

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Utilisation de la spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone
pour l'identification de métabolites urinaires de précurseurs de la
testostérone, de norstéroïdes et de pregnénolone**

Par
André Lajeunesse
B.Sc. en chimie

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Jacques de Ceaurriz
Laboratoire National antidopage
de Châtenay-Malabry

Examineur interne

Alain Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier

Directrice de recherche

Christiane Ayotte
INRS-Institut Armand-Frappier

31 mai 2004

Résumé

La détection de stéroïdes anabolisants androgènes pouvant être présents naturellement chez l'humain représente un réel défi pour les laboratoires impliqués dans la lutte au dopage sportif. L'analyse des modifications du profil d'excrétion des métabolites urinaires doit être effectuée afin de conclure à une administration de testostérone ou de l'un de ses précurseurs disponibles commercialement au Etats-Unis ou via l'internet. Des travaux rapportés par Becchi *et al.* ont indiqué la possibilité d'utiliser la spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone pour déterminer l'origine, endogène ou exogène, de métabolites urinaires (Becchi, Aguilera, Farizon, Flament, Casabianca, James. 1994. Rapid Communication in Mass Spectrometry, vol. 8, p. 304-308). Nous avons décidé de valider des applications pratiques de la spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone à l'identification formelle de stéroïdes "naturels" d'origine synthétique précurseurs de la testostérone.

Dans un premier temps, nous nous sommes attardés aux aspects de validation de l'utilisation de cette technique soit à déterminer les performances du spectromètre de masse couplé à un chromatographe à phase gazeuse (CG/C/SMRI) pour la précision et le domaine de linéarité des analyses. En vue d'améliorer l'analyse chromatographique et de diminuer le fractionnement isotopique, nous avons opté pour l'optimisation de la méthode d'extraction sélective rapportée par le groupe de Shackleton reposant sur la formation de dérivés hydrazones par l'emploi du réactif de Girard (Shackleton, Phillips, Chang et Li. 1997A. Steroids, vol. 62, p. 379-387). Les mises au point techniques nous ont permis d'obtenir une meilleure résolution chromatographique des métabolites urinaires ainsi qu'une amélioration du signal δ (‰). A partir des méthodes d'isolement combinées, nous avons extrait et analysé par CG/C/SMRI les stéroïdes urinaires présents dans des échantillons recueillis suite à l'administration de testostérone, de déhydroépiandrostérone (DHEA) et d'androstènedione. Nos résultats concluants ont permis de déterminer la nature exogène des métabolites finaux androstérone, étiocholanolone, 5 α - et 5 β -androstaniol et ce quelques heures seulement après la consommation. Les valeurs de δ (‰) ont été significativement altérées passant de -23‰, valeur moyenne mesurée pour

une population de référence à -32‰, valeur mesurée des stéroïdes synthétiques administrés.

Pour être diagnostique, la teneur en ^{13}C des métabolites urinaires d'agents dopants doit cependant être comparée à celle de stéroïdes dont l'excrétion n'est pas influencée par ces produits (Shackleton, Phillips, Chang et Li. 1997A. Steroids, vol. 62, p. 379-387). Les stéroïdes généralement utilisés à cette fin sont le pregnanediol, le pregnanetriol, le cholestérol, ou les 11-hydroxy androstérone et étiocolanalone. Nous avons observé que les deux premiers stéroïdes étaient des métabolites de la pregnénolone. Celle-ci étant disponible commercialement aux États-Unis et via Internet, prise souvent en combinaison avec les précurseurs de la testostérone, nous devons utiliser un troisième stéroïde de référence, le cholestérol.

Finalement, nous avons également comparé l'utilisation de deux techniques proposées de travaux précédents, soit la chromatographie en phase liquide (CLHP) à l'échelle semi-préparative et la chromatographie d'immunoaffinité (CIA) pour l'analyse de métabolites urinaires de norstéroïdes. Bien que la récupération des métabolites par CLHP soit d'environ 50%, la capacité maximale des gels d'affinité commerciaux spécifiques à la norandrostérone est toujours insuffisante; conséquemment, la purification par CLHP demeure la meilleure méthode disponible.



Étudiant



Directrice de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire de maîtrise, tout spécialement:

Christiane Ayotte, ma directrice de recherche, pour son encadrement, ses conseils judicieux, son accueil et son dynamisme incontestable.

Anahid Fakirian, pour son aide, ses commentaires pertinents et sa grande disponibilité.

Alain Charlebois et Jean-Pierre Couture pour leur support technique informatique et instrumental.

Toute l'équipe de techniciens pour leurs conseils et aide quotidienne.

La Fondation Armand-Frappier, le Secrétariat d'État au Sport amateur et le Centre canadien pour l'éthique dans les sports pour l'octroi de la bourse d'étude "Sport Canada".

Mon épouse Marlène, pour son support moral inépuisable, sa patience légendaire et son amour infini...

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre 1: Introduction	
1.1 Le dopage sportif.....	1
1.2 Les stéroïdes anabolisants	1
1.2.1 Historique	1
1.2.2 Structure et fonction des androgènes.....	3
1.2.3 Biosynthèse et métabolisme des androgènes.....	6
1.3 Méthodes de dépistage des stéroïdes naturels	8
1.3.1 Détermination du rapport T/E	8
1.4 Spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone (¹³ C/ ¹² C)...	10
1.4.1 La CG/C/SMRI.....	10
1.4.2 Principes de la CG/C/SMRI	12
1.4.3 Cycles bio-synthétiques des plantes C3 et C4.....	15
1.4.4 Choix des métabolites et précurseurs	16
1.5 Méthodes de purification des extraits urinaires.....	17
1.5.1 Extraction sélective via formation d'hydrazones.....	17
1.5.2 Emploi de la chromatographie d'immunoaffinité.....	18
1.6 Sommaire des objectifs	19
Chapitre 2: Matériel et méthodes	
2.1 Stéroïdes	21
2.2 Produits chimiques et biologiques.....	21
2.3 Description des procédures d'extraction.....	22
2.3.1 Procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués.....	22
2.3.2 Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques	22

2.3.3	Purification par chromatographie en phase liquide des 19-norstéroïdes	23
2.3.4	Procédures d'extraction par chromatographie d'immunoaffinité (CIA)	23
2.4	Description des paramètres instrumentaux.....	26
2.4.1	Isolement par CLHP	27
2.4.2	Analyse par CG/SM	27
2.4.3	Analyse par CG/C/SMRI.....	28
2.4.4	Courbes d'étalonnage.....	28
Chapitre 3:	Résultats et discussion	
3.1	Introduction	31
3.2	Performance de l'instrument CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)	31
3.2.1	Précision	31
3.2.2	Domaine de linéarité	33
3.3	Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques	37
3.3.1	Optimisation des paramètres d'extraction.....	39
3.3.2	Tests de validation.....	46
3.3.2.1	Répétabilité.....	46
3.3.2.2	Reproductibilité	50
3.3.2.3	Fractionnement isotopique.....	55
3.3.2.4	Stabilité des solutions extraites.....	58
3.4	Variation des valeurs de $\delta\%$ des métabolites excrétés consécutives à l'administration de précurseurs de testostérone	63
3.4.1	Androstènedione et DHEA.....	64
3.4.2	Pregnénolone	69
3.5	Analyse par CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de profils stéroïdiens "anormaux"	72
3.6	Purification et analyse de métabolites de 19-norstéroïdes	74
3.6.1	Procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués	75
3.6.2	Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques	76
3.6.3	CLHP à l'échelle semi-préparative	77
3.6.4	Chromatographie d'immunoaffinité	81
Chapitre 4:	Conclusion	85
Liste des références.....		89

Liste des figures

Figure 1.1:	Représentation de l'androstane	4
Figure 1.2:	Stéroïdes androgènes endogènes	5
Figure 1.3:	Schéma de bio-synthèse des androgènes.....	7
Figure 1.4:	Dérivés glucuroconjugués et sulfoconjugués de stéroïde androgènes	8
Figure 1.5:	Schéma d'un CG/C/SMRI $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	13
Figure 1.6:	Exemples typiques de valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ naturelles mesurées pour diverses substances organiques	16
Figure 1.7:	Réaction entre l'androstérone et le réactif de Girard (Ammonium de triméthyle acéthydrazide) formant l'hydrazone d'androstérone	18
Figure 3.1:	Tests de linéarité de CG/C/SMRI effectués à partir de l'injection de 2 μL de solutions standards de stéroïdes (5-800 $\text{ng}/\mu\text{L}$) : δ (‰) moyen en fonction de la concentration ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	36
Figure 3.2:	Tests de linéarité de CG/C/SMRI effectués à partir de l'injection de 2 μL de solutions standards de stéroïdes (5-800 $\text{ng}/\mu\text{L}$) : intensité du courant au détecteur (nA) en fonction de la concentration ($\text{ng}/\mu\text{L}$) ...	37
Figure 3.3:	Étapes préliminaires de la procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques.....	40
Figure 3.4:	Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques	43
Figure 3.5:	Chromatogrammes provenant de l'analyse CG/SM (balayage complet) d'échantillons urinaires recueillis suivant l'administration d'énanthate de testostérone. Résultats préliminaires de la procédure d'extraction sélective des Stéroïdes cétoniques avec solutions tampons acétate pH 4,74 et formiate (1M) pH 2,9: (A) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase organique, (B) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase aqueuse.....	44
Figure 3.6:	Chromatogrammes provenant de l'analyse CG/SM (balayage complet) d'échantillons urinaires recueillis suivant l'administration d'énanthate de testostérone. Procédure d'extraction sélective optimisée des stéroïdes cétoniques: (A) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase organique, (B) agrandissement de (A), (C) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase aqueuse.....	45

Figure 3.7:	Profil d'excrétion provenant de l'analyse CG/C/SMRI d'échantillons recueillis suite à l'administration d'une capsule de 100 mg d'androstènedione.....	65
Figure 3.8:	Profil d'excrétion provenant de l'analyse CG/C/SMRI d'échantillons recueillis suite à l'administration d'une capsule de 200 mg de DHEA.....	65
Figure 3.9:	Profil d'excrétion des stéroïdes analysés par CG/C/SMRI suivant l'administration d'une capsule de 50 mg de pregnènone (volontaire SA-60, sexe masculin).....	71
Figure 3.10:	Profil d'excrétion des stéroïdes analysés par CG/C/SMRI suivant l'administration d'une capsule de 50 mg de pregnènone (volontaire SA-58, sexe masculin).....	71
Figure 3.11:	Profil d'excrétion des stéroïdes analysés par CG/C/SMRI suivant l'administration d'une capsule de 50 mg de pregnènone (volontaire SA-57, sexe féminin).....	72
Figure 3.12:	Chromatogramme de l'analyse CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) réalisée à partir de l'extraction de 25 mL d'urine du volontaire ayant ingéré 100 mg de norandrostènedione (42 heures après ingestion) : a) extraction par procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés, b) procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés suivit d'une purification par CLHP à l'échelle semi-préparative.....	80

Liste des tableaux

Tableau 2.1: Préparation des solutions aqueuses de NA et NE purifiées par CIA suivant le protocole 1	25
Tableau 2.2: Préparation des solutions standards de NA et NE utilisées pour bâtir les courbes d'étalonnage sur CG/SM	29
Tableau 3.1: Valeurs obtenues de δ (‰) par CG/C/SMRI pour 5 injections de 1 μ L d'une solution standard de n-alcanes à 140 μ g/mL	32
Tableau 3.2: Valeurs de δ (‰) mesurées par CG/C/SMRI à partir de l'injection de 2 μ L de solutions standards de stéroïdes (5 à 800 ng/ μ L).....	35
Tableau 3.3: Répétabilité (5 mL d'urine témoin négative – phase organique).....	47
Tableau 3.4: Répétabilité (5 mL d'urine témoin positive – phase organique).....	48
Tableau 3.5: Répétabilité (5 mL d'urine témoin négative – phase aqueuse).....	49
Tableau 3.6: Répétabilité (5 mL d'urine témoin positive – phase aqueuse).....	50
Tableau 3.7: Reproductibilité (5 mL d'urine témoin négative – phase organique).....	51
Tableau 3.8: Reproductibilité (5 mL d'urine témoin positive – phase organique).....	52
Tableau 3.9: Reproductibilité (5 mL d'urine témoin négative –phase aqueuse).....	53
Tableau 3.10: Reproductibilité (5 mL d'urine témoin positive – phase aqueuse).....	54
Tableau 3.11: Récupération - Test de fractionnement isotopique (urine dopée, Phase organique).....	56
Tableau 3.12: Récupération - Test de fractionnement isotopique (urine dopée, phase aqueuse).....	57
Tableau 3.13: Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin négative (phase organique)	59
Tableau 3.14: Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin négative (phase aqueuse)	60
Tableau 3.15: Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin positive (phase organique)	61

Tableau 3.16: Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin positive (phase aqueuse)	62
Tableau 3.17: Valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ obtenues pour des métabolites excrétés post-administration d'androstènedione	67
Tableau 3.18: Valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ obtenues pour des métabolites excrétés post-administration de DHEA	67
Tableau 3.19: Évaluation de quatre cas de testostérone en combinant la CG/SM et la SMRI du carbone $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	74
Tableau 3.20: Pourcentage (%) de récupération de NA et NE par CG/SM en appliquant la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés	76
Tableau 3.21: Pourcentage (%) de récupération de NA et NE par CG/SM en appliquant successivement les procédures d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés ainsi que celle d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques (n=2 pour chacune des concentrations)	77
Tableau 3.22: Pourcentage (%) de récupération de NA et NE par CG/SM en appliquant successivement la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés et la purification par CLHP à l'échelle semi-préparative (n=2 pour chacune des concentrations)	78
Tableau 3.23: Pourcentage (%) de récupération obtenu à partir de solutions aqueuses de 5 mL dopées à la NA en purifiant par CIA sur gel sélectif à la nortestostérone (n=2 pour chacune des concentrations)	81
Tableau 3.24: Pourcentage (%) de récupération obtenu à partir de solutions aqueuses de 5 mL dopés à la NA en purifiant par CIA sur gel sélectif à la norandrostérone (n=2 pour chacune des concentrations)	82
Tableau 3.25: Pourcentage (%) de récupération obtenu à partir de solutions urinaires de 5 mL de NA en purifiant par CIA sur gel sélectif à la norandrostérone (n=2 pour chacune des concentrations)	83

Liste des abréviations

5 α -diol:	5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol ou 5 α -androstenediol
5 β -diol:	5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol ou 5 β -androstenediol
ACN:	Acétonitrile
Andro:	Androstérone
Androstanol:	5 α -androstan-3 α ,17 α -diol
CG:	Chromatographe phase Gazeuse
CG/SM:	Chromatographe phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse
CG/C/SMRI:	Chromatographe phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques
Cholest:	Cholestérol
CIA:	Chromatographie d'Immunoaffinité
C.I.O.:	Comité International Olympique
CLHP:	Chromatographie en phase Liquide de Haute Performance
C.V. (%):	Coefficient de Variation (en %)
DHEA:	Déhydroépiandrostérone
DHT:	Dihydrotestostérone
DSI:	Détection Sélective d'Ions
E:	Épitestostérone
EG:	Épitestostérone sous la forme glucuroconjuguée
Étio:	Étiocholanolone
IE:	Impact électronique
17 α -meandiol:	17 α -méthyl-5 α -androstan-3 β ,17 β -diol

m/z:	masse / charge
MeOH:	Méthanol
MTBE :	<i>tert</i> -butyl méthyl éther
NA:	Norandrostérone
NE:	Norétiocholanolone
PBS:	Solution Tampon Phosphate Saline
PD:	Pregnanediol
PT:	Pregnanetriol
SAA:	Stéroïde Anabolisant Androgène
SM:	Spectromètre de Masse
SMRI:	Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques
STD:	Standard
T:	Testostérone
TG:	Testostérone sous la forme glucuroconjuguée

Chapitre 1

Introduction

1.1 Le dopage sportif

L'usage d'agents dopants est un problème important touchant le monde sportif. Cette problématique s'applique particulièrement lorsque des substances stéroïdiennes fournissent des actions anabolisantes et androgènes aux athlètes désirant augmenter leurs performances sportives. La testostérone, la déhydroépiandrostérone (DHEA), la dihydrotestostérone (DHT) et l'androstènedione sont des exemples de stéroïdes qui possèdent ces potentiels recherchés (Flenker *et al.*, 1998).

Depuis 1968, la Commission Médicale du Comité International Olympique (C.I.O) et les importantes fédérations internationales ne cessent d'être concernées par les cas de dopage sportif. D'ailleurs, c'est à cette époque que la Commission a établi des listes de substances et de pratiques interdites qui sont encore valides à ce jour (C.I.O., 1998). Ainsi, les athlètes sont aujourd'hui confrontés au contrôle de plus d'une centaine de substances divisées en 5 catégories : les stimulants, les analgésiques narcotiques, les diurétiques, les hormones peptidiques et glycoprotéiniques et les agents anabolisants (agonistes- β et stéroïdes androgènes) (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996).

1.2 Les stéroïdes anabolisants

1.2.1 Historique

En 1849, Berthold le célèbre endocrinologue a découvert l'action des hormones par l'étude et l'observation chez des coqs de la régularisation du développement et du maintien des caractéristiques sexuelles par l'action d'une substance sécrétée dans le sang par les testicules (Blue *et al.*, 1999). Mais ce n'est qu'en 1929 que des chercheurs réussirent à prouver que l'urine d'homme possède une activité similaire à celle retrouvée dans des extraits de testicules.

En 1931, Butenandt réussit à isoler l'androstérone de l'urine humaine, mais s'aperçoit rapidement que la substance ne possède pas l'activité recherchée. Il faudra attendre 1935 pour que la testostérone soit isolée. Dans la même année, la synthèse totale de la testostérone est réalisée pour la première fois (Murad et Haynes, 1985). Peu de temps après, soit en 1939, les scientifiques ayant accompli cet exploit reçoivent le prix Nobel.

Les premiers traitements médicaux avec stéroïdes anabolisants remontent à la fin de la deuxième guerre mondiale. A cette époque, des médecins traitaient les états cataboliques associés à la famine et aux violents traumatismes en administrant en doses contrôlées ces substances aux patients souffrants. Aujourd'hui, l'usage de stéroïdes anabolisants est surtout limité aux adolescents pour favoriser la croissance, déclencher une puberté retardée, mais aussi pour traiter les micro-pénis (Landry *et al.*, 1990). D'autres applications utiles, soit le traitement de l'hypogonadisme (Wilson, 1988), de l'œdème angioneurotique héréditaire et de certaines formes de cancer du sein (Strauss, 1987) méritent d'être mentionnées.

Les premières utilisations de stéroïdes anabolisants dans un contexte de dopage sportif semblent débuter vers 1950. On raconte que des haltérophiles russes utilisaient de la testostérone afin d'augmenter leur masse musculaire, ainsi que la durée et l'intensité de leurs entraînements (Mottram *et al.*, 2000). La consommation de stéroïdes anabolisants se propagea ensuite vers d'autres disciplines.

Vers les années 70, les premières méthodes de détection de stéroïdes anabolisants sont disponibles. Ces nouveaux développements permettent en 1975 au C.I.O. d'ajouter les SAA à la liste des substances interdites. Historiquement, les premiers tests de dépistage de stéroïdes anabolisants androgènes (SAA) durant des Jeux olympiques sont effectués en 1976 à l'aide de tests immunométriques dont le résultat est confirmé par spectrométrie de masse (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Depuis les 2 dernières décennies, c'est le chromatographe phase gazeuse couplé au spectromètre de masse (CG/SM) qui est couramment utilisé comme instrument de dépistage (Catlin *et al.*, 1987).

Très performant, le CG/SM permet également des analyses quantitatives telles la mesure de concentration urinaire de métabolites d'androgènes comme la testostérone, l'androstérone l'étiocolanolone, ainsi que l'estimation de rapports diagnostiques. Citons l'application de la sonde TG/EG > 6 proposée par le groupe de Donike comme méthode de dépistage de l'utilisation de testostérone, stéroïde normalement présent dans l'urine humaine (Donike *et al.*, 1983). Alors que la seule présence d'un stéroïde ou de ses métabolites constitue la preuve d'administration d'une substance purement synthétique, l'utilisation de stéroïdes anabolisants endogènes i.e. *naturels* est beaucoup plus difficile à confirmer. Celle-ci représente toujours un réel défi pour les laboratoires impliqués dans la lutte au dopage sportif: les méthodes d'analyse CG/SM sont incapables de distinguer la nature endogène ou exogène de certains métabolites urinaires (Aguilera *et al.*, 1999).

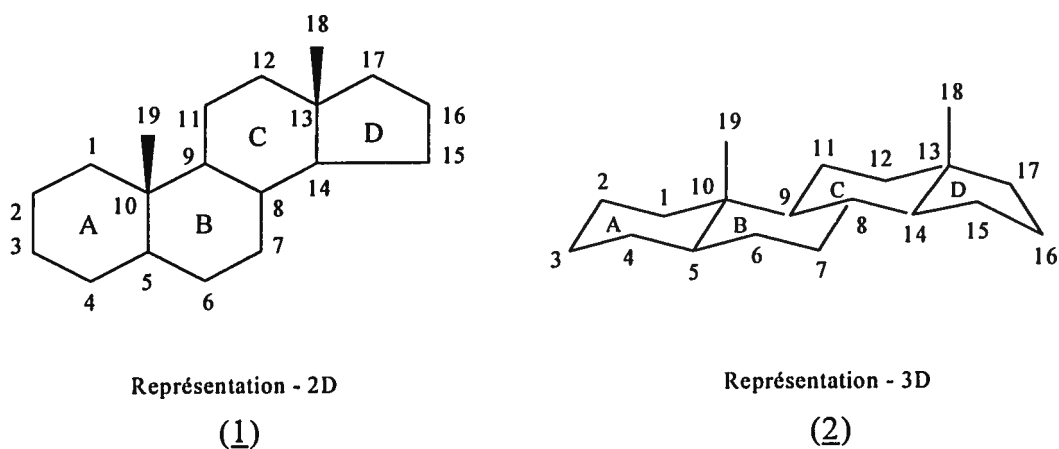
1.2.2 Structure et fonction des androgènes

Les stéroïdes sont nombreux dans la nature et plusieurs d'entre eux présentent une activité physiologique importante. Très fréquemment, les stéroïdes agissent en tant qu'hormones en régularisant l'activité biochimique. Dans le corps humain par exemple, ils contrôlent le développement sexuel ainsi que la fertilité, en plus d'autres fonctions.

Tel que démontré à la figure 1.1 avec la molécule d'androstane, le squelette stéroïdien possède quatre cycles qui sont désignés par les lettres A, B, C, D, et dont les atomes de carbone sont numérotés selon la convention. L'accolement des cycles en configuration *trans* permet de réaliser une configuration "chaise" qui est moins tendue et moins énergétique que celle "bateau" (Vollhardt, 1990). Chaque carbone possède un lien perpendiculaire au plan (position axiale) et un autre ayant un angle de 30° par rapport au plan (position équatoriale). Les groupes qui sont situés au-dessus du plan de la molécule, comme les méthyles aux positions 18 et 19, sont des substituants β , ceux en dessous du plan des substituants α . Dans la représentation à deux dimensions (1), les lignes pleines sont utilisées pour les substituants β , alors que les pointillés sont utilisés pour les α .

