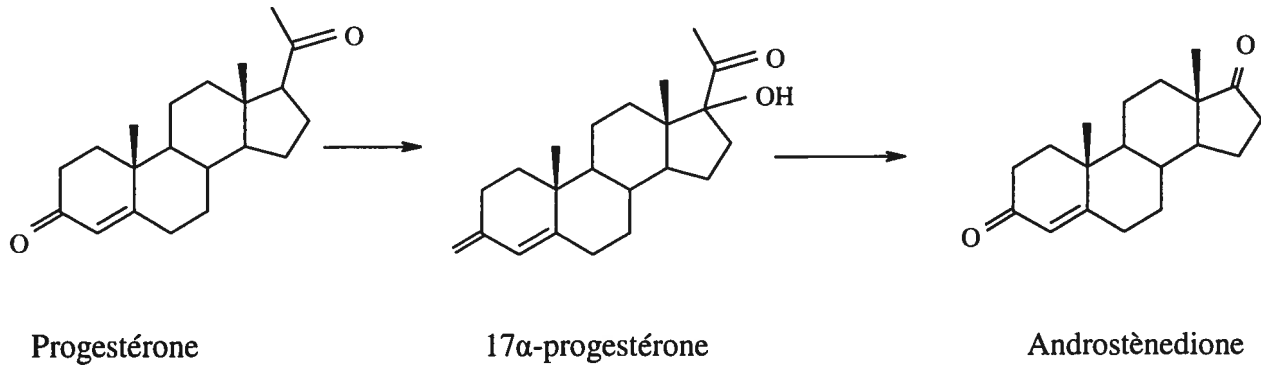


Figure 1.9 Transformation de la progestérone en androstènedione

1.5.2. Fixation du CO₂ par les plantes et discrimination du ¹³C

Les groupes de Becchi et de Southan (*Becchi et al, 1994 ; Southan et al, 1990*) ont les premiers démontré que la testostérone synthétique avait une abondance en ¹³C différente de la testostérone endogène urinaire. Cette différence est due à leur source respective, soit différents types de plantes. La discrimination envers les atomes de ¹³C se fait lors de l'assimilation et la fixation de carbone par les plantes qui se divisent en deux grandes catégories : C₃ et C₄. Ces dénominations ont été déterminées à cause du produit des réactions : le produit des plantes possédant un mécanisme d'assimilation dit en C₃ est un sucre à trois carbones, tandis que celui du mécanisme en C₄ est un sucre à 4 carbones.

Les plantes utilisant le mécanisme d'assimilation en C₃, qui constituent la majorité des plantes, dont le blé, utilisent le cycle de Calvin pour la fixation du CO₂ atmosphérique selon la réaction décrite à la figure 1.10 :

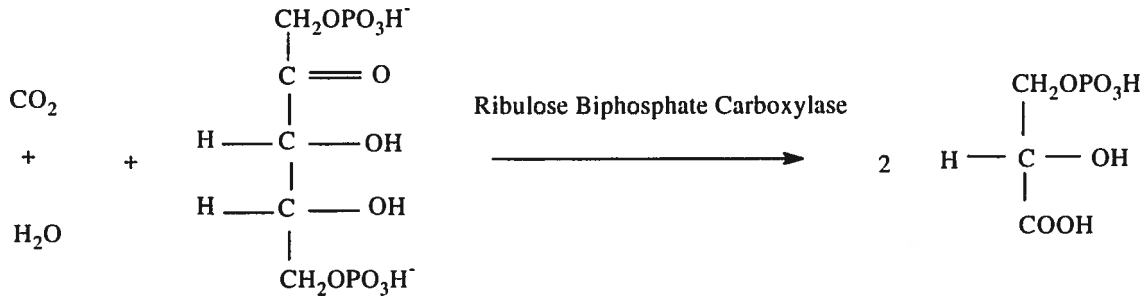


Figure 1.10 Fixation du CO₂ atmosphérique par les plantes en C₃

(Tiré de *Erlich et Roughgarden., 1987*)

Lors de la fixation du CO₂, l'enzyme qui en est responsable, la ribulose biphosphate carboxylase, incorpore un faible nombre de ¹³CO₂ menant à un faible pourcentage ¹³C tel que représenté sur la (*Smith et Epstein, 1971*).

Les plantes utilisant le mécanisme d'assimilation en C₄, dont le maïs, utilisent le cycle de Hatch-Slack pour la fixation du CO₂ atmosphérique selon la réaction décrite à la figure 1.11 :

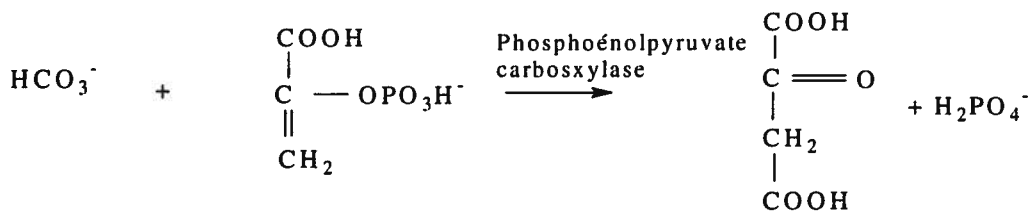


Figure 1.11 Fixation du CO₂ atmosphérique par les plantes en C₄

(Tiré de *Erlich et Roughgarden, 1987*)

Lors de la fixation, l'enzyme qui en est responsable, la phosphoénolpyruvate carboxylase, incorpore un nombre relativement élevé de ¹³CO₂ (*Liang et al, 1998*).

Chez l'humain, la biotransformation des stéroïdes endogènes vient d'une grande variété de végétaux qui sont retrouvés dans l'alimentation et qui appartiennent aux deux types de plantes. Ainsi, leur teneur en ^{13}C sera une moyenne de celles des diverses sources d'alimentation. Les stéroïdes synthétiques, quant à eux, sont produits à partir des plantes C_3 , telle la plante de soya à partir de laquelle est synthétisée la testostérone. Leur pourcentage de ^{13}C est donc significativement plus faible que celui des stéroïdes endogènes (*Shackleton, Phillips et al., 1997 ; Aguilera et al., 1999 ; De la Torre et al., 2000 ; Saudan et al., 2004*). C'est grâce à cette différence qu'il est possible de distinguer l'origine synthétique ou naturelle des métabolites urinaires stéroïdes par analyse en CG/C/SMRI.

1.6. CONTRÔLE DU DOPAGE A LA TESTOSTÉRONE ET SES PRÉCURSEURS : COMBINAISON CG/SM ET CG/C/SMRI

1.6.1. Dépistage par CG/SM

La technique de dépistage par CG/SM nous permet d'identifier et de déterminer les concentrations des différents stéroïdes urinaires qui sont présents dans un échantillon. Pour les stéroïdes naturels, l'Agence mondiale antidopage a établi des valeurs limites qui sont utilisées par les laboratoires pour effectuer des analyses complémentaires par CG/C/SMRI. Ces limites, pour quelques stéroïdes naturels glucuroconjugués, sont représentées au tableau 1.1.

Tableau 1.1 Concentrations limites permises par l'AMA pour certains stéroïdes naturels (AMA, 2005)

Stéroïdes endogènes	Concentration limite (ng/mL) Corrigée pour gravité spécifique 1,020
Testostérone et épitestostérone	200
Androstérone et étiocholanolone	10 000
DHEA-glucuronide	200

À partir des données récoltées en CG/SM, on peut également déterminer le rapport testostérone/épitestostérone (T/E) par la comparaison des surfaces ou des hauteurs des pics. La limite pour ce rapport a été fixée à quatre par l'AMA. Pour tous ces métabolites ou marqueurs, le résultat de l'analyse CG/C/SMRI est considéré comme étant concluant. En l'absence d'une telle analyse, un suivi doit être fait auprès de l'athlète afin de déterminer les valeurs individuelles basales.

Il faut mentionner que l'analyse CG/C/SMRI n'est pas effectuée par tous les laboratoires, sa maîtrise étant particulièrement difficile en matrice urinaire complexe et pour des analytes dont les concentrations sont très variables. Les stéroïdes possédant des fonctions hydroxyles sont usuellement dérivés afin d'en améliorer la stabilité, ce qui n'est pas réellement compatible à la détermination du rapport isotopique du carbone.

1.7. SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE RAPPORTS ISOTOPIQUES DU CARBONE (SMRI)

La technique d'analyse des rapports isotopiques du carbone est une technique connue depuis le milieu des années 1970 et est utilisée notamment dans le domaine de la géologie. Mais ce n'est qu'en 1990 que le premier appareil combinant la chromatographie en phase gazeuse, un four de combustion et un spectromètre de masse de rapports isotopiques (CG/C/SMRI), tel que nous le connaissons aujourd'hui, a été mis sur le marché. Puis, cette technique a été proposée en 1994 en tant que méthode de confirmation d'administration de stéroïdes synthétiques dans le domaine de contrôle du dopage sportif par le groupe de Becchi (*Becchi et al, 1994*). En 1996 et 1997, trois autres groupes ont proposé l'utilisation de cette technique dans ce domaine (*Aguilera et al., 1996 ; Horning et al, 1996 ; Horning et al., 1997; Shackleton et al, 1997*). L'application de cette méthode permet une mesure précise de l'abondance isotopique des atomes de carbone des différentes molécules contenues dans l'échantillon en mesurant le rapport $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$.

1.7.1. Fonctionnement de l'instrument

L'échantillon est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse, représenté à la figure 1.12, dans lequel les analytes seront séparés chromatographiquement sur une colonne capillaire. Puis, les analytes sont dirigés dans le four de combustion qui est chauffé à 860°C pour permettre la transformation complète des composés organiques en CO₂ + H₂O. L'eau va être éliminée par un piège de Nafion pour permettre au CO₂ de se rendre seul dans l'analyseur du spectromètre de masse qui sépare les masses m/z 44, 45 et 46 (correspondant respectivement au ¹²C¹⁶O¹⁶O, ¹³C¹⁶O¹⁶O et ¹²C¹⁸O¹⁶O).

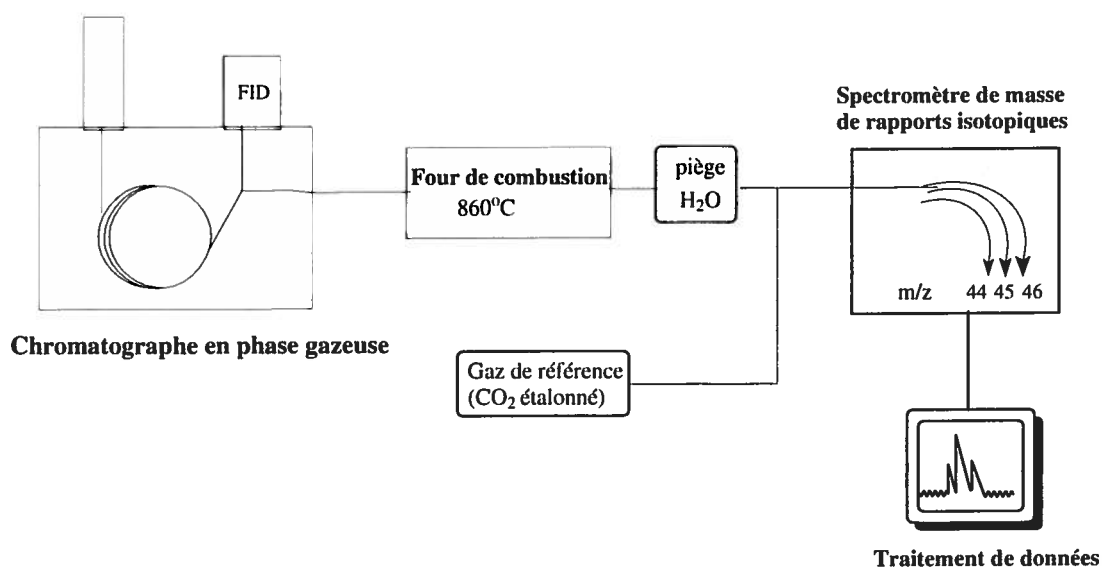


Figure 1.12 Schéma de l'appareil CG/C/SMRI

Le rapport ¹³C/¹²C mesuré (m/z 45 / m/z 44) n'est pas absolu, mais est plutôt la différence (δ) entre le rapport isotopique de l'échantillon et celui d'un standard international, le Pee Dee Belemnite (PDB), un carbonate (CaCO₃) provenant d'une formation de fossile calcaire retrouvée à Pee Dee en Caroline du Sud. Ce rapport donné en unité par mille, est calculé selon l'équation suivante :

$$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ ‰} = [(\text{RIC}_{\text{éch}} - \text{RIC}_{\text{réf}}) / \text{RIC}_{\text{réf}}] \times 1000$$

RIC_{éch} = rapport isotopique du carbone (¹³C/¹²C) de l'échantillon

RIC_{réf} = rapport isotopique du carbone (¹³C/¹²C) de la référence

1.7.2. Sources de carbone

Le potentiel discriminant de l'analyse isotopique du carbone est basé sur la différence de l'abondance naturelle de l'isotope ^{13}C , donnée en pourcentage, selon la source de carbone. Tel que représentée sur la figure 1.13, cette différence est d'environ 0,055 % ce qui se traduit par un intervalle de valeur δ de 50,0 ‰. Ceci est largement suffisant pour une comparaison en SMRI, puisque l'appareil peut détecter des variations d'abondance du ^{13}C aussi petites que 1 ‰ (Meier-Augenstein, 1999). Par convention, la valeur de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ du PDB est égale à 0 ‰. Puisque la référence possède une abondance naturelle de ^{13}C très élevée, soit de 1,1112 %, les échantillons qui lui sont comparés ont donc une valeur $\delta^{13}\text{C}$ négative. Dans la pratique cependant, dû à sa rareté, on utilise plutôt du CO_2 étalonné par rapport au PDB comme référence.

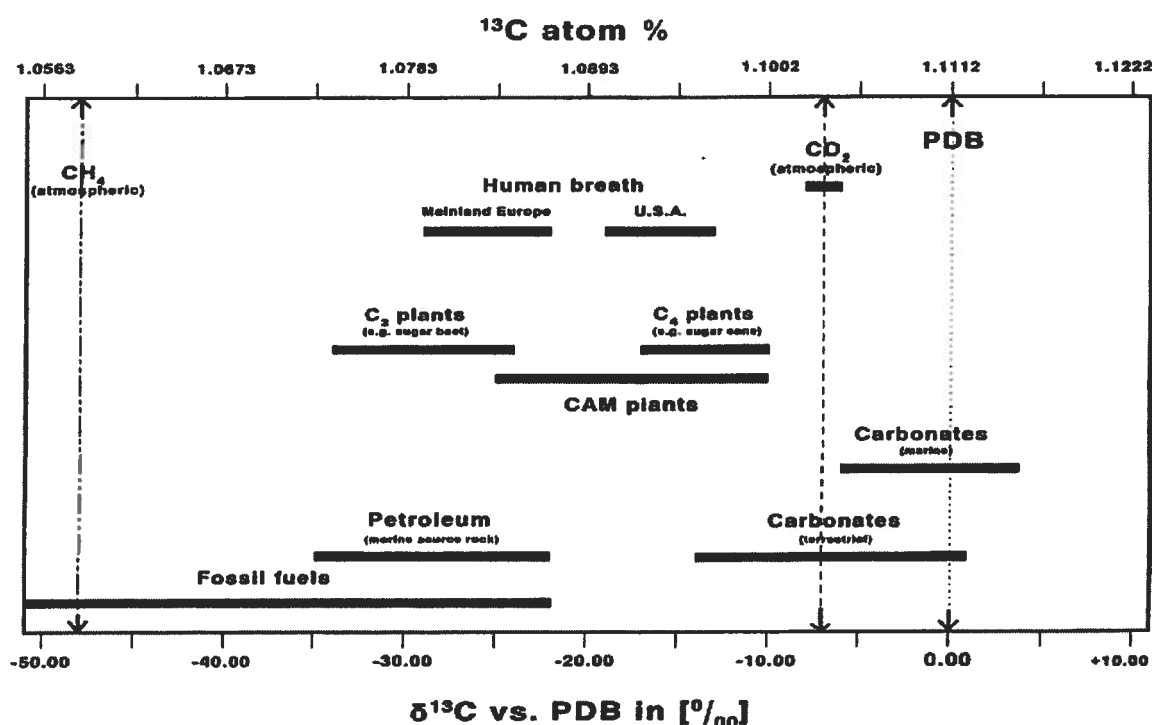


Figure 1.13 Relation entre le pourcentage de ^{13}C et $\delta^{13}\text{C}$ ‰ selon les sources de carbone

(Tiré de Brand, 1996 et de Meier-Augenstein, 1999)

1.7.3. Critère de positivité des échantillons analysés par SMRI

Afin de minimiser les différences individuelles pouvant être attribuées à des variations de diète, et à des techniques de laboratoire différentes, on compare les valeurs $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ des métabolites urinaires finaux androstérone, étiocholanolone, 5 α -androstane-3 β -diol et 5 β -androstane-3 α -diol, à celles de stéroïdes de référence non affectés par l'administration de testostérone ou de prohormones soit le cholestérol, le pregnane-3 β -diol et le pregnane-20 α -triol ou la 11-hydroxyandrostérone. On ne considère pas les valeurs absolues, plusieurs études dans ce domaine ayant démontré une différence des valeurs dites normales au sein des diverses populations d'athlètes dont les échantillons ont été analysés. (Ayotte *et al.*, 2001; Becchi *et al.*, 1994; Horning *et al.*, 1997; Ueki *et Okano*, 1999).

