

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

## **Détection et identification de divers glucocorticoïdes par CLHP-SM**

Par  
Sophie Charbonneau  
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	Dr. Pascal Kintz Institut de Médecine Légale Strasbourg, France
Examineur interne	Dr. François Lépine INRS-Institut Armand-Frappier
Directrice de recherche	Dr. Christiane Ayotte INRS-Institut Armand-Frappier

2 juillet 2004

© droits réservés de Sophie Charbonneau, 2004

## Résumé

Plusieurs glucocorticoïdes synthétiques sont utilisés de façon régulière à des fins thérapeutiques. De plus, cette classe de médicaments possède des propriétés intéressantes au point de vue du dopage sportif, telles des pouvoirs anti-inflammatoires et une certaine réaction psychostimulante. L'agence mondiale antidopage a donc soumis l'utilisation des glucocorticoïdes à certaines restrictions.

Nous avons développé et optimisé une méthode basée sur l'utilisation de la combinaison chromatographie liquide à haute performance et de la spectrométrie de masse (CLHP/SM). Des glucocorticoïdes synthétiques, les plus couramment utilisés au Canada, ont été ciblés, ainsi que quatre corticostéroïdes naturels. Dans le cadre de ces recherches, une méthode d'extraction efficace des glucocorticoïdes de l'urine a aussi été développée. De plus, deux études d'excrétion ont été conduites, suite à l'administration orale de prednisone et de prednisolone, les deux glucocorticoïdes les plus souvent prescrits au Canada. Ces études nous permis d'identifier les métabolites excrétés, soit la prednisone, la prednisolone et la  $20\beta$ -dihydroprednisolone. Nous avons constaté que ces molécules ne semblent pas, ou très peu, être conjuguées à l'acide glucuronique, elles se retrouvent sous forme libre dans l'urine. Ceci est en accord avec la littérature.

Sophie Charbonneau

Étudiante

Christine

Directrice de recherche

## Remerciements

Après de longs mois de travail, beaucoup de sueurs et parfois même de pleurs, je voudrais remercier les personnes qui m'ont soutenue tout au long de cette période ; grâce à vous, j'en sors grandie...

Christiane, ma directrice de recherche, qui, par seulement son regard au-dessus de ses lunettes, m'a appris à me faire confiance,

Ma mère pour sa présence, sa patience, son soutien et ses encouragements et pour me permettre encore d'être son « Tanguy »...,

Nath, qui a seulement compris la chimie pour moi, et qui me l'a toujours dit... oui, oui, le titre tu le mérites aussi,

Danielle, Jean-Pierre et Alain qui m'ont permis de fouiller et de questionner la machine, mais aussi leurs têtes...,

Toute l'équipe de techniciens et de techniciennes pour leur aide quotidienne, en particulier Carole et Catherine,

Tous mes amis, en particulier Ju, Carl, Caro et J-F, qui par leur présence, même à distance, ont su me changer les idées...,

L'Institut National de la Recherche Scientifique pour m'avoir accordé une bourse d'études.

*À la mémoire de mon père  
qui m'a toujours encouragée  
dans mes études, qui m'a appris  
la persévérance et l'importance  
de faire ce que l'on aime*

## Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Le dopage sportif.....	1
1.2 Les glucocorticoïdes.....	2
1.3 Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.....	4
1.4 Effets secondaires des glucocorticoïdes.....	4
1.5 Structures des glucocorticoïdes synthétiques.....	5
1.6 Métabolisme des glucocorticoïdes.....	11
1.7 La détection et l'identification des glucocorticoïdes dans l'urine.....	12
1.8 Objectifs des présents travaux.....	13
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	14
2.1 Stéroïdes.....	14
2.2 Produits chimiques et biologiques.....	16
2.3 Préparation des tampons et des solutions.....	16
2.3.1 Tampon acétate 0.1 M (pH 5.2).....	16
2.3.2 Tampon phosphate (pH 6.9).....	17
2.3.3 Tampon carbonate (pH 9).....	17
2.3.4 Tampon acétate d'ammonium 1mM.....	17
2.4 Procédure d'extraction des glucocorticoïdes de l'urine.....	17
2.4.1 Extraction sur phase solide des stéroïdes libres.....	17
2.4.2 Hydrolyse.....	18
2.4.3 Extraction liquide-liquide.....	18
2.5 CLHP / SM.....	19
2.5.1 Chromatographie liquide de haute performance.....	19