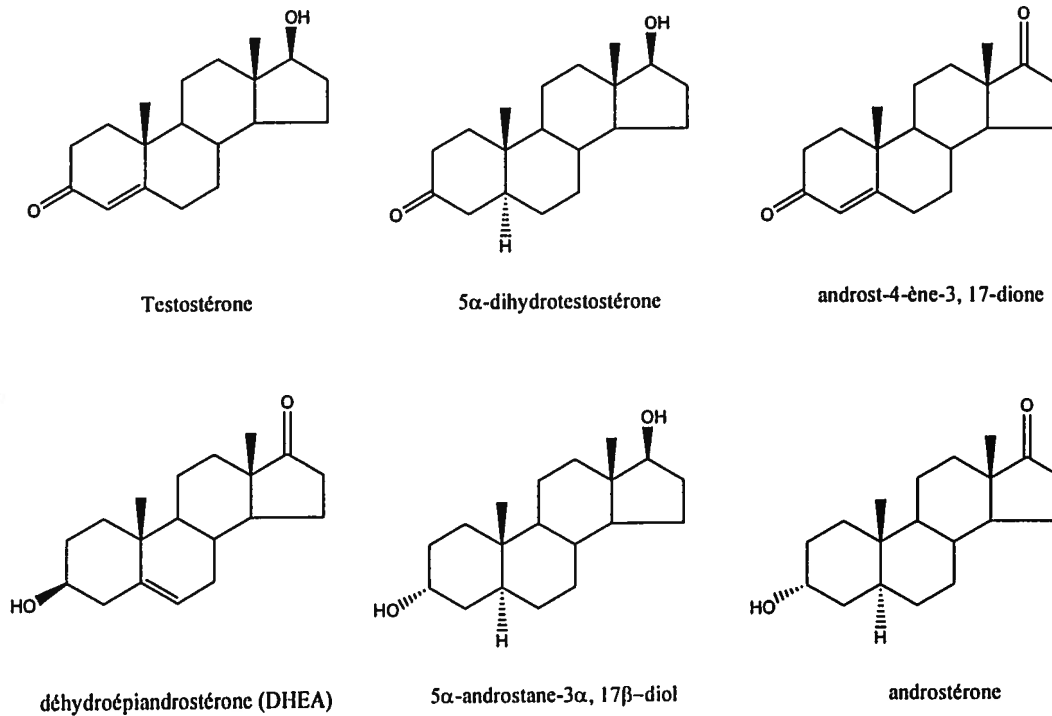
Selon la convention de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), pour les fonctions alcool, cétone ou alcène, on utilise les suffixes ol, one ou ène respectivement en ajoutant le numéro de l'atome de carbone auquel la fonction chimique est rattachée.

Figure 1.1 Représentations de l'androstane.



D'un point de vue de leur action physiologique, les hormones stéroïdiennes peuvent être divisées en quatre grandes classes : les corticostéroïdes, les oestrogènes, les pregnanes et les androgènes (Gower, 1979). Bien qu'il existe plusieurs stéroïdes androgènes, la testostérone et la 5α -dihydrotestostérone (5α -DHT) sont considérées comme étant les deux plus puissants androgènes endogènes (voir figure 1.2). La forte activité de ces androgènes dépend principalement de la présence d'un groupement hydroxyle en position β sur le carbone C-17, et aussi d'une fonction cétone en C-3 (Gower, 1979).

Figure 1.2 : Stéroïdes androgènes endogènes



Malgré le fait que la testostérone soit un stéroïde androgène endogène puissant, elle devient inefficace lors d'ingestion par voie orale ou injection parentérale (Murad *et al.*, 1985). Après administration orale, par effet de premier passage dans le foie, une infime quantité de testostérone atteindra la circulation systémique alors que la majeure partie de la dose administrée sera inactivée en métabolites conjugués finaux androstérone, étiocolanolone, androstanediols. Quant à l'administration parentérale, la testostérone injectée est métabolisée rapidement dans les tissus locaux. Ainsi donc, pour qu'un androgène soit efficace autant par voie orale ou parentérale, il a fallu modifier chimiquement la molécule pour retarder son absorption ou sa dégradation.

Selon Wilson (1988), trois types de modifications ont été effectuées à cette fin soit: i) l'estérification de la fonction hydroxyle en β sur le carbone C-17; ii) l'alkylation en α du carbone C-17; iii) la modification de la structure des anneaux A, B et C. Ces modifications ont permis le développement d'une série de composés dont on a

effectivement retardé le métabolisme hépatique lors d'ingestion orale, ou décriu la polarité et ainsi ralenti l'absorption dans les tissus du site d'injection.

Outre les raisons évoquées précédemment, la structure chimique des stéroïdes a aussi été modifiée pour tenter d'améliorer des caractéristiques anabolisantes tout en minimisant certains effets androgènes négatifs. Dès 1953, les 19-norstéroïdes sont synthétisés et utilisés fréquemment en thérapie médicale (Chinerey, 1983). Parmi ces stéroïdes anabolisants androgènes disponibles de nos jours figurent la 19-nortestostérone ou nandrolone et la norandrostènedione. En 1980, plus de 120 stéroïdes androgènes anabolisants synthétiques sont inventoriés (Rogozkin, 1991).

1.2.3 Biosynthèse et métabolisme des androgènes

Selon les travaux rapportés dans la littérature, deux voies mènent à la formation de la testostérone à partir du cholestérol (voir figure 1.3). Quant aux voies d'élimination, deux réactions favorisent la désactivation et l'excrétion des stéroïdes: ce sont les réactions de phase I et II.

Dans les réactions de type I, des réactions enzymatiques telles l'oxydation, la réduction, l'hydroxylation et la désalkylation sont impliquées (Dutton, 1978). Pour les réactions de type II, ce sont des molécules endogènes polaires telles l'acide glucuronique, et l'acide sulfurique qui s'associent aux métabolites de la phase I (voir figure 1.4). Par exemple, les métabolites de stéroïdes androgènes sont majoritairement excrétés sous leur forme glucuroconjuguée bien que la DHEA et l'épiandrostérone, toutes deux possédant des groupements 3β -ol sont sulfoconjuguées (Dutton, 1978; Leunissen, 1979; Lévesque, 1998).

Figure 1.3 Schéma de biosynthèse des androgènes (Gower, 1979).

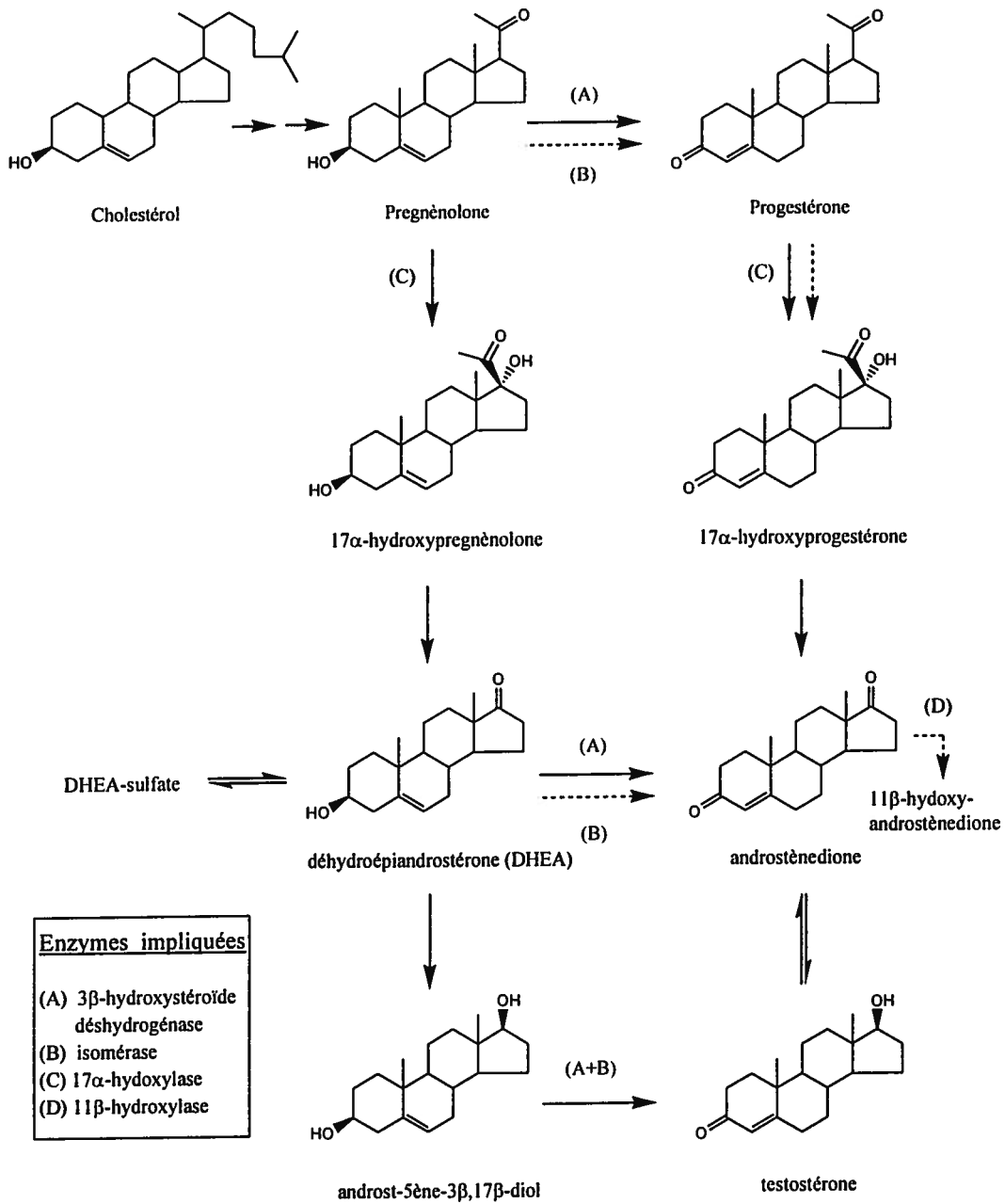
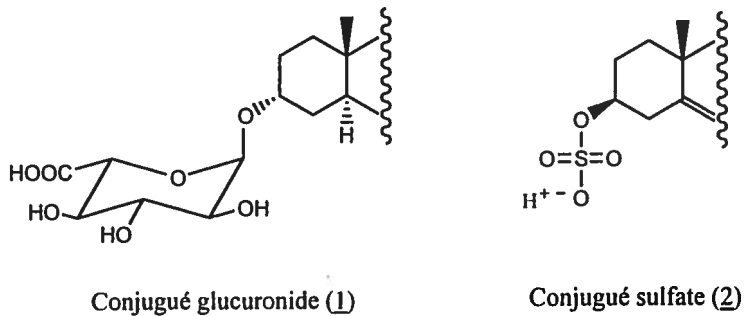


Figure 1.4 Dérivés glucuroconjugués et sulfoconjugués de stéroïdes androgènes.



En ce qui concerne les 19-norstéroïdes, l'administration de nortestostérone, ou de l'un de ses précurseur norandrostènedione ou norandrostènediol provoque l'excrétion sous forme glucuroconjuguée de norandrostérone (NA) et de norétiocholanolone (NE) dans une proportion de 72:28 (Schänzer *et al.*, 2000; Engel, Alexander et Wheeler, 1958; Dehennin *et al.*, 1999; Cléroux et Ayotte, 2001; Uralets et Gillette, 1999).

1.3 Méthodes de dépistage des stéroïdes naturels

1.3.1 Détermination du rapport T/E

En 1982, Donike et son équipe ont proposé une méthode d'analyse quantitative des urines d'athlètes permettant la détection de l'administration de testostérone. Cette approche était basée sur l'augmentation du rapport [testostérone / épitestostérone] urinaire au-delà d'une valeur limite de 6 fixée par observation des valeurs mesurées dans plusieurs centaines d'échantillons (Donike *et al.*, 1983). L'administration de testostérone conduit à l'augmentation de l'excrétion de testostérone glucuronide en comparaison avec celle de son épimère en C-17, qui elle diminue ou demeure inchangée après administration de testostérone.

Selon Dehennin et Matsumoto (1993), lors d'une forte administration de testostérone, il se produirait un phénomène de régulation au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire produisant une diminution de la sécrétion naturelle

de la testostérone et de l'épitéstostérone (Dehennin et Matsumoto, 1993 ; Lévesque, 1998). Ainsi, une augmentation du rapport TG/EG et de la concentration urinaire de testostérone sont les premiers indices d'une consommation de testostérone. Vingt ans après la proposition initiale de Donike *et al.* (1983), plusieurs milliers d'échantillons urinaires d'athlètes féminins et masculins ont été analysés et les distributions normales des concentrations de métabolites urinaires sont maintenant bien caractérisées. La valeur moyenne des rapports T/E est d'environ 1:1, 97.5% des valeurs se situant en deçà de 3:1 (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996; Geyer *et al.*, 1997; Ayotte *et al.*, 2001).

Donike *et al.* ont observé chez 3000 athlètes que 99,9% des rapports T/E mesurés se situaient entre 0,05 et 5,27 (Lévesque, 1998). Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres laboratoires (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996 ; Geyer *et al.*, 1997 ; Ayotte *et al.*, 2001). Suite aux observations du groupe de Donike, le C.I.O. a fixé à 6:1 la valeur limite du rapport TG/EG. Ainsi, tout rapport T/E supérieur à 6 est considéré comme un indice de l'administration de testostérone.

Les valeurs individuelles du rapport T/E sont stables. En effet, chez un individu donné, l'analyse des rapports T/E démontre une faible variation de la valeur moyenne et ce durant des années. On a cependant observé chez certains athlètes que l'excrétion naturelle et systématique de valeurs du rapport T/E avoisine le seuil de 6:1. C'est pourquoi l'obtention d'une valeur élevée du rapport T/E n'est pas suffisante pour conclure à l'administration de testostérone. L'évaluation de tels résultats doit impliquer la revue des tests préalables afin de démontrer l'augmentation de la valeur par rapport à la normale de l'athlète (Ayotte, 1997A).

Des sondes complémentaires ont été proposées. Par exemple, Dehennin et Matsumoto ont proposé l'utilisation du rapport TG/(EG+ES) qui tiendrait compte de la portion d'épitéstostérone sulfoconjuguée (Dehennin et Matsumoto, 1993). Cependant, des études menées dans notre laboratoire n'ont pu vérifier l'efficacité de cette sonde. En effet, l'évaluation des rapports TG/(EG+ES) générés lors de cette étude n'a pas permis de distinguer les athlètes qui possèdent des valeurs TG/EG naturellement élevés de ceux

réellement positifs (Lévesque, 1998). D'autres sondes complémentaires telles les mesures de rapports T/LH, T/17-hydroxyprogestérone ainsi que l'utilisation du kétoconazole (Kicman *et al.*, 1993), ont été proposées sans que l'on adopte leur utilisation; leur efficacité n'ayant pas été démontrée et appliquée à tous les cas.

La seule mesure d'un rapport T/E supérieur à 6:1 s'est toutefois révélée incapable de détecter tous les cas de dopage à la testostérone. En effet, de la Torre *et al.* ont observé auprès de populations orientales possédant des rapports T/E normaux inférieurs à 1 que l'administration de testostérone ne conduisait pas toujours au dépassement du seuil.

Il appert malgré tout que l'évaluation du rapport T/E, combinée aux études longitudinales, demeurent jusqu'à présent le meilleur outil de premier diagnostic que possèdent les laboratoires.

1.4 Spectrométrie de masse de rapports isotopiques du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)

1.4.1 La CG/C/SMRI

L'importante percée de la CG/SM en chimie analytique organique a incité l'adaptation de la technique de mesure d'isotopes stables à ce champ d'analyses. En 1976, Sano *et al.* ont rapporté les résultats d'une étude du métabolisme de l'aspirine marquée au ^{13}C par spectrométrie de masse de rapports isotopiques (SMRI). Dans cette étude, l'aspirine et ses métabolites sont séparés par CG avant d'être oxydés en $^{13}\text{CO}_2$ et $^{12}\text{CO}_2$ dans un réacteur de combustion artisanal dont l'effluent est par la suite analysé par un spectromètre de masse détectant uniquement les ions à m/z 44 et 45. Deux années plus tard, Matthews et Hayes ont rapporté l'augmentation de la précision de l'instrument produite par l'utilisation d'un secteur magnétique muni d'un contrôleur permettant l'alternance du voltage d'accélération des ions entre les deux valeurs prédéterminées (Matthews et Hayes, 1978). Toutefois, ce n'est qu'en 1984 que la compagnie parisienne Pernod-Ricard mettra au point un spectromètre de masse permettant l'analyse des gaz de combustion provenant d'une colonne de CG en débit continu (Brand, 1996). Peu de temps après, Barrie et son équipe améliorent la précision du système à moins de 1‰

(notation δ per mille) en utilisant une fournaise de quartz avec capillaire rempli de Co_3O_4 suivi d'un piège cryogénique permettant de capter l'eau formée lors du processus de combustion. Ce système fut le premier authentique CG/C/SMRI (C pour combustion) construit et opéré en débit continu couplé à un spectromètre de masse muni de deux canaux collecteurs d'ions distincts (Meier-Augenstein, 1999).

Les premiers instruments de CG/C/SMRI ont été commercialisés en 1988 et ils sont devenus rapidement populaires dans plusieurs sphères d'activité. Ils sont notamment utilisés pour l'authentification d'ingrédients en chimie agroalimentaire, dans la détermination de la provenance de certaines drogues interdites, en archéologie, en géochimie ainsi qu'en environnement. En 1990, Southan et son équipe utilisent la SMRI pour démontrer que la testostérone synthétique possède une teneur en ^{13}C différente de celle des hormones endogènes (Southan *et al.*, 1990). S'appuyant sur ces résultats, Becchi *et al.* ont proposé l'utilisation de la spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone pour la détection de consommation de testostérone par les sportifs (Becchi *et al.*, 1994). Ainsi, l'administration de testostérone synthétique modifierait non seulement le profil d'excrétion urinaire des principaux métabolites, mais aussi leur rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

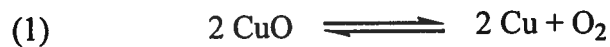
Déjà en 1997, trois groupes de chercheurs avaient démontré la modification des rapports isotopiques suite à l'administration de testostérone (Aguilera *et al.*, 1996; Horning *et al.*, 1996; Shackleton *et al.*, 1997A). En effet, ces chercheurs ont observé une baisse rapide des valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ de la testostérone analysée, mais aussi de ses principaux métabolites i.e. androstérone, étiocholanolone, 5α - et 5β -androstane-3 α -diol. Alors que les valeurs $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ des stéroïdes endogènes oscillent normalement aux alentours d'une valeur moyenne de -23‰ avant ingestion, celles de la testostérone et de ses métabolites chutent vers -30‰ à peine quelques heures post-consommation.

Bien que cette tendance soit observée par plusieurs groupes de recherche, une étude réalisée par l'équipe de Shackleton auprès de volontaires chinois démontre des valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, après ingestion de testostérone, ne dépassant pas -29‰ (Shackleton *et*

al., 1997A). Ces auteurs croient possible que la différence de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ observée dans divers échantillons urinaires puisse être attribuable aux différentes diètes retrouvées dans chacun des pays. Ainsi, il serait préférable de ne pas établir de seuil absolu de valeur de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, ce qui risquerait de conduire les analystes de laboratoire vers de fausses conclusions. Ayant observé une constance dans les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ pour les *stéroïdes endogènes de référence* cholestérol et pregnanediol, Shackleton *et al.* suggèrent plutôt l'application d'une sonde exprimée par le ratio [$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ métabolite / $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ stéroïdes de référence] > 1,1. Très pratique, cette sonde pourrait permettre de "normaliser" les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, mais aussi de diminuer les variations des résultats entre les différents laboratoires.

1.4.2 Principes de la CG/C/SMRI

Pour en mesurer des rapports d'isotopes stables du carbone i.e. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, les analytes séparés par CG doivent être totalement convertis en un gaz simple avant d'entrer dans la source du spectromètre de masse (voir figure 1.5). Ainsi, les produits éluant de la colonne du chromatographe en phase gazeuse (point A) subissent une combustion au travers d'un capillaire de quartz ou de céramique (point B) à l'intérieur duquel l'oxyde de cuivre assure une libération continue d'oxygène selon l'équation 1 ci-dessous:



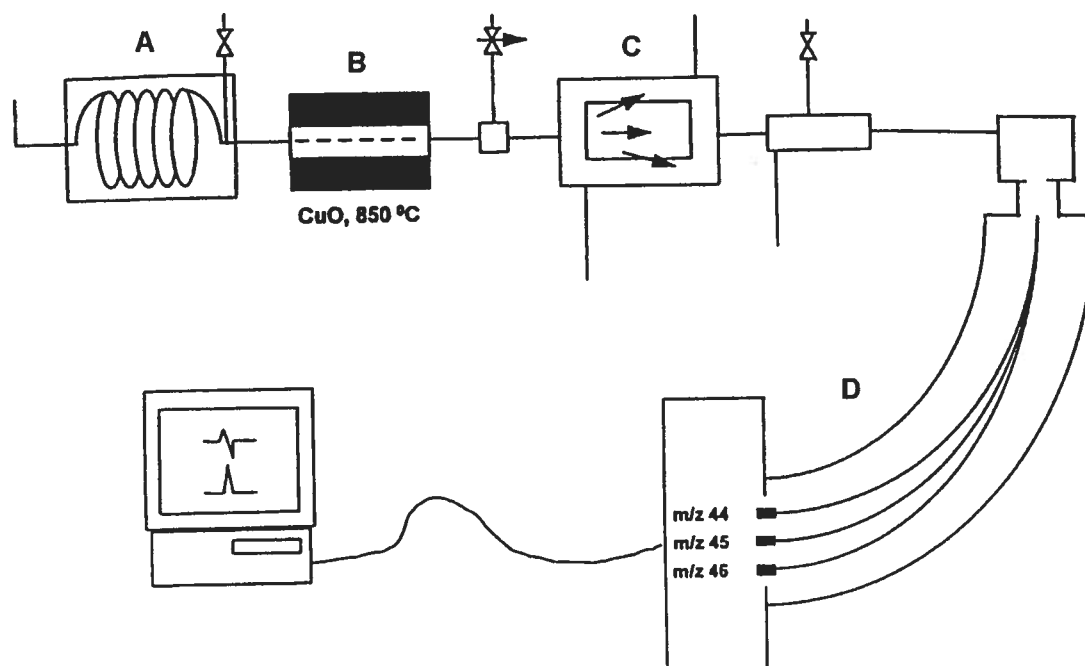
Pour un système impliquant le Cu, des traces de Cu_2O , CuO et O_2 sont présentes lorsque l'équilibre de pression partielle de O_2 à l'intérieur du réacteur s'exprime selon l'équation (2) :

$$(2) \quad \log p_{\text{O}_2} (\text{Torr}) = 12,8026 - 13686,3 / T$$

où T représente la température absolue en Kelvin (K). Ainsi, pour une température de chauffage de 850°C , la pression partielle de O_2 à l'intérieur du réacteur pour un fil de CuO est environ 5 Torr, alors qu'à 950°C elle se rapproche davantage de 50 Torr. Donc,

plus la température à l'intérieur du réacteur augmente, plus il y a d'oxygène libéré par le fil de CuO, favorisant une meilleure combustion des substances organiques. Toutefois, la

Figure 1.5 Schéma d'un CG/C/SMRI $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Aguilera *et al.*, 1996).

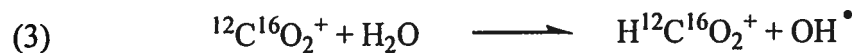


- A Chromatographe phase gazeuse
- B Réacteur de combustion avec capillaire de quartz ou céramique
- C Membrane de Nafion®
- D Canaux collecteurs d'ions (secteurs magnétiques)

température maximale pouvant être atteinte avec ce fil est limitée. En effet, lorsque la température du réacteur excède 850°C, le CuO subit une dégradation spontanée graduelle qui le rend incapable de se régénérer lorsque l'on fait passer un débit d'oxygène à plus basse température. Pour cette raison, certains réacteurs sont munis de fils de platine qui agissent comme un catalyseur en favorisant les réactions d'oxydation au-delà de la température limite. Les fils de NiO sont également utilisés puisqu'ils permettent de libérer une plus grande quantité d'oxygène: ils peuvent être chauffés à des températures >

1050°C sans se dégrader. Cependant, les fils de NiO nécessitent un apport constant d'oxygène pour conserver une bonne précision isotopique en évitant de former des "phases de liaison" Ni-carbone (Merritt *et al.*, 1995; Meier-Augenstein, 1999).

Les molécules de CO₂ produites de la combustion sont composées de ¹²C¹⁶O₂, ¹³C¹⁶O₂, mais aussi des isotopomères ¹²C¹⁷O¹⁶O, ¹²C¹⁸O¹⁶O et ¹²C¹⁷O₂. Au sortir de la chambre de combustion, l'effluent passe une membrane de Nafion® (voir figure 1.5, point C), polymère fluoré nécessaire à l'élimination de l'eau formée par la combustion des molécules organiques. Cette étape cruciale permet d'éviter une interférence non négligeable dans les calculs des résultats; la présence d'eau produisant une molécule ionisée de même masse que celle du ¹³C¹⁶O₂ (voir équation 3), surestimant ainsi la teneur en ¹³C de la molécule (Leckrone et Hayes, 1998).