En 1997, Shackleton a rapporté l'obtention de valeurs de -29 ‰ pour les métabolites urinaires suite à l'administration d'énanthate de testostérone. Cette valeur ne peut cependant être considérée dans l'absolu car, sachant que l'administration de testostérone ou ses précurseurs entraîne une diminution des valeurs de delta des métabolites de -4 ‰ à -7 ‰, la méthode serait non discriminante chez les individus dont la valeur de base des stéroïdes urinaires est de -19 ‰ et dont les valeurs ne descendraient qu'à -26 ‰ après dopage. De plus, considérant le retour à la normale, après quelque temps, la composition isotopique des métabolites urinaires reflétera leur double origine.

Par ailleurs, la teneur en ^{13}C de divers stéroïdes endogènes est pratiquement identique pour un individu donné. Suite à l'administration d'un stéroïde, que ce soit la testostérone, un précurseur ou un corticostéroïde, la différence des valeurs mesurées entre les stéroïdes de référence et les métabolites s'accroît d'au moins -3 ‰ (Aguilera *et al.*, 2000; Ayotte *et al.*, 2001; Horning *et al.*, 1997; Shackleton *et al.*, 1997). Présentement, l'Agence mondiale antidopage recommande de considérer comme d'origine différente, les métabolites dont la valeur de $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ diffère de plus de 3 unités ‰ de celle des stéroïdes de référence.

1.7.4. Pregnènone : biosynthèse et rôle

Synthétisée dans les glandes surrénales et dans le système nerveux central, la pregnènone est un métabolite direct du cholestérol. Elle se métabolise et est excrétée principalement en pregnanediol et, plus faiblement, en pregnanetriol. L'industrie du supplément alimentaire américain a mis en marché des gélules de pregnènone alléguant des bénéfices pour la mémoire, les fonctions cognitives et sur les conditions de la peau ; elle jouerait aussi un rôle en tant que prohormone bien que très lointaine de la testostérone (*Saudan et al, 2004*).

La pregnènone n'a donc pas de rôle direct en dopage sportif. Par contre, son administration altère la valeur de $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ de son métabolite principal, le pregnanediol et pourrait ainsi masquer l'utilisation d'un stéroïde tel la testostérone ou ses précurseurs puisque, tel que mentionné auparavant, le pregnanediol et le pregnanetriol sont des stéroïdes de référence. Pour ces raisons, nous avons convenu d'étudier la teneur en ^{13}C des métabolites urinaires de la pregnènone dans le cadre de cette étude.

1.7.5. Purification des extraits de stéroïdes urinaires en vue de l'analyse

CG/C/SMRI

Les premières méthodes d'analyse proposées par Shackleton étaient basées sur la mesure des androstanediols. Cependant, leur isolement préalable de la matrice urinaire était nécessaire dû à leur faible concentration comparée à la celle de l'androstérone et de l'étiocolanone entre autres. Shackleton (*Shackleton et al., 1997*) a proposé de séparer les diols des stéroïdes possédant des fonctions cétoniques (comme l'androstérone) en transformant ces derniers en hydrazones, par l'emploi du réactif de Girard. L'extraction par un solvant organique permet la récupération des stéroïdes libres, soient notamment les androstanediols et les stéroïdes de référence pregnanediol et pregnanetriol (*Girard et al., 1936*) tel que présenté à l'équation à la figure 1.14.

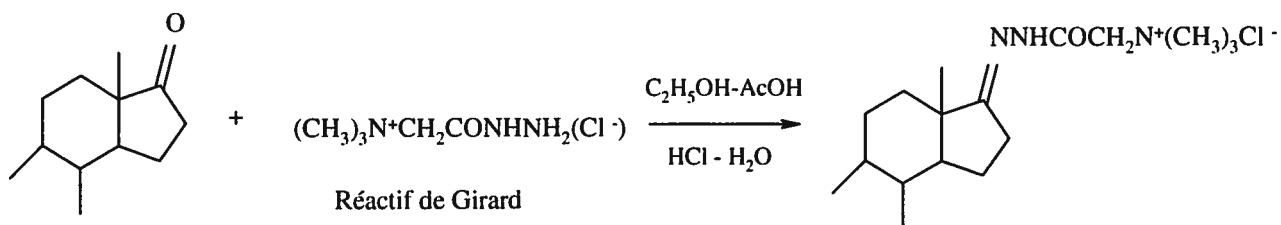


Figure 1.14 Formation d'hydrazone : réaction de Girard

Des travaux antérieurs nous ont permis de mettre au point l'analyse complémentaire des stéroïdes cétoniques qui sont récupérés par traitement acide des hydrazones suivi d'une extraction (Ayotte, 2001 ; Lajeunesse, 2004).

1.8. ÉTUDES ANTÉRIEURES DÉMONTRANT L'EFFET DE DOPAGE PAR DIVERS STÉROÏDES SUR LES VALEURS $\delta^{13}\text{C}$ ‰ DES MÉTABOLITES URINAIRES

1.8.1. Études antérieures concernant des urines contrôles négatives

Selon les études effectuées par le groupe de Ueki, en 1999, qui a analysé les urines de vingt volontaires n'ayant pas suivi de traitement, les valeurs moyennes des rapports isotopiques obtenues pour le 5α -androstane-3 β -diol, le 5β -androstane-3 β -diol et le pregnane-3 β -diol dans des urines contrôles négatives se situent entre -15,5 ‰ et -20,6 ‰. Le groupe d'Ayotte (Ayotte *et al*, 2001) a également analysé des urines négatives afin d'établir les valeurs de référence chez les athlètes. Soixante-dix-huit urines d'athlètes provenant de tests de routine (données négatives suite à la recherche de stéroïdes anabolisants androgènes) ont été analysées. L'androstérone et l'étiocolanone présentait des valeurs moyennes de rapports isotopiques de -23,4 ‰ et -23,3 ‰ respectivement, tandis que les stéroïdes de référence, le pregnane-3 β -diol, le pregnane-20 α -triol et le cholestérol présentait des valeurs moyennes de -24,9 ‰, -23,8 ‰ et -24,2 ‰. Il faut noter que

l'instrument utilisé pour ces tests produit des valeurs systématiquement et uniformément plus négatives. Ces observations ont été vérifiées lors de cette étude. Les écarts inter-individus variaient entre -19,9 ‰ et -26,8 ‰. Notons que nous ne pouvons exclure l'administration de stéroïdes androgènes non détectées dans ces urines qui provenaient des contrôles routiniers effectués auprès de sportifs.

Le groupe d'Aguilera (*Aguilera et al., 2001*) a obtenu des valeurs moyennes se situant entre -25,0 ‰ et -26,6 ‰ pour les deux androstanediols et des valeurs moyennes se situant entre -24,1 ‰ et -24,3 ‰ pour le pregnanediol. L'échantillon contrôle se composait de 62 volontaires habitant les États-Unis et provenant de différentes ethnies, soit des Africains américains, des hispaniques, des asiatiques et des caucasiens. Le groupe de Shackleton a lui aussi évalué un échantillon contrôle, comprenant 5 volontaires chinois. Les valeurs obtenues pour le pregnanediol se situent entre -25,5 ‰ et -27,8 ‰ tandis que les valeurs obtenues pour les androstanediols se situent entre -25,3 ‰ et -28,3 ‰ (*Shackleton et al., 1997*). Il faut noter que l'addition de groupement acétate produit des valeurs artificiellement appauvries c'est-à-dire plus négatives.

1.8.2. Études antérieures sur l'effet d'une prise de testostérone, DHEA et androstènedione

Des études préalables, faites entre autres par les groupes de Shackleton et Phillips (1997) et d'Aguilera (2000) ont démontré qu'une prise de testostérone fait varier significativement les valeurs δ ‰ des métabolites, soit de -6,2 ‰ pour l'androstérone et l'étiocolanolone et de -3 ‰ pour les deux androstanediols. Tel qu'attendu, les stéroïdes de référence, dont le pregnanediol, ont gardé exactement la même valeur de delta pré et post traitement, soit -25 ‰ qui est la valeur non corrigée de l'acétate (Shackleton, 1997). Ces deux études comptaient chacune cinq volontaires ayant eu des injections d'énanthate de testostérone.

On retrouve exactement les mêmes résultats pour les prises de DHEA et d'androstènedione tel que l'ont démontré les études des groupes de Horning (1997), Shackleton (1997), et Ayotte (2001). Ces laboratoires ont trouvé qu'une prise de DHEA entraînait, respectivement, une diminution moyenne de -8,9 ‰, -7,2 ‰ et 8,3 ‰ pour les quatre métabolites principaux, tandis

que les stéroïdes de référence conservaient la même valeur δ ‰ (les diminutions étant au plus de -0,3 ‰). Le groupe d'Ayotte (2001) a également analysé les effets causés par l'administration orale d'androstènedione. Tout comme pour les prises de testostérone et de DHEA, une prise d'androstènedione fait diminuer les $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites de 8,9 ‰ tandis que ceux des stéroïdes de référence demeurent intacts.

L'androstènedione, prohormone en vente libre aux États-Unis jusqu'en janvier 2005, étant un précurseur de la testostérone, est convertie entre autre en androstérone, étiocolanolone, 5 α -androstaniol et 5 β -androstaniol tel qu'illustré à la figure 1.5 ; les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites chutent rapidement jusqu'à 50 heures suivant l'administration (Ayotte *et al.*, 2001).

1.9. OBJECTIFS ET APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE

La première partie du projet est la détection des norstéroïdes par CG/C/SMRI. Nous avons utilisé des échantillons recueillis lors d'études précédentes suite à l'administration de norandrostènedione et de norandrostènediol afin de connaître la teneur en ^{13}C des métabolites excrétés. La concentration des métabolites des norstéroïdes excrétés dans l'urine est généralement trop faible pour en permettre l'analyse fiable lorsqu'en présence de métabolites urinaires très importants comme l'androstérone et l'étiocolanolone. Le premier objectif du projet était de comparer l'efficacité de deux méthodes de purification des fractions contenant les stéroïdes glucuroconjugués, soit l'extraction sélective par la formation d'hydrazones et l'isolement par chromatographie liquide à haute performance.

Dans un deuxième temps, le second objectif de ce projet visait la mise au point d'une méthode d'isolement de la testostérone et de l'épitéstostérone permettant leur analyse directe, et non seulement celle des métabolites majeurs, androstérone et étiocolanolone dont la présence peut être due à tous les autres androgènes naturels. La concentration de testostérone n'est élevée possiblement que dans les premières heures suivant son administration. Les pratiques dopantes étant souvent plus sophistiquées, les concentrations urinaires de testostérone et d'épitéstostérone

sont généralement plus faibles et la mesure fiable de leur teneur en ^{13}C peut être altérée par la présence de stéroïdes en fortes concentrations. De plus, ces deux épimères ne sont pas résolus chromatographiquement lorsque non dérivés. Nous avons voulu prendre avantage des méthodes de séparation par CLHP préalables à l'analyse isotopique.

Finalement, le troisième objectif du projet était d'effectuer une étude comparative multicentre ayant pour objet la mesure des rapports isotopiques du carbone des métabolites urinaires de la testostérone et de ses précurseurs par CG/C/SMRI. Cette étude visait à démontrer l'efficacité de la technique de confirmation par CG/C/SMRI dans la lutte anti-dopage; peu importe la méthode de purification des échantillons et l'instrument utilisés, les résultats obtenus par divers laboratoires devraient être concordants. Pour ce faire, des solutions d'étalonnage de standards authentiques, ainsi que des échantillons urinaires recueillis suite à l'administration de divers stéroïdes naturels, ont été partagés entre les laboratoires de Montréal, de Cologne et de Tokyo. Ces trois laboratoires expérimentés dans le domaine du contrôle de dopage sportif utilisent la CG/C/SMRI depuis plusieurs années et ont développé leur propre méthode analytique. Cette étude multicentre a été subventionnée par l'Agence mondiale antidopage.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 MATÉRIEL UTILISÉ POUR LA PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

2.1.1. Produits chimiques

2.1.1.1. Produits utilisés pour l'isolement des stéroïdes glucuroconjugés

Tous les solvants proviennent de Caledon (Georgetown, Ontario, Canada). L'hexane, le méthanol, l'éther diéthylique et l'acétonitrile sont de qualité CLHP ou distillés dans le verre. La β -glucuronidase de *Escheria coli* type IX -A, a été achetée chez Sigma (Saint-Louis, MD, USA). Le NaOH, le NaH₂PO₄ et le NaHCO₃ proviennent de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ, USA); l'acide sulfurique 97% provient de Baker (Phillispburg, NJ, USA); le Na₂CO₃ a été acheté chez Mallinckrodt (Paris, KY, USA) et le Na₂HPO₄ a été acheté chez EMScience (Gibbstown, NJ, USA). Ces réactifs ont été utilisés pour la préparation des tampons phosphate 0,1M pH 6,8 et carbonate 1M.

2.1.1.2. Produits utilisés pour l'extraction sélective via formation d'hydrazones (réactif de Girard)

L'acide acétique, le dichlorométhane et le *tert*-butylméthyléther proviennent de Caledon (Georgetown, Ontario, Canada) tandis que le réactif de Girard a été acheté chez Sigma (Saint-Louis, MD, USA). Les solutions aqueuses utilisées sont : une solution de NaOH 6N et une solution d'acide sulfurique 8 N (4 M). La solution d'étalon externe utilisée est une solution de

5 α -androstan-17 β -ol à 100 ng/ μ L dans du TBME. La solution d'étalon interne est une solution méthanolique de 17 α -méthyl-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol à 100 ng/ μ L.

2.1.1.3. Étalons de stéroïdes authentiques

Les standards authentiques de stéroïdes utilisés dans ce projet ont été partagés par les trois laboratoires. Ceux-ci ont été analysés sans préparation préalable autre que leur mise en solution dans le TBME pour donner une concentration de 50 ng/ μ L. Plusieurs standards de stéroïdes proviennent de Sigma (Saint-Louis, MD, USA), soit le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, le 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol, l'étiocolanolone et le 5 β -pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol. Le 5 α -androstane-17 β -ol (standard externe) a été acheté chez Steraloids (Newport, RI, USA). Amersham (Arlington Heights, Ill, USA) nous a fourni le 17 α -méthyl androstanediol (étalon interne). Le pregnanediol a été acheté chez Acros (NJ, USA). L'androstérone provient de Upjohn (Kalamazoo, Mich, USA), tandis que la testostérone provient de Calbiochem (La Jolla, CA).