2.5.2 Spectrométrie de masse.....	19
2.6 Courbes d'étalonnage.....	20
2.7 Pourcentages de récupération.....	22
2.8 Limites de détection.....	22
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	23
3.1 Introduction.....	23
3.2 Méthode CLHP / SM.....	23
3.2.1 Source d'ionisation.....	23
3.2.2 Paramètres chromatographiques et spectrométriques.....	26
3.2.3 Spectres de masse obtenus.....	30
3.2.4 Fragmentation.....	42
3.3 Extraction des glucocorticoïdes de l'urine.....	44
3.3.1 Pourcentages de récupération.....	44
3.3.2 Limites de détection inférieures.....	46
3.4 Dégradation de la béclo méthasone.....	48
3.5 Différentiation de la bétaméthasone et de la dexaméthasone, deux stéréoisomères.....	52
3.6 Première étude d'excrétion (prednisolone).....	55
3.7 Deuxième étude d'excrétion (prednisone).....	61
Chapitre 4 : Conclusion.....	66
Références.....	68

## Liste des figures

Figure 1.1 : Structure du cortisol.....	5
Figure 1.2 : Glucocorticoïdes synthétiques usuels.....	9
Figure 2.1 : Structures du 6 $\alpha$ -hydroxycortisol , du 6 $\beta$ -hydroxycortisol , de l'acétate de méthénolone (étalon interne), et du propionate de clobétasol (étalon externe).....	15
Figure 3.1 : Schémas des deux sources d'ionisation à pression atmosphérique : l'électronébulisation, et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).....	25
Figure 3.2 : Chromatogramme de l'analyse CLHP/SM en mode SIM d'un mélange de standards authentiques de chacun des glucocorticoïdes étudiés ainsi que des étalons interne et externe (10 ng/ $\mu$ L).....	29
Figure 3.3 : Spectres de masse obtenus de l'analyse CLHP/SM en mode de balayage complet (SCAN) des solutions de standards authentiques de chacun des glucocorticoïdes étudiés ainsi que des étalons interne et externe (10 ng/ $\mu$ L).....	41
Figure 3.4 : Étude de la dégradation de la béclo méthasone. Chromatogrammes obtenus après 0, 18, 24 et 45 heures suivant la préparation de l'échantillon (standard authentique, 10 ng/ $\mu$ L).....	50
Figure 3.5 : Spectres de masse de la béclo méthasone et du produit de dégradation.....	51
Figure 3.6 : Schéma métabolique proposé par Rodchenkov et al. pour la prednisone et la prednisolone (1991).....	56
Figure 3.7 : Chromatogrammes provenant de l'analyse CLHP/SM de la fraction des stéroïdes libres de l'échantillon recueilli après l'administration de prednisolone (50 mg) et d'un échantillon témoin négatif.....	58
Figure 3.8 : Chromatogrammes provenant de l'analyse CLHP/SM de la fraction combinée des stéroïdes libres et glucuroconjugués de l'échantillon recueilli après l'administration de prednisolone (50 mg) et d'un échantillon témoin négatif.....	59

Figure 3.9 : Chromatogramme provenant de l'analyse CLHP/SM (mode SIM) de la fraction des stéroïdes libres d'un échantillon recueilli 19 heures après l'administration de prednisone (25 mg).....63

Figure 3.10 : Profil d'excrétion des métabolites (total après hydrolyse enzymatique) provenant de l'administration orale de 25 mg de prednisone.....64

**Liste des tableaux**

Tableau I : Propriétés comparatives de certains glucocorticoïdes.....	10
Tableau II : Poids moléculaires, ions les plus abondants (m/z) servant à la quantification et équations des régressions linéaires ( $y = mx + b$ ) (concentrations de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L) des glucocorticoïdes étudiés.....	21
Tableau III : Paramètres de l'analyse CLHP/SM : temps de rétention relatifs et ions choisis pour le dosage et l'identification.....	27
Tableau IV : Pourcentages de récupération de l'urine des divers glucocorticoïdes. Urines dopées, de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L. (aire ion majeur / aire SE) extrait / (aire ion majeur / aire SE) non-extrait.....	45
Tableau V : Limites de détection inférieures des divers glucocorticoïdes S/N = 3, du 3 <sup>ème</sup> ion le plus abondant.....	47
Tableau VI : Résultats obtenus de la détermination des abondances relatives des ions (m/z) de la bétaméthasone et de la dexaméthasone.....	54
Tableau VII : Glucocorticoïdes identifiés dans l'urine recueillie 5 heures après administration orale d'une dose unique de 50 mg de prednisolone.....	57
Tableau VIII : Glucocorticoïdes identifiés dans l'urine recueillie 3, 10, 19, 25 et 28 heures après administration orale d'une dose unique de 25 mg de prednisone.....	62
Tableau IX : Concentrations totales des glucocorticoïdes excrétés suite à l'administration d'une dose unique de 25 mg de prednisone.....	63