L'abondance A_y de l'isotope ¹³C provenant d'un échantillon "y" est exprimée en atome % (at.%) selon $A_y = R_y / (1 + R_y) \times 100$, où R_y représente le rapport ¹³C/¹²C de l'échantillon "y".

L'enrichissement d'un isotope dans un échantillon par rapport à une valeur standard (A_{std}) est exprimé habituellement en excès at.%. Les variations mesurées en abondance de ¹³C par rapport à une valeur de référence fixe sont exprimées en utilisant la notation δ ou unité per mille (‰). Ainsi, la différence de l'abondance isotopique de ¹³C dans l'échantillon "y" par rapport à l'abondance d'un étalon se traduit par l'équation $\delta^{13}\text{C} = (R_y / R_{\text{std}} - 1) \times 1000$ (‰), où R_{std} représente la mesure du rapport ¹³C/¹²C de l'étalon de référence (Meier-Augenstein, Watt et Langhans, 1996).

En spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone, le standard universel est le CaCO₃, Bélemnite de Pee Dee (PDB), dont l'abondance en ¹³C est de 1,1112328 at.% et dont le rapport isotopique ¹³C/¹²C est de 0,0112372 (Brand, 1996). Pour des raisons pratiques, les instruments développés pour l'analyse d'effluents de chromatographe en

phase gazeuse étant peu appropriés à l'analyse du carbonate de calcium, on utilise plutôt comme référence le CO₂ dont le rapport ¹³C/¹²C a été préalablement calibré avec exactitude contre un étalon primaire (PDB) ou secondaire (autres sources de CO₂ ou étalons certifiés). Par convention, la notation δ¹³C assigne la valeur de 0,00‰ au PDB.

1.4.3 Cycles bio-synthétiques des plantes C3 et C4

Sur la terre, l'abondance naturelle des isotopes stables n'est pas constante et peut varier subtilement pour plusieurs composantes organiques. Ce phénomène communément appelé fractionnement isotopique, permet de déterminer l'origine d'une substance organique grâce à l'analyse par spectrométrie de masse (voir la figure 1.6).

Le rapport isotopique d'une substance donnée dépend de la façon dont la source de carbone disponible se fixe ou est assimilée par cette dernière. Chez les végétaux par exemple, le processus de photosynthèse implique deux voies de fixation du CO₂ atmosphérique : le cycle de Calvin et celui de Hatch-Slack (Meier-Augenstein, 1999). Dans le premier cycle, la fixation du CO₂ permet la bio-synthèse d'unités 3-phosphoglycérate (3-PGA). Les plantes qui utilisent ce chemin de fixation du CO₂ sont appelées plantes C3. Quant au second mécanisme, les plantes qui l'utilisent sont dites C4 et forment des unités acide di-carboxylique (oxalo acétate). En général, les valeurs moyennes de δ¹³C pour les plantes C3 sont plus basses de 10-15‰ que celles des plantes C4 : les plantes C3 sont plus pauvres en ¹³C que les plantes C4 (δ¹³C plantes C3 ≈ -28‰, δ¹³C plantes C4 ≈ -12‰) (Meir-Augenstein, 1999).

Les stéroïdes de synthèse disponibles commercialement proviennent de molécules isolées de plante C3 telles le stigmastérol extrait du soya, les graines de calabar, la diogénine et la solasodine provenant de la *dioscorea*, ou encore l'hecogénine issue du *sisal* (Ueki *et al.*, 2001). Ainsi, la teneur en ¹³C de ces stéroïdes est plus faible que celle des stéroïdes produits par le corps humain. En effet, la cascade métabolique des stéroïdes androgènes endogènes chez l'humain débute par le cholestérol qui possède une valeur δ¹³C ≈ -22‰. Puisque le cholestérol subit peu de fractionnement isotopique lors de son

pour le stéroïde 4). Les stéroïdes urinaires de référence i.e. ceux qui ne sont pas affectés par l'administration des produits hormonaux, sont généralement le cholestérol, les pregnanediol et pregnanetriol (produits de l'ingestion de pregnénolone) ainsi que les 11-hydroxy ou céto androstérone et étiocholanolone.

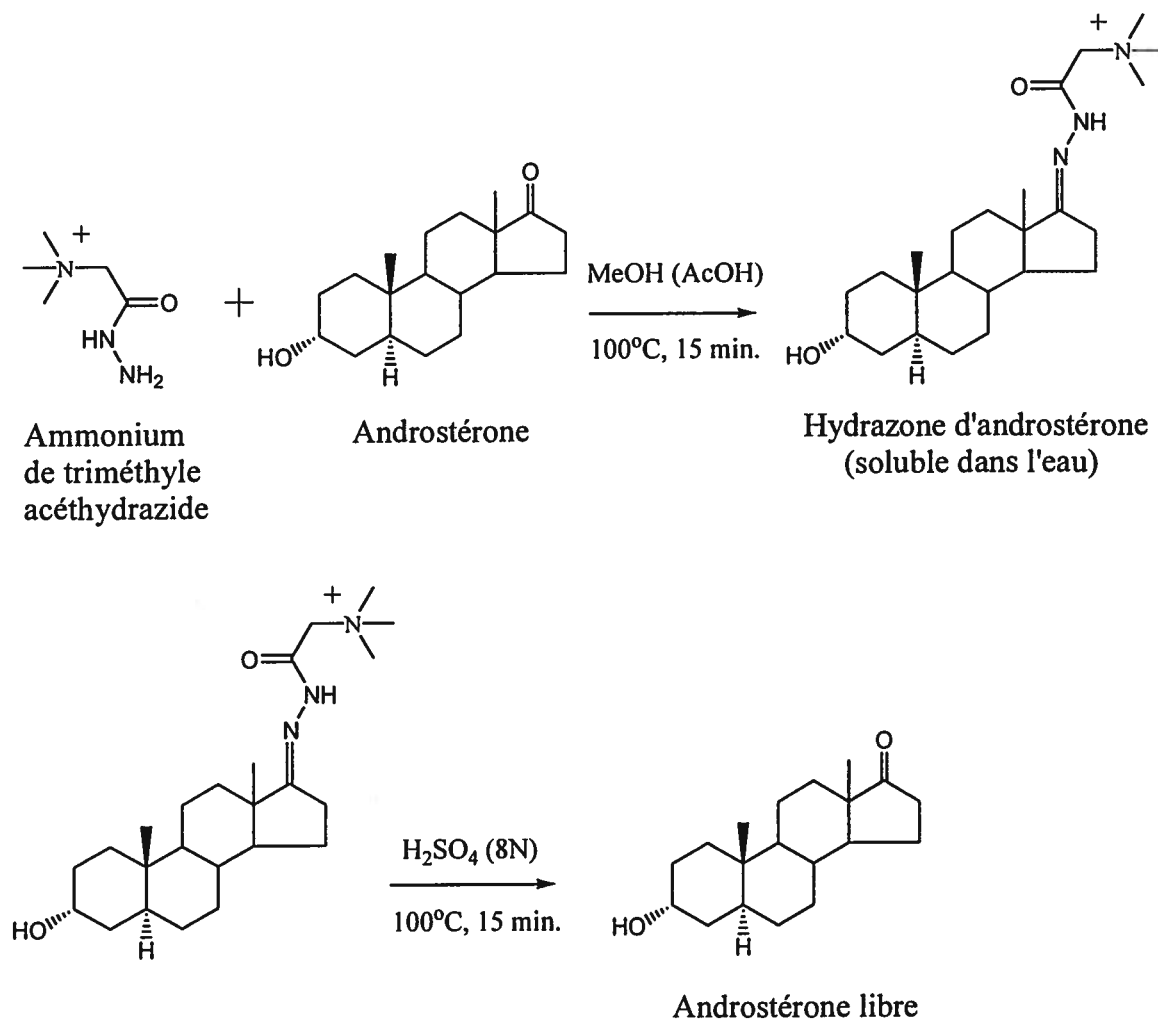
1.5 Méthodes de purification des extraits urinaires

1.5.1 Extraction sélective via formation d'hydrazones

L'isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués de l'urine a été décrit précédemment (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996; Lévesque, 1998). Cette méthode est basée sur l'emploi d'extraction solide-liquide suivie de l'hydrolyse enzymatique par β -glucuronidase de *E. Coli* et extraction liquide-liquide. Cette méthode produit des extraits qui conviennent à l'analyse CG/SM mais non à la CG/C/SMRI (Shackleton *et al.*, 1997A).

Tel qu'il a été proposé par Shackleton *et al.* (1997A), et conformément aux travaux réalisés dans nos laboratoires depuis ce temps, cette méthode vise à séparer les stéroïdes qui contiennent des groupements alcools (diols, triols) de ceux cétoniques (voir réaction figure 1.7). La séparation est réalisée à partir du réactif de Girard (possédant une fonction hydrazine) qui réagit en milieu acide sur le groupement carbonyle des cétones pour former des dérivés hydrazones solubles dans l'eau (Girard et Sandulesco, 1936). Une extraction liquide-liquide appropriée réalisée après neutralisation du milieu permet d'extraire les stéroïdes hydroxylés de la phase organique. Par la suite, la phase aqueuse est soumise à des conditions acides plus rigoureuses qui favorisent l'hydrolyse des dérivés hydrazones: une dernière extraction liquide-liquide permet de retrouver les stéroïdes cétoniques libres (Shackleton *et al.*, 1997A).

Figure 1.7 Réaction entre l'androstérone et le réactif de Girard (Ammonium de triméthyle acéthydrazide) formant l'hydrazone d'androstérone.



1.5.2 Emploi de la chromatographie d'immunoaffinité

La sélectivité de la chromatographie d'immunoaffinité (CIA) provient de l'utilisation d'une bio-molécule (anticorps) hautement spécifique immobilisée sur un support de gel d'Agarose® ou de Sépharose® chimiquement modifié. Ainsi, lorsqu'une substance déterminée (antigène) passe à travers ce gel, elle induit une réponse

immunitaire vis-à-vis la bio-molécule en provoquant une liaison réversible entre l'antigène et l'anticorps hautement spécifique (Desroches *et al.*, 2002; Machnik *et al.*, 1996).

Il y a quelques années, des composés comme le β -oestradiol ou les 19β -nortestostérone et 19α -nortestostérone avaient été analysés respectivement dans le sérum et l'urine par CIA (Desroches *et al.*, 2002). Toutefois, les études concernant l'utilisation de la CIA pour isoler et concentrer la norandrostérone (NA) urinaire sont peu nombreuses et assez récentes. Mathurin *et al.* (2001) ont rapporté des essais d'isolement par chromatographie d'immunoaffinité avec gel spécifique à la nortestostérone pour isoler les principaux métabolites de la nandrolone i.e. la norandrostérone et la norétiocholanolone (Mathurin *et al.*, 2001). Malheureusement, les auteurs qui ont tenté de reproduire les résultats du groupe Robinson *et al.* (1998), n'ont pu extraire que 17% de la NA.

1.6 Sommaire des objectifs

La recherche effectuée dans le cadre de ce mémoire vise à développer des applications pratiques de la spectrométrie de masse d'isotopes stables du carbone à l'identification formelle de stéroïdes "naturels" synthétiques qui sont précurseurs de la testostérone.

Dans un premier temps, nous nous sommes attardés aux aspects de validation de l'utilisation de cette technique i.e. la détermination des performances de la CG/C/SMRI, notamment la précision ainsi que la linéarité. Afin d'améliorer les conditions chromatographiques et de minimiser le fractionnement isotopique, nous avons décidé d'optimiser une méthode d'extraction sélective rapportée par Shackleton basée sur la formation d'hydrazones à l'aide du réactif de Girard (Shackleton *et al.*, 1997A). Par la suite, certains paramètres d'extraction tels que la robustesse, la reproductibilité, le fractionnement isotopique et la stabilité des solutions extraites ont été déterminés.

A partir de méthodes d'isolement combinées, nous avons extrait et analysé par CG/C/SMRI plusieurs échantillons urinaires de volontaires ayant ingéré de la

testostérone¹, de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et de l'androstènedione². Nous avons également étudié le profil d'excrétion de volontaires ayant ingéré de la pregnénolone²: en particulier l'excrétion des principaux métabolites urinaires pregnanediol et pregnanetriol. Dans le but d'éliminer les fluctuations individuelles, les valeurs ont été comparées à celles de stéroïdes urinaires de référence [$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ métabolite / $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ stéroïdes de référence].

Enfin, nous avons étudié la possibilité d'utiliser la CG/C/SMRI pour l'analyse des métabolites urinaires de norstéroïdes. Nous avons comparé deux techniques de purification rapportées dans des travaux précédents, soit la CLHP à l'échelle semi-préparative et la chromatographie d'immunoaffinité (CIA).

¹ Prescrit pour des raisons médicales et non administré spécifiquement pour cette étude.

² Volontaires dont le consentement informé a été obtenu et conformément à l'approbation du comité d'éthique institutionnel.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Stéroïdes

La testostérone, le cholestérol, le 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol (5α -androstanediol), le 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol (5β -androstanediol), la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'étiocolanolone ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO, E.-U.). L'androstérone a été achetée chez Upjohn (Don Mills, Canada) et le 5α -androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol (androstanol) chez Steraloids (Wilton, NH, E.-U.). Le 17α -méthyl- 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol (17α -méthyl- 5α -androstanediol) provient quant à lui de chez Amersham / Searle (Oakville, Canada), alors que la pregnénolone, le pregnanediol et le pregnanetriol ont été achetés chez Merck & Co inc. (New-Jersey, NY, E.-U.). Les capsules de pregnénolone (50mg; Ultimate Nutrition") ont été obtenues de Body Building.com (Farmington, CT, É.-U.). Finalement, nous nous sommes procuré des solutions standards de norandrostérone (NA) et norétiocolanolone (NE) de concentration 1,0 mg/mL dans le 1,2-DME de Radian International (Austin, TX, E.-U.).

2.2 Produits chimiques et biologiques

Le phosphate de sodium monobasique, le phosphate de potassium monobasique, le phosphate de sodium dibasique, le carbonate de sodium, le chlorure de sodium, le bisulfite de sodium, l'acide sulfurique, l'acide acétique glacial, l'acétate de sodium, l'acide formique, le formiate de sodium et l'hydroxyde de sodium ont été achetés soit chez J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, E.-U.), Merck (New-Jersey, NY, E.-U.), Fisher Scientific (Montréal, Canada), BDH (Montréal, Canada), E.M. Science (Montréal, Canada) ou Malinckrodt (Paris, KY, E.-U.). Le réactif T Girard de pureté 99% et la β -glucuronidase de *Escherichia coli*, type IX-A sous forme de poudre lyophilisée (1 500 000 à 2 000 000 U/g d'activité β -glucuronidase) ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO, E.-U.). L'acétonitrile, le méthanol, l'hexane, le chloroforme, le dichlorométhane et le *tert*-butyl méthyl éther (MTBE) de qualité CLHP et diéthyl éther de qualité "distillée sur verre" proviennent de chez Caledon (Montréal, Canada). L'eau a été purifiée par osmose inverse

et filtrée par un système Milli-Q avant d'être utilisée (Millipore, Mississauga, Canada). L'azote (qualité zéro) et le gaz de référence CO₂ utilisé pour la CG/C/SMRI (qualité SFC, pureté: 99,995%) proviennent de chez Air Liquide Canada (Montréal, Canada).

2.3 Description des procédures d'extraction

2.3.1 Procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés

Selon la procédure développée et utilisée au laboratoire (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996), à des volumes d'urine variant entre 1,5 et 10 mL en fonction de leur gravité spécifique, sont ajoutés 2 mL ou 5 mL de tampon acétate (pH 5,2). Après une brève agitation, les analytes sont isolés par extraction solide-liquide sur cartouches C18 Sep-Pak® Plus préalablement conditionnées avec 5 mL de méthanol (MeOH) et 5 mL d'eau purifiée. Des lavages successifs avec 5 mL d'eau purifiée et 5 mL d'hexane sont exécutés avant d'éluer les stéroïdes retenus sur la cartouche avec 5 mL de MeOH. Le MeOH recueilli est évaporé sous jet d'azote en chauffant à 50°C et le culot est par la suite dissous dans 1 mL de tampon phosphate (pH 6,9). On ajoute 50 µL d'une solution de 1500 à 2000 U de β-glucuronidase (*E. coli*, type IX-A) fraîchement préparée (tampon phosphate). L'hydrolyse est effectuée par incubation à 50°C pendant 1 heure. Les stéroïdes libres sont extraits avec 5 mL diéthyl éther après addition de 200 µL d'une solution aqueuse de K₂CO₃ (2M). Le solvant est évaporé sous jet d'azote.

2.3.2 Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques

Par une modification de la méthode décrite par Shackleton (1997A), le résidu obtenu en 2.3.1 est repris dans 100 µL de MeOH avant d'ajouter 25 µL d'une solution méthanolique de 17α-méthyl-5-androstanediol ou 17-méthylandrostanediol (100 µg/mL) et 0,5 mL du réactif de Girard (solution préparée par la dissolution de 100 mg de réactif dans 0,5 mL d'acide acétique glacial). La réaction est complétée par chauffage à 100°C pendant 15 minutes. La solution est par la suite ramenée à T.P. avant d'ajouter 1,5 mL d'une solution aqueuse de NaOH (6N). Après agitation, une extraction liquide-liquide est

effectuée avec 2 x 5 mL d'un mélange hexane / dichlorométhane (1:1). La phase organique est évaporée à sec sous un jet d'azote à 50°C. Cette fraction dite "organique" qui contient les stéroïdes hydroxylés (sans groupement carbonyle) est reconstituée ultérieurement dans 25 µL d'une solution de 5β-androstanol (standard externe) à 100 µg/mL dans le *tert*-butyl méthyl éther (MTBE).

On ajoute à nouveau le standard interne à la phase aqueuse (i.e. volume de 17-méthylandrostanediol à 100 µg/mL dans le MeOH variant selon la concentration des stéroïdes carbonylés d'intérêt) ainsi que 1,1 mL d'une solution aqueuse de H₂SO₄ (8N) dans un tube fermé. Le mélange réactionnel est agité et chauffé à 100°C pendant 15 minutes. Par la suite, une extraction liquide-liquide est effectuée avec 2 x 5 mL d'hexane. Après agitation et centrifugation, la phase organique est évaporée à sec sous un jet d'azote à 50°C. Cette fraction dite "aqueuse" qui contient les stéroïdes cétoniques est reconstituée dans 75 µL (ou autre volume dépendamment des concentrations des stéroïdes analysés) d'une solution 5β-androstanol à 100 µg/mL dans le MTBE. Ces fractions "organiques" et "aqueuses" sont analysées comme telles par CG/SM ou CG/C/SMRI.

2.3.3 Purification par chromatographie en phase liquide des 19-norstéroïdes

Cette procédure étant utilisée pour l'isolement de stéroïdes présents en faible concentration, on utilise des volumes d'urine supérieurs (i.e. 20 à 25 mL) et le résidu final est dissous dans 25 µL de MeOH avant la séparation par CLHP (section 2.3.1). Les conditions analytiques sont décrites à la section 2.4.1.

2.3.4 Procédures d'extraction par chromatographie d'immunoaffinité (CIA)

Nous avons testé l'efficacité de deux gels d'immunoaffinité développés pour l'analyse de norstéroïdes (nortestostérone, norandrostérone) que nous nous sommes procurés au Laboratoire d'Hormonologie de Marloie (Belgique). Le support de matrice est le Sépharose®. Des colonnes "Econo" (diamètre 1,5 cm, longueur 14 cm), provenant

de la compagnie Biorad (Glattbrugg, Suisse), sont utilisées pour contenir les gels. La capacité des colonnes d'immunoaffinité ainsi formées est donnée comme étant de 300 ng/mL de gel.

Deux solutions tampon ont été testées ("Phosphate Buffer Saline" ou PBS). La première est celle utilisée par le groupe Robinson (Robinson *et al.*, 1998). Elle est constituée de NaCl (120 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (10 mM) et de NaN₃ (0,05%, p/v) avec un pH final ajusté à 7,4 par ajout de HCl concentré. La seconde solution provient du groupe de recherche Mathurin (Mathurin *et al.*, 2001): elle contient du NaCl (9 g/L), du KH₂PO₄ (0,75 g/L), du Na₂HPO₄ (6,3 g/L) et du NaN₃ (1,0 g/L).

Deux protocoles d'extraction ont été testés:

Protocole 1

Préparation des échantillons

Les échantillons aqueux testés sont préparés en évaporant à sec un volume établi de solution standard de NA et NE (1000 ng/mL) dans le MeOH. L'extrait est par la suite reconstitué dans 5 mL de solution tampon et prêt à être utilisé (voir tableau 2.1). Pour les échantillons urinaires, 5 mL d'urine d'enfant (garçon de 5 ans) ou d'adulte (homme 22 ans) sont préalablement purifiés par la procédure d'isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués (voir section 2.3.1). Par la suite, l'extrait sec recueilli est rehaussé à partir de la même solution standard de NA et NE (1000 ng/mL).

Tableau 2.1 Préparation des solutions aqueuses de NA et NE purifiées par CIA suivant le protocole 1.

Volume de solution intermédiaire NA, NE 1000 ng/mL utilisé (µL)	Quantité extraite de NA, NE sur colonne (ng)
250	250
100	100
50	50

Note: La concentration de la solution mère de NA, NE est de 50 000 ng/mL dans le MeOH.

Extraction des échantillons

La colonne d'immunoaffinité est préparée à partir de 5 mL de gel (maintenu à 4°C au réfrigérateur). Elle est en suite lavée avec 5 mL de solution tampon phosphate saline (PBS) avant d'être équilibrée avec trois fois 5 mL d'eau purifiée. L'échantillon (aqueux ou urinaire) transvidé sur la colonne est mélangé au gel par un brassage délicat. La colonne est laissée au repos pour ~15 minutes. Trois lavages consécutifs sont effectués avec 3 mL d'eau purifiée poussés par un léger jet d'azote. De la même façon, un autre lavage est effectué avec 3 mL d'une solution MeOH / eau purifiée (10:90) v/v. Par la suite, les stéroïdes d'intérêt sont désorbés avec deux portions de 3 mL d'une solution MeOH / eau purifiée (80:20) et recueillis dans un tube de verre. Le gel est alors rincé avec deux portions de 5 mL d'eau purifiée et rééquilibré avec 5 mL de solution tampon phosphate saline (PBS) lorsque toutes les purifications sont terminées. Les solutions de désorption recueillies sont évaporées à sec sous jet d'azote à 50°C. Après évaporation du solvant, 200 µL de MTBE sont ajoutés et la solution est transvidée dans un flacon d'injection. On évapore de moitié avec de l'azote à 50°C le solvant avant d'ajouter 50 µL d'une solution standard de 17-méthylandrostanediol à 10 000 ng/mL dans le MTBE. Ensuite, on évapore complètement le solvant et on reconstitue avec 25 µL de MTBE.

Protocole 2

Préparation des échantillons

Les échantillons aqueux et urinaires sont préparés de la même façon que décrite dans le *Protocole 1*, la seule différence étant qu'après l'isolement avec la procédure des stéroïdes libres et glucuroconjugés les extraits sont reconstitués dans 1,65 mL d'une solution tampon phosphate saline (PBS) / MeOH (90:10) v/v avant d'être utilisés.

Extraction des échantillons

L'extraction des échantillons est quelque peu différente de celle décrite au *Protocole 1*. La colonne est équilibrée avec 2 x 5 mL de solution tampon phosphate (PBS). Puis la solution aqueuse ou urinaire issue de la procédure d'isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugés est immédiatement versée sur le gel. L'agitation du gel est effectuée par quelques inversions de la colonne, puis le gel est laissé au repos pour ~15 minutes. Avec un léger jet d'azote en haut de colonne, deux lavages consécutifs sont effectués avec 3 mL d'eau purifiée. Une autre série de lavage avec 4 x 3 mL d'une solution MeOH / eau purifiée (20:80) est également réalisée. L'élution s'effectue avec 2 x 3 mL d'une solution MeOH / eau purifiée (80:20) et les fractions recueillies sont évaporées à sec sous jet d'azote à 50°C. Les autres étapes jusqu'à la reconstitution finale de l'échantillon sont identiques à celle décrite au *Protocole 1*.