Ces stéroïdes sont utilisés pour préparer une solution de référence que nous utilisons en début et fin de chaque séquence d'analyse afin de s'assurer de la stabilité de l'appareil tout au long des analyses.

2.1.1.4. Matériel d'étalonnage

Nous avons partagé avec le laboratoire de Tokyo et celui de Cologne une solution d'étalonnage ; la solution de composés inertes utilisés pour l'étalonnage de l'appareil est la solution « Mixture C » qui comprend les alcanes : C-17, C-19, C-21, C-23, C-25. Cette solution provient de l'Université d'Indiana qui certifie les valeurs de rapports isotopiques de chacun des alcanes (*Schimmelman, 2002*).

2.1.2. Matériel biologique

Tous les échantillons biologiques lors de ce projet ont été approuvés par les comités d'éthiques des instituts impliqués.

2.1.2.1. Contrôles

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide d'échantillons d'urine en lots auxquels étaient ajoutés un contrôle positif et un contrôle négatif. Ce dernier provenait d'un volontaire masculin sain ne suivant aucun traitement. Le contrôle positif était un recueil d'urines provenant d'un volontaire masculin suivant un traitement de testostérone (100 mg d'énanthate de testostérone i.m.) pour raisons médicales. Les urines de ces volontaires ont été recueillies de façon répétitive, puis elles ont été combinées. Une portion aliquote de chacune était utilisée pour chaque lot d'échantillons.

2.1.2.2. Matériel biologique pour l'étude d'extraction de norandrostènedione

Des échantillons obtenus d'études précédemment effectuées ont été utilisés pour ce projet. Les échantillons choisis ont été recueillis suite à l'administration topique de 1 mL d'une crème commerciale, « Sports creme, NorAndro », de la compagnie Medlean, d'une composition de 45 mg de norandrostènediol et de 30 mg de norandrostènedione par millilitre.

2.1.2.3. Matériel biologique pour la comparaison inter-laboratoire : contrôles négatifs

Des urines provenant de 15 volontaires sains, n'ayant suivi aucun traitement, ont été aliquotées puis partagées entre les laboratoires de Montréal, Cologne et Tokyo. Ces urines ont été fournies par le laboratoire de Cologne, Allemagne.

2.1.2.4. Matériel biologique pour l'étude d'excrétion de testostérone, de DHEA, de pregnénolone et d'androstènedione pour la comparaison inter-laboratoire

Des urines d'études d'excrétion ayant été réalisées en 1999 par le laboratoire de contrôle de dopage sportif de l'INRS (*Ayotte et al., 2001*) ont été récupérées et partagées entre les trois laboratoires aux fins de ce projet : les produits administrés par voie orale contenaient l'androstènedione, la DHEA et la pregnénolone. Les volontaires ont donné leur consentement, les urines sont anonymes et le projet a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'INRS. Trois urines recueillies avant un traitement (de DHEA, d'androstènedione ou de pregnénolone) ont été combinées ainsi que trois urines post-traitement afin d'augmenter le volume total pour le partage de ces échantillons ; les temps combinés ainsi que les substances administrées sont résumés au tableau 2.1.

Tableau 2.1 Études d'excrétion de produits à base de DHEA, d'androstènedione et de pregnénolone

Urines combinées	Volontaires	traitement
1a pré-traitement 1b post-traitement	Homme, 25 ans	DHEA 200 mg prise orale
2a pré-traitement 2b post-traitement	Homme, 23 ans	DHEA 200 mg prise orale
3a pré-traitement 3b post-traitement	Femme, 32 ans	DHEA 200mg prise orale
4a pré-traitement 4b post-traitement	Homme, 30 ans	Androstènedione 100 mg prise orale
5a pré-traitement 5b post-traitement	Homme, 33 ans	Androstènedione 100 mg prise orale
6a pré-traitement 6b post-traitement	Femme, 42 ans	Androstènedione 100 mg prise orale
7a pré-traitement 7b post-traitement	Femme, 35 ans	Pregnénolone 50mg prise orale
8a pré-traitement 8b post-traitement	Homme, 27 ans	Pregnénolone 50 mg prise orale
9a pré-traitement 9b post-traitement	Homme, 31 ans	Pregnénolone 50 mg prise orale

Des urines de volontaires ayant tout d'abord reçu un traitement de testostérone puis, quelques semaines plus tard, de pregnènone provenant du laboratoire de Tokyo, Japon, ont également été partagées entre les trois laboratoires (tableau 2.2). Encore une fois, l'administration des stéroïdes a été faite avec l'autorisation du comité d'éthique local.

Tableau 2.2 Études d'excrétion de produits à base de testostérone et de pregnènone

Urines	Volontaires	traitement
10a	Homme, 49 ans	Sans traitement
10b		Testostérone propionate ~50 mg par voie orale
11a	Homme, 35 ans	Sans traitement
11b		Testostérone propionate ~50 mg par voie orale
12a	Homme, 34 ans	Sans traitement
12b		Testostérone propionate ~50 mg par voie orale
13a	Homme, 44 ans	Sans traitement
13b		Testostérone propionate ~50 mg par voie orale
14a	Femme, 36 ans	Sans traitement
14b		Testostérone propionate ~50 mg par voie orale
15a	Femme, 42 ans	Sans traitement
15b		Testostérone propionate ~50 mg par voie orale
16a	Homme, 49 ans	Sans traitement
16b		Pregnènone 45 mg par voie orale
17a	Homme 35 ans	Sans traitement
17b		Pregnènone 45 mg par voie orale
18a	Homme, 34 ans	Sans traitement
18b		Pregnènone 45 mg par voie orale
19a	Homme, 44 ans	Sans traitement
19b		Pregnènone 45 mg par voie orale
20a	Femme, 36 ans	Sans traitement
20b		Pregnènone 45 mg par voie orale
21a	Femme, 42 ans	Sans traitement
21b		Pregnènone 45 mg par voie orale

2.2 MÉTHODE

La spectrométrie de masse de rapports isotopiques est une technique très précise pour la mesure de l'abondance isotopique de certains éléments chimiques. En contrepartie, l'appareil est peu sensible (*Meier-augenstein, 1999*). Ainsi, pour permettre des analyses valides, nous devons tout d'abord procéder à la purification des échantillons afin d'éliminer le plus possible les interférences de la matrice urinaire pour ne conserver que les métabolites d'intérêt et les stéroïdes de référence. La méthode de purification se divise en deux étapes principales, soit l'isolement des stéroïdes glucuroconjugés, puis l'extraction sélective par formation d'hydrazones (par l'emploi du réactif de Girard tel qu'introduit à la section 1.7.5).

2.2.1 Méthode d'isolement des stéroïdes glucuroconjugés de l'urine

Le volume d'extraction requis est déterminé selon la gravité spécifique de l'échantillon ainsi que selon sa concentration en androstérone et en étiocholanolone préalablement déterminées par une analyse par CG/SM selon une méthode décrite précédemment (*Ayotte et al., 1996*). L'isolement des stéroïdes libres et conjugués, ainsi que l'hydrolyse des glucuroconjugés, ont été effectués conformément à la méthode décrite par Ayotte et al. (1996). Lorsque nous avons dû quantifier l'androstérone et l'étiocholanolone, les dérivés TMS-énol, TMS-éther furent obtenus, toujours selon la même méthode.

2.2.2 Extraction sélective par formation d'hydrazones

Le résidu contenant les stéroïdes libres et hydrolysés est repris dans 100 μL de méthanol, puis l'on ajoute 25 μL de la solution d'étalon interne (17 α -méthylandrostanediol) et 500 μL de la solution acide contenant le réactif de Girard (100 mg de réactif dans 0,5 mL d'acide acétique glacial). L'échantillon est alors chauffé à 100°C pendant quinze minutes pour permettre la formation d'hydrazones (voir section 1.7.5). Une fois la réaction complétée, l'échantillon est refroidi sous l'eau froide. Les stéroïdes ne comportant que des fonctions hydroxyles sont extraits deux fois avec 5 mL d'un mélange 50 : 50 (V : V) dichlorométhane : hexane, en milieu basique suite à l'addition de 1,5 mL d'une solution aqueuse 4 M de NaOH. La phase organique est évaporée à sec sous jet d'azote.

Les stéroïdes comportant une fonction cétone sont récupérés par la procédure suivante : après l'addition de l'étalon interne (dont le volume doit être ajusté selon les concentrations d'androstérone et d'étiocolanolone afin d'obtenir un rapport d'environ 1 :1), on ajoute 1,1 mL d'acide sulfurique 8 N à la phase aqueuse. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes puis extrait deux fois à l'hexane (deux portions de 5 mL). La phase organique est évaporée à sec sous jet d'azote. Le résidu est dissous dans 200 µL de TBME et transféré dans un manchon de verre introduit dans une vial à fond plat. On évapore à sec, on ajoute ensuite l'étalon externe (5 α -androstanol), le volume étant identique à celui de l'étalon interne ajouté précédemment.

2.2.3 Méthodes de purification des métabolites de la norandrostènedione

Deux méthodes ont été étudiées pour la purification des échantillons contenant les métabolites de la norandrostènedione, soit la norandrostérone (NA) et la norétiocolanolone (NE). Un premier échantillon directement issu de la procédure d'isolement des stéroïdes urinaires libres et glucuroconjugués tel que décrit à la section 2.2.1. est analysé directement. L'échantillon est reconstitué dans 25 µL de TBME avant d'être injecté au CG/C/SMRI. Nous avons par la suite purifié cet extrait par CLHP. Après l'isolement des stéroïdes hydrolysés, l'échantillon est dissous dans 25 µL de méthanol et injecté. La fraction contenant la norandrostérone, la norétiocolanolone et l'étalon interne est recueillie et évaporée puis, après transfert dans du TBME, est injectée dans le CG/C/SMRI.

2.2.4 Méthode de séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone

Après la procédure d'isolement des stéroïdes glucuroconjugués de l'urine décrite dans la section 2.2.1, le résidu est reconstitué dans 25µL de méthanol, puis injecté dans le CLHP. Lorsque les deux stéroïdes sont recueillis, on procède à une double extraction à l'aide de 5 mL de TBME. Après évaporation des solvants, on dissout le résidu dans 25 µL de TBME, puis on injecte sur CG/SM afin de vérifier l'identité des pics. Finalement, on injecte dans le CG/C/SMRI en utilisant la méthode décrite précédemment.

2.3 INSTRUMENTATION

2.3.1 Chromatographe en phase gazeuse/ four de combustion/ spectromètre de masse d'isotope stable (CG/C/SMRI)

2.3.1.1 Instrumentation CG/C/SMRI

L'analyse des extraits urinaires a été effectuée par un spectromètre de masse d'isotope stable (SMRI) PDZ Europa, modèle 20-20 (Cheshire, Angleterre) couplé à un four à combustion PDZ Europa, modèle Orchid, lui même couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG) modèle HP-5890, série II. Les données sont traitées par les logiciels Anca-GC et GC-Graph développés par PDZ Europa. La colonne utilisée est une colonne capillaire de Supelco SPB5 ayant une phase 5% diphényl/ 95% diméthylsiloxane (30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et une épaisseur de film de 0,25 µm).

2.3.1.2 Méthode d'analyse CG/C/SMRI

Pour toutes les analyses d'échantillons, la programmation utilisée du CG/C/SMRI est la même. La programmation de température du chromatographe en phase gazeuse, ainsi que les températures des injecteur et détecteur sont décrites dans le tableau 2.3. Le gaz vecteur est l'hélium. La température du four de combustion est 860°C tout au long des analyses.

Tableau 2.3 Programmation du CG pour l'analyse chromatographique de stéroïdes

Injecteur	
Mode	Débit non partagé « pulsé »
Température	275°C
Volume d'injection	2 µL
Four	
Température initiale	150°C
Temps initial	1 min
Taux 1	5°C/min
Température 2	290°C
Taux 2	25°C/min
Température finale	320°C
Temps final	10 min
Temps total de l'analyse	40,2 min
Détecteur FID	
Température	300°C

2.3.2 Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse

2.3.2.1 Instrumentation CG/SM

Le chromatographe en phase gazeuse est un appareil de Agilent, modèle 6890N, couplé à un spectromètre de masse également de Agilent, modèle 5973 (filtre quadripolaire; ionisation par impact électronique de 70 eV). La colonne utilisée est une colonne capillaire de HP 5MS (30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et une épaisseur de film de 0,25 µm).

2.3.2.2 Méthode d'analyse CG/SM

La programmation du CG est identique à celle décrite précédemment (voir tableau 2.3) à l'exception de la pression de l'injecteur qui est de 30 PSI. Ces analyses sont effectuées pour vérifier l'attribution des pics en CG/C/SMRI.

2.3.3 Chromatographie en phase liquide

2.3.3.1 Instrumentation CLHP

L'appareil utilisé en chromatographie liquide de haute performance est un appareil de Hewlett-Packard (HP, série II, modèle 1090). Selon les analytes étudiés nous avons utilisé une colonne analytique de 150 mm ou de 250 mm de longueur. Ces deux colonnes sont fabriquées par Zorbax (SB-C₁₈) et ont un diamètre interne de 4,6 cm.

2.3.3.2 Méthode de séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone

La phase mobile utilisée est un mélange eau / acétonitrile (57% / 43%) qui reste constant tout au long de l'analyse à un débit de 1 mL/min. Dans ces conditions, le temps de rétention de la testostérone est de 16,5 min et celui de l'épitéstostérone est de 20,7 min.

2.3.3.3 Méthode d'isolement par CLHP des métabolites NA et NE

La méthode utilisée pour l'isolement des métabolites de nortestostérone par CLHP est celle décrite par Le Bizec (*Le Bizec et al., 2000*). La phase mobile est un mélange méthanol / eau (gradient de 60 : 40 à 90 : 10 (v/v) en 15 minutes) et son débit est de 1 mL/min. Les fractions de 1 mL sont recueillies et la fraction d'intérêt contenant la norandrostérone et la norétiocholanolone est celle recueillie entre 10 et 11 minutes ; les solvants sont évaporés sous jet d'azote. Le culot est dissous dans 200 μ L de TBME pour le transfert dans un vial avec manchon, puis est évaporé. L'échantillon est alors solubilisé dans 25 μ L de TBME et est analysé comme tel par CG/C/SMRI..

CHAPITRE III

ANALYSE DE NORSTÉROÏDES

Tel que mentionné dans la section 1.4, les concentrations endogènes des métabolites des norstéroïdes, lorsque présents, sont très faibles en comparaison des métabolites urinaires principaux, tels l'androstérone et l'étiocolanone. Alors que ces faibles concentrations ne gênent pas trop l'analyse par CG/SM, dont les limites de détection pour ces stéroïdes se situent normalement entre 0,3-0,5 ng/mL, il en est autrement pour l'analyse isotopique. En effet, la limite de détection de l'instrument que nous possédons est d'environ 10 ng/μL à l'injection (*Cléroux, 2002*). Nous avons comparé deux méthodes de préparation des échantillons afin de déterminer celle qui donne la meilleure sensibilité afin de diminuer notre limite de détection.

3.1 ANALYSE DU PRODUIT COMMERCIAL À BASE DE NORSTÉROÏDES

Les norstéroïdes isolés du produit commercial étudié ont été analysés par CG/C/SMRI. La teneur en ^{13}C de la norandrostènedione est de -32,3 ‰, ce qui est plus négatif que ce que le groupe de Mathurin avait trouvé pour des préparations pharmaceutiques contenant des esters de la nandrolone, les deltas se situant entre -28,7 ‰ et -30,5 ‰ (*Mathurin et al., 2001*). La teneur en ^{13}C du norandrostènediol n'a pu être déterminée puisque sa concentration était trop faible.