**Liste des abréviations**

CLHP / SM : chromatographie liquide de haute performance / spectrométrie de masse

m/z : masse / charge

S/N : signal / bruit de fond

ICPA : ionisation chimique à pression atmosphérique

SI : standard interne

SE : standard externe

# CHAPITRE 1

## Introduction

### 1.1 Le dopage sportif

Il ne suffit pas de prendre une pilule pour gagner une médaille olympique. Par contre, même avec certains talents physiques et psychologiques et des années d'entraînement, certains athlètes n'atteignent pas le niveau qu'ils désirent et plusieurs se tournent alors vers le dopage.

Bien qu'il existe depuis très longtemps, le dopage sportif a connu un certain essor avec les progrès de la médecine au 19<sup>ème</sup> siècle. Il aura sûrement fallu que des décès surviennent pour sonner l'alarme et montrer à quel point la consommation de substances interdites peut être dangereuse. En 1886, Arthur Linton, un cycliste, meurt pendant une course suite à une overdose de drogues que lui avait données son entraîneur ; en 1967, Tom Simpson, un autre cycliste, est victime d'une défaillance cardiaque lors d'une étape du Tour de France. Un nombre impressionnant d'histoires semblables viennent ternir la réputation du monde du sport et la valeur des performances atteintes (Bellocq, 1991).

Bien sûr, l'arsenal des substances utilisées en dopage sportif a évolué au rythme des découvertes de l'industrie pharmaceutique. C'est ainsi que les amphétamines ont été les drogues prisées des années 1930 à 1960. Les stéroïdes anabolisants ont ensuite fait leur apparition, au début des années 1960. La liste ne cesse de s'allonger, et chaque sport aurait ses substances fétiches, que ce soit pour améliorer l'endurance, la masse musculaire, la concentration, les réflexes, ou encore pour combattre la fatigue ou les blessures.

Ce n'est que durant les années 1960-70 que l'on commence à s'attaquer sérieusement au problème du dopage sportif. C'est alors que s'amorce une lutte qui se poursuit encore

aujourd'hui et qui est d'autant plus ardue que les progrès de l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies font en sorte que de nouvelles substances sont sans arrêt développées.

Une liste de classes de substances interdites a été établie par le Comité international olympique (CIO), puis par l'Agence mondiale antidopage (AMA) et est revue périodiquement. Elle est divisée en catégories : les stimulants, les narcotiques, les cannabinoïdes, les agents anabolisants, les hormones peptidiques, les 2-agonistes béta, les agents possédant des propriétés anti-estrogéniques, les agents masquants et les glucocorticoïdes. Certaines substances sont soumises à des restrictions, comme, par exemple, les glucocorticoïdes qui sont interdits lorsque administrés oralement, par voie rectale, par injection intramusculaire ou intraveineuse. Toute autre route d'administration (topique, par inhalation, injection intra-articulaire) est permise lorsque l'athlète a présenté une demande d'exemption au préalable.

## 1.2 Les glucocorticoïdes

Les corticostéroïdes représentent une classe de médicaments énormément utilisés pour contrer divers troubles (endocriniens, rhumatismaux, dermatologiques, ophtalmiques, allergiques, respiratoires, hématologiques). Ce sont les analogues synthétiques des hormones sécrétées par le cortex surrénalien. Ils sont divisés en deux classes en fonction de leurs effets : les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes.

Les minéralocorticoïdes exercent leur action principalement sur le transport des électrolytes et sur la distribution de l'eau dans les tissus, ils sont le principal régulateur du volume des fluides extracellulaires. De plus, ils sont un déterminant majeur du métabolisme du potassium,  $K^+$ . L'aldostérone est le minéralocorticoïde principal chez l'homme (Briggs, 1970 ; Genard, 1974).

Les glucocorticoïdes affectent surtout le métabolisme intermédiaire, ce qui inclut une action sur la régulation du métabolisme des protéines, des glucides et des lipides et des

acides nucléiques. Le principal stéroïde chez l'homme est le cortisol (hydrocortisone). Il est à noter que certains glucocorticoïdes possèdent également une certaine activité minéralocorticoïde (Briggs, 1970 ; Genard, 1974).