2.4 Description des paramètres instrumentaux

Dans cette section sont décrits les paramètres des différents instruments utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise. La sous-section 2.4.4 Courbes d'étalonnage quant à elle renseigne sur les méthodes d'obtention des pourcentages de récupération des métabolites NA, NE.

2.4.1 Isolement par CLHP

Nous avons utilisé en mode semi-préparatif un chromatographe liquide Hewlett-Packard modèle 1090 avec injecteur automatique et détecteur UV. La colonne employée est une XDB-C18 (4,6mm de diamètre, 15cm de longueur, diamètre moyen des particules de phase stationnaire 3,5 μ m). La phase mobile utilisée est constituée de deux solvants: le MeOH et l'eau déionisée ou purifiée. Un gradient est utilisé pour augmenter la teneur en MeOH de 60% à 90% en 15 minutes. Ce pourcentage de MeOH est maintenu pendant 5 minutes. Le volume injecté est de 25 μ L et le débit est de 1,0 mL/minute. Aucun détecteur n'est utilisé en aval de la colonne puisque la NA isolée n'absorbe qu'aux longueurs d'onde UV disponibles. Les fractions sont recueillies entre 9 et 10 minutes dans des tubes de verre avant d'être évaporées à sec sous jet d'azote à 50°C. Le culot est dissous dans 200 μ L de MTBE, puis transféré dans un vial d'injection. Après évaporation de la moitié du solvant, on ajoute 50 μ L de solution standard de 17-méthylandrostanediol à 10 000 ng/mL. Puis on évapore la solution complètement et on ajoute 25 μ L de MTBE. L'échantillon est analysé tel quel.

2.4.2 Analyse par CG/SM

Les analyses des extraits urinaires et des autres échantillons standard ont été effectuées par chromatographe en phase gazeuse (modèle HP 5890, Série II) munie d'un spectromètre de masse (modèle HP 5973 avec filtre quadripolaire) en mode d'ionisation par impact électronique (IE) à 70 eV et d'un injecteur automatique de modèle HP 7673. Le traitement des données est effectué avec le logiciel MS ChemStations de Hewlett Packard. La colonne capillaire est une Agilent HP-5MS dont la phase est composée de 5% phényl polyméthyl siloxane (diamètre interne de 0,20 mm x 25 m de longueur avec une épaisseur de phase de 0,33 μ m) est utilisée. Le débit d'hélium est ajusté à 1 mL / minute. Les volumes d'injections sont de 1 μ L.

La température du port d'injection est fixée à 275°C, celle de l'interface entre le CG et le SM est à 310°C. La programmation de température est la suivante: température

initiale 150°C pendant 1 minute, ensuite augmentation de 5°C / minute jusqu'à 290°C puis de 25°C / minute jusqu'à une température de 320°C maintenue jusqu'à 34,20 minutes. Le spectromètre de masse est utilisé en mode de détection sélective d'ion (DSI) pour la quantification, et en mode de balayage complet (enregistrement de spectres de masse complet) pour l'identification de pics chromatographiques.

2.4.3 Analyse par CG/C/SMRI (^{13}C / ^{12}C)

Le spectromètre de masse de rapport isotopique est un Orchid 20-20 (PDZ Europa, Crewe, Ukraine) couplé à un chromatographe phase gazeuse HP 6890 (Agilent, Alto Palo, E.-U.). Le chromatographe en phase gazeuse est utilisé avec la même colonne chromatographique et les mêmes paramètres expérimentaux décrits à la section précédente 2.4.2 (exception pour le volume d'injection qui est de 2 μL). La transformation des stéroïdes en CO_2 se fait dans un four de combustion constitué de 12 fils de cuivre et 1 fil de platine. La température de cette fournaise est fixée à 860°C.

2.4.4 Courbes d'étalonnage

Une solution méthanolique de NA et NE (10 000 ng/mL) a été préparée dans le MeOH à partir de deux solutions mères de 1,0 mg/mL de chaque stéroïde. On a utilisé différents volumes de cette solution standard pour obtenir les solutions de concentrations différentes requises pour les courbes d'étalonnage. Après évaporation complète des échantillons, 50 μL d'une solution de standard interne de 17-méthylandrostanediol (13 200 ng/mL) sont ajoutés avant de l'évaporer et de compléter avec 25 μL de MTBE. Les différents volumes de solution standard prélevés ainsi que les concentrations finales obtenues sont présentés au tableau 2.2. Chacune de ces six solutions est injectée en triplicata au CG/SM en mode de balayage d'ions sélectifs (DSI). La quantification est effectuée en calculant le rapport des surfaces sous les pics chromatographiques des ions sélectionnés pour l'analyte et le standard interne.

Tableau 2.2 Préparation des solutions standards de NA et NE utilisées pour bâtir les courbes d'étalonnage sur CG/SM.

Concentration initiale de préparation (ng/5 mL)	Volume de solution standard prélevé (μL)	Concentration finale (ng/ μL) dans 25 μL de MTBE
2500	250	100
1000	100	40
500	50	20
250	25	10
50	5	2
25	2,5	1

Note: La concentration du standard interne est de 26,4 ng/ μL avant injection dans le CG.

Quantification de la norandrostérone (NA)

Pour la NA, l'ion à m/z 276 est utilisé et les concentrations vont de 1,0 à 100 ng/ μL . L'équation de la droite d'étalonnage obtenue est $y = 2,41x - 0,221$ avec un coefficient de régression de 0,999. Le standard interne utilisé est le 17-méthylandrostanediol (ion à m/z 291) de concentration 26,4 ng/ μL .

Cette courbe sera utilisée pour les analyses quantitatives effectuées pour évaluer la récupération de la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués, la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués combinée à celle d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques, ainsi que celle utilisant la CLHP semi-préparative. Avec chaque essai, des échantillons de contrôle (QC) de 100 ng/ μL et 20,0 ng/ μL sont injectés afin de vérifier la courbe d'étalonnage (une variation de $\pm 10\%$ autour des valeurs nominales de solution QC signifie que la courbe d'étalonnage est acceptable et peut être utilisée pour quantifier). Pour les tests de chromatographie d'immunoaffinité (CIA), nous avons utilisé une courbe nouvellement obtenue dont l'équation est $y = 5,23x - 0,0118$ ($r^2 = 0,997$). Finalement, pour la détermination de la capacité maximale du gel NA utilisé (tests de récupération de CIA), le domaine de concentration des solutions standard est réduit entre 1,00 et 20,0 ng/ μL . Une nouvelle courbe d'étalonnage nous

Chapitre 3

Résultats et Discussion

3.1 Introduction

Cette section contient les résultats et observations de plusieurs analyses par CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Dans un premier temps, les performances de l'instrument ont été établies par comparaison aux valeurs expérimentales rapportées dans la littérature. Ensuite, nous avons optimisé notre méthode d'extraction basée sur l'utilisation du réactif de Girard. Avec ces conditions optimales, des urines de volontaires ayant consommé de l'androstènedione, de la DHEA et de la pregnènone ont été extraites avant d'être analysées par CG/C/SMRI. A partir des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) recueillies pour chacun des volontaires, nous avons établi une valeur normale (comparée à celle proposée par l'équipe Shackleton) au-delà de laquelle nous pouvons détecter les échantillons contenant des stéroïdes exogènes. Finalement, la problématique de purification des 19-norstéroïdes a été brièvement abordée par l'utilisation de la CLHP semi-préparative et la chromatographie d'immunoaffinité avant injection sur CG/C/SMRI.

3.2 Performance de l'instrument CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)

3.2.1 Précision

Afin de déterminer les performances instrumentales de notre système CG/C/SMRI, nous avons effectué des tests de précision à partir d'une solution contenant la série de n-alcanes C-17, C-19, C-21, C-23 et C-25 en concentration de 1,4 mg/mL diluée par un facteur 10. Pour ces tests, 1 μL de solution a été injecté à 5 reprises. Les injections ont été effectuées par un auto-échantillonneur de modèle HP 6890 à une température de l'injecteur de 270°C (voir section 2.4.3). La pression de tête a été fixée à 33 psi, sans division du débit de gaz vecteur (mode "splitless").

Tel que présentés au tableau 3.1, les résultats obtenus de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) indiquent une assez grande précision de l'instrument. Les valeurs d'écart-type $< 0,40\%$ pour tout les types d'alcane confirment une faible dispersion pour les données enregistrées.

Tableau 3.1 : Valeurs obtenues de δ (‰) par CG/C/SMRI pour 5 injections de 1 μ L d'une solution standard de n-alcanes à 140 μ g/mL.

Type d'alcane	C-17	C-19	C-21	C-23	C-25
δ (‰)	-34,39	-36,12	-31,35	-33,86	-30,70
	-33,48	-35,72	-31,12	-33,59	-30,44
	-33,60	-35,74	-31,15	-33,59	-30,75
	-33,50	-35,65	-31,03	-33,66	-30,65
	-33,49	-35,69	-31,12	-33,76	-30,20
Moyenne (‰)	-33,69	-35,78	-31,15	-33,69	-30,55
Ecart-type σ (‰)	0,39	0,19	0,12	0,12	0,23
% C.V.	1,2	0,53	0,39	0,36	0,75
Écart δ (‰) moyen vs. réf.*	-3,51	-3,54	-2,70	-2,93	-1,92

* Écart entre la valeur moyenne expérimentale et celle théorique en ‰.

En 2001, Aguilera *et al.* ont déterminé la précision de leur système CG/C/SMRI par l'injection de 1 μ L d'une solution standard contenant 25 mg/L de 5 α -androstane diol, 5 β -androstane diol ou de pregnane diol dérivés sous forme di-acétate. Après 25 injections réparties sur 2 semaines, ils ont établi des critères de précision à partir d'une moyenne et d'un écart-type calculé pour chacun des stéroïdes testés. Selon ces auteurs, pour qu'une séquence puisse être acceptable, la solution standard injectée doit posséder des valeurs moyennes de δ (‰) se situant à ± 2 écart-types pour 2 des 3 stéroïdes analysés (Aguilera *et al.*, 2001). Lorsque les résultats de δ (‰) mesurés n'entrent pas dans cet intervalle, le système est jugé inadéquat et imprécis. Dès lors, des entretiens préventifs sont effectués sur le port d'injection et la colonne du CG. De plus, le réacteur d'oxydation (capillaire de la fournaise) est vérifié ou changé au besoin.

Dans notre laboratoire, la précision des analyses est vérifiée en utilisant une solution standard de 100 μ g/mL appelée "Perform" qui contient 10 stéroïdes non dérivés. Les stéroïdes analysés sont l'androstane (standard externe), l'étiocolanone, le 5 β -

androstanediol, l'androstérone, le 5 α -androstanediol, le 17-méthylandrostanediol (standard interne), la testostérone, la pregnanediol, la pregnanetriol et le cholestérol. Historiquement, des statistiques ont été accumulées avec une cinquantaine d'injections de la solution "Perform" pour définir un pourcentage d'erreur acceptable. A partir des valeurs moyennes de δ (‰) obtenues, nous avons établi nos limites supérieures et inférieures pour chaque stéroïde en utilisant ± 2 écart-types.

3.2.2 Domaine de linéarité

L'un des paramètres importants à évaluer dans la performance d'un système CG/C/SMRI est sans contredit sa linéarité. Par définition, la linéarité instrumentale analytique correspond à une relation mathématique qui exprime toute modification d'un signal au détecteur en fonction d'une variation de concentration d'un analyte. Pour un instrument de SMRI, les valeurs de rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) mesurées doivent demeurer constantes dans un domaine ou plage de concentrations données. Dans ce cas, la linéarité est vérifiée par la présence d'une pente nulle dans un graphique où les valeurs de δ (‰) sont exprimées en fonction de la concentration.

Pour définir notre domaine de linéarité, des solutions contenant 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 et 800 ng/ μL d'un mélange de plusieurs stéroïdes ont été injectées en triplicata sur CG/C/SMRI avec les mêmes conditions instrumentales mentionnées à la section 2.4.3. Pour chaque concentration, la moyenne, l'écart-type (σ) et le coefficient de variation (C.V.) en % ont été calculés (voir tableau 3.2). En se basant sur des normes standards provenant d'autres instruments analytiques, nous avons décidé que seules les données présentant des C.V. inférieures à 2% étaient acceptables. Donc, en tenant compte de cette limite choisie, nous avons défini notre domaine de linéarité comme se situant entre 25 et 200 ng/ μL (voir figures 3.1 et 3.2).

Pour cette plage de linéarité, seuls l'androstanol, la 17 α -méthyl-androstanediol et la pregnanediol présentent des C.V. > 2%. Or, ces trois résultats hors norme peuvent s'expliquer par l'obtention d'un signal de faible intensité pour la solution de

concentration 25 ng/ μ L. Dès lors, une deuxième contrainte provient de l'intensité du signal qui doit être $> 0,60$ nA. Néanmoins, pour qu'une analyse sur SMRI soit fiable, nous avons constaté qu'une quantité minimale de 50 ng doit être extraite si 2 μ L de la solution finale sont injectés. L'androstanol et la 17-méthylandrostanediol qui sont respectivement étalon externe et interne, ne représentent donc aucun problème d'analyse étant donné leur utilisation à des concentrations supérieures à 50 ng/ μ L.

Le graphique de la figure 3.2 donnant l'intensité en fonction des concentrations (5-800 ng/ μ L) montre des courbes en relation linéaire "quadratique" plutôt que linéaire de type " $y = mx + b$ ". Cette tendance confirme en quelque sorte un certain plafonnement caractéristique du spectromètre de masse lorsque de hautes concentrations sont atteintes. Parmi les solutions de concentrations supérieures à 300 ng/ μ L, seules celles de l'étiocolanolone et du pregnanetriol présentent une saturation sous forme de "plateau" à partir de 200 ng/ μ L. Le pregnanetriol est particulièrement affecté par les conditions analytiques, fort possiblement à cause de ses trois groupements hydroxyles non dérivés. À la lumière de ces observations, nous suggérons qu'une quantité maximale de 400 ng doit être extraite lorsque 2 μ L de solution finale sont injectés.

Idéalement, une bonne linéarité sur SMRI se définit par des rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (δ) constants en fonction de la concentration, mais aussi par l'absence de saturation du signal au détecteur (d'intensité minimale de 0,60 nA) toujours en fonction de la concentration. Les échantillons urinaires qui n'entrent pas dans la plage de concentration de 25 à 200 ng/ μ L, doivent être ajustés en prélevant un plus gros volume d'urine, ou encore dilués lors du prélèvement initial ou de la reconstitution finale.

Tableau 3.2 Valeurs de δ (‰) mesurées par CG/C/SMRI à partir de l'injection de 2 μ L de solutions standards de stéroïdes (5 à 800 ng/ μ L).

	δ (‰) moyens mesurés pour différents stéroïdes						
Sol. STD (ng/ μ L)	Androstanol STD	Étio	Andro	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
5	-32,00	-23,65	-34,01	-34,70	-31,67	-32,03	-25,64
10	-32,92	-24,63	-35,72	-35,81	-32,33	-32,99	-26,00
25	-34,63	-25,88	-38,23	-38,30	-35,00	-34,55	-27,43
50	-36,67	-26,43	-38,77	-39,98	-36,28	-36,21	-28,29
100	-37,13	-26,43	-38,83	-40,85	-36,43	-36,53	-28,57
150	-37,37	-26,02	-38,56	-40,49	-36,37	-36,50	-28,62
200	-37,64	-26,17	-38,49	-40,77	-36,40	-36,38	-28,79
300	-37,97	-25,22	-38,40	-40,72	-35,81	-34,70	-28,55
400	-37,41	-24,45	-38,07	-40,45	-35,50	-34,40	-27,97
500	-37,41	-24,33	-37,89	-40,43	-35,00	-34,01	-28,09
600	-37,53	-24,02	-37,83	-40,24	-34,80	-33,58	-27,66
800	-37,42	-23,80	-37,60	-40,30	-34,86	-33,42	-27,82
Moyenne *	-36,69	-26,19	-38,58	-40,08	-36,09	-36,04	-28,34
Écart-type σ *	1,21	0,25	0,24	1,05	0,61	0,84	0,54
C.V. (%) *	**3,3	1,0	0,62	**2,6	1,7	**2,3	1,9

* Statistiques calculées avec les valeurs δ (‰) des solutions 25 à 200 ng/ μ L.

** Donnée présentant un C.V. > 2% i.e. [Écart-type / Moyenne] x 100 > 2%.

Figure 3.1 Tests de linéarité de CG/C/SMRI effectués à partir de l'injection de 2 μL de solutions standards de stéroïdes (5-800 $\text{ng}/\mu\text{L}$) : δ (‰) moyen en fonction de la concentration ($\text{ng}/\mu\text{L}$).

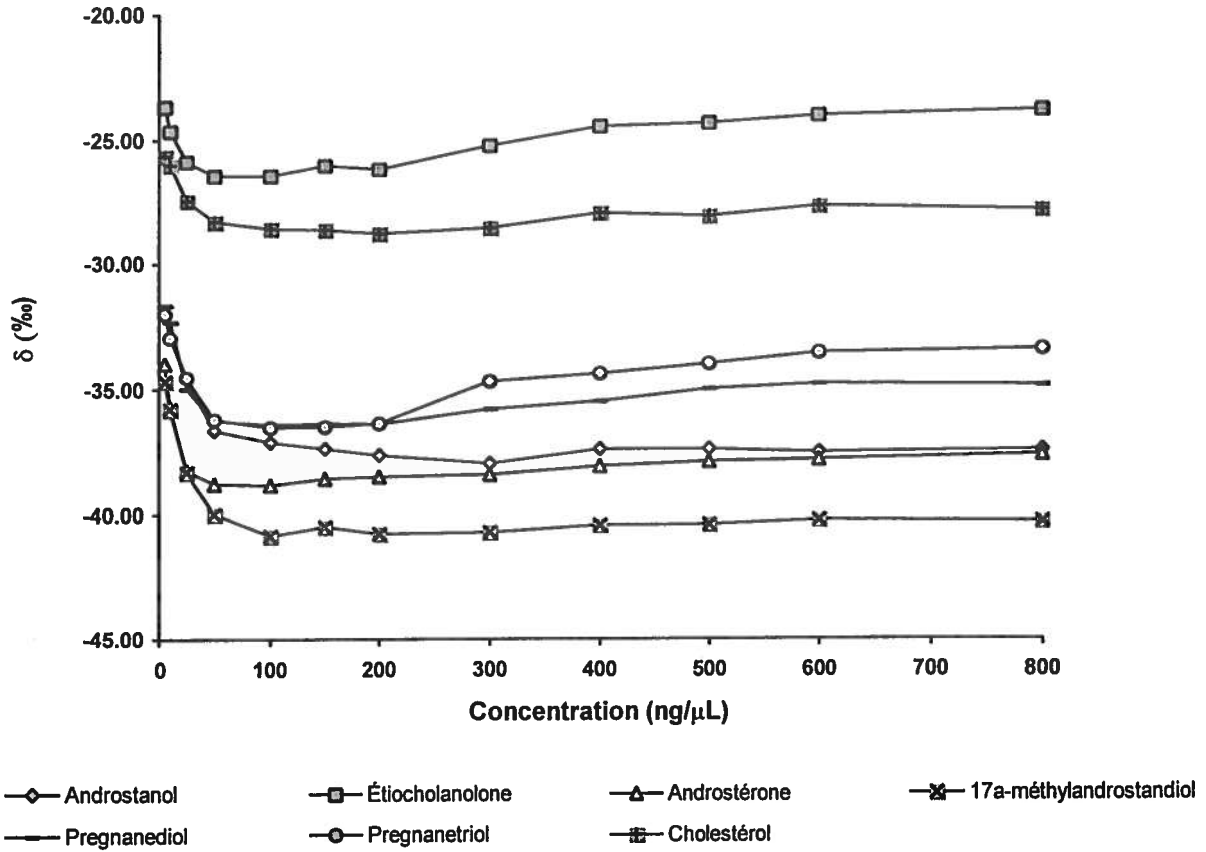
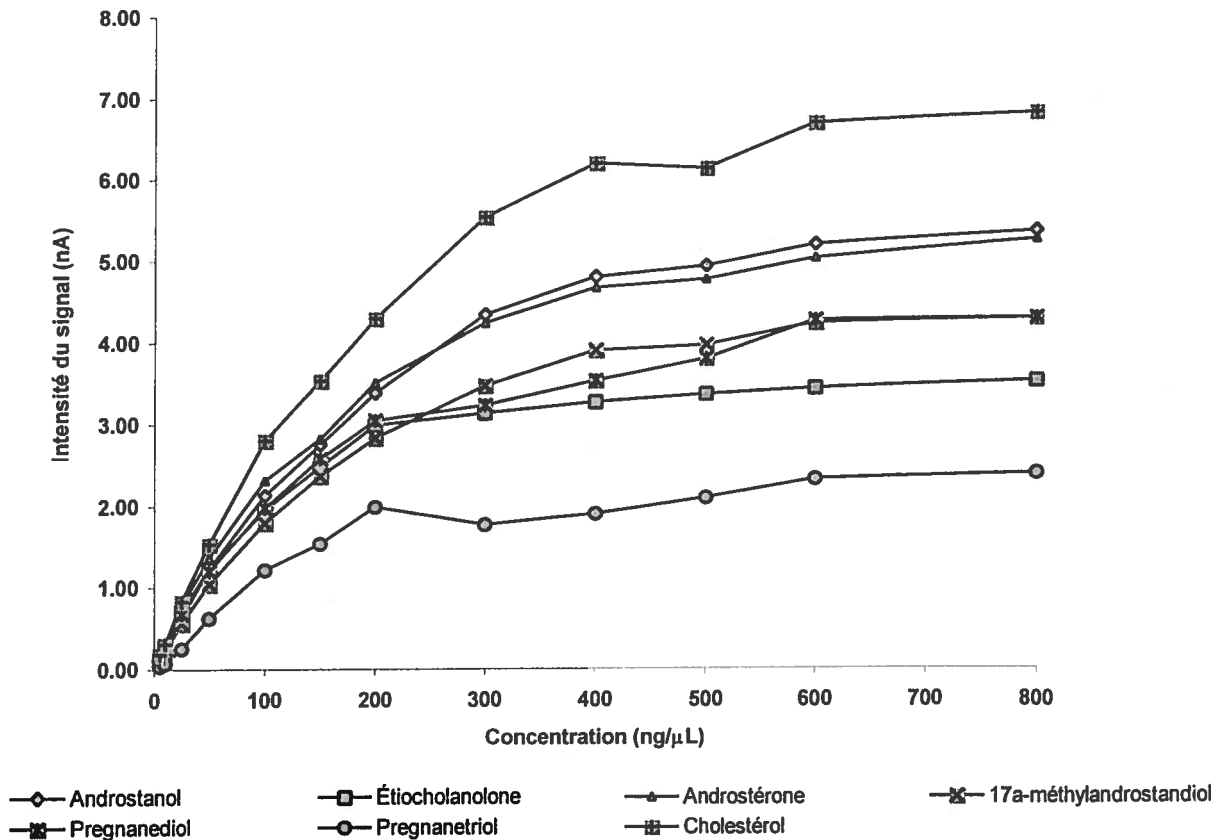


Figure 3.2 Tests de linéarité de CG/C/SMRI effectués à partir de l'injection de 2 μL de solutions standards de stéroïdes (5-800 $\text{ng}/\mu\text{L}$) : intensité du courant au détecteur (nA) en fonction de la concentration ($\text{ng}/\mu\text{L}$).