3.2 ÉTUDE DES ÉCHANTILLONS URINAIRES

Vingt-quatre urines ont été recueillies suivant l'application de la crème. Les deux méthodes de préparation des échantillons pour l'analyse isotopique des norstéroïdes, telles que décrites dans la section 2.2.3, nous permettent de déterminer les rapports isotopiques des métabolites NA et NE jusqu'à des concentrations d'environ 50 ng/mL dans l'urine. Puisque les métabolites de stéroïdes ont les mêmes valeurs $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ que leurs composés parents, les valeurs obtenues pour l'analyse des métabolites devraient se situer près de la valeur de $-32,3 \text{‰}$ mesurée pour la norandrostènedione en l'absence de fractionnement biologique. Tel que présenté à la figure 3.1, les valeurs minimales de NA et NE que nous avons mesurées étaient de $-34,5 \text{‰}$ pour les échantillons purifiés par CLHP et de $-32,8 \text{‰}$ pour les échantillons analysés directement. La différence de valeurs est probablement liée au fractionnement isotopique qui aurait lieu lors de la purification par CLHP. Si le pic entier n'a pas été recueilli, la teneur en ^{13}C pourra en être altérée, le début ou la fin du pic étant de composition isotopique différente.

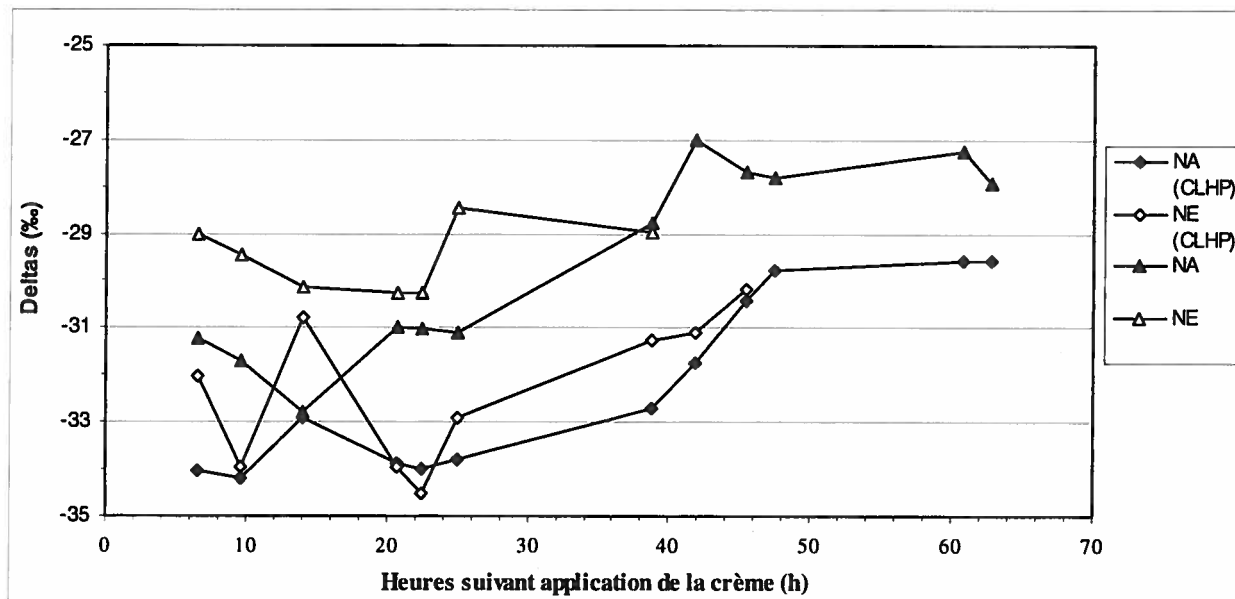


Figure 3.1 Variation dans le temps des $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ des métabolites NA et NE suivant l'application d'une crème contenant de la norandrostènedione.

Résultats sans (\blacktriangle , \triangle) et avec séparation par CLHP (\blacklozenge , \lozenge)

De plus, on remarque une variation assez importante dans les valeurs obtenues pour une même méthode de préparation. Cette variation a le même profil, quoique inversé, que la courbe des concentrations de NA et de NE de l'échantillon, soit un maximum se situant environ quinze heures après l'application de la crème. Étant purement exogènes, les métabolites devraient garder le même rapport isotopique pour toutes les urines, peu importe le temps écoulé depuis le traitement, à moins de fractionnement biologique. Cette variation des valeurs, pour les analyses faites directement suite à l'isolement, pourrait être expliquée par une contamination des fractions, une mauvaise intégration des pics ou par un fractionnement biologique. En effet, les pics de NA et NE de ces analyses sont très petits à la limite de sensibilité de l'instrument. Dans le cas des premières urines, la concentration est très forte, donc le pic est beaucoup plus grand que le bruit de fond, n'altérant pas la valeur de teneur en ^{13}C mesurée.

Le tableau 3.1 résume les données de quantification par CG/SM et d'analyse en spectrométrie de masse d'isotopes stables suite à l'isolement direct des stéroïdes hydrolysés (glucuroconjugés). Les sept dernières urines recueillies présentent des pics correspondant aux métabolites NA et NE trop faibles pour pouvoir les quantifier. Elles n'ont donc pas été incluses dans le tableau.

**Tableau 3.1 Valeurs $\delta^{13}\text{C}$ des métabolites et des stéroïdes de référence des urines de
l'étude d'excrétion de norstéroïdes**

Légende : NA : norandrostérone ; NE : norétiocholanolone ; E : étiocholanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol
NQ : non quantifiable ; ND : non détectable ; G.S. : gravité spécifique

urines	Temps (h)	G.S.	[NA]	[NE]	Intensité NA	Intensité NE	NA	NE	E	A	PD	NA-PD (%)
			ng/mL		nA							
1	0,0	1,008	0,18	NQ	ND	ND	NQ	NQ	-19,7	-19,6	-20,4	-
2	1,0	1,014	8.4	1.2	0,5	ND	NQ	NQ	-20,0	-20,5	-20,1	-
3	6,5	1,017	428.4	133.1	5,2	2,9	-31,2	-29,0	-19,6	-19,5	-18,9	-12,3
4	9,7	1,008	274.7	84.1	1,8	0,93	-31,7	-29,4	-20,1	-19,4	-19,2	-12,5
5	14,0	1,014	634.3	212.7	3,2	1,7	-32,8	-30,1	-19,5	-19,7	-20,0	-12,8
6	20,7	1,023	771.0	189.0	4,2	2,3	-31,0	-30,3	-20,3	-19,1	ND	-
7	22,5	1,021	677.0	228.0	3,5	2	-31,0	-30,3	-19,7	-18,9	-20,3	-10,7
8	24,9	1,008	201.5	60.5	1,3	0,86	-31,1	-28,5	-21,0	-19,6	-20,2	-10,9
9	31,6	1,016	190.8	53.8	1,3	1	-28,8	-28,9	-20,2	-19,0	-20,1	-8,7
10	38,7	1,021	203.8	53.9	1,3	1,1	-28,8	-29,0	-20,2	-19,0	-21,1	-7,7
11	41,4	1,021	151.2	43.3	1,4	ND	-27,0	NQ	-19,9	-18,8	ND	-
12	45,4	1,020	173.1	44.5	1,0	ND	-27,7	NQ	-20,3	-19,1	-19,7	-8,0
13	47,4	1,008	27.7	7.2	0,5	ND	NQ	NQ	-20,1	-18,6	-19,5	-
14	60,7	1,015	49.9	12.6	0,8	ND	-27,2	NQ	-19,8	-18,4	ND	-
15	62,7	1,017	52.8	15.9	1,0	ND	-28,0	NQ	-19,8	-18,6	-20,0	-8,0
16	68,5	1,010	22.0	7.2	1,0	ND	-27,1	NQ	-19,8	-18,9	-20,7	-6,4
17	70,7	1,007	9.25	2.6	0,5	ND	NQ	NQ	-20,2	-17,9	ND	-
Moyenne							-29,1	-29,4	-20,0	-19,1	-20,0	-9,8
Écart-type							2,2	0,7	0,4	0,6	0,6	2,3

Les valeurs se situant en dessous de la limite de détection sont inscrites en caractères gras

Le tableau 3.1 rapporte les valeurs obtenues pour les métabolites de la norandrostènedione et du norandrostènediol, la norandrostérone et la norétiocholanolone, les métabolites des androgènes, l'androstérone et l'étiocholanolone, ainsi que celles du stéroïde de référence, le pregnanediol. Les métabolites de norstéroïdes d'origine exogène ont des teneurs en ^{13}C différentes de celles de l'androstérone, de l'étiocholanolone et du pregnanediol qui ne sont pas altérées. En effet, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ mesurées pour la NA et la NE se situent entre -27 ‰ et -32,8 ‰, tandis que les valeurs de l'androstérone, de l'étiocholanolone et du pregnanediol se maintiennent entre -17,9 ‰ et -21,1 ‰ ; encore ici, les différences entre les valeurs mesurées chez un même individu peuvent être dues à une mauvaise intégration des pics. Les différences mesurées entre le pregnanediol et la norandrostérone sont situées entre 6,4 ‰ et 12,8 ‰ (moyenne : 9,8 ‰) et

reflètent clairement leur origine différente. Dans ce cas-ci, le dopage est visible jusqu'à 62 heures après l'application de la crème. Au point culminant, à l'échantillon 6, la concentration de NA est plus de 350 fois plus élevée que le seuil de 2 ng/ml. Par contre, moins de 48 heures plus tard, la concentration de NA est trop faible pour être quantifiée.

En général, lorsque la concentration des métabolites NA et NE dans l'urine est plus faible que 50 ng/mL, il est impossible de déterminer avec certitude leur rapport isotopique respectif puisque cette concentration correspond à la limite de mesure qui est de 0,81 nA (*Cléroux, 2002*). Le groupe de Mathurin a obtenu des résultats semblables puisque leur concentration initiale requise est de 60 ng/mL dans l'urine (*Mathurin et al., 2001*).

Les travaux ont été continués suite à ce projet et ont permis l'atteinte du degré de sensibilité requis. En effet, le laboratoire de Cologne a développé une méthode de purification par l'emploi de deux colonnes de phases différentes, alors que notre laboratoire utilise des colonnes semi-préparatives en phase inversée. Les échantillons sont analysés de routine dans ces deux laboratoires et une note technique de l'Agence mondiale antidopage y réfère (*Hebestreit et al., 2006 ; Ayotte et al., 2006*).

3.3 CONCLUSION POUR L'ANALYSE DE NORSTÉROÏDES

Nos travaux ont confirmé que les rapports isotopiques des métabolites norandrostérone et norétiocholanolone excrétés suite à l'administration d'une préparation de norstéroïdes étaient significativement différents de ceux des autres stéroïdes urinaires tels l'androstérone, l'étiocholanolone et le pregnanediol. Les concentrations de métabolites étant suffisamment élevées, nous avons pu mesurer des rapports isotopiques de tous les stéroïdes ciblés, sans devoir recourir à la purification par CLHP. Cette dernière méthode a dû être ultérieurement optimisée car elle s'est révélée insuffisante en présence de concentrations urinaires plus faibles. Le fractionnement isotopique lors du recueil des fractions ou de l'analyse, tel que discuté dans la section 3.2, pourrait être à l'origine des résultats que nous avons obtenus suite à l'analyse de fractions recueillies. Ces travaux nous ont cependant permis de connaître les difficultés inhérentes.

CHAPITRE IV

SÉPARATION DE LA TESTOSTÉRONE ET DE L'ÉPITESTOSTÉRONE

4.1. PROBLÈMES DE DÉTECTION DE LA TESTOSTÉRONE PAR CG/C/SMRI

Il a été observé que la testostérone est excrétée principalement en métabolites et que seulement 1 à 5 %, dépendant des études, est excrété sous la forme conjuguée. Par ailleurs, le rendement de récupération de la testostérone suite à l'emploi de l'extraction sélective par formation d'hydrazones est très faible, ce qui empêche généralement son analyse isotopique (*Aguilera et al., 1999*). Nous devons ainsi procéder à l'analyse des métabolites finaux, présents en quantité importante, soit l'androstérone et l'étiocolanolone. De plus, la testostérone et l'épitéstostérone, épimère à la position C-17, analysées directement sans dérivation chimique, ne sont pas résolues dans les conditions chromatographiques employées pour l'analyse par CG/C/SMRI. Tel que décrit dans la section 2.2.4, nous avons utilisé la CLHP pour purifier la matrice urinaire et afin de séparer ces deux stéroïdes en deux fractions distinctes, pour ensuite les analyser en SMRI lorsque les concentrations sont suffisantes.

4.2. ÉTUDE DE SÉPARATION PAR CLHP DE LA TESTOSTÉRONE ET DE L'ÉPITESTOSTÉRONE

Tel qu'amené dans la section 1.10, le but de ce travail visait à étudier la possibilité de séparer la testostérone de l'épitéstostérone afin d'en mesurer précisément le rapport isotopique, sans interférence de l'épitéstostérone. En effet, suite à l'administration de testostérone, le rapport isotopique de la testostérone excrétée sera modifié alors que celui de l'épitéstostérone sera

maintenu aux valeurs basales, l'épitéstostérone n'étant pas produite suite à l'administration de testostérone.

4.2.1. Essais de séparation

Nous avons testé deux méthodes différentes de séparation par CLHP rapportées dans la littérature (*Gonzalo-Lumbreras et al., 2003 ; Horning et al., 1996*). Pour la méthode du groupe de Gonzalo-Lumbreras, nous avons évalué deux colonnes de longueur différente. Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans le tableau 4.1. Les échantillons utilisés pour ces essais étaient ceux du contrôle négatif décrit à la section 2.1.2.1 et la méthode de préparation des échantillons suivie étant celle décrite dans la section 2.2.4. Les différences majeures entre ces deux méthodes sont les conditions de solvants. La méthode décrite par le groupe de Gonzalo-Lumbreras s'appuie sur des conditions de solvants isocratiques, tandis que celle du groupe de Horning favorise un gradient de solvant. Les solvants utilisés pour les deux méthodes sont les mêmes, soit un mélange d'eau et d'acétonitrile.

Tableau 4.1 Séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone par CLHP

Légende : T : testostérone ; ET : épitéstostérone ; ACN : acétonitrile

Méthode utilisée	Colonne	Condition de solvant	Temps de rétention Fraction T (min)	Temps de rétention Fraction ET (min)	Commentaires
1. Gonzalo-Lumbreras et al., 2003	C18 15 cm	Isocratique 57/43 H ₂ O/ACN	7,9-8,4	10,7- 11,4	Contamination du pic de T par interférence
2. Gonzalo-Lumbreras et al., 2003	C18 25 cm	Isocratique 57/43 H ₂ O/ACN	15,5-16,5	18,5-19,5	Pas de contamination
3. Horning 1996	C18 25 cm	30% à 100% ACN	7,8-8,3	8,8- 9,2	Contamination du pic de T par interférence

Les deux méthodes chromatographiques permettent la séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone. Par contre, nos résultats démontrent que l'emploi d'une colonne de 25 cm utilisée avec un mélange de solvants composé d'eau et d'acétonitrile en mode isocratique permet

la récupération d'une fraction ne contenant que la testostérone. L'emploi d'une colonne plus courte ne permet pas la résolution chromatographique des pics interférents, tel que démontré par les chromatogrammes obtenus avec les méthodes 1 et 2 du tableau 4.1.

4.2.2. Optimisation de l'extraction liquide-liquide

La séparation des stéroïdes est effectuée en utilisant la chromatographie en phase inversée et conséquemment, les solvants sont constitués en partie d'eau (acétonitrile : eau) et l'évaporation est difficile. Nous avons procédé à l'évaluation d'extractions doubles liquide-liquide des fractions récoltées. Nous avons réalisé ces extractions à l'aide de trois solvants différents, soit l'hexane, le TBME et l'éther diéthylique et afin d'en déterminer l'efficacité avant les extractions nous avons ajouté 12,5 µL d'étalon externe afin de comparer les rendements des diverses extractions.