Les glucocorticoïdes possèdent des propriétés intéressantes au point de vue du dopage sportif. En effet, non seulement possèdent-ils les pouvoirs anti-inflammatoires recherchés, mais en plus, ils semblent pouvoir induire une certaine réaction psychostimulante (Harper, 1977).

Les glucocorticoïdes sont essentiels à la vie. Chez l'humain, ils permettent à l'organisme de s'adapter à l'intermittence de l'apport alimentaire en stabilisant la glycémie ; ils maintiennent également l'équilibre du volume sanguin en empêchant l'eau de pénétrer dans les cellules. Lors d'un stress important, quel qu'il soit (infection, hémorragie, traumatisme physique ou émotionnel), une augmentation spectaculaire de glucocorticoïdes est provoquée, ce qui aide l'organisme à lutter contre la crise. Comme toutes les hormones stéroïdiennes, les glucocorticoïdes agissent sur les cellules cibles en modifiant l'activité des gènes (McKerns, 1968 ; Marieb, 1999).

Le principal effet métabolique des glucocorticoïdes est une augmentation de la néoglucogenèse. En effet, ces stéroïdes aident à la formation de glucose à partir de molécules non glucidiques, comme par exemple, les acides aminés des protéines et le glycérol des triglycérides. Aussi, le cortisol mobilise les acides gras du tissu adipeux, favorisant ainsi leur utilisation à des fins énergétiques, ce qui permet alors de réserver le glucose au système nerveux. Il a aussi été noté que les glucocorticoïdes augmentaient la biosynthèse des enzymes nécessaires à la néoglucogenèse. Les glucocorticoïdes inhibent aussi la sécrétion de l'insuline. De plus, ces stéroïdes intensifient les effets vasoconstricteurs de l'adrénaline. Finalement, l'augmentation de la pression artérielle et de l'efficacité circulatoire assure ensuite un apport rapide de nutriments et d'oxygène aux cellules (McKerns, 1968 ; Schleimer, Claman et Oronsky, 1989 ; Marieb, 1999).

### 1.3 Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

L'effet anti-inflammatoire produit par les glucocorticoïdes peut provenir de divers mécanismes dont la réduction du nombre de cellules immunocompétentes circulantes et de macrophages et l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines et les leucotriènes. En concentrations élevées, les glucocorticoïdes diminuent donc les réactions protectrices cellulaires (en augmentant la résistance capillaire) et en particulier retardent la migration des leucocytes (en particulier les neutrophiles) dans les régions traumatisées. De plus, les glucocorticoïdes empêchent l'augmentation de la perméabilité et de la dilatation des vaisseaux sanguins capillaires causée par l'histamine et la sérotonine, ce qui normalement se produit lors d'une réaction inflammatoire. L'effet anti-inflammatoire de ces stéroïdes peut aussi être expliqué par une stabilisation de la membrane des lysosomes (Briggs, 1970 ; Genard, 1974 ; Harper, 1977 ; Makin, 1984).

Les glucocorticoïdes pénètrent dans la cellule cible de manière passive et se fixent au récepteur des stéroïdes. Le complexe corticoïde-récepteur pénètre dans le noyau de la cellule où il interagit avec le génome et stimule la transcription de protéines (Marieb, 1999).

### 1.4 Effets secondaires des glucocorticoïdes

Comme tout médicament, les glucocorticoïdes ont des effets secondaires non-désirés et ceux-ci sont nombreux. Les extraits suivants du Compendium canadien des préparations pharmaceutiques en font preuve (CPS, 2002) :

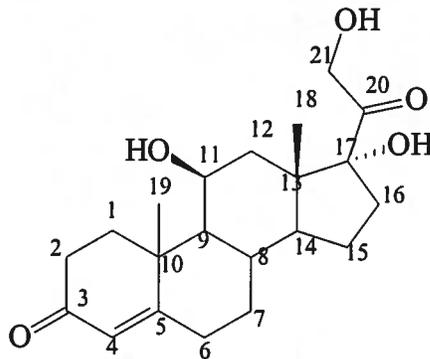
- 1- Complications «endocrinologiques et métaboliques» (obésité facio-tronculaire, diabète, prise de poids, oedèmes, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque...)
- 2- Complications digestives (ulcères gastro-intestinaux)

- 3- Complications cutanées (acné, retard de cicatrisation...)
- 4- Complications ostéo-musculaires (amyotrophie, ostéoporose...)
- 5- Troubles psychiques (euphorie, insomnie, dépression, hallucinations...)
- 6- Complications infectieuses (infections bactériennes, virales, parasitaires, fongiques)

L'utilisation de corticostéroïdes étant très fréquente chez les sportifs et ceux qui les soignent, il devenait essentiel d'en limiter l'administration abusive et c'est l'objectif que tentent d'atteindre les autorités sportives.