3.3 Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques

La recherche des agents anabolisants est effectuée par l'analyse de la fraction contenant les stéroïdes libres et glucuroconjugués (voir section 1.5). Très utile pour les tests de routine sur CG/SM, cette méthode d'extraction s'avère parfois inadéquate lorsqu'elle est utilisée seule pour les analyses de CG/C/SMRI. Concrètement, les colonnes capillaires utilisées pour la chromatographie en phase gazeuse ne permettent pas la résolution complète et satisfaisante de certains stéroïdes et produits potentiellement interférants. La détermination des rapports isotopiques étant effectuée sur les molécules

de CO₂ provenant de la combustion de l'éluant du chromatographe en phase gazeuse, des problèmes peuvent se produire par le fractionnement isotopique thermodynamique qui survient lorsque des pics sont difficilement intégrables, mal résolus (Meier-Augenstein, Watt et Langhans, 1996). Pour ce type de fractionnement, les isotopomères les plus lourds sont élués avant les légers ce qui crée un enrichissement en ¹³C au début d'un pic chromatographique. Lorsque 2 pics sont mal séparés, le début du second pic se confond avec la fin du premier et il se produit une contribution isotopique qui fausse les valeurs de δ (‰) pour l'un et l'autre des composés. Dans les conditions existantes, les chromatogrammes de CG/C/SMRI démontrent une faible résolution des paires de pics étiocholanolone / 5β-androstanediol et androstérone / 5α-androstanediol lorsque la procédure d'extraction de routine des stéroïdes libres et glucuroconjugués est utilisée comme unique méthode d'isolement.

Pour corriger la situation, certains auteurs préconisent la formation de dérivés acétates en utilisant l'anhydride acétique dans la pyridine (Becchi *et al.*, 1994). Toutefois, les produits "acétylés" qui sont formés ne sont pas toujours non plus séparés en CG/C/SMRI ce qui nécessite l'emploi d'autres moyens de purification (Aguilera *et al.*, 1996). De plus, toute dérivatisation avec un produit chimique carboné augmente le risque d'effet de fractionnement isotopique cinétique (Meier-Augenstein, Watt et Langhans, 1996). La formation des dérivés acétates entraîne l'introduction de 2 atomes de carbone supplémentaires ce qui influence la valeur δ¹³C qui peut varier jusqu'à 2‰; une correction adéquate devient nécessaire pour éliminer cette contribution externe.

Une autre approche consiste à purifier par CLHP à l'échelle semi-préparative les extraits issus de la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués. Encore une fois, des risques de fractionnement isotopique sont possibles lors de la collecte des différentes fractions. Flenker et ses coéquipiers ont observé jusqu'à 10‰ de différence entre la première et la dernière fraction recueillie d'androstérone et d'étiocholanolone lors d'une purification par CLHP (Flenker *et al.*, 1998). Une vigilance accrue est donc nécessaire pendant le temps de collection : chaque produit doit être bien séparé et recueilli entièrement dans les tubes.

Suite aux différentes possibilités de fractionnement isotopique soulevées précédemment, nous avons opté pour une autre voie de purification. Nous avons décidé d'optimiser une méthode proposée il y a quelques années par le groupe de Shackleton qui nécessite l'utilisation du réactif de Girard (Shackleton *et al.*, 1997A). Nous avons modifié les conditions réactionnelles de la méthode d'extraction afin d'en faciliter l'utilisation.

Brièvement, le but de la méthode consiste à séparer les stéroïdes hydroxylés (diols, triols) de ceux portant des fonctions cétoniques. Le réactif de Girard (chlorure d'ammonium de tri-méthyle acéthylhydrazide) une hydrazide qui réagit avec les fonctions carbonyles des cétones et aldéhydes pour former des hydrazones solubles dans l'eau. Les stéroïdes uniquement hydroxylés (diols et triols) sont extraits aisément par un solvant organique, puis analysés sur CG/C/SMRI comme tels. L'hydrolyse subséquente en milieu acide des dérivés hydrazones contenus dans la phase aqueuse permet de récupérer les composés cétoniques qui peuvent être à leur tour analysés.

Dans la prochaine sous-section, nous traiterons des principales démarches qui ont été entreprises en vue d'optimiser cette méthode d'extraction. En ce qui concerne les différents types de fractionnement isotopique, ils seront discutés davantage à la sous-section 3.3.2.3.

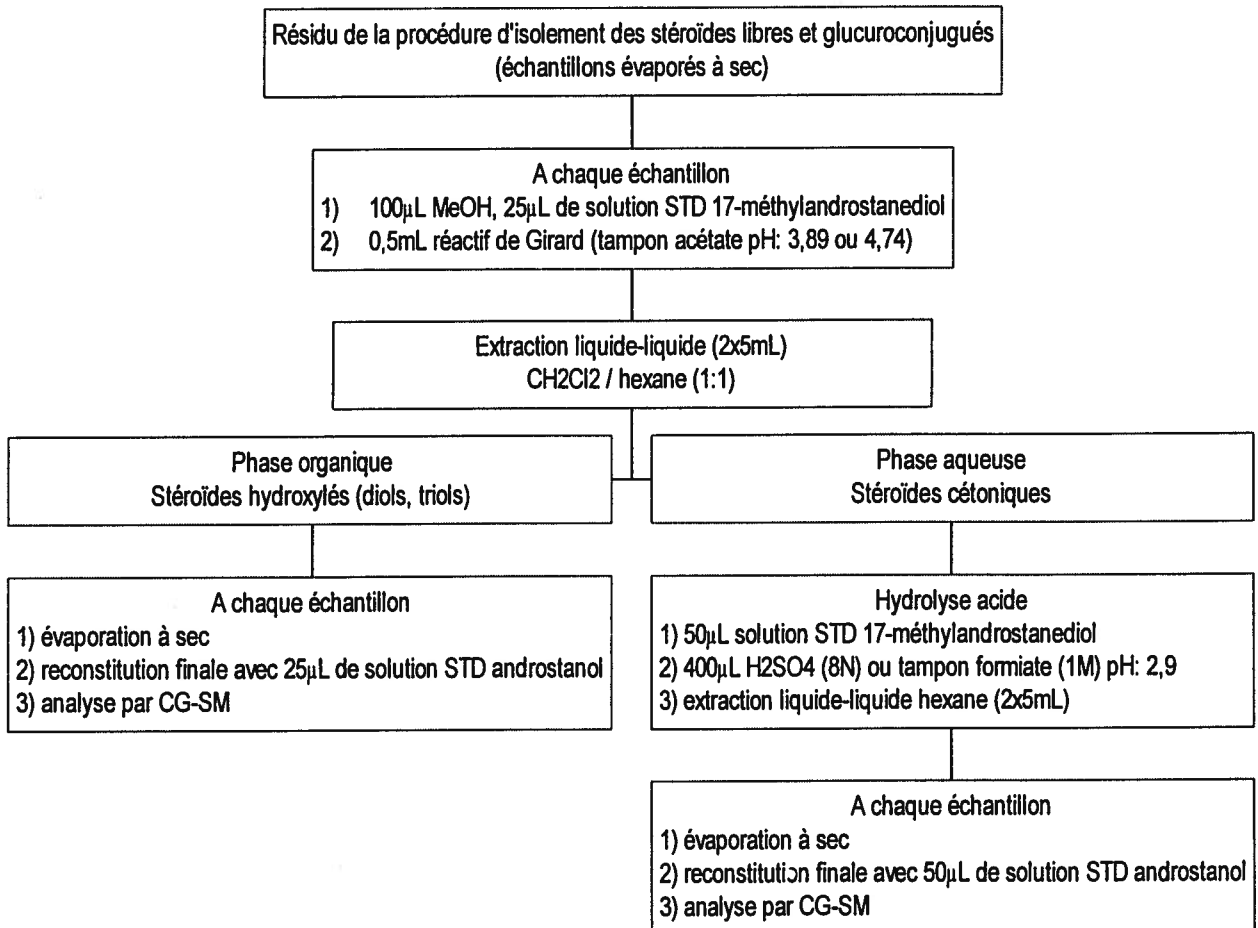
3.3.1 Optimisation des paramètres d'extraction

En 1936, Girard et Sandulesco ont publié un article scientifique traitant d'une nouvelle méthode pour extraire et caractériser les substances cétoniques et aldéhydiques (Girard et Sandulesco, 1936). A l'époque, de la folliculine (oestrone) contenue dans les urines de juments pouvait être extraite par cette méthode. Ayant jugé cette approche très pertinente pour l'avancement de nos travaux, nous avons décidé de combiner les principales lignes directrices de cet article à celles retrouvées dans une publication récente du groupe Shackleton (Shackleton *et al.*, 1997A).

Afin d'obtenir une méthode d'isolement efficace, mais aussi pour éviter d'ajouter d'autres manipulations telles une dérivation chimique avec anhydride acétique

(Shackleton, 1997A), une optimisation des paramètres d'extraction a été effectuée en laboratoire. Pour ce faire, plusieurs échantillons urinaires (témoins négatifs et positifs provenant d'une administration de 100 mg d'énanthate de testostérone) de 5 mL ont été extraits en procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués avant d'être utilisés pour les tests avec le réactif de Girard (voir figure 3.3). Les solutions finales issues des phases organiques et aqueuses ont été injectées sur CG/SM en mode de balayage complet des masses (voir paramètres chromatographiques à la section 2.4.2).

Figure 3.3 Étapes préliminaires de la procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques.



L'optimisation des paramètres de réaction pour la méthode d'isolement avec réactif de Girard a été effectuée dans le but d'optimiser la formation d'hydrazones en variant les solvants et le pH de la réaction, la température et le temps de réaction.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'optimiser les conditions de réaction initiale en expérimentant deux solutions tampon acétate de différents pH (solutions 0,2M, pH 3,89 et 4,74). Le solvant de dissolution du réactif de Girard a été préparé en respectant des proportions de 100 mg de réactif pour 0,5 mL de solution acide. De même, deux solutions acides (solutions acide sulfurique 8N et tampon formiate 1M, pH 2,9) ont été testées pour effectuer l'hydrolyse des dérivés hydrazones contenus dans la phase aqueuse.

Les premiers résultats ont démontré une meilleure extraction lorsque le tampon acétate 0,2M à pH 3,89 est utilisé. En effet, peu d'androstérone et d'étiocolanolone sont retrouvés dans la phase organique après l'extraction liquide-liquide avec la solution dichlorométhane / hexane (1:1) ce qui atteste de l'efficacité de la réaction de formation d'hydrazone. Pour ce qui est des tests d'hydrolyse, les résultats optimaux sont obtenus avec la solution acide sulfurique 8N : cette dernière permet l'hydrolyse d'une plus grande quantité d'hydrazone d'androstérone et d'étiocolanolone.

D'autres tests ont été effectués en préparant le réactif de Girard en utilisant diverses solutions, soit les tampons formiate 1,0M, pH 2,91 et acétate 1,5M, pH 3,98. Cette fois, les meilleurs résultats ont été obtenus de l'emploi de la solution tampon acétate qui est légèrement plus concentrée que celle de formiate.

Nous avons décidé d'effectuer d'autres tests avec une solution tampon acétate 6M, mais aussi avec de l'acide acétique glacial pur. Des volumes de 0,5 et 1,0 mL ont été testés pour chaque solvant de dissolution en prenant soin d'ajouter une étape de neutralisation avec 1,5 mL d'hydroxyde de sodium 6M lorsque l'acide acétique est utilisé. Sans vraiment de surprise, les meilleurs résultats sont obtenus avec l'acide

acétique. Un volume optimal de 0,5 mL en acide acétique est choisi pour la préparation du réactif.

La dernière partie de notre optimisation consistait donc à optimiser la durée de la réaction ainsi que la température. Les premières expérimentations qui ont été effectuées sur les réactions d'hydrolyse ont permis de vérifier que pour des volumes équivalents de 1 mL en acide sulfurique 8N et une durée de temps de 30 minutes, seules les solutions chauffées à 50°C donnaient des résultats d'hydrolyse plus élevés. Toutefois, lorsque le volume d'acide sulfurique 8N est augmenté à 1,5 mL, nous récupérons une plus grande quantité d'androstérone et d'étiocolanolone, et ce malgré une réaction plus courte de 15 minutes à température pièce (T.P.). La quantité d'acide sulfurique 8N ajoutée joue un rôle important dans l'hydrolyse de la phase aqueuse. Cependant, nous avons trouvé un compromis intéressant en utilisant 1,1 mL d'acide sulfurique 8N avec chauffage à 100°C pendant 15 minutes. En effet, ce volume optimal nous a permis d'utiliser moins d'acide tout en obtenant le maximum d'hydrolyse des dérivés hydrazones.

En ce qui concerne la réaction de formation des hydrazones, un chauffage à 100°C pendant 15 minutes permet un meilleur taux de conversion. Même si l'équipe de Shackleton a rapporté un temps de réaction de 30 minutes, nous n'avons pas observé d'amélioration du taux de conversion au-delà de 15 minutes de chauffage.

La figure 3.4 résume les principales étapes de la méthode d'extraction finale optimisée. Un peu plus loin, des chromatogrammes représentatifs sont présentés (voir figures 3.5 et 3.6) afin d'apprécier les améliorations de résolution obtenues pour les stéroïdes étudiés. Toutefois, l'efficacité relative de cette méthode par rapport à celles développées par d'autres laboratoires demeure difficile à établir, celles-ci différant substantiellement. Shackleton *et al.* ont rapporté une application légèrement modifiée de cette méthode d'extraction impliquant toutefois une étape d'"acétylation" des stéroïdes purifiés que nous désirions éviter. (Shackleton *et al.*, 1997A ; Shackleton *et al.*, 1997B).

Alors que les pourcentages de récupération tournent aux alentours de 80% pour une procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués, la combinaison successive de cette procédure et de celle d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques permet une récupération d'environ 45%. Étant donné le modeste recouvrement observé, cette méthode d'extraction devient moins attrayante lorsque des stéroïdes en faibles concentrations dans l'urine doivent être analysés par CG/C/SMRI. Néanmoins, tous les stéroïdes extraits par cette nouvelle méthode sont de pureté satisfaisante et ont été caractérisés par SM par comparaison à des standards authentiques.

Figure 3.4 Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques.

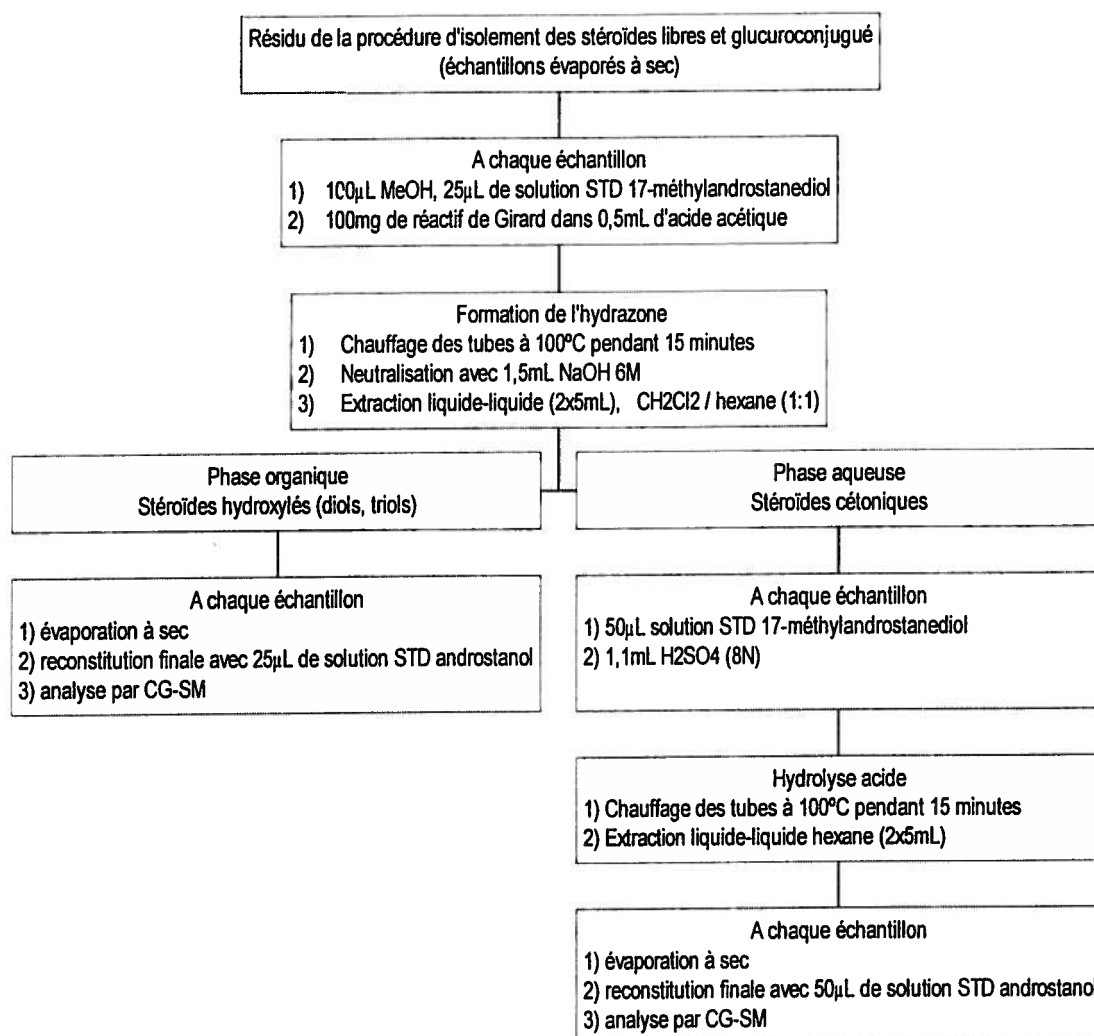


Figure 3.5 Chromatogrammes provenant de l'analyse CG/SM (balayage complet) d'échantillons urinaires recueillis suivant l'administration d'énanthate de testostérone. Résultats préliminaires de la procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques avec solutions tampons acétate pH 4,74 et formiate (1M) pH 2,9: (A) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase organique, (B) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase aqueuse.

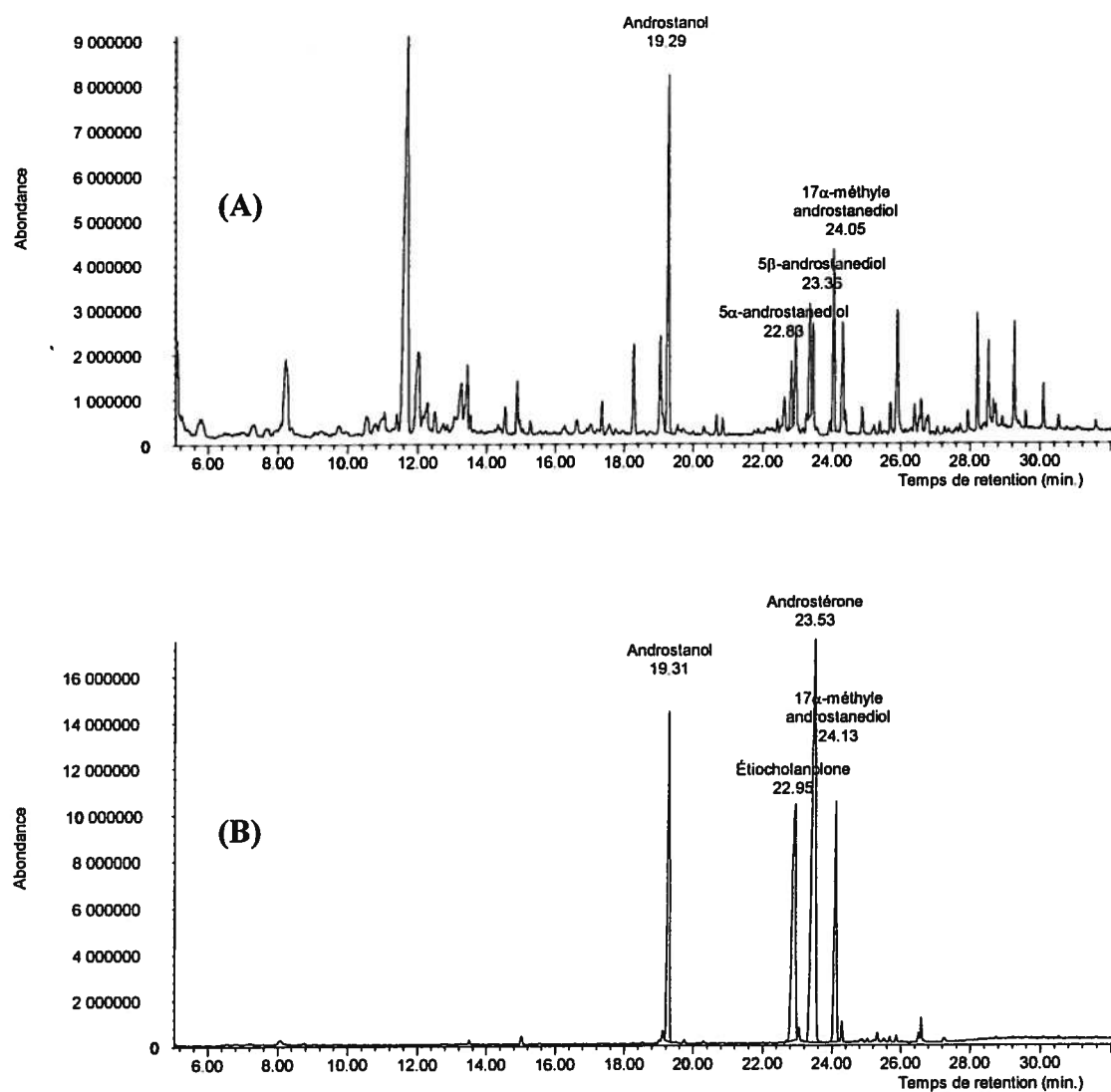
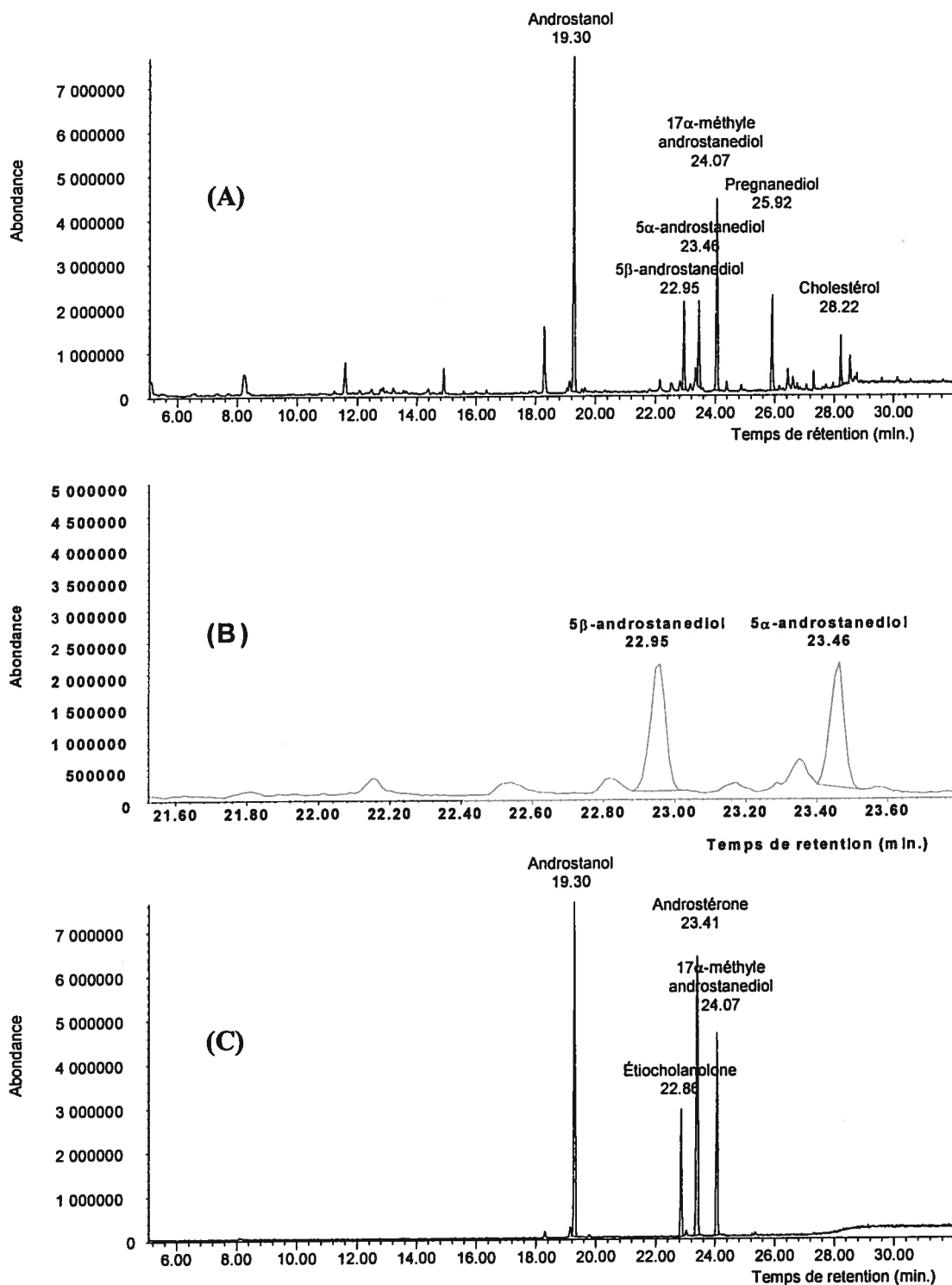


Figure 3.6 Chromatogrammes provenant de l'analyse CG/SM (balayage complet) d'échantillons urinaires recueillis suivant l'administration d'énanthate de testostérone. Procédure d'extraction sélective optimisée des stéroïdes cétoniques: (A) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase organique, (B) agrandissement de (A), (C) chromatogramme provenant de l'analyse de la phase aqueuse.