Tel qu'attendu, les éthers étant plus polaires, les extractions faites à l'aide d'éther diéthylique sont celles qui nous permettent de récupérer le plus de testostérone et d'épitéstostérone (figure 4.1). De plus, le temps d'évaporation de l'éther diéthylique est nettement inférieur à celui du TBME.

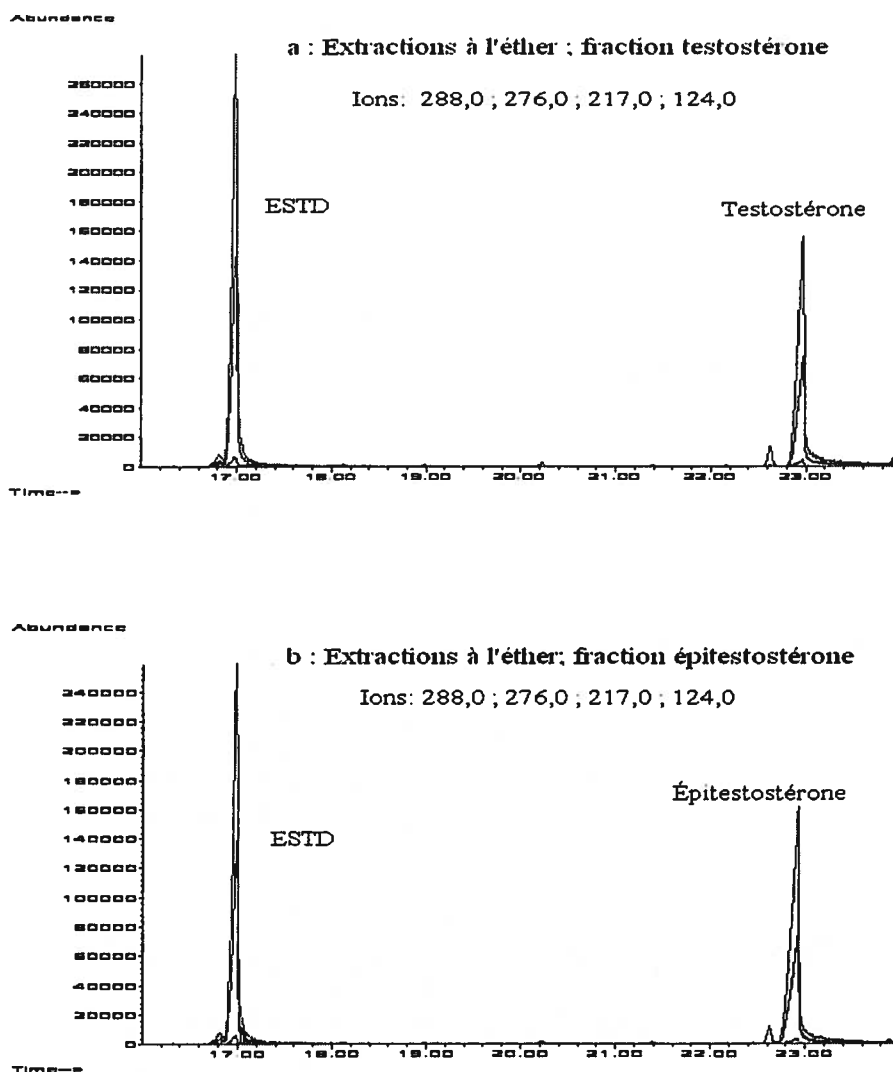


Figure 4.1 Chromatogrammes CG/SM de standards authentiques de testostérone (a) et épitestostérone (b) purifiés par une double extraction liquide-liquide à l'éther

4.2.3. Résultats de l'analyse SMRI

La méthode a été testée avec un échantillon du contrôle négatif. Les rapports isotopiques obtenus pour la testostérone et l'épitestostérone après une séparation par CLHP sont comparables à ceux que l'on obtient pour leurs métabolites, soit en moyenne : -23,5 ‰ pour la testostérone et -25 ‰ pour l'épitestostérone. L'origine biologique de l'épitestostérone n'est pas bien connue. Celle-ci ne provient qu'en partie des testicules et ainsi, il pourrait y avoir un fractionnement biologique.

De plus, alors que la testostérone est rapidement métabolisée, l'épitestostérone ne l'est que faiblement. Les origines de même que le métabolisme en étant différents, il faut s'attendre à un tel fractionnement isotopique. Un chromatogramme type de l'analyse CG/C/SMRI de la fraction contenant la testostérone est présenté à la figure 4.2 ; le rapport isotopique de la testostérone est ainsi facilement mesurable.

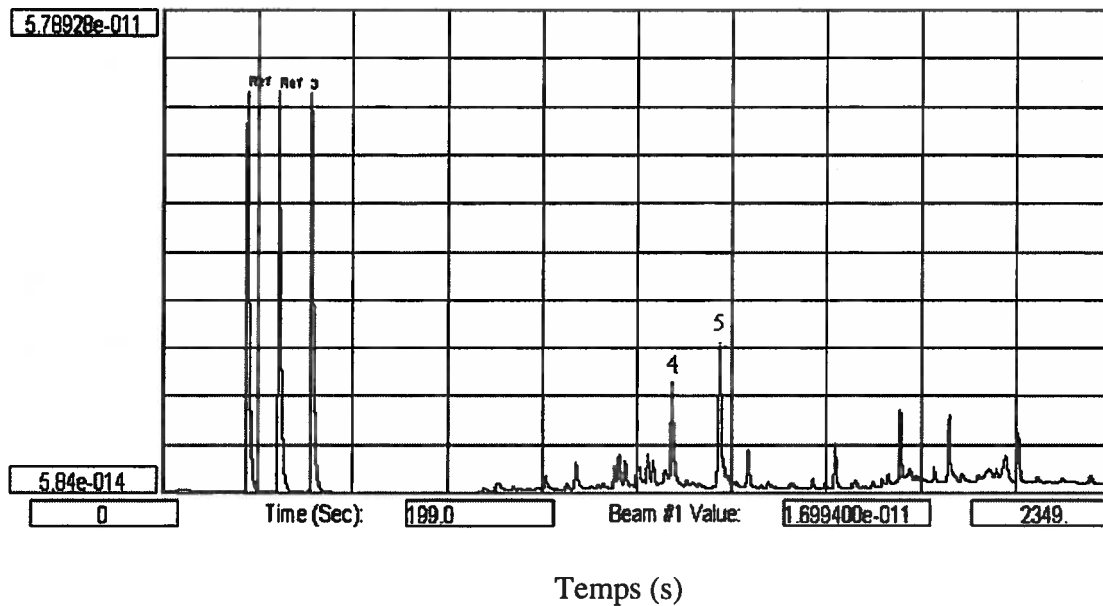


Figure 4.2 Chromatogramme CG/C/SMRI de la fraction de testostérone isolée du contrôle négatif après séparation par CLHP

Légende : Ref : pics de référence du CO₂ ; pic 4 : 17 α -méthylandrostanediol; pic 5 : testostérone

4.3. CONCLUSION POUR LA SÉPARATION DE LA TESTOSTÉRONE ET DE L'ÉPITESTOSTÉRONE

Le problème de résolution des pics de testostérone et d'épitestostérone en analyse isotopique a été réglé par la méthode d'isolement et de séparation par la chromatographie liquide à haute performance puisque ainsi ces deux composés se retrouvent dans deux fractions distinctes. De plus, l'extraction à l'éther qui suit la séparation par CLHP, permet un rendement de récupération satisfaisant. Les chromatogrammes des analyses en SMRI sont allégés par cette méthode de préparation, ce qui permet l'analyse d'échantillons dont les concentrations de testostérone sont plutôt faibles.

CHAPITRE V

COMPARAISON INTER-LABORATOIRE DE L'ANALYSE DE STÉROÏDES PAR CG/C/SMRI

Environ la moitié des laboratoires accrédités par l'AMA ont inclus à leurs protocoles l'analyse de la composition isotopique des stéroïdes urinaires par CG/C/SMRI. Cette méthode de confirmation étant relativement nouvellement appliquée en contrôle de dopage sportif, l'objectif principal d'une comparaison inter-laboratoire était de démontrer la généralisation de la technique peu importe la méthode de purification des échantillons et l'instrument utilisés. Nous voulons donc démontrer que les résultats obtenus par trois laboratoires différents soit celui de Montréal, Canada, celui de Cologne, Allemagne, et celui de Tokyo, Japon, sont concordants. Ces trois laboratoires sont accrédités par l'Agence mondiale antidopage et ont une longue expérience dans le domaine du contrôle de dopage sportif. Les résultats de différents types d'échantillons sont présentés dans les sections qui suivent.

5.1 ÉTALONNAGE DE L'APPAREIL

5.1.1 Résultats

Avant les analyses d'échantillons nous avons procédé à l'étalonnage de notre appareil à l'aide d'une solution contenant un mélange d'alcane tel que décrit dans la section 2.1.1.4. Nous avons obtenu des valeurs justes et précises qui sont présentées dans le tableau 5.1. La déviation la plus grande est de -0,3 ‰, ce qui correspond à une erreur relative de moins de 1%. L'écart-type pour chaque n-alcane est de 0,1.

Tableau 5.1 Résultats pour l'étalonnage du CG/C/SMRI

Alcanes	Valeurs Théoriques (‰)	Essais Rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}$ ‰						Moyenne	Écart-type	Déviation
		1	2	3	4	5	6			
n-17	-31,0	-31,0	-31,3	-31,2	-31,4	-31,4	-31,3	-31,3	0,1	-0,3
n-19	-33,1	-33,1	-33,1	-33,2	-33,1	-33,2	-33,2	-33,2	0,1	-0,1
n-21	-29,0	-29,0	-29,2	-29,0	-29,2	-29,2	-29,2	-29,1	0,1	-0,1
n-23	-31,7	-31,7	-31,6	-31,5	-31,6	-31,7	-31,6	-31,6	0,1	0,1
n-25	-28,5	-28,5	-28,8	-28,7	-28,8	-28,6	-28,4	-28,7	0,1	-0,2

5.1.2 Comparaison de l'étalonnage des instruments des laboratoires de Montréal, de Tokyo et de Cologne

Le tableau 5.2 donne la comparaison de nos résultats de l'étalonnage par rapport à ceux des laboratoires de Cologne et de Tokyo qui ont utilisé la même solution d'alcanes comme étalon. Leur instrument donne également des résultats qui sont justes. La plus grande déviation des valeurs obtenues par Cologne par rapport aux valeurs théoriques est de 0,5 ‰ et celle de Tokyo est de -0,4 ‰.

Tableau 5.2 Solution d'alcane - Résultats obtenus par les laboratoires de Cologne, Montréal et Tokyo

Laboratoires		C-17	C-19	C-21	C-23	C-25
Université d'Indiana	δ théorique (‰)	-31,0	-33,1	-29,0	-31,7	-28,5
Cologne (n = 2 à 5)	δ (‰)	-31,1	-32,7	-28,5	-31,2	-28,0
	Déviations (‰)	-0,1	0,4	0,5	0,5	0,5
	Erreur relative (%)	0,3	1,2	1,7	1,6	1,8
Montréal (n=5)	δ (‰)	-31,3	-33,2	-29,1	-31,6	-28,7
	Déviations (‰)	-0,3	-0,1	-0,1	0,1	-0,2
	Erreur relative (%)	1,0	0,3	0,3	0,3	0,7
Tokyo (n=5)	δ (‰)	-31,1	-33,2	-29,2	-31,9	-28,9
	Déviations (‰)	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	-0,4
	Erreur relative (%)	0,3	0,3	0,7	0,6	1,4
Moyennes	Moyenne (‰)	-31,2	-33,0	-28,9	-31,6	-28,5
	Déviations moyennes (‰)	-0,2	0,1	0,1	0,1	0
	Écart-type	0,1	0,3	0,4	0,4	0,5

Pour chacun des alcanes, les erreurs relatives des résultats obtenus par les trois laboratoires sont toutes inférieures à 2 % et les déviations standard sont plus petites que 0,2 ‰. Nous avons alors pu procéder à l'analyse de stéroïdes, sous forme de standard ou dans des échantillons biologiques.

5.2 STANDARDS AUTHENTIQUES DE STÉROÏDES

5.2.1 Résultats

Les solutions de standards authentiques ont été analysées en triplicata et les résultats sont présentés au tableau 5.3. Tout comme pour la solution de n-alcanes, la reproductibilité d'analyse est acceptable. Les écarts-types sont tous de 0,1 sauf celui des valeurs pour le pregnanetriol dont l'écart-type est 0,4, ce qui n'est pas totalement inattendu puisque ce stéroïde possède trois fonctions hydroxyle, ce qui le rend plus polaire et donc plus fragile (déshydratation) lorsque analysé comme tel, sans dérivation et protection chimique par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 5.3 Standards de stéroïdes authentiques

stéroïdes	Essais $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$			moyenne	Écart-type
	1	2	3		
5 α -androstanediol	-33,4	-33,3	-33,4	-33,4	0,1
5 β -androstanediol	-31,3	-31,2	-31,2	-31,2	0,1
Androstérone	-35,0	-34,8	-34,9	-34,9	0,1
Étiocholanolone	-23,9	-24,0	-23,7	-23,9	0,1
Pregnanediol	-32,1	-32,1	-32,2	-32,1	0,1
Pregnanetriol	-32,4	-33,1	-32,7	-32,7	0,4
Cholestérol	-25,1	-25,1	-25,0	-25,1	0,1
Androstanol (ESTD)	-34,5	-34,6	-34,7	-34,6	0,1
17 α -méthylandrostanediol (ISTD)	-36,0	-36,1	-36,2	-36,1	0,1

5.2.2 Comparaison inter-laboratoire

Les résultats obtenus pour l'analyse de neuf stéroïdes par chacun des trois laboratoires ont été mis en commun et sont présentés dans le tableau 5.4. Ces résultats, qui sont la moyenne des rapports isotopiques mesurés pour chaque stéroïde, servent à vérifier la précision et justesse obtenues en utilisant la même méthode chromatographique et en recherchant les mêmes produits.

Ces résultats montrent que, pour ces solutions, les valeurs obtenues par notre laboratoire de Montréal sont tel que nous l'avons déterminé, systématiquement plus négatives (environ -2 ‰) que celles obtenues par les deux autres laboratoires. Notons que l'un des laboratoires n'analyse pas de routine le pregnanetriol et le cholestérol. Les écarts-types se situent entre 0,2 et 1,1, ce qui démontre que les résultats obtenus par les trois laboratoires sont concordants.

Tableau 5.4 Standards authentiques de stéroïdes - Résultats des trois laboratoires

Stéroïdes	Montréal (n = 3)	Cologne (n = 5)	Tokyo (n = 4)	Moyenne (‰)	Écart-type
	$\delta^{13}\text{C}$ ‰				
5 α -androstanediol	-33,4	-32,2	-32,9	-32,8	0,5
5 β -androstanediol	-31,2	-29,2	-30,1	-30,2	1,0
Androstérone	-34,9	-32,8	-33,5	-33,7	1,0
Étiocholanolone	-23,9	-21,9	-22,4	-22,7	0,9
Pregnanediol	-32,1	-30,7	-31,0	-31,3	0,7
Pregnanetriol	-32,7	-	-31,0	-31,8	1,0
Cholestérol	-25,1	-	-25,2	-25,2	0,2
ESTD	-34,6	-32,8	-33,1	-33,5	1,0
ISTD	-36,1	-34,2	-35,3	-35,2	1,1

5.3 CONTRÔLES

5.3.1 Contrôle négatif ; stabilité des valeurs mesurées

Comme le montre le diagramme présenté à la figure 5.1, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des stéroïdes urinaires du contrôle négatif mesurées sur une période de 8 mois se situent entre -20 ‰ et -23,5 ‰. Ces valeurs sont similaires à celles retrouvées dans une population de référence présentée dans la section 5.4. Les variations peuvent être expliquées entre autres par le fait que les urines utilisées proviennent du même volontaire mais à des temps différents. Une autre explication, qui peut être complémentaire, est l'état de l'appareil. Bien que la calibration de l'appareil soit vérifiée périodiquement, une légère variation peut survenir, notamment selon l'état de l'oxydation du four de combustion qui a une influence importante sur les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰. Par contre, il est important de noter que les différences entre les métabolites (androstérone, étiocholanolone et les deux androstanediols) et les stéroïdes de référence (pregnanediol, pregnanetriol et cholestérol) sont inférieures à - 3 ‰, confirmant qu'elles correspondent à des échantillons négatifs, c'est-à-dire que ces produits ont bien la même origine.