### 1.5 Structures des glucocorticoïdes synthétiques

Les glucocorticoïdes synthétiques ont une analogie structurale avec le cortisol (voir figure 1.1).



**Figure 1.1 : Structure du cortisol.**

Ils possèdent tous un oxygène en position C-11, soit une fonction hydroxyle ou cétone, et la conformation  $11\beta$ -OH semble être indispensable à l'effet biologique. L'activité glucocorticoïde semble requérir de plus la présence d'une fonction cétone en C-3 et en C-

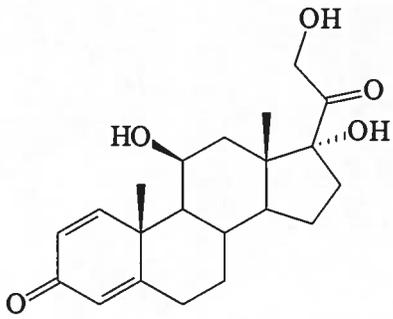
20, d'une fonction alcool en C-21, d'un oxygène en position C-17 et d'une double liaison C-4 – C-5 (Genard, 1974 ; Volin, 1995 ; Orth et Kovacs, 2001).

Depuis les années 1950, divers glucocorticoïdes ont été synthétisés en recherchant toujours une meilleure activité anti-inflammatoire et également une dissociation des effets anti-inflammatoires et des effets physiologiques cortisoliques. Pour ce faire, divers types de modifications chimiques ont été apportées à la molécule de cortisol et celles résumées ci-dessous ont permis d'augmenter l'effet glucocorticoïde :

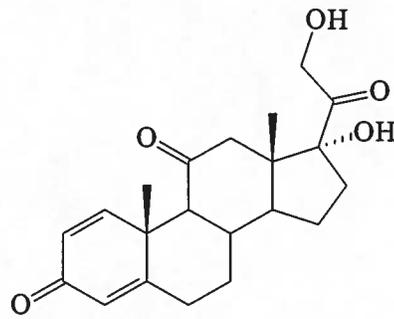
- 1- Une liaison double en position C-1 – C-2 (augmentation de l'effet glucocorticoïde de 4 fois par rapport au cortisol et diminution notable de l'effet minéralocorticoïde)
- 2- Un groupe méthyle ou un halogène en position C-6 alpha
- 3- Un halogène en position C-9 alpha (par exemple : la présence d'un atome de fluor conduit à une augmentation de l'effet glucocorticoïde 12 fois supérieur à celui du cortisol, et l'effet minéralocorticoïde 125 fois celui du cortisol)
- 4- Un groupe méthyle en C-16 alpha

Bien sûr, des combinaisons de plusieurs de ces modifications chimiques permettent d'obtenir de meilleurs résultats. Par exemple, l'ajout d'un atome de fluor en position C-9 alpha permet d'obtenir de bons effets anti-inflammatoires, mais l'activité minéralocorticoïde est alors très élevée, ce qui entraîne des problèmes de balance d'électrolytes. Pour contrer cela, il est possible d'ajouter en position C-16 alpha un groupe hydroxyle ou méthyle. De plus, en ajoutant également une double liaison en position C-1 – C-2, l'effet glucocorticoïde est alors 30 fois supérieur à celui du cortisol alors que l'activité minéralocorticoïde est nulle. Malheureusement, toutes ces modifications chimiques ne permettent pas de diminuer certains effets secondaires non-désirés, mentionnés précédemment (Genard, 1974 ; Orth et Kovacs, 2001).