3.3.2 Tests de validation

Après optimisation des paramètres de la méthode d'extraction, nous avons vérifié sa fiabilité en lui faisant subir différents tests de validation couramment utilisés en chimie analytique. Les données obtenues des expériences de validation sont résumées aux sections suivantes.

3.3.2.1 Répétabilité

Une urine témoin négative et une autre positive, soit celle recueillie suite à l'administration de testostérone ont été extraites 5 fois chacune le même jour. Chaque échantillon urinaire a été d'abord préparé en utilisant la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués, puis avec celle basée sur l'utilisation du réactif de Girard. Les conditions chromatographiques demeurent identiques à celles décrites dans la section 3.2.1.

Les résultats nous indiquent que la méthode est acceptable (C.V. < 2%), démontrant également que le signal doit être suffisamment élevé pour obtenir une réponse supérieure à 0,60 nA au détecteur (voir tableaux 3.3 à 3.6).

Tableau 3.3 Répétabilité (5 mL d'urine témoin négative - phase organique).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés						
	Androstanol STD	5β-diol	5α-diol	17α-meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
1	-37,09	-23,14	-23,24	-40,14	-23,80	-24,42	-22,92
2	-37,06	-23,43	-22,74	-40,08	-23,49	-24,14	-22,80
3	-37,13	-22,77	-23,02	-40,28	-23,84	-24,17	-23,88
4	-37,08	-22,70	-23,60	-40,29	-23,59	-24,13	-23,78
5	-37,23	-23,43	-22,59	-40,28	-23,76	-24,39	-22,94
Moyenne	-37,12	-23,09	-23,04	-40,21	-23,70	-24,25	-23,26
Écart-type σ	0,070	0,35	0,40	0,10	0,15	0,14	0,52
C.V. (%)	0,19	1,5	1,7	0,25	0,63	0,58	*2,2

* Valeur de C.V. > 2%
Intensité au détecteur de 0,45 nA

Tableau 3.4 Répétabilité (5 mL d'urine témoin positive - phase organique).

Échantillons	δ (%) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés						
	Androstanol STD	5 β -diol	5 α -diol	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
1	-36,69	-29,24	-33,74	-40,13	-23,30	-23,05	-23,56
2	-37,00	-29,39	-33,87	-40,08	-23,47	-23,04	-23,12
3	-37,07	-29,46	-33,47	-40,29	-23,82	-23,22	-23,24
4	-37,07	-29,69	-33,59	-40,26	-23,48	-23,14	-22,98
5	-36,97	-29,70	-33,62	-40,37	-23,48	-23,07	-22,38
Moyenne	-36,96	-29,50	-33,66	-40,23	-23,51	-23,10	-23,06
Écart-type σ	0,16	0,20	0,15	0,12	0,19	0,081	0,43
C.V. (%)	0,43	0,68	0,45	0,30	0,81	0,35	1,9

Tableau 3.5 Répétabilité (5 mL d'urine témoin négative - phase aqueuse).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
	Androstanol STD	Étio	Andro	17α-meandiol STD
1	-37,08	-24,30	-24,30	-40,46
2	-37,27	-24,44	-24,47	-40,22
3	-37,12	-24,18	-24,65	-40,37
4	-37,09	-24,28	-24,34	-40,23
5	-36,96	-24,36	-24,64	-40,08
Moyenne	-37,10	-24,31	-24,48	-40,27
Écart-type σ	0,11	0,093	0,16	0,15
C.V. (%)	0,30	0,38	0,65	0,37

Tableau 3.6 Répétabilité (5 mL d'urine témoin positive - phase aqueuse).

	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
Échantillons	Androstanol STD	Étio	Andro	17 α -meandiol STD
1	-37,80	-27,15	-28,85	-40,16
2	-37,80	-27,25	-29,14	-40,52
3	-38,10	-27,01	-29,09	-40,04
4	-37,82	-27,27	-28,78	-40,24
5	-37,98	-27,22	-29,21	-40,45
Moyenne	-37,90	-27,18	-29,01	-40,28
Écart-type σ	0,13	0,11	0,19	0,20
C.V. (%)	0,34	0,40	0,65	0,50

3.3.2.2 Reproductibilité

Nous avons vérifié la reproductibilité des résultats obtenus en traitant les urines témoins négative et positive (testostérone) 5 fois chacune, à deux occasions, en laissant plusieurs jours d'intervalle entre chaque moment d'extraction.

Les résultats de "Reproductibilité" sont acceptables avec une erreur < 2% (voir les tableaux 3.7 à 3.10).

Tableau 3.7 Reproductibilité (5 mL d'urine témoin négative - phase organique).

Échantillons	δ (%) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés						
	Androstanol STD	5 β -diol	5 α -diol	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
Extrait 02/05/2002	-37,26	-21,94	< lid*	-38,85	-23,80	< lid	-22,66
	-37,59	-22,91	< lid	-40,12	-24,10	< lid	-22,20
	-37,48	-23,58	-20,28	-39,84	-24,09	< lid	-22,52
	-37,56	-22,71	-20,53	-39,68	-23,64	< lid	-22,50
	-37,60	-22,92	-20,37	-40,23	-24,19	< lid	-22,36
Extrait 30/04/2002	-37,49	-22,82	-20,73	-40,47	-24,54	-23,92	-22,10
	-37,77	-23,05	-21,10	-40,88	-24,43	-23,83	-22,10
	-37,59	< lid	< lid	< lid	-25,02	-24,73	-21,69
	-37,51	-22,99	-20,88	-40,92	-24,57	-23,91	-22,45
	-37,45	-22,91	-20,79	-41,25	-24,40	-23,91	-22,79
Moyenne	-37,53	-22,87	-20,67	-40,25	-24,28	-24,06	-22,34
Écart-type σ	0,13	0,43	0,29	0,74	0,40	0,38	0,32
C.V. (%)	0,35	1,9	1,4	1,8	1,6	1,6	1,4

* Signal inférieur à la limite de détection (lid).

Tableau 3.8 Reproductibilité (5 mL d'urine témoin positive - phase organique).

Échantillons	δ (%) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés						
	Androstanol STD	5 β -diol	5 α -diol	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
Extrait 24/04/2002	-36,69	-29,24	-33,74	-40,13	-23,30	-23,05	-23,56
	-37,00	-29,39	-33,87	-40,08	-23,47	-23,04	-23,12
	-37,07	-29,46	-33,47	-40,29	-23,82	-23,22	-23,24
	-37,07	-29,69	-33,59	-40,26	-23,48	-23,14	-22,98
	-36,97	-29,70	-33,62	-40,37	-23,48	-23,07	-22,38
Extrait 30/04/2002	-37,58	-30,24	-32,97	-39,72	-23,95	-23,85	< lid*
	-37,58	-29,80	-33,14	-40,13	-24,67	-23,31	< lid
	-37,59	-30,14	-32,99	-39,69	-23,74	-23,08	< lid
	-37,57	-30,08	-32,83	-39,77	-23,93	-23,72	< lid
	-37,68	-29,94	-33,09	-39,70	-23,81	-23,74	< lid
Moyenne	-37,28	-29,77	-33,33	-40,01	-23,77	-23,32	-23,06
Écart-type σ	0,35	0,34	0,37	0,27	0,39	0,32	0,43
C.V. (%)	0,94	1,1	1,1	0,67	1,6	1,3	1,9

* Signal inférieur à la limite de détection (lid).

Tableau 3.9 Reproductibilité (5 mL d'urine témoin négative - phase aqueuse).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
	Androstanol STD	Étio	Andro	17α-meandiol STD
Extrait 02/05/2002	-37,73	-23,63	-24,47	-40,19
	-37,95	-23,45	-24,51	-40,33
	-37,87	-23,52	-24,29	-40,24
	-37,88	-23,60	-24,28	-40,21
	-37,90	-23,64	-24,24	-40,21
Extrait 30/04/2002	-37,52	-23,82	-24,38	-40,63
	-37,88	-23,84	-24,66	-41,76
	-37,68	-24,23	-24,61	-40,82
	-37,64	-24,08	-24,50	-40,90
	-37,57	-24,10	-24,49	-40,60
Moyenne	-37,76	-23,79	-24,44	-40,59
Écart-type σ	0,15	0,27	0,14	0,49
C.V. (%)	0,40	1,1	0,57	1,2

Tableau 3.10 Reproductibilité (5 mL d'urine témoin positive - phase aqueuse)

Échantillons	δ (%) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
	Androstanol STD	Étio	Andro	17α-meandiol STD
Extrait 24/04/2002	-37,80	-27,15	-28,85	-40,16
	-37,80	-27,25	-29,14	-40,52
	-38,10	-27,01	-29,09	-40,04
	-37,82	-27,27	-28,78	-40,24
	-37,98	-27,22	-29,21	-40,45
Extrait 30/04/2002	-38,54	-26,14	-28,54	-40,12
	-38,51	-26,55	-28,55	-40,13
	-38,52	-26,54	-28,69	-40,13
	-38,55	-26,17	-28,59	-40,07
	-38,61	-26,85	-28,61	-40,00
Moyenne	-38,22	-26,82	-28,81	-40,19
Écart-type σ	0,35	0,44	0,26	0,17
C.V. (%)	0,92	1,8	0,90	0,42

3.3.2.3 Fractionnement isotopique

La résolution des pics chromatographiques est impérative en SMRI si l'on veut éviter que le fractionnement isotopique thermodynamique ne vienne fausser les résultats. Nous avons donc tenté d'optimiser la séparation des pics avant l'étape d'oxydation en CO₂. Certains auteurs ont décrit l'utilisation de dérivation chimique pour améliorer la qualité de la chromatographie (Aguilera *et al.*, 1999; Becchi *et al.*, 1994; Shackleton *et al.*, 1997B). Cette pratique implique un risque non négligeable de fractionnement isotopique cinétique puisque des liaisons covalentes sont créées ou brisées (Meier-Augenstein, 1996). Lorsque cela se produit, une correction dans le calcul des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ peut être nécessaire.

Pour éviter le fractionnement isotopique cinétique, nous avons décidé de développer une méthode d'analyse ne possédant pas d'étape de dérivation chimique. Afin de prouver l'atteinte de nos objectifs, nous avons rehaussé une urine d'enfant de 4 ans en ajoutant 100 μL d'une solution enrichie de plusieurs stéroïdes à une concentration de 100 ng/ μL . Après séparation des stéroïdes hydroxylés de ceux cétoniques, les extraits ont été reconstitués dans 50 μL *tert*-butyl méthyl éther (MTBE). Les urines d'enfant qui sont dépourvues en stéroïdes, nous ont permis de vérifier la génération ou non de fractionnement isotopique au cours des deux procédures d'extraction (i.e. procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés et celle sélective des stéroïdes cétoniques). Une solution non extraite de stéroïdes en même concentration finale que celles des extraits précédents a été traitée et analysée simultanément par CG/C/SMRI.

Les résultats obtenus sont concluants et prouvent que la méthode n'induit pas de fractionnement isotopique. Tous les C.V. sont inférieurs à 2% autant pour les stéroïdes hydroxylés que ceux cétoniques (voir tableaux 3.11 et 3.12). Les nombreuses extractions liquide-liquide exécutées durant les procédures d'isolement n'ont pas modifié les ratios isotopiques des stéroïdes ajoutés dans l'urine d'enfant.

Tableau 3.11 Récupération - Test de fractionnement isotopique (urine dopée, phase organique).

	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés				
Échantillons	Androstanol STD	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
NE*	-37,13	-40,85	-36,43	-36,53	-28,26
1	-37,76	-40,21	-35,89	-36,45	-27,73
2	-37,74	-40,73	-35,88	-36,38	-28,19
3	-37,60	-40,66	-35,80	-36,20	-28,25
Moyenne 1,2,3	-37,70	-40,53	-35,86	-36,34	-28,06
Écart-type σ 1,2,3	0,087	0,28	0,049	0,13	0,28
C.V. (%) 1,2,3	0,23	0,69	0,14	0,36	1,0

* Solution non extraite (NE)

Tableau 3.12 Récupération - Test de fractionnement isotopique (urine dopée, phase aqueuse).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
	Androstanol STD	17α-meandiol STD	Étio	Andro
NE*	-37,20	-40,85	-26,43	-38,83
1	-37,04	-40,32	-25,83	-38,23
2	**< lid	< lid	< lid	< lid
3	-37,49	-40,16	-26,21	-38,23
Moyenne 1,2,3	-37,27	-40,24	-26,02	-38,23
Écart-type σ 1,2,3	0,32	0,11	0,27	0,00
C.V. (%) 1,2,3	0,86	0,27	1,0	0,00

* Solution non extraite (NE)

** Signal inférieur à la limite de détection (lid)

3.3.2.4 Stabilité des solutions extraites

L'évaluation de la stabilité des solutions de stéroïdes extraites est également l'un des tests de validation important à vérifier. Étant donné la sensibilité et l'ajustement très fin des aimants du SMRI, il peut arriver à l'occasion d'être obligé de retarder les injections pour en améliorer les conditions instrumentales. Parfois, ce sont des bris de pièces fragiles ou de petites fuites de gaz difficiles à localiser qui causent certains délais d'opération. C'est à ce moment que la stabilité des solutions prend toute son importance. Or, nos échantillons reconstitués sont-ils suffisamment stables à température pièce, pendant plusieurs heures, pour être ré-injectés sur CG/C/SMRI sans variations considérables des valeurs de δ (‰) ?

Cette évaluation s'est effectuée par l'extraction de 6 échantillons d'urine témoin (3 négatives et 3 positives issues de l'administration de testostérone). Les extraits sont transférés dans des vials ambrés munis d'un "insert" de verre et bouchés par des septums étanches. Des injections répétées ont été effectuées à 5 jours d'intervalle à température de la pièce.

Les résultats obtenus sont satisfaisants: tout les C.V. sont inférieurs à 2% (sauf pour le cholestérol qui possède un C.V. de 5.1%), ce qui prouve que les rapports isotopiques des analytes ne changent pas avec le temps, du moins selon les conditions étudiées (voir tableaux 3.13 à 3.16).

Tableau 3.13 Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin négative (phase organique).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés						
	Androstanol STD	5 β -diol	5 α -diol	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
Injection 24/04/2002	-37,09	-23,14	-23,24	-40,14	-23,80	-24,42	-22,92
	-37,06	-23,43	-22,74	-40,08	-23,49	-24,14	-22,80
	-37,13	-22,77	-23,02	-40,28	-23,84	-24,17	-23,88
Injection 29/04/2002	-37,25	-22,58	-23,47	-40,58	-23,52	-24,08	-20,98
	-37,25	-23,10	-23,57	-40,18	-23,35	-23,31	-21,77
	-37,14	-23,42	-23,01	-40,32	-23,35	-23,84	-21,14
Moyenne	-37,15	-23,07	-23,18	-40,26	-23,56	-23,99	-22,25
Écart-type σ	0,082	0,34	0,31	0,18	0,21	0,38	1,14
C.V. (%)	0,22	1,5	1,3	0,45	0,89	1,6	*5,1

* Donnée présentant un C.V. > 2%.

Intensité moyenne du signal produit par le Cholestérol (24/04/2002): 0,45 nA

Intensité moyenne du signal produit par le Cholestérol (29/04/2002): 0,36 nA

Tableau 3.14 Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin négative (phase aqueuse).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
	Androstanol STD	Étio	Andro	17 α -meandiol STD
Injection 24/04/2002	-37,08	-24,30	-24,30	-40,46
	-37,27	-24,44	-24,47	-40,22
	-37,12	-24,18	-24,65	-40,37
Injection 29/04/2002	-37,81	-24,66	-25,07	-40,31
	-37,86	-24,74	-25,25	-40,42
	* < lid	< lid	< lid	< lid
Moyenne	-37,43	-24,46	-24,75	-40,36
Écart-type σ	0,38	0,24	0,40	0,091
C.V. (%)	1,0	0,98	1,6	0,23

* Signal inférieur à la limite de détection (lid)

Tableau 3.15 Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin positive (phase organique).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes hydroxylés						
	Androstanol STD	5 β -diol	5 α -diol	17 α -meandiol STD	Pd	Pt	Cholest
Injection 24/04/2002	-36,69	-29,24	-33,74	-40,13	-23,30	-23,05	-23,56
	-37,00	-29,39	-33,87	-40,08	-23,47	-23,04	-23,12
	-37,07	-29,46	-33,47	-40,29	-23,82	-23,22	-23,24
Injection 29/04/2002	-37,45	-29,97	-32,36	-40,58	-23,71	-22,69	-21,64
	-37,32	-29,84	-32,87	-40,77	-23,57	-22,67	-21,26
	-37,63	-29,68	-32,66	-40,63	-23,74	-22,81	-20,52
Moyenne	-37,19	-29,60	-33,16	-40,41	-23,60	-22,91	-22,22
Écart-type σ	0,34	0,28	0,62	0,29	0,19	0,22	1,25
C.V. (%)	0,91	0,95	1,9	0,72	0,81	0,96	*5,6

* Données présentant un C.V. > 2%.

Intensité moyenne Cholestérol (24/04/2002): 0,63 nA

Intensité moyenne Cholestérol (29/04/2002): 0,55 nA

Tableau 3.16 Stabilité des valeurs de δ (‰) des extraits d'une urine témoin positive (phase aqueuse).

Échantillons	δ (‰) mesurés pour différents stéroïdes cétoniques			
	Androstanol STD	Étio	Andro	17 α -meandiol STD
Injection 24/04/2002	-37,80	-27,15	-28,85	-40,16
	-37,80	-27,25	-29,14	-40,52
	-38,10	-27,01	-29,09	-40,04
Injection 29/04/2002	-38,18	-27,59	-28,82	-40,22
	-37,92	-27,75	-29,14	-40,20
	-38,29	-27,16	-28,73	-40,97
Moyenne	-38,02	-27,32	-28,96	-40,35
Écart-type σ	0,21	0,29	0,18	0,34
C.V. (%)	0,55	1,1	0,62	0,84

3.4 Variations des valeurs de $\delta\%$ des métabolites excrétés conséquentes à l'administration de précurseurs de testostérone

Depuis les deux dernières décennies, de nombreuses études portant sur le métabolisme des stéroïdes anabolisants ont pu être réalisées par CG/SM. Un des exemples intéressant relié au dopage sportif est sans contredit celui de la détection de l'administration de testostérone par la mesure du rapport T/E urinaire proposé par l'équipe Donike en 1982 (Donike *et al.*, 1983).

Récemment, il a été prouvé qu'une administration de testostérone ou de l'un de ses précurseurs comme l'androstènedione et la DHEA pouvait être détectée par l'analyse CG/SM lorsque les concentrations urinaires de certains métabolites ne correspondaient pas à ceux attendus dans un profil d'excrétion normal (Donike *et al.*, 1983, 1993). Il a été également démontré qu'une ingestion orale d'androstènedione et de DHEA semblait produire une augmentation marquée du rapport T/E chez certains volontaires comme chez les femmes, mais pas systématiquement chez les hommes (Bowers, 1999; Bossy, Moore et Poklis, 1999; Van Eenoo, F.T. Delbeke, N. Desmet et P. De Backer, 1999A; Garle et Palonek, 1999; Uralets, V.P. et P.A. Gillette, 1999; Lévesque et Ayotte, 1999).

D'autres altérations du profil de stéroïdes urinaires ont aussi permis de détecter l'administration de stéroïdes. Ainsi, les augmentations des concentrations d'androstérone et d'étiocolanolone, la présence de métabolites hydroxylés glucuro et sulfoconjugués caractéristiques tels la 6 α -hydroxyandrostènedione et 6 β -hydroxyépiandrostérone pour l'androstènedione en sont quelques exemples. Plus récemment pour la DHEA, les travaux initiés par J.-F. Lévesque et complétés par J. Roy ont démontrés qu'une augmentation de l'excrétion de la 7 β -hydroxydéhydroépiandrostérone accompagnée d'une suppression de l'excrétion de la 16 α -hydroxyandrostérone pouvait être un marqueur d'utilisation efficace (Ayotte *et al.*, 2001).

L'analyse d'urines d'athlètes (mixtes, toutes nationalités confondues) recueillies dans le cadre des prélèvements de contrôle du dopage ont permis d'établir des valeurs de

références de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ pour différents stéroïdes d'intérêt. Ainsi, nous observons que les valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ mesurées oscillent aux alentours de -23‰ autant pour les métabolites que les stéroïdes de référence (Ayotte *et al.*, 2001). Cependant, lorsque de la testostérone, de la DHEA ou de l'androstènedione synthétiques sont consommées, nous observons post administration une chute des valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ pour les métabolites atteignant des valeurs de -28 à -33‰ .

3.4.1 Androstènedione et DHEA

Comme résumés par les schémas de métabolisme de la testostérone proposés par Leunissen et Gower (Leunissen, 1979; Gower, 1979), l'androstènedione et la DHEA sont précurseurs de la testostérone dans le corps humain. Des résultats préalables ont démontrés par l'analyse d'échantillons urinaires recueillis auprès de volontaires chez certains d'entre eux une élévation du ratio T/E après ingestion d'androstènedione et de DHEA. Toutefois, les valeurs de la sonde T/E ne sont pas toujours affectées par la prise de précurseurs biologiques de testostérone.

L'analyse des stéroïdes urinaires par SMRI présente une complémentarité très intéressante au profil d'excrétion traditionnel effectué par CG/SM: la grande sensibilité du SMRI permet de détecter d'infimes variations de teneur en ^{13}C versus ^{12}C , pour un métabolite donné après administration. Par exemple, pour des volontaires ayant ingéré 100 mg d'androstènedione (volontaire SA-48) et 200 mg de DHEA (volontaire SA-50), nous avons observé une modification des valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ durant plus de 40 heures.

Les variations des valeurs de $\delta \text{‰}$ sont présentées sous forme de graphiques (voir figures 3.7 et 3.8). Nous observons 2 heures après l'ingestion une chute brusque des valeurs aux alentours de -33‰ pour les métabolites principaux androstérone, étiocholanolone, 5α et 5β -androstaniol. Quant aux stéroïdes de référence pregnanediol, pregnanetriol et cholestérol, leurs valeurs demeurent inchangées à -23‰ jusqu'à la fin. L'obtention de valeurs de δ des métabolites inférieures à -28‰ , indique leur origine synthétique. Afin de compenser les différences individuelles, les valeurs absolues ne sont

Figure 3.7 Profil d'excrétion provenant de l'analyse CG/C/SMRI d'échantillons recueillis suite à l'administration d'une capsule de 100 mg d'androstènedione.