5.3.2 Contrôle positif: stabilité des valeurs mesurées

Pour le contrôle positif, comme le montre le résumé présenté à la figure 5.2, la teneur en ^{13}C des métabolites est nettement diminuée. Les valeurs obtenues pour les métabolites sont très négatives, soit entre -26,0 ‰ et -28,5 ‰, tandis que les stéroïdes de référence présentent des valeurs normales, soit entre -20,0 ‰ et -23,5 ‰. La différence entre ces valeurs excède clairement la limite de -3 ‰, tel qu'attendu.

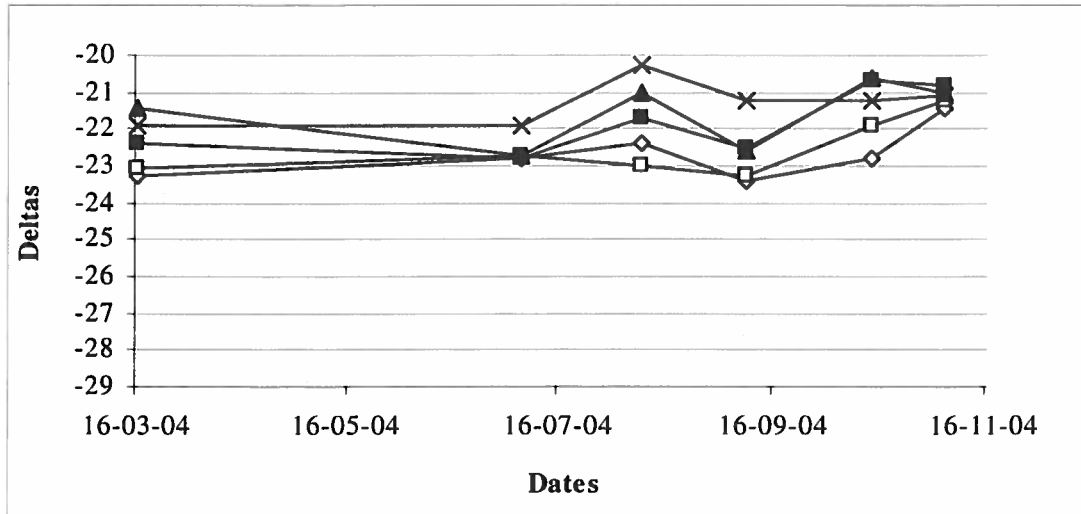


Figure 5.1 Résultats pour le contrôle négatif : valeurs à travers le temps

Légende : ◇ : étiocholanolone ; □ : androstérone ; ▲ : pregnanediol ; × : pregnanetriol ; ■ : cholestérol

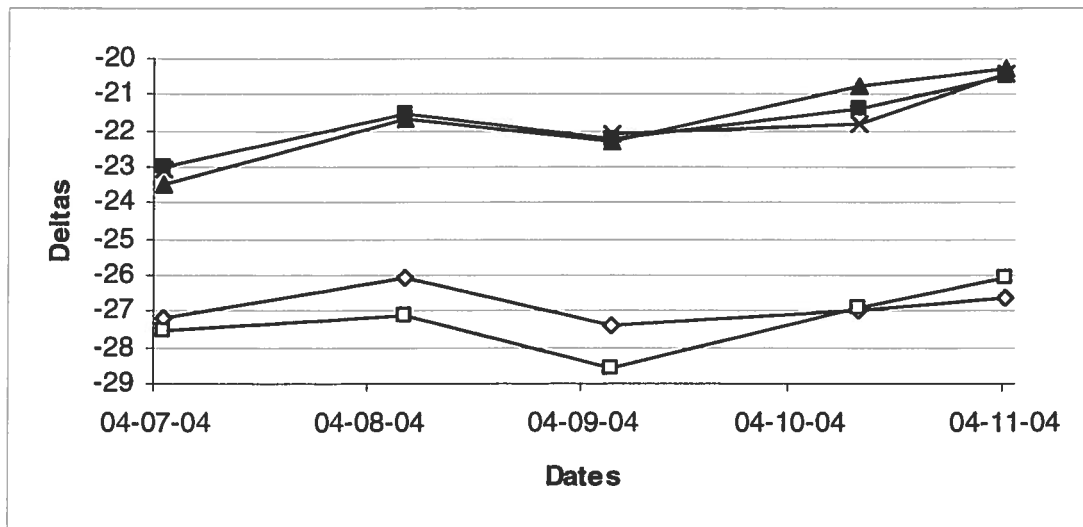


Figure 5.2 Résultats pour le contrôle positif: valeurs à travers le temps

Légende : ◇ : étiocholanolone ; □ : androstérone ; ▲ : pregnanediol ; × : pregnanetriol ; ■ : cholestérol

5.4 URINES CONTROLES NÉGATIVES

5.4.1 Résultats des rapports isotopiques des urines contrôles négatives

Les valeurs des rapports isotopiques des stéroïdes analysés que nous avons obtenues pour les 15 urines négatives sont toutes semblables aussi bien entre différentes urines pour un même stéroïde urinaire qu'entre les différents stéroïdes. Tel que présenté au tableau 5.5, les moyennes des cinq stéroïdes urinaires analysés se situent toutes entre -24,0 ‰ et -24,4 ‰, ce qui nous donne des différences entre les métabolites et les stéroïdes de référence inférieures à 0,3 ‰. Nous utilisons le pregnanediol comme stéroïde de référence puisqu'il est analysé par les trois laboratoires, les valeurs absolues des rapports isotopiques exprimés en $\delta^{13}\text{C}$ ‰ se situent entre -22,4 ‰ et -25,4 ‰.

Tableau 5.5 Urines négatives- Valeurs obtenues par le laboratoire de Montréal

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ; PT : pregnanetriol ; C : cholestérol

Échantillons		E	A	PD	PT	C	E-PD	A-PD
		δ (‰)					‰	
1	F	-25,4	-25,0	-23,3	-24,5	-25,1	-2,1	-1,7
2	F	-25,4	-24,8	-24,4	-24,2	-24,1	-1,0	-0,4
3	F	-25,0	-24,4	-23,8	-24,2	-24,1	-1,2	-0,6
4	F	-24,0	-23,0	-23,6	-23,3	-23,7	-0,4	0,6
5	F	-25,0	-25,1	-25,1	-25,2	-25,0	0,1	0,0
6	M	-23,8	-23,4	-24,3	-24,0	-24,4	0,5	0,9
7	M	-24,4	-24,0	-24,3	-24,9	-23,3	-0,1	0,3
8	M	-24,8	-24,1	-24,0	-25,0	-22,4	-0,8	-0,1
9	M	-25,3	-24,6	-24,4	-24,8	-24,3	-0,9	-0,2
10	M	-24,2	-23,6	-24,8	-22,8	-24,6	0,6	1,2
11	M	-24,0	-23,8	-24,9	-25,1	-23,8	0,9	1,1
12	M	-23,3	-23,4	-23,9	-24,6	-22,8	0,6	0,5
13	M	-24,7	-24,0	-23,8	-24,8	-	-0,9	-0,2
14	M	-23,7	-23,8	-23,3	-24,2	-24,4	-0,4	-0,5
15	F	-22,9	-22,6	-23,6	-24,1	-23,1	0,7	1,0
Moyenne		-24,4	-24,0	-24,1	-24,4	-24,0	-0,3	0,1
Écart-type		0,8	0,7	0,5	0,6	0,8	0,9	0,8

n = 1 pour chaque échantillon

5.4.2 Comparaison inter-laboratoire

Les valeurs des rapports isotopiques des quatre stéroïdes urinaires tels qu'analysés par le laboratoire de Cologne se situent entre -21,7 ‰ et -23,1 ‰ menant à une différence de 0,7 ‰ entre les métabolites et le pregnanediol, tandis que le laboratoire de Tokyo a obtenu des valeurs entre -22,4 ‰ et -23,0 ‰ menant ainsi à une différence {métabolites – pregnanediol} égale à 0,4 ‰. Les écarts-types intra laboratoires sont tous plus petits que 1 (tableau 5.6).

Tableau 5.6 Urines contrôles négatives –
Comparaison des résultats des laboratoires de Cologne, Montréal et de Tokyo

Légende : E : étiocolanalone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ;
PT : pregnanetriol ; 11-OH : 11-hydroxyandrostérone

Laboratoire	n = 15	E	A	PD	PT (11OH)	E- PD	A-PD
Cologne	Moyenne (‰)	-23,1	-21,7	-22,4	(-22,2)	-0,7	0,7
	écart-type	0,7	0,7	0,6	(0,6)	0,4	0,5
Montréal	Moyenne (‰)	-24,4	-24,0	-24,1	-24,4	-0,3	0,1
	écart-type	0,8	0,7	0,5	0,6	0,9	0,8
Tokyo	Moyenne (‰)	-22,6	-22,6	-23,0	-22,4	0,4	0,4
	écart-type	0,9	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
comparaison	Moyenne (‰)	-23,4	-22,8	-23,2	-23,0	-0,2	0,4
	Écart-type	0,9	1,2	0,9	1,2	0,6	0,3

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des deux métabolites et des deux stéroïdes de référence mesurés par les trois laboratoires pour les 15 urines négatives se situent entre -21,7 ‰ et -24,4 ‰. Comme nous l'avons observé précédemment, nous obtenons des valeurs systématiquement plus négatives que les deux autres laboratoires. Par contre, pour chacun des laboratoires, la différence entre les métabolites et les stéroïdes de référence est plus faible que 1 ‰ et les écarts-types intra-laboratoire se situent tous en dessous de 1,0, ce qui démontre que les urines de notre population de référence ont des deltas très similaires. Les écarts-types inter-laboratoires sont quant à eux en dessous de 1,2, tel que présenté dans le tableau 5.6.

5.5 ÉTUDES D'EXCRÉTION DE STÉROÏDES NATURELS

Les échantillons recueillis avant et après d'administration de quatre stéroïdes naturels ont été examinés. Les stéroïdes étudiés sont la pregnénolone, la testostérone et ses deux précurseurs principaux disponibles commercialement au début de ces travaux, soit l'androstènedione et la DHEA. Ces urines proviennent d'études qui ont été réalisées lors d'un précédent projet auprès de volontaires sains et consentants et avec l'approbation du comité d'éthique institutionnel.

5.5.1 Excrétion des métabolites de l'androstènedione

5.5.1.1 Résultats

Dans le tableau 5.7, nous avons regroupé les résultats obtenus de l'analyse des urines combinées des trois volontaires ayant ingéré une capsule d'androstènedione. La comparaison des valeurs δ ‰ des métabolites avec celles des stéroïdes de référence dans les urines pré- et post- traitement, nous indique clairement l'altération des valeurs δ ‰ des métabolites urinaires mesurés. En effet, les résultats pour les urines pré-traitement sont les mêmes que ceux retrouvés dans la population de référence, soit des deltas équivalents pour tous les stéroïdes donnant une différence {métabolites – pregnanediol} tendant vers zéro. Par contre, pour les trois urines post-traitement, les différences maximales mesurées se situent entre -5,3 ‰ et -9,1 ‰ selon les volontaires.

**Tableau 5.7 Étude d'excrétion de produits à base d'androstènedione-
Profil isotopique des stéroïdes**

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ; PT : pregnanetriol ; C : cholestérol

ECHANTILLON	E	A	PD	PT	C	E-PD	A-PD
	$\delta^{13}\text{C}$ ‰					‰	
4a	-21,2	-21,3	-21,7	-21,4	-20,0	0,5	0,4
4b	-29,8	-28,2	-22,9	-22,9	-21,0	-6,9	-5,3
5a	-21,4	-21,2	-21,3	-21,3	-20,9	-0,1	0,1
5b	-28,1	-27,5	-20,4	-20,4	-19,9	-7,1	-7,7
6a	-20,4	-20,2	-20,8	-20,4	-20,5	0,4	0,6
6b	-29,1	-29,3	-20,2	-19,0	-20,2	-8,9	-9,1

n = 1 pour chaque échantillon
a : échantillons pré-traitement
b : échantillons post-traitement

5.5.1.2 Comparaison inter-laboratoire

Nous avons ensuite comparé nos résultats avec ceux obtenus par les laboratoires de Cologne et de Tokyo, tous présentés dans le tableau 5.8. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ de l'androstérone et de l'étiocolanolone ont chuté de -7,9 ‰ et de -7,7 ‰ et les différences entre ces valeurs et celles des stéroïdes de référence se situent en moyenne à -8 ‰. Les écarts-types inter-laboratoire des valeurs de différences « métabolites - stéroïdes de référence » sont légèrement plus faibles que ceux des valeurs absolues de deltas (0,8 pré-traitement et 0,6 post-traitement).

Tableau 5.8 Étude d'excrétion de produits à base d'androstènedione- Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ;
PT : pregnanetriol ; 11-OH : 11-hydroxyandrostérone

ANDROSTÈNEDIONE		LABORATOIRE	E	A	PD	PT (11OH)	E- PD
Moyennes Pré-traitement	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Montréal (n=3)	-21,0	-20,9	-21,3	-21,0	0,3
		Cologne (n=3)	-20,7	-20,0	-19,5	(-19,4)	-1,2
		Tokyo (n=3)	-19,2	-19,2	-19,2	-19,5	0
		Moyenne	-20,3	-20,0	-20,0	-20,0	-0,3
		Écart-type	1,0	0,9	1,1	0,9	0,8
Moyennes Post-traitement	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	Montréal (n=3)	-29,0	-28,3	-21,2	-20,8	-7,8
		Cologne (n=3)	-27,2	-26,1	-19,3	(-19,5)	-7,9
		Tokyo (n=3)	-28,4	-28,6	-19,6	-19,0	-8,8
		Moyenne	-28,2	-27,7	-20,0	-19,8	8,2
		Écart-type	0,9	1,4	1,0	0,9	0,6
Différence (moyenne pré-traitement – moyenne post-traitement) (‰)			-7,9	-7,7	0,0	0,2	-

5.5.2 Excrétion de DHEA

Tout comme l'androstènedione, la DHEA est métabolisée notamment en androstérone et en étiocolanolone (Ayotte *et al.*, 2001).

5.5.2.1 Résultats

Dans le tableau 5.9, nous avons regroupé les résultats obtenus pour les collections d'urines des trois volontaires ayant ingéré une capsule de DHEA. Les résultats obtenus sont très semblables à ceux obtenus lors de l'étude d'excrétion d'androstènedione. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des stéroïdes urinaires mesurées dans les échantillons recueillis avant l'administration sont semblables. Pour ce qui est des trois urines post-traitement, les différences entre les deltas se situent entre -7,7 ‰ et -9,9 ‰ selon les volontaires.