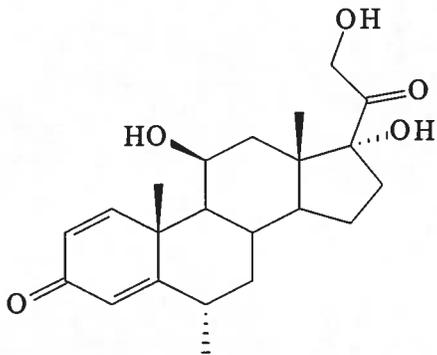
C'est ainsi que plusieurs glucocorticoïdes ont été synthétisés depuis 50 ans. Les plus couramment utilisés sont présentés à la figure 1.2 ci-dessous :



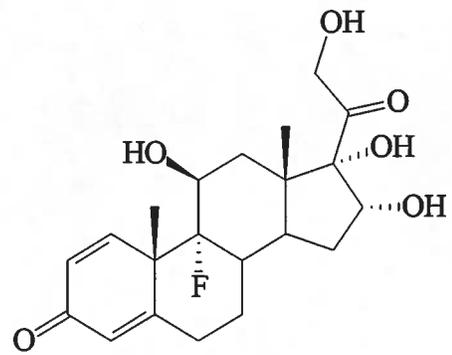
Prednisolone



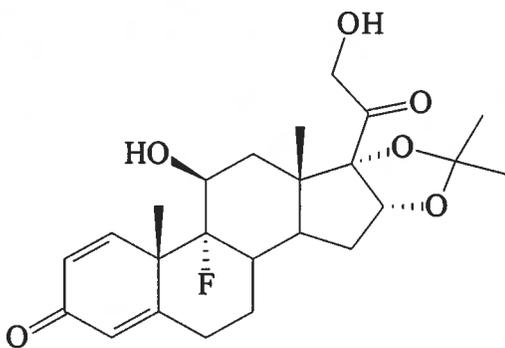
Prednisone



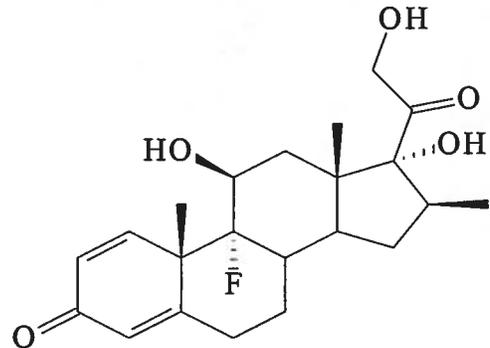
Méthylprednisolone



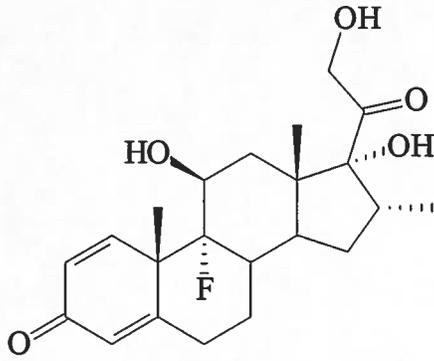
Triamcinolone



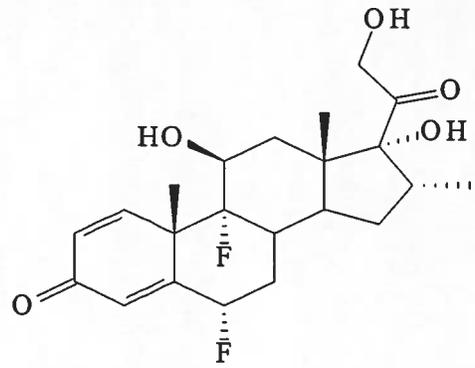
Acétonide de triamcinolone



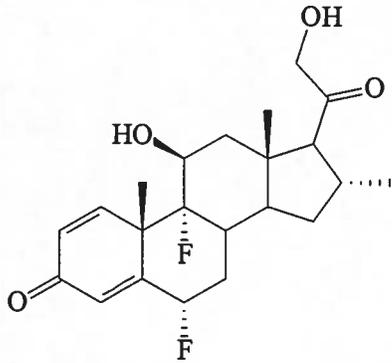
Bétaméthasone



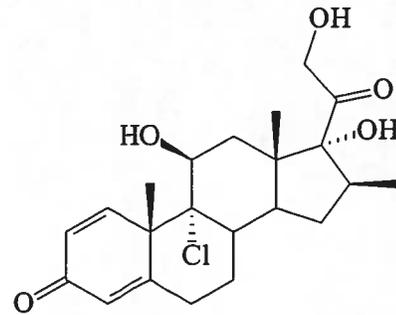
Dexaméthasone



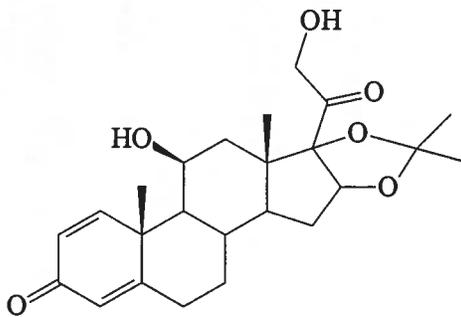
Fluméthasone



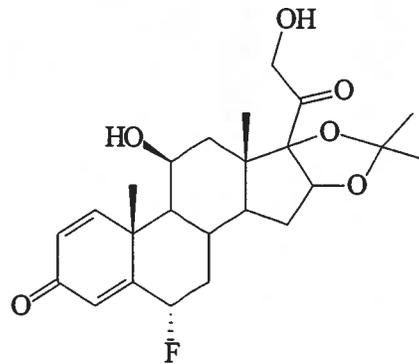
Diflucortolone



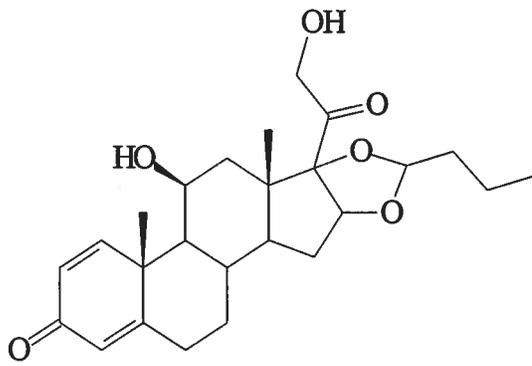
Béclométhasone



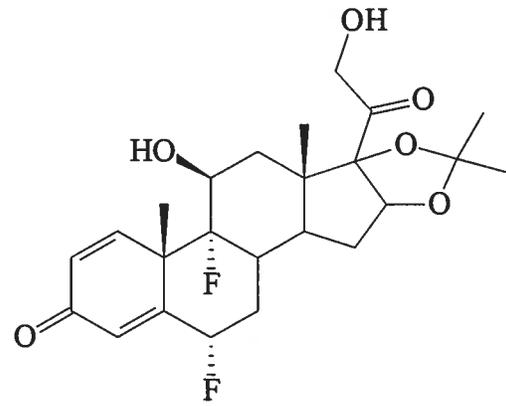
Désonide



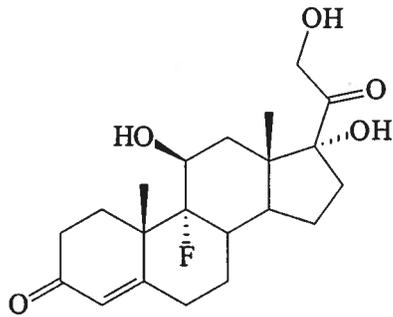
Flunisolide



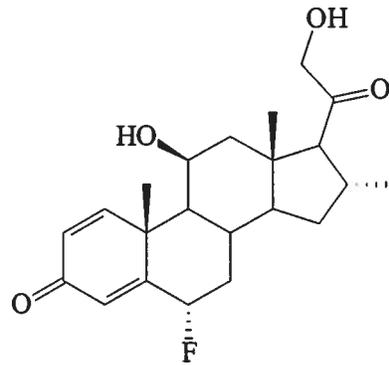
Budésonide



Acétonide de fluocinolone



Fluorhydrocortisone



Fluocortolone

Figure 1.2 : Glucocorticoïdes synthétiques usuels.