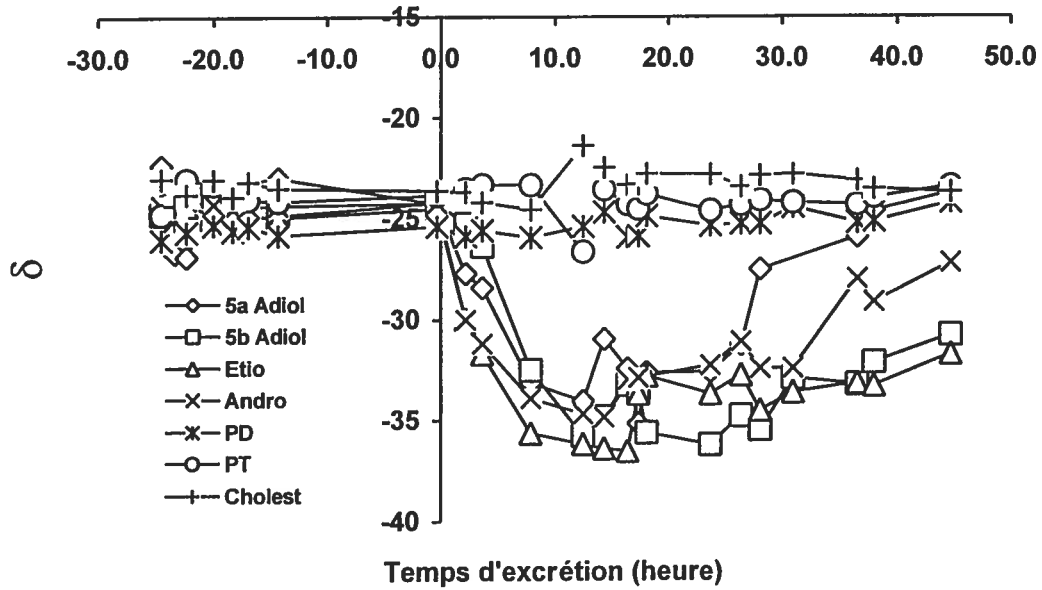
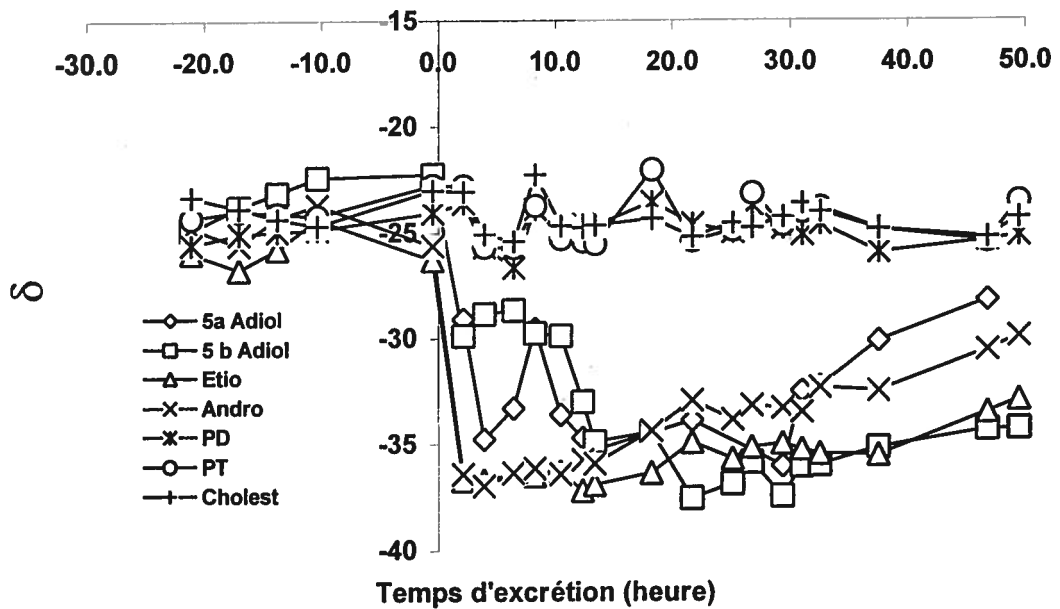


Figure 3.8 Profil d'excrétion provenant de l'analyse CG/C/SMRI d'échantillons recueillis suite à l'administration d'une capsule de 200 mg de DHEA.



pas diagnostiques mais les différences entre les métabolites et les stéroïdes de référence le sont.

L'élimination des fluctuations naturelles a été suggérée par l'équipe de Shackleton qui propose une sonde, le rapport [$\delta^{13}\text{C}\%$ métabolite / $\delta^{13}\text{C}\%$ stéroïdes de référence]. Ainsi, tout rapport mesuré excédant 1,1 pourrait démontrer l'administration d'un stéroïde anabolisant androgène (Shackleton *et al.*, 1997A). Nous avons donc décidé de tester cette nouvelle sonde en utilisant nos valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\%$ recueillies dans nos études d'excrétion à l'androstènedione et à la DHEA. Le métabolite choisi pour cet exercice est l'androstérone (A), alors que les stéroïdes de référence sont le pregnanediol (Pd) et le cholestérol (Chol).

Tel que présenté dans les tableaux 3.17 et 3.18, nos résultats avant et après ingestion confirment l'application. Ainsi, nous observons avant ingestion (autant pour le volontaire à l'androstènedione que celui de DHEA) des valeurs moyennes tournant autour de -23‰ avec rapports calculés [$\delta^{13}\text{C}\%$ métabolite / $\delta^{13}\text{C}\%$ stéroïde de référence] se rapprochant de l'unité. Après ingestion, les valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\%$ pour les métabolites se rapprochent davantage de -32‰, alors que celles des stéroïdes de référence restent stables à -23‰. Les deux sondes [A / Pd] et [A / Chol] sont alors supérieures à 1,1. Notons que les valeurs de δ mesurées pour les métabolites urinaires sont comparables à celles obtenues pour le stéroïde androstènedione ou DHEA isolé du comprimé administré (voir tableaux ci-dessous).

Le choix des bons stéroïdes de référence est primordial. La résolution entre deux pics chromatographiques doit être satisfaisante et les intégrations à la base des pics doivent être correctement complétées pour éviter le phénomène de fractionnement isotopique (Flenker *et al.*, 1998). Également, le rapport (signal / bruit de fond) doit être acceptable i.e. intensité au détecteur > 0,60 nA, de même le bruit de fond qui doit demeurer constant tout au long du temps d'analyse instrumental.

Tableau 3.17 Valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ obtenues pour des métabolites excrétés post-administration d'androstènedione.

→ Avant ingestion (n=8). Valeur moyenne $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ de l'androstènedione présente dans les comprimés est de $-31,71 \pm 0,26\text{‰}$ (n=6).

	A	Pd	Chol	A / Pd	A / Chol
Moy	-24,32	-25,51	-23,55	0,95	1,03
σ	0,13	0,32	0,56		

→ Après ingestion (n=14)

	A	Pd	Chol	A / Pd	A / Chol
Moy	-31,65	-25,34	-23,17	1,25	1,37
σ	2,4	0,46	0,77		

Tableau 3.18 Valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ obtenues pour des métabolites excrétés post-administration de DHEA.

→ Avant ingestion (n=5). Valeur moyenne $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ de la DHEA présente dans les comprimés est de $-32,25 \pm 0,16\text{‰}$ (n=6).

	A	Pd	Chol	A / Pd	A / Chol
Moy	-24,80	-24,89	-23,83	1,00	1,04
σ	0,83	0,54	0,69		

→ Après ingestion (n=17)

	A	Pd	Chol	A / Pd	A / Chol
Moy	-31,14	-24,82	-24,41	1,38	1,40
σ	2,1	0,84	0,81		

Tel que mentionné précédemment, les stéroïdes de référence que nous avons choisis sont le pregnanediol, le pregnanetriol et le cholestérol. Bien que ces derniers soient des métabolites finaux, que savons-nous réellement sur leur stabilité isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) dans le corps humain ?

Une étude sud-africaine portant sur le métabolisme *in vivo* du cholestérol dans le sérum humain nous indique que le rapport isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de ce stéroïde de référence est très stable dans le temps (Mendelsohn *et al.*, 1986). Les résultats rapportés à partir de quatre volontaires de cholestérolémie normale ayant suivi différentes diètes sont plutôt éloquentes: les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ mesurées hebdomadairement pendant 1 mois sont quasi identiques pour tous les volontaires testés. De plus, le faible écart-type obtenu pour l'ensemble des analyses (0,32‰) correspond approximativement à l'erreur globale de la méthode utilisée. À la lumière de ces résultats, le cholestérol humain ne subirait pas de fractionnement isotopique lors de sa synthèse endogène pendant au moins un mois, indépendamment du type de diète observé (Mendelsohn *et al.*, 1986).

Nos résultats démontrent que les valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ obtenues pour l'analyse du cholestérol lors des études d'excrétion suite à l'administration de DHEA et d'androstènedione se rapprochent de -23,7‰, ce qui est très comparable aux valeurs moyennes naturelles de -24,6‰ rapportées par l'équipe de Becchi (Becchi *et al.*, 1994). En ce qui concerne le pregnanediol, notre valeur moyenne de -25,1‰ est quasi identique à celle de -25,2‰ publiée par le groupe Shackleton (Shackleton *et al.*, 1997A). Toutefois, nous remarquons une assez grande différence entre les valeurs moyennes $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ de cholestérol mesurées par SMRI pour les volontaires sud-africain (-17,6‰) et celles de nos études provenant d'échantillons urinaires d'origine mixte (-23,7‰). Il semble donc nécessaire de comparer les valeurs des métabolites par rapport aux stéroïdes de référence à l'intérieur d'une même analyse.

Néanmoins, la constance des valeurs $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ du cholestérol urinaire obtenue sur plusieurs mois pour nos échantillons témoins (négatifs, positif: énanthate de testostérone),

nous indique que le "compartiment" humain de cholestérol est relativement grand, et qu'il ne semble pas se produire de fractionnement isotopique perceptible à court terme.

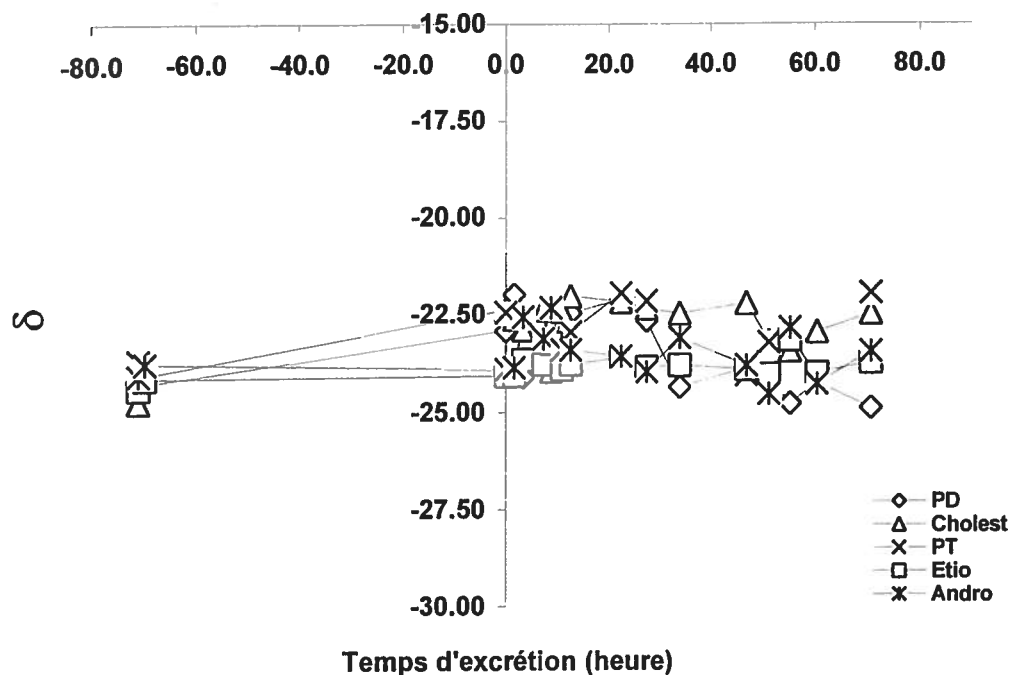
En résumé, les résultats de nos études confirment les observations de nombreux autres travaux publiés sur le sujet. Nous avons pu vérifier la nouvelle sonde proposée par l'équipe Shackleton en utilisant 3 stéroïdes de référence différents (cholestérol, pregnanediol et pregnanetriol): toutes nos valeurs moyennes de $\delta^{13}\text{C}\%$ après ingestion d'androstènedione ou de DHEA produisent des variations de rapports au-delà du seuil proposé de 1,1. La SMRI utilisée de façon complémentaire à la CG/SM améliore les chances de dépistage, puisque cette nouvelle technologie permet d'élargir la "fenêtre de positivité" moyenne de 12 heures à plus de 24 heures.

3.4.2 Pregnénolone

Retrouvée en vente libre au États-Unis comme supplément alimentaire, la pregnénolone est vendue comme précurseur lointain de la testostérone même si cette dernière ne possède de grand pouvoir androgène. Sa consommation n'est pas prohibée par les organismes de régulation du dopage sportif même si certains suspectent une influence potentielle sur la production de DHEA, et de certains métabolites comme la pregnanediol, ce qui pourrait en faire un agent masquant (Ferry *et al.*, 2000).

Tel que démontré par l'équipe de Ferry, l'ingestion de pregnénolone synthétique combinée à l'ingestion d'un précurseur de testostérone peut conduire à un résultat faux-négatif lorsque la sonde [$\delta^{13}\text{C}\%$ métabolite / $\delta^{13}\text{C}\%$ stéroïde de référence] de Shackleton est appliquée si l'on ne se préoccupe pas des valeurs δ individuelles. Selon ces chercheurs, l'administration de pregnénolone synthétique génère la formation du métabolite pregnanediol dont l'analyse par SMRI révèle une valeur $\delta^{13}\text{C}\%$ nettement différente de celle retrouvée pour le pregnanediol endogène (-31‰ vs. -25‰).

Figure 3.11 Profil d'excrétion des stéroïdes analysés par CG/C/SMRI suivant l'administration d'une capsule de 50 mg de pregnénolone (volontaire SA-57, sexe féminin).



3.5 Analyse par CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de profils stéroïdiens "anormaux"

L'une des grandes utilités de la SMRI réside dans sa complémentarité vis-à-vis la CG/SM. Parfois limitée par une courte "fenêtre de positivité" d'un profil d'excrétion (i.e. étendue de temps durant laquelle le rapport T/E est supérieur à 6), ou par un profil d'excrétion légèrement anormal, la SMRI permet d'éclaircir certains résultats d'analyse limites. Les rapports T/E utilisés dans les tests de contrôle du dopage trouvent donc parfois leurs limitations, en particulier lorsqu'ils approchent la valeur du seuil de 6:1.

Récemment, nous avons publié quelques résultats d'analyse démontrant l'efficacité de la SMRI dans le dépistage de stéroïdes anabolisants androgènes (Ayotte *et al.*, 2001). Ces résultats d'analyse sont présentés au tableau 3.19.

De façon systématique, les urines de 4 athlètes différents dans lesquelles ont été mesurés des valeurs de $T/E \geq 6$, ont été réanalysées selon les procédures d'extraction habituelles i.e. procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués, ainsi que la procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques. Les volumes d'urine prélevés pour les analyses par SMRI ont été déterminés selon la gravité spécifique évaluée à la réception des échantillons, mais aussi par les différentes concentrations des métabolites finaux androstérone et étiocholanolone.

Les résultats de l'analyse GC/C/SMRI viennent confirmer les conclusions de l'étude des résultats provenant de l'analyse CG/SM. En effet, chez le premier athlète, l'étude des résultats a démontré une excrétion systématique de valeurs de T/E élevées et avoisinant le seuil de positivité de 6 (moyenne = 4,2; $\sigma = 1,7$). L'échantillon urinaire ré-analysé selon notre méthode SMRI a révélé la présence de métabolites d'origine endogène, les valeurs de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ne différant pas de celles des stéroïdes de référence et se situant dans la fourchette de valeurs naturelles i.e. -23‰.

Des conclusions similaires sont tirées de l'analyse des résultats combinés CG/SM et GC/C/SMRI des deux cas suivants présentés au tableau 3.20. En effet, les valeurs de T/E sont systématiquement élevées alors que le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des métabolites est normal et ne diffère pas de celui des standards de référence. Par ailleurs, le dernier cas présenté est similaire au profil du volontaire ayant consommé de la testostérone. L'analyse par GC/C/SMRI vient supporter le résultat positif obtenu avec le rapport T/E. Ainsi, nous observons pour cet athlète des valeurs de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pour les métabolites finaux androstérone et étiocholanolone de l'ordre de -31‰, alors que les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ des stéroïdes de référence demeurent normales soit à -25‰.

A la lumière des résultats présentés, la combinaison de la CG/SM et la SMRI représente certainement un atout dans la détermination de l'origine des métabolites urinaires d'androgènes. Ces observations vont déboucher sur l'application de meilleures techniques de dépistage du dopage sportif aux androgènes.

Tableau 3.19 Évaluation de quatre cas de testostérone en combinant la CG/SM et la SMRI du carbone $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Ayotte *et al.*, 2001).

Athlètes	T/E	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$					A/Pd	A/Chol
		Étio	A	Pd	Pt	Chol		
Testostérone	15,7 ^a	-28,5	-28,1	-23,8	-24,0	---	1,2	---
#1 (négatif)	4,2 ^b	-22,6	-23,7	-23,7	-23,8	---	1,0	---
#2 (négatif)	6,7 ^c	-26,0	-26,3	-26,7	-26,2	---	1,0	---
#3 (négatif)	6,1 ^d	-21,7	-22,2	-23,0	-23,5	---	1,0	---
#4 (positif)	38	-31,3	-31,9	---	-25,3	-25,7	---	1,2

^a n=15 témoin positif (traitement médical: injection intra-veineuse de testostérone énanthate, 2 semaines de collection); Dév. STD T/E = 5,0.

^b Dév. STD T/E = 1,7; T/E n=8; $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ n=1.

^c Dév. STD T/E = 1,5; T/E n=4, $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ n=3.

^d Dév. STD T/E = 1,5; T/E n=2, $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ n=2.

3.6 Purification et analyse de métabolites de 19-norstéroïdes

Les métabolites norandrostérone (NA) sont excrétés de façon naturelle dans l'urine par la femme (Van Eenoo *et al.*, 1999B; Dehennin, Jondet et Schöller, 1987; Reznik *et al.*, 2001) et l'homme (Dehennin, Bonnaire et Plou, 1999) mais à l'état de trace i.e. sous 1 ng/mL.

La possibilité de distinguer la nature endogène ou exogène des 19-norstéroïdes excrétés a également été investiguée. La spectrométrie de masse de rapports isotopiques ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) est une fois de plus sollicitée pour déterminer l'origine des métabolites analysés. Toutefois, le réel problème réside dans la faible concentration de ces métabolites présents naturellement en trace. En effet, étant donné la quantité minimale exigée de 50 ng injectée pour toute analyse sur CG/C/SMRI (i.e. injection de 2 μL d'une solution à 25 ng/ μL), il devient alors impératif de concentrer les solutions finales pour demeurer dans le domaine de linéarité de l'instrument. Or, en prélevant un plus gros volume d'urine

initial, nous augmentons en l'occurrence proportionnellement la concentration des autres métabolites étiocholanolone et androstérone, ce qui crée une importante interférence lors de l'intégration des pics ce qui perturbe la mesure des rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (voir figure 3.12 a), page 80). Pour ces raisons, nous devons utiliser un moyen de purification efficace qui nous permettra d'isoler les métabolites NA et norétiocholanolone (NE) avant l'analyse CG/C/SMRI. À ce jour, les principales techniques de purification de NA et NE rapportées sont la chromatographie liquide haute performance (CLHP) semi-préparative et la chromatographie d'immunoaffinité (CIA).

Afin d'améliorer la qualité des analyses de CG/C/SMRI, nous avons donc étudié la performance des 2 techniques de purification mentionnées précédemment, et également celle de la méthode d'isolement basée sur l'utilisation du réactif de Girard. Pour chacune des techniques ou méthodes de purification, nous avons évalué le pourcentage de récupération à l'aide de courbes d'étalonnage par CG/SM en mode de détection sélective d'ions. Tel que décrit à la section 2.4.4, les quantifications ont été réalisées à partir de solutions aqueuses rehaussées ou dopées en calculant les rapports des surfaces de pics [métabolite / standard interne] en fonction des concentrations des métabolites NA et NE. L'étalon interne utilisé est le 17α -méthylandrostanediol à une concentration injectée de 26,4 ng/ μL . Finalement, l'ion choisi pour les deux métabolites est l'ion moléculaire à m/z 276,2 pour le standard interne c'est l'ion m/z 291,0 qui est utilisé.

3.6.1 Procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués

Les premiers tests effectués ont été réalisés en duplicata à partir de solutions d'eau purifiée de 5 mL dopées à des concentrations de stéroïdes de 50, 100 et 200 ng/mL. Les échantillons ont été préparés tel que décrit à la section 2.3.1. Après reconstitution des échantillons dans 25 μL de MTBE, les solutions de concentrations finales de 10, 20 et 40 ng/ μL ont été analysées par CG/SM. Une droite d'étalonnage couvrant l'échelle de concentrations de 1 à 100 ng/ μL a été établie. Chacun des standards a été injecté en

triplicata en respectant rigoureusement les conditions instrumentales présentés à la section 2.4.2. Les pourcentages de récupération pour les métabolites NA et NE sont présentés au tableau 3.20.

Tableau 3.20 Pourcentage (%) de récupération de NA et NE par CG/SM en appliquant la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués.

Échantillon Concentration finale (ng/ μ L)	% récupération moyen	
	NA	NE
40	75,7	72,8
20	80,7	78,2
10	87,2	84,9

Les pourcentages de récupération des métabolites NA et NE tournent en moyenne aux alentours de 82%, ce qui est conforme aux résultats habituellement obtenus de la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués.

3.6.2 Procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques

Les résultats rapportés dans cette section proviennent d'extractions successives par procédures d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués suivi de l'extraction sélective des stéroïdes cétoniques (voir section 2.3.2). Puisque les métabolites NA et NE possèdent tous les deux une fonction chimique cétone, seules les phases aqueuses de l'extraction ont été conservées pour analyse sur CG/SM. Les quantifications ont été effectuées à partir de la même droite d'étalonnage utilisée précédemment (une seule journée sépare les deux expériences). Des solutions aqueuses contenant 50, 100 et 200 ng/mL des métabolites ont été extraites, puis reconstituées dans 25 μ L de MTBE. Les résultats sont présentés au tableau 3.21.

L'isolement des stéroïdes cétoniques par la formation de dérivés hydrazones permet une récupération moyenne de 44% de NA et 45% de NE. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus pour les autres stéroïdes (androstérone et étiocholanolone) extraits par la même procédure. Bien qu'intéressante à première vue, cette méthode d'isolement pourrait apporter certains ennuis pour l'intégration de pics chromatographiques. En effet, même si la procédure permet d'isoler les métabolites d'intérêt, elle ne fait pas de discrimination entre les métabolites 19-norstéroïdes et les autres métabolites endogènes urinaires majeurs tels l'androstérone et l'étiocholanolone. Ainsi, lorsque de grands volumes d'urine sont extraits, la concentration des autres stéroïdes est augmentée par le même facteur, ce qui crée des problèmes d'interférence chromatographique lors de l'analyse CG/C/SMRI. Néanmoins, l'exercice nous a permis de mesurer l'efficacité de cette méthode d'isolement pour les métabolites NA et NE.

Tableau 3.21 Pourcentage (%) de récupération de NA et NE par CG/SM en appliquant successivement les procédures d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés ainsi que celle d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques (n=2 pour chacune des concentrations).

Échantillons Concentration finale (ng/μL)	% récupération moyen	
	NA	NE
40	36,6	35,1
20	*41,9	*40,9
10	52,3	56,1

* Une seule valeur de % rapportée, perte d'un échantillon en cours d'extraction

3.6.3 CLHP à l'échelle semi-préparative

A partir des travaux rapportées par l'équipe Le Bizec (Le Bizec *et al.*, 1999), nous avons décidé d'estimer le pourcentage de récupération de NA lorsqu'une méthode de purification par CLHP semi-préparative est utilisée.

Pour ce faire, des échantillons aqueux de 20 mL dopés avec 50, 100 et 200 ng de NA ont été extraits par la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés en reconstituant les extraits dans 25 μ L de méthanol. Par la suite, les extraits reconstitués sont injectés en totalité au CLHP en prenant soin de recueillir en aval de la colonne toutes les fractions d'élution se situant entre 9 et 10 minutes. (voir paramètres chromatographiques à la section 2.4.1). Finalement, les derniers extraits concentrés sont reconstitués avec 25 μ L de MTBE avant injection sur CG/SM. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau 3.22.