Tableau 5.9 Étude d'excrétion de produits à base de DHEA- Profil isotopique des stéroïdes

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ; PT : pregnanetriol ; C : cholestérol

ECHANTILLON	E	A	PD	PT	C	E-PD	A-PD
	$\delta^{13}\text{C}$ ‰					‰	
1a	-21,6	-22,0	-20,4	-20,8	-21,1	-1,2	-1,6
1b	-30,7	-29,7	-21,2	-21,7	-21,2	-9,5	-8,5
2a	-21,4	-21,4	-21,7	-21,4	-19,8	0,3	0,3
2b	-30,7	-30,0	-20,8	-19,2	-19,6	-9,9	-9,2
3a	-23,0	-21,9	-21,1	ND	-23,0	-1,9	-0,8
3b	-31,6	-30,1	-22,4	ND	-23,0	-9,2	-7,7

n = 1 pour chaque échantillon

a : échantillons pré-traitement

b : échantillons post-traitement

5.5.2.2 Comparaison inter-laboratoire

Les laboratoires de Cologne et de Tokyo ont eu des résultats très semblables à ceux présentés au tableau 5.9. Les écarts-types inter-laboratoire des moyennes se situent entre 0,5 et 1,5. Les mesures effectuées par les trois laboratoires sont donc précises. Selon ces résultats, présentés dans le tableau 5.10, on peut affirmer qu'un traitement de DHEA diminue significativement les valeurs de delta des métabolites tout comme l'avaient conclu les groupes de Horning (1997),

Shackleton et Roitman (1997) et Ayotte (2001). Les écarts-types des valeurs absolues sont relativement faibles pour chacun des stéroïdes (entre 0,5 et 1,5), mais sont encore plus faibles pour la différence E-PD (0,6 pré-traitement et 0,3 post-traitement).

**Tableau 5.10 Étude d'excrétion de produits à base de DHEA-
Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires**

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ;

PT : pregnanetriol ; 11-OH : 11-hydroxyandrostérone

DHEA		LABORATOIRE	E	A	PD	PT (11OH)	E-PD
Moyennes Pré-traitement	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Montréal (n=3)	-22,0	-21,8	-21,1	-21,1	-0,9
		Cologne (n=3)	-20,5	-19,7	-19,8	(-20,0)	-0,7
		Tokyo (n=3)	-20,5	-20,5	-20,8	-21,5	0,3
		Moyenne	-21,0	-20,7	-20,6	-20,9	-0,4
		Écart-type	0,9	1,1	0,7	0,8	0,6
Moyennes Post-traitement	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Montréal (n=3)	-31,0	-29,9	-21,5	-20,4	-9,5
		Cologne (n=3)	-28,7	-27,2	-19,8	(-19,9)	-8,9
		Tokyo (n=3)	-29,9	-29,8	-20,8	-20,8	-9,1
		Moyenne	-29,9	-29,0	-20,7	-20,4	-9,2
		Écart-type	1,2	1,5	0,9	0,5	0,3
Différence (moyenne pré-traitement – moyenne post-traitement) (‰)			-8,9	-8,3	-0,1	0,5	-

5.5.3 Excrétion de la testostérone

La testostérone se métabolisant principalement en androstérone et étiocolanolone, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ de ces deux métabolites devraient diminuer après ingestion. En contrepartie, les $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des stéroïdes de référence ne devraient pas être altérés, tel que rapporté dans la littérature (Shackleton, Phillips et al., 1997 ; Aguilera et al., 1999 ; Aguilera et al., 2000).

5.5.3.1 Résultats

Les résultats obtenus pour l'étude d'excrétion de la testostérone ont été réunis dans le tableau 5.11. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour les 6 volontaires, soit une diminution prononcée des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites, qui ont chuté d'au moins $-4,7$ ‰, tandis que les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites de référence n'ont pas varié, les variations les plus grandes étant de $-0,7$ ‰. Ces variations nous donnent des différences {métabolites – PD} comprises entre $-5,3$ ‰ et $-8,4$ ‰.

**Tableau 5.11 Étude d'excrétion de produits à base de testostérone-
Profil isotopique des stéroïdes**

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ; PT : pregnanetriol

ÉCHANTILLON	E	A	PD	PT	E-PD	A-PD
	δ (‰)				‰	
10a	-21,6	-21,5	-21,3	-21,0	-0,3	-0,2
10b	-26,6	-27,3	-21,0	-21,7	-5,6	-6,3
11a	-22,5	-21,6	-22,2	-22,7	-0,3	0,6
11b	-27,3	-27,2	-22,0	-22,1	-5,3	-5,2
12a	-22,0	-20,8	-20,7	-21,1	-1,3	-0,1
12b	-27,2	-26,9	-20,8	-21,6	-6,4	-6,1
13a	-24,1	-22,6	-21,6	-23,0	-2,5	-1,0
13b	-28,8	-28,4	-21,8	-22,8	-7,0	-6,6
14a	-23,8	-22,3	-21,8	-21,8	-2,0	-0,5
14b	-29,0	-27,5	-22,2	-21,9	-6,8	-5,3
15a	-21,4	-20,3	-20,3	-20,9	-1,1	0
15b	-28,8	-28,9	-20,5	-20,6	-8,3	-8,4
moyenne pré-	-22,6	-21,5	-21,3	-21,8	-1,3	-0,2
écart-type pré-	1,1	0,9	0,7	0,9	0,9	0,5
moyenne post-	-28,0	-27,7	-21,4	-21,8	-6,6	-6,3
écart-type post-	1,0	0,8	0,7	0,7	1,1	1,2

n = 1 pour chaque échantillon
a : échantillons pré-traitement
b : échantillons post-traitement

5.5.3.2 Comparaison inter-laboratoire

Les laboratoires de Cologne et de Tokyo ont également obtenu de fortes diminutions des valeurs de deltas des métabolites variant entre -5,7 ‰ et -8,0 ‰. Les deltas des stéroïdes de référence n'ont pas été altérés apportant ainsi des différences (métabolites – PD) plus grandes que -3 ‰. Les valeurs moyennes mesurées sont compilées au tableau 5.12.

Les valeurs obtenues, tant pour les urines pré-traitement que pour les urines post-traitement, sont précises à la fois pour un même laboratoire entre les individus et pour un même individu entre les laboratoires. Les écarts-types se situent entre 0,7 et 1,6, ce qui est très semblable à ceux que nous avons trouvés pour les études d'excrétion d'androstènedione et de DHEA. Les écarts-types de la différence E-PD sont encore une fois plus petits que ceux des valeurs absolues (soit 0,8 pré-traitement et 0,6 post-traitement).

**Tableau 5.12 Étude d'excrétion de produits à base de testostérone-
Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires**

Légende : E : étiocholanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ;

PT : pregnanetriol ; 11-OH : 11-hydroxyandrostérone

TESTOSTÉRONE		LABORATOIRE	ÉTIO	ANDRO	PD	PT (11OH)	E-PD
Moyennes Pré-traitement	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Montréal (n=3)	-22,6	-21,5	-21,3	-21,8	-1,3
		Cologne (n=3)	-21,0	-19,5	-20,0	(-20,4)	-1,0
		Tokyo (n=3)	-19,5	-19,8	-19,7	-19,5	0,2
		Moyenne	-21,0	-20,3	-20,3	-20,6	-0,7
		Écart-type	1,6	1,1	0,9	1,2	0,8
Moyennes Post-traitement	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Montréal (n=3)	-28,0	-27,7	-21,4	-21,8	-6,6
		Cologne (n=3)	-26,7	-26,1	-20,0	(-20,4)	-6,7
		Tokyo (n=3)	-27,2	-27,8	-19,6	-19,3	-7,6
		Moyenne	-27,3	-27,2	-20,3	-20,5	-7,0
		Écart-type	0,7	1,0	0,9	1,3	0,6
Différence (moyenne pré-traitement – moyenne post-traitement) (‰)			-6,3	-6,9	0,0	0,1	-

5.5.4 Excrétion de la pregnénolone

La pregnénolone n'est pas métabolisée en androstérone, ni en étiocolanolone et conséquemment, leur rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ respectif ne devrait pas être affecté. Par contre, comme le pregnanediol est un métabolite majeur de la pregnénolone, ce rapport devrait être altéré suite au traitement (*Saudan et al., 2004*).

5.5.4.1 Résultats

Nos résultats ont confirmé l'altération des valeurs $\delta\text{‰}$ du pregnanediol dans deux des trois collections d'urines et le maintien de celles des autres stéroïdes analysés (voir résumé au tableau 5.13). Les valeurs $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ du pregnanediol suite à l'administration de pregnénolone par deux volontaires masculins (collection d'urines 8 et 9) chutent de $-7,5\text{‰}$ et $-5,5\text{‰}$ respectivement. Par contre, dans la collection d'urines du volontaire féminin 7, la valeur $\delta\text{‰}$ du pregnanediol est à peine plus négative que les valeurs du pregnanetriol et du cholestérol, entraînant des différences avec l'étiocolanolone et l'androstérone plus petites que 2. Il semble donc que la biotransformation de la pregnénolone ne produise pas systématiquement les mêmes métabolites chez tous les volontaires.

Tableau 5.13 Étude d'excrétion de produits à base de pregnénolone

(Échantillons de Montréal)- Profil isotopique des stéroïdes

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ; PT : pregnanetriol ; C : cholestérol

ÉCHANTILLONS	E	A	PD	PT	C	E-PD	A-PD
	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$					‰	
7a	-21,7	-21,5	-21,8	-21,6	-21,4	0,1	0,3
7b	-21,8	-21,3	-22,9	-20,4	-20,8	1,1	1,6
8a	-21,9	-21,6	-21,3	-21,2	-20,8	-0,6	-0,3
8b	-22,2	-21,7	-28,8	-21,3	-20,8	6,6	7,1
9a	-21,7	-21,3	-22,0	-22,0	-21,2	0,3	0,7
9b	-21,6	-21,1	-27,5	-21,5	-21,3	5,9	6,4

n = 1 pour chaque échantillon
a : échantillons pré-traitement
b : échantillons post-traitement

Les résultats que nous avons obtenus pour l'étude des urines procurées par le laboratoire de Tokyo sont regroupés dans le tableau 5.14. Tout comme pour l'étude d'excrétion de pregnenolone sur les volontaires de Montréal, nous observons une baisse d'environ -7,4 ‰ pour les cinq premiers volontaires. Chez le sixième volontaire, urines 21, la valeur $\delta^{13}\text{C}$ ‰ du pregnanediol est un peu moins altérée. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ de l'androstérone, de l'étiocolanolone, du pregnanetriol et du cholestérol ne varient pas après l'administration de pregnenolone.

**Tableau 5.14 Étude d'excrétion de produits à base de pregnenolone
(Échantillons de Tokyo)-Profil isotopique des stéroïdes**

Légende : E : étiocolanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ; PT : pregnanetriol ; C : cholestérol

ÉCHANTILLONS	E	A	PD	PT	C	E-PD	A-PD
	$\delta^{13}\text{C}$ ‰					‰	
16a	-21,5	-21,3	-21,2	-21,2	-21,1	-0,3	-0,1
16b	-21,8	-21,1	-28,9	-21,5	-20,2	7,1	7,8
17a	-22,8	-21,9	-22,1	-22,6	-22,0	-0,7	0,2
17b	-22,8	-21,8	-30,3	-22,4	-20,5	7,5	8,5
18a	-22,1	-20,8	-21,5	-21,4	-20,4	-0,6	0,7
18b	-22,2	-21,0	-29,1	-21,6	-19,9	6,9	8,1
19a	-23,5	-22,5	-22,4	-22,6	-21,2	-1,1	-0,1
19b	-22,9	-22,3	-29,6	-23,4	-21,8	6,7	7,3
20a	-23,3	-21,8	-22,2	-22,0	-22,3	-1,1	0,4
20b	-23,6	-21,8	-29,5	-22,2	-21,2	5,9	7,7
21a	-21,3	-21,2	-19,5	-21,1	-21,8	-1,8	-1,7
21b	-21,0	-19,0	-23,9	-21,4	-21,1	2,9	4,9

n = 1 pour chaque échantillon
a : échantillons pré-traitement
b : échantillons post-traitement

5.5.4.2 Comparaison inter-laboratoire

Des résultats concordants sont obtenus de la comparaison des résultats provenant des trois laboratoires tels que présentés au tableau 5.15. Comme lors des évaluations précédentes, les écarts-types sont tous plutôt faibles, soit inférieurs à 1,6.

Tableau 5.15 Étude d'excrétion de produits à base de pregnènone-

Comparaison des résultats obtenus par les trois laboratoires

Légende : E : étiocholanolone ; A : androstérone ; PD : pregnanediol ;
PT : pregnanetriol ; 11-OH : 11-hydroxyandrostérone

PREGNÈNOLONE	UNITE	LABORATOIRE	E	A	PD	PT (11OH)	E-PD
Moyennes Pré-traitement	$\delta^{13}\text{C} \text{‰}$	Montréal (n=3)	-22,2	-21,5	-21,5	-21,7	-0,7
		Cologne (n=3)	-21,4	-19,6	-20,0	(-20,3)	-1,4
		Tokyo (n=3)	-19,6	-19,6	-19,8	-19,4	0,2
		Moyenne	-21,1	-20,2	-20,4	-20,5	-0,7
		Écart-type	1,3	1,1	0,9	1,2	0,8
Moyennes Post-traitement	$\delta^{13}\text{C} \text{‰}$	Montréal (n=3)	-22,2	-21,2	-27,8	-21,7	5,6
		Cologne (n=3)	-21,5	-20,0	-26,3	(-20,4)	4,8
		Tokyo (n=3)	-19,8	-20,0	-27,6	-22,5	7,8
		Moyenne	-21,2	-20,4	-27,2	-21,5	6,1
		Écart-type	1,2	0,7	0,8	1,1	1,6
Différence (moyenne pré-traitement – moyenne post-traitement) (‰)			-0,1	-0,2	-6,8	-1,0	-

5.6 CONCLUSION DE L'ÉTUDE COMPARATIVE INTER-LABORATOIRE

L'analyse des échantillons par trois laboratoires de trois continents différents confirme l'applicabilité de la technique de spectrométrie de masse d'isotopes stables à la détection de l'origine endogène ou exogène des métabolites urinaires normalement présents dans les urines humaines. En effet, nous avons observé des chutes significatives et similaires des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ‰ des métabolites principaux par les trois laboratoires. Ces métabolites étant l'androstérone et l'étiocolanone pour la testostérone et ses précurseurs que sont la DHEA et l'androstènedione. Les valeurs mesurées par les trois laboratoires sont similaires, les variations mesurées étant faibles (écarts-types entre 0,5 et 1,6). D'autre part, nous avons confirmé que sur cet instrument, les valeurs que nous avons obtenues sont systématiquement plus négatives que celles des deux autres laboratoires, que ce soit pour les mesures effectuées sur les étalons authentiques ou les stéroïdes urinaires, soit environ -2 ‰. Cependant, cette déviation étant systématique et uniforme, la différence des valeurs entre les métabolites d'intérêt et ceux utilisés comme référence interne demeure constante. Ces observations confirment et généralisent l'applicabilité de la proposition de Shackleton (1997) soit d'utiliser la différence entre les valeurs mesurées pour les métabolites et les stéroïdes de référence pour chaque échantillon et non les valeurs absolues.

Sauf dans le cas de l'étude d'excrétion de pregnènone, tous les écarts-types inter-laboratoires de la différence E-PD sont plus faibles que les écarts-types des valeurs absolues, parfois de moitié, montrant que ces valeurs sont plus précises. La comparaison des résultats de différents laboratoires est donc meilleure et plus significative lorsque basée sur les différences entre les valeurs des métabolites et des stéroïdes de référence (δ métabolites – δ stéroïdes de référence).

Dans l'analyse de l'excrétion de la pregnènone, chez deux volontaires féminins, nous avons constaté qu'aucun des stéroïdes analysés ne semble avoir été issu de la pregnènone (voir section 5.5.4.1, urines 7 et 21). Le métabolisme de la pregnènone pourrait différer chez les hommes et les femmes, ce qui fera l'objet d'autres études.

CHAPITRE VI

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le contrôle de dopage sportif par les stéroïdes anabolisants naturels représente un défi considérable pour les laboratoires d'analyse. Un grand pas a été franchi par la communauté scientifique depuis la mise en pratique de la spectrométrie de masse de rapports isotopiques afin de dépister les cas de tels dopages. Cette technique permet désormais de dépister les dopages par la testostérone et par ses précurseurs, l'androstènedione et la déhydroépiandrosterone à l'aide de l'analyse isotopique du carbone de leurs métabolites.