Le tableau I montre les propriétés comparatives de certains glucocorticoïdes. On peut ainsi constater à quel point les stéroïdes synthétiques sont puissants par rapport aux naturels (CPS, 2002).

**Tableau I : Propriétés comparatives de certains glucocorticoïdes.**

<b>Médicament</b>	<b>Demi-vie biologique (heures)</b>	<b>Dose anti-inflammatoire équivalente (mg) APPROXIMATIVE</b>	<b>Effet minéralocorticoïde</b>
<b>COURTE durée d'action</b>  Cortisone Cortisol	8 à 12	  25 20	  2 2
<b>MOYENNE durée d'action</b>  Méthylprednisolone Prednisolone Prednisone Triamcinolone	18 à 36	  4 5 5 4	  0 1 1 0
<b>LONGUE durée d'action</b>  Bétaméthasone Dexaméthasone	36 à 54	  0.6 0.75	  0 0

Des études comparatives entre le cortisol et certains glucocorticoïdes synthétiques ont été réalisées (Araki et al., 1965). Il a ainsi été remarqué que les glucocorticoïdes synthétiques restent plus longtemps dans le plasma, leurs modifications métaboliques sont plus lentes, ils sont moins conjugués et leur volume de distribution apparent est plus élevé que celui du cortisol.