La purification par CLHP à l'échelle semi-préparative donne un pourcentage de récupération moyen d'environ 50% pour les 2 métabolites étudiés. Toutefois, l'utilisation de la CLHP présente un net avantage vis-à-vis la procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques puisqu'elle permet de diminuer remarquablement les interférences des autres stéroïdes de la matrice urinaire. Une extraction réalisée à partir d'un échantillon urinaire recueillis après l'ingestion de 100 mg de norandrostènedione confirme bien ces faits. Tel que démontré à la figure 3.12 b), l'isolement de NA et NE par CLHP à l'échelle semi-préparative permet d'obtenir des extraits qui conviennent à l'analyse CG/C/SMRI.

Tableau 3.22 Pourcentage (%) de récupération de NA et NE par CG/SM en appliquant successivement la procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés et la purification par CLHP à l'échelle semi-préparative (n=2 pour chacune des concentrations).

Échantillon Concentration finale (ng/ μ L)	% récupération moyen NA	% récupération moyen NE
40-2	43,2	43,4
20-1	40,6	38,3
10-1	53,8	55,0

La purification par CLHP de 25 mL d'une urine contenant 54 ng/mL de NA nous a permis de concentrer et isoler la NA des autres stéroïdes qui interféraient auparavant i.e.

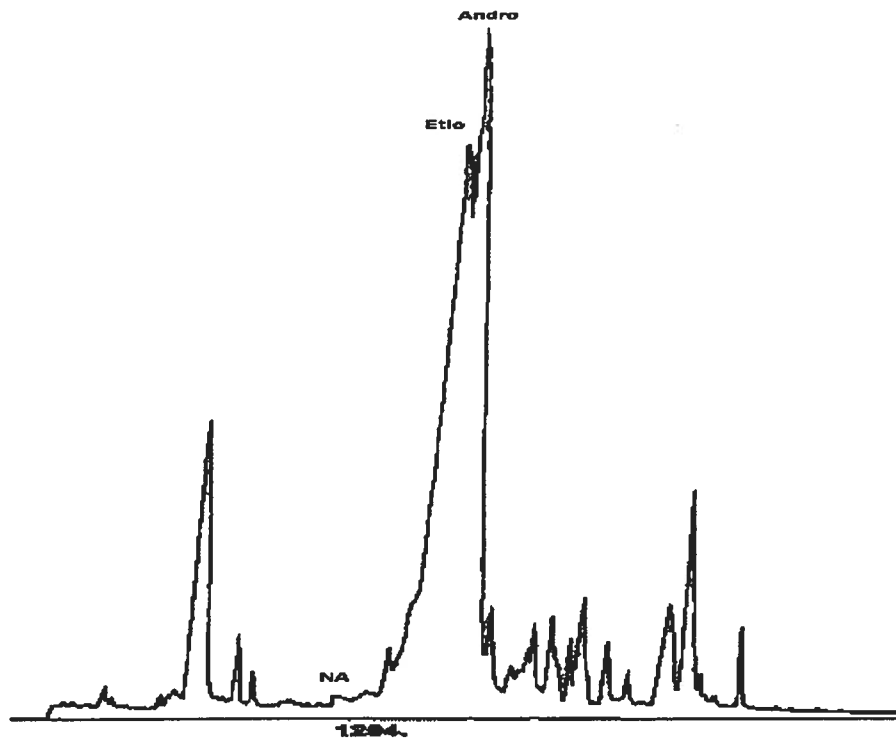
étiocholanolone et androstérone. Après analyse du chromatogramme de CG/C/SMRI présent à la Figure 3.12 b), nous observons non seulement une augmentation marquée du pic de NA, mais aussi une meilleure résolution chromatographique. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}\%$ mesurées avant et après purification par CLHP sont respectivement de -30,3‰ et -31,1‰.

Hormis les avantages cités précédemment, la méthode de purification par CLHP comporte cependant quelques désavantages non négligeables. En premier, cette méthode nécessite l'utilisation de grands volumes d'urine. Étant donné les volumes limités qui sont prélevés lors des contrôles antidopage, soit environ 70 mL, nous risquons d'épuiser une bonne partie de l'échantillon lorsqu'une analyse par CG/C/SMRI est demandée. Deuxièmement, la purification par CLHP est longue et les fractions doivent être recueillies de façon à prévenir le fractionnement isotopique i.e. en récupérant le pic au complet.

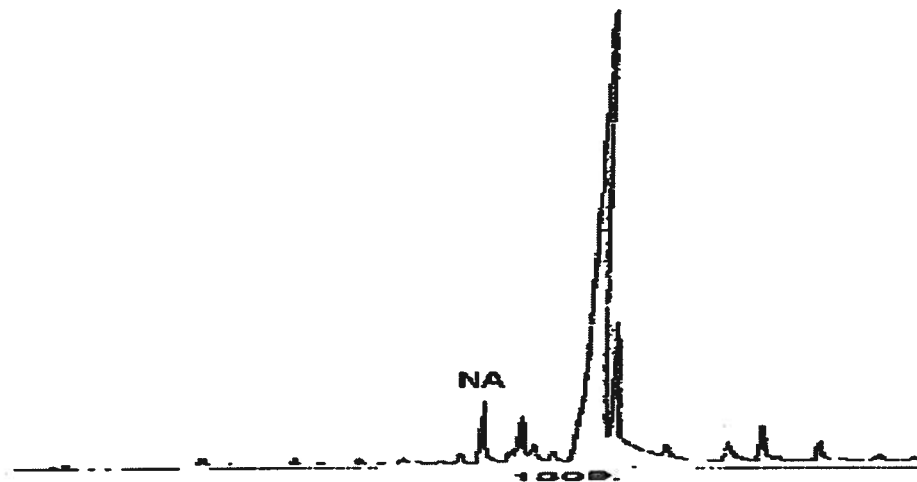
Néanmoins, malgré les quelques désavantages rapportés, la méthode de purification par CLHP demeure une excellente technique pour purifier et concentrer le métabolite NA.

Figure 3.12 Chromatogramme de l'analyse CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) réalisée à partir de l'extraction de 25 mL d'urine du volontaire ayant ingéré 100 mg de norandrostènedione (42 heures après ingestion) : a) extraction par procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués, b) procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués suivie d'une purification par CLHP à l'échelle semi-préparative

a)



b)



3.6.4 Chromatographie d'immunoaffinité

Dans le but de vérifier l'efficacité d'une purification par chromatographie d'immunoaffinité (CIA), nous avons testé des nouveaux gels sélectifs à la nortestostérone et la norandrostérone développés par le Laboratoire d'Hormonologie de Belgique. Pour ce faire, nous avons évalué la quantité de NA retenue sur des gels à l'aide d'une analyse par CG/SM. Selon les informations recueillies auprès du fabricant, les gels utilisés possèderaient une capacité minimale de 300 ng en NA par mL de gel.

Une courbe d'étalonnage comprenant des concentrations variant de 1 à 100 ng/μL en NA a été construite à partir de solutions aqueuses en utilisant le 17α-méthylandrostanediol (26,4 ng/μL) comme standard interne. Les échantillons testés dopés avec 250, 100 et 50 ng de NA ont été quant à eux été préparés selon le *Protocole 1* de la section 2.3.4 en utilisant la solution tampon phosphate saline (PBS) tel que décrit par le groupe Robinson (Robinson *et al.*, 1998).

Les premiers tests ont été effectués avec le gel "nortestostérone" à partir d'échantillons aqueux rehaussés avec NA. Nos résultats expérimentaux n'ont pas pu confirmer ceux obtenus par l'équipe Robinson. A partir d'un échantillon contenant 100 ng, nous ne récupérons qu'à peine 17,5% de NA (voir tableau 3.23). Cela signifie que le gel "nortestostérone" ne semble pas posséder une grande affinité pour le métabolite norandrostérone, d'ailleurs ces faibles rendements sont confirmés par un autre groupe ayant tenté des expérimentations similaires (Mathurin *et al.*, 2001).

Tableau 3.23 Pourcentage (%) de récupération obtenu à partir de solutions aqueuses de 5 mL dopées à la NA en purifiant par CIA sur gel sélectif à la nortestostérone (n=2 pour chacune des concentrations).

Quantité NA sur colonne (ng)	Échantillons injectés Concentration finale (ng/μL)	% Récupération moyen NA
250	10	37
100	4	18
50	2	5

En utilisant le gel sélectif à la norandrostérone, nous avons obtenu des rendements de 80% de récupération lorsqu'une solution dopée à 10 ng/mL de NA a été extraite, évaporée à sec, puis reconstituée avec 25 μ L de MTBE (i.e. solution de concentration finale à 2 ng/ μ L). Toutefois, lorsque l'équivalent de 250 ng est déposé sur le gel, le rendement diminue à 36% (voir tableau 3.24). Ainsi, nos résultats sont décevants et ne semblent pas confirmer une capacité de 300 ng.

Tableau 3.24 Pourcentage (%) de récupération obtenu à partir de solutions aqueuses de 5 mL dopées à la NA en purifiant par CIA sur gel sélectif à la norandrostérone (n=2 pour chacune des concentrations).

Quantité NA sur colonne (ng)	Échantillons injectés Concentration finale (ng/ μ L)	% Récupération moyen NA
250	10	36
100	4	58
50	2	80

D'autres tests ont été réalisés en rehaussant des urines d'enfant et d'adulte dépourvues en NA. Cette fois-ci, un maximum de 20% de récupération est obtenu lorsqu'un volume équivalent à 50 ng de NA est extrait par CIA dans 5 mL d'urine (voir tableau 3.25). La différence de densité des urines testées (enfant: 1,014 g/mL, adulte: 1,020 g/mL) ne semble pas affecter outre mesure les pourcentages de récupération qui plafonnent à environ 20%. Toutefois, nous constatons une diminution du pourcentage de récupération lorsque la quantité de NA déposée sur colonne augmente.

Tableau 3.25 Pourcentage (%) de récupération obtenu à partir de solutions urinaires de 5 mL de NA en purifiant par CIA sur gel sélectif à la norandrostérone (n=2 pour chacune des concentrations).

Matrice urinaire	Quantité NA sur colonne (ng)	Échantillons injectés Concentration finale (ng/ μ L)	% Récupération moyen NA
Enfant	250	10	3
	100	4	21
	50	2	21
Adulte	250	10	2
	100	4	21
	50	2	18

Afin d'améliorer cette méthode, nous avons décidé d'utiliser une autre solution tampon phosphate pour la préparation des échantillons, tel que proposé par le groupe Mathurin (Mathurin *et al.*, 2001). Nous avons également décidé d'extraire toutes nos urines en procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués avant de les rehausser avec la NA. Des nouvelles droites d'étalonnage ont été construites avec un plus court domaine de linéarité (i.e. 1,0 à 20,0 ng/ μ L). De plus, nous avons décidé d'abaisser la concentration de notre standard interne 17 α -méthylandrostanediol à 13,2 ng/ μ L afin d'obtenir un signal plus représentatif des concentrations utilisées pour l'étude.

Nos premiers résultats n'ont pas pu corroborer ceux rapportés par le groupe Desroches (Desroches *et al.*, 2002). Malgré une utilisation rigoureusement identique du même gel, acheté chez le même fabricant, notre pourcentage de récupération n'excède guère les 75% pour un échantillon aqueux de 50 ng. Contrairement aux résultats "quantitatifs" obtenus par Desroches *et al.* avec des urines rehaussées en NA, nos pourcentages de récupération sont quasi identiques (autant pour les urines d'enfant que celles d'adulte) à ceux obtenus avec l'autre solution tampon saline testée auparavant. De plus, une grande proportion de NA (~ 35%) se retrouve dans l'éluat de mise sur colonne, prouvant que la NA n'est pas entièrement retenue sur notre colonne d'immunoaffinité.

L'équipe Desroches évalue la capacité maximale de leur gel à 400 ng pour des urines de densités égales à 1,007 et 1,016 g/mL, et à 200 ng pour d'autres urines de 1,030 g/mL.

Il ne semble pas qu'entre nos mains la capacité du gel soit suffisante pour en permettre l'utilisation. D'autres tests complétés en rehaussant des urines d'enfants et d'adultes avec 250 ng de NA nous permettent de récupérer que 20% du métabolite, nous laissant croire que nous sommes en possession d'un gel d'une capacité maximale de 50 ng.

Malgré l'indéniable sélectivité du gel de NA, sa faible capacité sur colonne ne nous permet pas d'isoler la quantité minimale requise pour une analyse par CG/C/SMRI. Pour respecter cette quantité minimale fixée à 25 ng/ μ L, il faudrait extraire l'équivalent de 625 ng sur le gel si nous voulons maintenir un volume de reconstitution de 25 μ L et un volume d'injection de 2 μ L. Or, pour extraire cette quantité minimale de NA, il faudrait 12,5 extractions successives par CIA, ce qui représenterait beaucoup trop de temps en extraction. Idéalement, un gel de capacité se situant entre 300 et 400 ng pourrait représenter un bon compromis puisque 2 extractions consécutives seraient amplement suffisantes pour obtenir une bonne purification.

Néanmoins, la CIA demeure de loin la meilleure façon de purifier la norandrostérone. Cependant, et nous en convenons, selon les opinions rapportées par quelques équipes de recherche, cette méthode n'est pas facile à utiliser, peu reproductible, et implique le suivi de nombreux détails techniques.

Chapitre 4

Conclusion

Dans le cadre de ce projet, nous avons d'abord évalué les performances de l'instrument de CG/C/SMRI ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Le paramètre de précision a été vérifié à partir de solutions de n-alcanes C-17, C-19, C-21, C-23 et C-25 de teneur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ connue. L'obtention de valeurs d'écart-type $< 0,40\%$ à la moyenne pour tous les types d'alcanes a confirmé une faible dispersion entre les données, d'où une excellente précision de l'instrument. Les tests de linéarité effectués avec des solutions standards de stéroïdes ont quant à eux permis de vérifier la plage de concentrations pouvant être utilisée lors d'une analyse par CG/C/SMRI. Ainsi, pour rester dans le domaine de linéarité de la source, nous devons travailler avec des concentrations comprises entre 25 et 200 ng/ μL à l'injection. Il est également nécessaire d'avoir un signal d'une intensité minimale de 0,60 nA au détecteur.

Nous avons ensuite optimisé une procédure de purification spécifique à certains stéroïdes en utilisant le réactif de Girard. La formation d'un dérivé hydrazone avec les stéroïdes cétoniques permet d'isoler les stéroïdes ne comportant que des fonctions hydroxyles du milieu, et d'améliorer l'analyse chromatographique par CG/C/SMRI. Nous observons que les conditions de réaction sont optimales lorsque nous dissolvons 100 mg de réactif de Girard dans 0,5 mL d'acide acétique pur en chauffant les solutions pendant 15 minutes à 100°C. La récupération des stéroïdes cétoniques est quant à elle rendue possible par une hydrolyse en milieu acide (solution H_2SO_4 (8N)) en utilisant un chauffage à 100°C pendant 15 minutes. Les pourcentages de récupération tournent aux alentours de 80% pour une simple extraction avec procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués, mais lorsque nous ajoutons par la suite la nouvelle procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques, nous obtenons une récupération finale d'environ 45%.

Après l'optimisation de notre procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques, nous avons évalué différents paramètres de réaction tels que la répétabilité, la reproductivité et la stabilité des extraits urinaires préparés. Pour l'ensemble de ces tests, des valeurs acceptables de C.V. à la moyenne inférieures à 2% sont observées avec une stabilité minimale de 5 jours à température pièce pour les solutions reconstituées. Le paramètre de fractionnement isotopique a également été testé pour vérifier si les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\%$ demeurent similaires avant et après application de la nouvelle procédure d'extraction. A notre grande satisfaction, nous n'avons pas observé de fractionnement isotopique pour les urines témoins positives et négatives testées.

L'application de la procédure d'extraction sélective des stéroïdes cétoniques nous a également permis d'étudier des profils d'excrétion par CG/C/SMRI. Des échantillons recueillis après l'administration d'une dose unique par voie orale d'androstènedione et de DHEA ont été extraits puis analysés. Des valeurs de $\delta^{13}\text{C}\%$ chutant entre -28 et -33% ont permis de vérifier l'origine exogène des métabolites ciblés. Les valeurs demeurent significativement altérées durant plus de 24 heures suivant l'administration, ce qui confirme l'utilité de cette technique lorsque appliquée au contrôle du dopage sportif en permettant d'augmenter sensiblement la fenêtre de "positivité".

Dans le but d'éliminer les fluctuations imputables à la nationalité et à la diète des athlètes, nous avons testé la sonde [$\delta^{13}\text{C}\%$ métabolite / $\delta^{13}\text{C}\%$ stéroïdes de référence] > 1,1 proposée par l'équipe de Shackleton. Dans tous les cas étudiés, soit des urines provenant de l'administration de stéroïdes synthétiques, nous avons obtenu des rapports > 1,1 en moyenne après 2 heures d'ingestion. Cette nouvelle sonde a également été vérifiée avec 3 stéroïdes de référence différents (cholestérol, pregnanediol et pregnanetriol). Malgré de bons résultats, nous croyons qu'une attention particulière doit être portée dans le choix du stéroïde de référence impliqué. En effet, les études réalisées avec des urines provenant de volontaires ayant ingéré de la pregnénolone nous ont permis de constater une modification des valeurs $\delta^{13}\text{C}\%$ pour les métabolites pregnanediol et pregnanetriol. Suivant une administration de pregnénolone, nous avons mesuré pour ces métabolites excrétés des valeurs $\delta^{13}\text{C}\%$ de l'ordre de -28 à -33%. Dans l'éventualité où la

pregnénolone pourrait être consommée en combinaison avec un stéroïde synthétique tel la testostérone, l'androstènedione ou la DHEA, le diagnostique basé sur la comparaison aux stéroïdes de référence serait faussé puisque les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ mesurées pour ces précurseurs seraient altérées. Ainsi, dans de telles circonstances, l'utilisation du cholestérol comme stéroïde de référence pourrait représenter une solution. D'autre part, nous avons observé que l'administration de pregnénolone ne cause pas chez tous les volontaires étudiés, la production de pregnanediol et pregnanetriol, les valeurs de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ne diffèrent pas.

D'autres tests effectués à partir de quelques échantillons d'athlètes analysés dans le cadre de programmes de contrôle du dopage et dont l'analyse par CG/SM avait démontré des paramètres du profil stéroïdien anormaux nous ont également permis de vérifier l'utilité de la CG/C/SMRI pour des cas limites de rapports T/E avoisinant 6. L'application de la sonde proposée par l'équipe de Shackleton a été particulièrement efficace pour confirmer les cas d'excrétion naturelle de valeurs de T/E systématiquement et naturellement élevées.

Finalement, nous avons testé deux méthodes de purification qui permettent de concentrer les métabolites urinaires NA / NE et de diminuer les interférences chromatographiques rencontrées avec la CG/C/SMRI.

Dans un premier temps, nous avons testé l'emploi de la CLHP à l'échelle semi-préparative et avons obtenu des résultats satisfaisants. L'extraction d'un échantillon urinaire provenant d'un volontaire ayant ingéré de la norandrostènedione, nous a permis à la fois d'améliorer l'analyse chromatographique sur CG/C/SMRI, mais aussi d'augmenter le signal de détection. Malgré une amélioration des conditions d'analyse, l'emploi de la CLHP à l'échelle semi-préparative implique cependant beaucoup de manipulations et fournit un rendement maximal de 50% lorsqu'elle est précédée d'une procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugés. De plus, l'exécution de cette méthode nécessite une grande attention lors de la collecte des fractions pour éviter le fractionnement isotopique.

La seconde et dernière méthode de purification que nous avons testé est la chromatographie d'immunoaffinité (CIA) en utilisant un matériel dit spécifique à la nortestostérone et à la norandrostérone. Très sélective, cette méthode pourrait représenter une belle alternative à l'emploi de la CLHP à l'échelle semi-préparative. Malheureusement, les faibles rendements de récupération de la NA obtenus, ainsi que l'incapacité à reproduire les travaux d'autres équipes de recherche ne nous permettent pas d'utiliser ce gel.

Liste des références

Aguilera, R., M. Becchi et H. Casabianca. 1996. Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography / combustion / isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids. J. Mass Spectrom., vol. 31, p. 169-176.

Aguilera, R., D.H. Catlin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, R.S. Swerdloff, H.G. Pope, C.K. Hatton. 1999. Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols. J. Chromatogr. B, vol. 727, p. 95-105.

Aguilera, R., T.E. Chapman, B. Starcevic, C. Hatton, D.H. Catlin. 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. Clin. Chem., vol. 47, p. 292-300.

Ayotte, C., D. Goudreault et A. Charlebois. 1996. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. J. Chromatogr., vol. 687, p. 3-25.

Ayotte, C. 1997A. Evaluation of elevated testosterone / epitestosterone values in athletes' urine sample. dans IAF New Studies in athletics, vol. 12:2-3, p.87.

Ayotte, C. et A. Charlebois. 1997B. T/E values: measurements and observations. dans W. Schänzer *et al.*, Recent Advances in Doping Analysis (4) – Proceedings of the Manfred Donike 14th Cologne Workshop on Dope Analysis, Sport und Buch Strauß, Köln., p. 91-98.

Ayotte, C., D. Goudreault, A. Lajeunesse, M. Cl  roux, Y. Richard, A. Charlebois, J.-P. Couture, A. Fakirian. 2001. GC/C/IRMS and GC/MS in "natural" steroids testing. dans W. Schänzer *et al.*, Recent Advances in Doping Analysis (9) – Proceedings of the Manfred Donike 19th Cologne Workshop on Dope Analysis, Sport und Buch Strauß, Köln., p. 133-143.

Becchi, M., R. Aguilera, Y. Farizon, M-M. Flament, H. Casabianca, P. James. 1994. Gas chromatography / combustion / isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of Testosterone in sport. Rapid Communication in Mass Spectrometry, vol. 8, p. 304-308.

Blue, J.G. et J.A. Lombardo. 1999. Steroids and steroid-like compounds. Clinics in sports medicine, vol. 18 (3), p. 667-690.

Bossy, T.Z., K.A. Moore et A. Poklis. 1998. The effect of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on the urine testosterone / epitestosterone (T/E) ratio in human male volunteers. J. Analytical Toxicology, vol. 22, p.455-459.

Bowers, L. 1999. Oral dehydroepiandrosterone supplementation can increase the testosterone / epitestosterone ratio. Clin. Chem., vol.45, p.295-297.

Brand, W.A. 1996. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. J. Mass Spectrom., vol. 31, p.225-235.

Catlin, D.H. *et al.* 1987. Analytical chemistry at the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles, Clinical Chemistry, vol. 23, p. 319-327.

Catlin, D.H., C. Hatton et S.H. Starcevic. 1997. Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine. Clin. Chem., vol. 43 (7), p. 1280-1288.

Chinerey, S. 1983. dans Chapter 3: Androgenic-Anabolic Steroids. Anabolic Steroids and Bodybuilding, L & S Research, SMS Publishing, NJ, p. 35-43.

Cl  roux, M. et C. Ayotte. 2001. <http://www.acfas.ca/congres/congres69/s308.htm>.

COMITÉ INTERNATIONAL OLYMPIQUE. 1995. Code m  dical du C.I.O. et document explicatif.

Dehennin, L., M. Jondet et R. Sch  ller. 1987. Androgen and 19-norsteroids profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: an isotope dilution-mass spectrometric study. J. Steroid Biochem., vol. 26, p. 399-405.

Dehennin, L. et A.M. Matsumoto. 1993. Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alteration of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sport. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., vol. 44, p.179-189.

Dehennin, L., Y. Bonnaire et P.H. Plou. 1999. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., vol. 721, p. 301-307.

De la Torre, X., J. Segura, Z. Yang, Y. Li et M. Wu. 1997. Testosterone detection in different ethnic groups. dans W. Schänzer *et al.*, Recent Advances in Doping Analysis (4) – Proceedings of the Manfred Donike 14th Cologne Workshop on Dope Analysis, Sport und Buch Strauß, Köln., p. 71-90.

Desroches, M.C., J.C. Mathurin, Y. Richard, P. Delahaut, J. de Ceaurriz. 2002. Urinary 19-norandrosterone purification by immunoaffinity chromatography: application to gas chromatography / combustion / isotope ratio mass spectrometric analysis. Rapid Communication in Mass Spectrometry, vol. 16, p. 370-374.