Le projet comprenait trois grands volets, soit l'analyse de métabolites urinaires de norstéroïdes, la séparation de la testostérone et de l'épitéstostérone par CLHP, et une étude comparative inter-laboratoire.

L'analyse isotopique s'est faite sur les principaux métabolites glucuroconjugués de ces deux norstéroïdes, la norandrostérone et la norétiocholanolone excrétés suite à l'administration topique d'un produit commercial à base de norstéroïdes. Alors que l'analyse de la norandrostérone est possible dans les conditions décrites dans ce mémoire à des concentrations urinaires produites dans les deux jours suivant l'administration, la norétiocholanolone est excrétée en concentration généralement trop faible pour permettre une analyse juste et précise. Les valeurs $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ obtenues par cette méthode sont très rapprochées de la valeur du stéroïde parent, mais ce, seulement pour des concentrations de NA et NE assez élevées pour que l'apport du bruit de fond soit très faible, sinon, nul. Dans le cas de plus petites concentrations, les valeurs obtenues semblent altérées par le bruit de fond. De plus, la méthode appliquée dans ce projet n'était pas complètement satisfaisante, puisque nous remarquons un fractionnement isotopique qui altère les valeurs $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ lors de l'analyse SMRI et ne convenait pas à des échantillons contenant de faibles concentrations de NA et NE.

Le deuxième volet du projet qui portait sur la séparation par CLHP de la testostérone et l'épitestostérone avait pour but la détermination du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Étant mal résolus en CG/C/SMRI lorsque présents en assez grandes concentrations, la fraction de testostérone présente une valeur de delta qui est altérée par la contribution de l'épitestostérone. Une séparation préalable par CLHP nous permet non seulement d'analyser ces deux stéroïdes dans deux fractions distinctes, mais également allège le chromatogramme ce qui nous permet d'analyser plus facilement la testostérone lors de concentrations un peu plus faibles. Également, nous avons déterminé qu'une double extraction liquide-liquide à l'aide de TBME permettait de raccourcir le temps de préparation tout en gardant un bon rendement.

Finalement, le dernier volet du projet était une étude comparative inter-laboratoire. La méthode d'analyse par CG/C/SMRI étant relativement récente dans le domaine du contrôle de dopage sportif, il est intéressant de comparer les résultats obtenus par trois laboratoires qui utilisent cette méthode de façon routinière. Chaque laboratoire a gardé sa propre méthode de préparation des échantillons et utilisent trois instruments de différents manufacturiers.

Afin de mener cette étude comparative, les trois laboratoires se sont partagés des échantillons urinaires provenant de diverses études d'excrétion ainsi que les standards authentiques de stéroïdes et des échantillons recueillis suite à l'administration de l'androstènedione, de la DHEA, de la pregnènone, de la testostérone, ou des volontaires n'ayant pris aucun stéroïde. L'analyse a été faite sur les métabolites principaux, l'androstérone et l'étiocolanolone, et sur les stéroïdes de référence, le pregnanediol, le pregnanetriol et le cholestérol. Dans tous les cas, nous avons observé une chute significative et constante des δ ‰ des métabolites. Les valeurs absolues des δ ^{13}C ‰ obtenues ont d'abord été comparées entre les laboratoires. Tel qu'attendu, ces valeurs varient légèrement entre les trois laboratoires, ainsi qu'entre les individus. Les valeurs obtenues au laboratoire de Montréal étaient, tel que nous l'avions observé précédemment avec cet instrument, plus négatives d'environ -2 ‰. Les études publiées ayant montré des différences bien que mineures entre les stéroïdes endogènes c'est pourquoi, il est généralement admis et recommandé que les résultats soient analysés selon la différence (δ métabolites – δ stéroïdes de référence). Une différence plus grande que -3‰ est indicatrice d'origines distinctes. De cette façon, les trois méthodes et instruments différents ont toujours donné des résultats concordants avec de faibles écarts-types, étant tous entre 0,3 et 1,6.

CHAPITRE VII

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGUILERA, R., Becchi, M., Casabianca, H., Hatton, C., Catlin, D.H., Starcevic, B., Pope, H.G. 1996. «Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids». Journal of mass spectrometry, vol. 31, p.169-176.
- AGUILERA, R., Becchi, M., Grenot, C., Casabianca, H., Hatton, C.K. 1996. «Detection of testosterone misuse: comparison of two chromatographic sample preparation methods for gas chromatographic-combustion/ isotope ratio mass spectrometric analysis». Journal of Chromatography B, vol. 687, p. 43-53.
- AGUILERA, R., Catlin, D.H., Becchi, M., Phillips, A., Wang, C., Swerdloff, R., Pope, H.G., Hatton, C.K. 1999. «Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols». Journal of Chromatography B, vol. 727, p. 95-105.
- AGUILERA, R., Chapman, T.E., Catlin, D.H. 2000. «A rapid screening assay for measuring urinary androsterone and etiocholanolone $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry». Rapid commun. in mass spectrom., vol. 14, p. 2294-2299.

- AGUILERA, R., Chapman, T.E., Starcevic, B., Hatton, C.K., Catlin, D.H. 2001. «Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios». Clinical chemistry, vol. 47, p.292-300.
- ALLAIN, P. 1996. Les médicaments. Paris: Ed. Estem, 414 p.
- AYOTTE, C., Goudreault, D., Charlebois, A. 1996. « Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine». Journal of chromatography B, vol. 687, p.3-25.
- AYOTTE, C., Goudreault, D., Lajeunesse, A., Cléroux, M., Richard, Y., Charlebois, A., Couture, J.-P., Fakirian, A. 2001. « GC/C/IRMS and GC/MS in « natural » steroids testing ». Recent advances in doping analysis (9), Proceedings of the Koln workshop on dope analysis, p.133.
- AYOTTE, C., Guay, C., Cléroux, M., Goudreault D., Fakirian, A. 2002. «Origin of elevated levels of norandrosterone in human urine: half-truths vs. facts». Recent advances in doping, p. 13-19.
- AYOTTE, C., Romiguière, C., Fakirian, A., Flenker, U., Hebestreit, M., Piper, T., Schänzer, W. 2006. «The usefulness of GC/C/IRMS in determining the origin of low levels 19-NA – application in routine analysis», Proceedings of the Cologne Workshop on Dope Analysis, accepted for publication (2006).
- BECCHI, M., Aguilera, R., Farizon, Y., Flament, M.M., Casabianca, H., James, P. 1994. «Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport». Rapid Commun. Mass Spectrom., vol. 8, p. 304-308.
- BRAND, W.A. 1996. « High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry». Journal of mass spectrometry, vol. 31, p.225-235.

- BUTENANDT, A., Hanisch, G. 1935. «Über testosteroone. Umwandlung des Dehydroandrosteroone in androstendiol und testosteroone, ein Weg zur Darstellung des testosteroone aus cholesterin ». Hoppe-Seylers Z. Physiol Chem., vol. 237, p.89-97.
- CATLIN, D.H., Cowan, D.A., de la Torre, R., Donike, M., Fraise, D., Oftebro, H., Hatton, C.K., Starcevic, B., Becchi, M., de la Torre, X., Norli, H., Geyer, H., Walker, C.J. 1996. « Urinary testosterone (T) to epitestosterone (E) ratios by GC/MS. I. Initial comparison of uncorrected T/E in six international laboratories ». Journal of mass spectrometry, vol. 31, no. 4, p.397-402.
- CELOTTI, F., Negri Cesi, P. 1992. «Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics » J. Steroid Biochem. Molec. Biol., vol. 43, no. 5, p. 469-477.
- CLEROUX, M. 2002. «Détermination de l'origine endogène ou exogène de la norandrostéone urinaire par GC-C-IRMS ». Mémoire de maîtrise, Québec, Université du Québec, INRS- Institut Armand-Frappier, 59 p.
- DAVID, K., Dingemans, E., Freud, J., Lacquer, E. 1935. « Über kristallines männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder Cholesterin bereitetes Androsteron ». Hoppe-Seylers Z Physiol Chem, vol. 233, p.281-282.
- DE LA TORRE, X., Gonzalez, J.C., Pichini, S., Pascual, J.A., Segura, J. 2000. «¹³C/¹²C isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations ». Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis, vol. 24, p. 645-650.

- DEHENNIN, L., Jondet, M., Scholler R. 1987. « Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles : an isotope dilution-mass spectrometric study ». Journal of steroid biochemistry, vol. 26, no.3, p. 399-405.
- DESROCHES, M.C., Mathurin, J.C., Richard, Y., Delahaut, P., de Ceaurriz, J. 2002. «Urinary 19-norandrosterone purification by immunoaffinity chromatography : application to gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis». Rapid Commun. Mass Spectrom., vol. 16, p. 370-374.
- EHRlich, P.R., Roughgarden, J. 1987. The science of ecology. États-Unis: Macmillan Publishing company, 710 p.
- ENGEL, L.L., Alexander, J., Wheeler, M. 1958. « Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone ». Journal of biological chemistry, vol. 231, p. 1674-1675.
- GIRARD, A., Sandulesco, G. 1936. « Sur une nouvelle série du groupe carbonyle, leur utilisation à l'extraction des substances cétoniques et à la caractérisation microchimique des aldéhydes et cétones ». Helvetica Chimia Acta, vol. 19, p.1095.
- GONZALO-LUMBRERAS, R., Pimentel-Trapero, D., Izquierdo-Hornillos, R. 2003. Journal of Chromatographic Science, Vol. 41, May/June, p. 261-266.
- HEBESTREIT, M., Flenker U., FuBhöller G., Geyer H., Güntner U., Mareck U., Piper T., Thevis M., Ayotte, C. and Schänzer W. 2006. «Determination of the Origin of Urinary Norandrosterone Traces by Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry». Analyst, vol.131, pp. 1021-1026.
- HORNING, S., Geyer, H., Machnik, M., Schänzer, W., Hilker, A., Oebelmann, J. 1996. « Detection of exogenous testosterone by ^{13}C / ^{12}C analysis». Recent advances in doping analysis (4)- Proceedings of the 14th Cologne workshop on dope analysis (Cologne 17 au 22 mars 1996), p.275-283. Sport und Buch Strauss Köln.

- HORNING, S., Geyer, H., Flenker, U., Schanzer, W. 1997. «Detection of exogenous steroids by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analysis». Recent Advances in Doping, vol. 5, p.135-147.
- KOHLER, R.M.N., Lambert, M.I. 2002. « Urine nandrolone metabolites : false positive doping test». Br J Sports Med, vol. 36, October, p. 325-329.
- LABRIE, F., Bélanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Cusan, L., Gomez, J.-L., Candas, B. 1998. « DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: Its role during aging ». Steroids, vol. 63, p.322-328.
- LAJEUNESSE, A. 2004. Mémoire de maîtrise, Montréal, INRS.
- LAUTALA, P. 2000. « Cathecol O-methyltransferase : glucuronidations of inhibitors and methylation of substrates ». Dissertation académique, Finlande, University of Helsinki, 59 p.
- LE BIZEC, B., Gaudin, I., Monteau, F., André, F., Impens, S., De Wash, 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 communications in mass spectrometry, vol.14, p.1058-1065.
- LIANG, Y., White, W.S., Yao, L., Serfass, R.E. 1998. «Use of high-precision gas isotope ratio mass spectrometry to determine natural abundance ^{13}C in lutein isolated from C_3 and C_4 plant sources». Journal of chromatography A, vol. 800, p.51-58.
- MANGAT, R., Geiger, J.D. 1999. «Anabolic-androgenic steroids: use and abuse». The enhancer : Sport medicine Council of Manitoba, Juin, p. 1-4.

- MASSE, R., Laliberte, C., Tremblay, L., Dugal, R. 1985. « Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone urinary metabolites in man ». Biomed. Mass Spectrom., vol. 12, no. 3, p. 115-121.
- MATHURIN, J.C., Herrou, V., Bourgoigne, E., Pascaud, L., de Ceaurriz, J. 2001. «Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis of 19-norsteroids : application to the detection of a nandrolone metabolite in urine». Journal of chromatography B, vol. 759, p. 267-275.
- MEIER-AUGENSTEIN, W. 1999. «Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry». Journal of chromatography A, vol. 842, p. 351-371.
- MOTTRAM, D.R., George, A.J. 2000. « Anabolic steroids». Baillière's clinical endocrinology and metabolism, vol. 14, no.1, p.55-69.
- OFTEBRO, H. 1992. « Evaluating an abnormal urinary steroid profile ». Lancet, vol. 339, p. 941-942.
- RAYNAUD, E., Audran, M., Brun, JF., Fedou, C., Chanal, JL., Orsetti, A. 1992. « False-positive cases in detection of testosterone doping ». Lancet, vol. 340, p. 1468-1469.
- REZNIK, Y., Herrou, M., Dehennin, L., Lemaire, M., Leymaire, P. 1987. « Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy : determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography- mass spectrometry ». J. Clin. Endocrinol. Metab., vol. 64, no. 5, p. 1086- 1088.
- RUZICKA, L., Goldberg, M.W., Rosenberg, H.R. 1935. « Über die künstliche Herstellung des testikelhormons testosteron (Androsten-3-on-17-ol) ». Helv. Chim. Acta. Vol. 18, p. 1264-1275.

- SAUDAN, C., Baume, N., Mangin, P., Saugy M. 2004. « Urinary analysis of 16(5 α)-androst-3 α -ol by gas chromatograph/combustion/isotope ratio mass spectrometry: implications in antidoping». Journal of chromatography B, vol. 810, p. 257-264.
- SCHANZER, W. 1996. « Metabolism of anabolic androgenic steroids». Clinical chemistry, vol. 42, no.7, p.1001-1020.
- SCHANZER, W. 1997. « Metabolism of anabolic androgenic steroids: 5 α - and 5 β -reduction of 3-keto-4-ene steroids.». Recent advances in doping analysis (4). Proceedings of the Manfred Donike 14th Cologne workshop on dope analysis, Eds. Sport und Buch Straub, p.185-201.
- SCHIMMELMANN, A. 2002. Université d'Indiana
<http://mypage.iu.edu/~aschimme/hc.html>
- SHACKLETON, C., Phillips, A., Chang, T., Li, Y. 1997. «Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstane diols». Steroids, vol. 62, p. 379-387.
- SHACKLETON, C., Roitman, E., Phillips, A., Chang, T. 1997. «Androstane diol and 5-androstane diol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry». Steroids, vol. 62, p. 665-673.
- SHORT, R.V. 1960. « Identification of 19-norandrostenedione in follicular fluid ». Nature, vol. 188, p. 232.
- SMITH, B. N., Epstein, S. 1971. « Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants ». Plant Physiol., vol. 47, p. 380-384.

SNEDEN, A. 2005. Virginia Commonwealth University.

<http://www.people.vcu.edu/~asnedden/Progesterone%20and%20Steroid%20Hormones.pdf>

SOUTHAN, G. et al. 1990. « Misuse of testosterone in sport: an approach to detection by measurement of isotopic abundance using GC-IRMS ». 2nd Int. Symp. on Applied mass Spect., Programme & Abstracts, p. 306.

TOWNSLEY, J.D., Brodie, H.J. 1967. « Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. IV. Ovarian metabolism of estr-4-ene-3,17-dione ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 144, p. 440-445.

UEKI, M., Okano, M. 1999. «Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry». Rapid commun. in mass spectrum., vol. 13, p. 2237-2243.

URALETS, V.P., Gillette, P.A. 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*, vol. 23, p. 357-366.

WADA-AMA, WADA statistics 2003.

http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2003_Labstats_FINAL.pdf

WU, F.C.W. 1997. « Endocrine aspects of anabolic steroids». Clinical chemistry, vol.43, no. 7, p.1289-1292.