### 1.6 Métabolisme des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont métabolisés essentiellement par les enzymes du foie et excrétés presque exclusivement par les reins. Lors de leur passage dans le foie, ils peuvent subir diverses modifications chimiques telles une réduction des doubles liaisons du cycle A, une réduction des groupes carbonyles en C-3 et C-20, une oxydation en C-20 – C-21 (en carboxyles) et une hydroxylation en C-6.

De plus, le foie permettrait l'obtention de métabolites actifs en effectuant notamment la conversion du groupement 11-kéto en 11 $\beta$ -hydroxyle, à l'aide de l'enzyme 11 $\beta$ -dihydrogénase (par exemple : la transformation de la cortisone en cortisol, de la prednisone en prednisolone). La cortisone et la prednisone sont donc inactives lorsque administrées de manière topique, l'effet de premier passage étant évité (Briggs, 1970).

On peut retrouver dans l'urine les produits inchangés et les métabolites de phase I et II, et donc présents sous la forme libre ou conjuguée. La conjugaison de certaines molécules est un phénomène métabolique fréquent qui aide à l'augmentation de la solubilité et donc facilite l'élimination de ces composés. Ces derniers sont généralement glucuroconjugués, mais il est possible de retrouver des métabolites sulfoconjugués (Harper, 1977 ; Makin, 1984).

### **1.7 La détection et l'identification des glucocorticoïdes dans l'urine**

La détection des glucocorticoïdes dans l'urine présente plusieurs problèmes. En effet, leur concentration dans l'urine est très variable, allant de très faible, car les doses administrées (en aérosol notamment) le sont, à plus importantes lorsque administré per os. Les modes d'administration sont variés, leur structure est diversifiée, les métabolites attendus nombreux. Par exemple, les doses administrées par inhalation varient de 400 à 2000  $\mu\text{g}/\text{jour}$  alors que les doses orales vont de 0.5 à 30 mg/kg (CPS, 2002).

Plusieurs études ont été réalisées en utilisant la technique de chromatographie en phase gazeuse (CG) qui ne s'est pas avérée efficace pour ces stéroïdes (Heftmann, 1975). En effet, cette technique analytique est inappropriée pour les glucocorticoïdes car ceux-ci sont trop peu volatils, se dégradent à des températures élevées (principalement à cause de la présence de groupements hydroxyles pouvant donner lieu à de la déshydratation thermique et dont la dérivation est difficilement réalisable à cause de l'encombrement stérique ; ainsi que celle d'une fonction labile en position C-17) (exemple : Segura, Ventura et Jurado, 1998).

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) semble mieux appropriée à l'analyse des glucocorticoïdes. Par contre, ces derniers sont difficiles à identifier en utilisant les simples détecteurs UV en raison de leurs spectres semblables (ils absorbent tous à une longueur d'onde ( $\lambda$  max) d'environ 240 nm). Le couplage avec le spectromètre de masse est donc essentiel à l'identification et permet de plus d'atteindre les faibles concentrations requises.

### 1.8 Objectifs des présents travaux

Étant donné que de nombreux glucocorticoïdes sont disponibles commercialement, nous avons dans un premier temps limité notre étude à 17 glucocorticoïdes synthétiques, les plus couramment utilisés au Canada. Quatre corticostéroïdes naturels ont aussi été inclus dans nos travaux (le  $6\alpha$ -hydroxycortisol, le  $6\beta$ -hydroxycortisol, la cortisone et le cortisol) car ils sont présents en concentrations notables dans l'urine.

Ces stéroïdes ont été utilisés dans le développement d'une méthode analytique efficace pour la détection et l'identification des glucocorticoïdes et de leurs métabolites urinaires dans le contexte de leur usage illégal par les athlètes.

Afin de récupérer le plus possible les glucocorticoïdes de l'urine, une méthode d'extraction efficace doit être étudiée. De plus, il est essentiel de vérifier, lors d'études de volontaires, si les glucocorticoïdes administrés se retrouvent sous forme conjuguée dans l'urine à l'aide d'une hydrolyse enzymatique. Si tel était le cas, les métabolites conjugués seraient analysés directement par CLHP/SM.

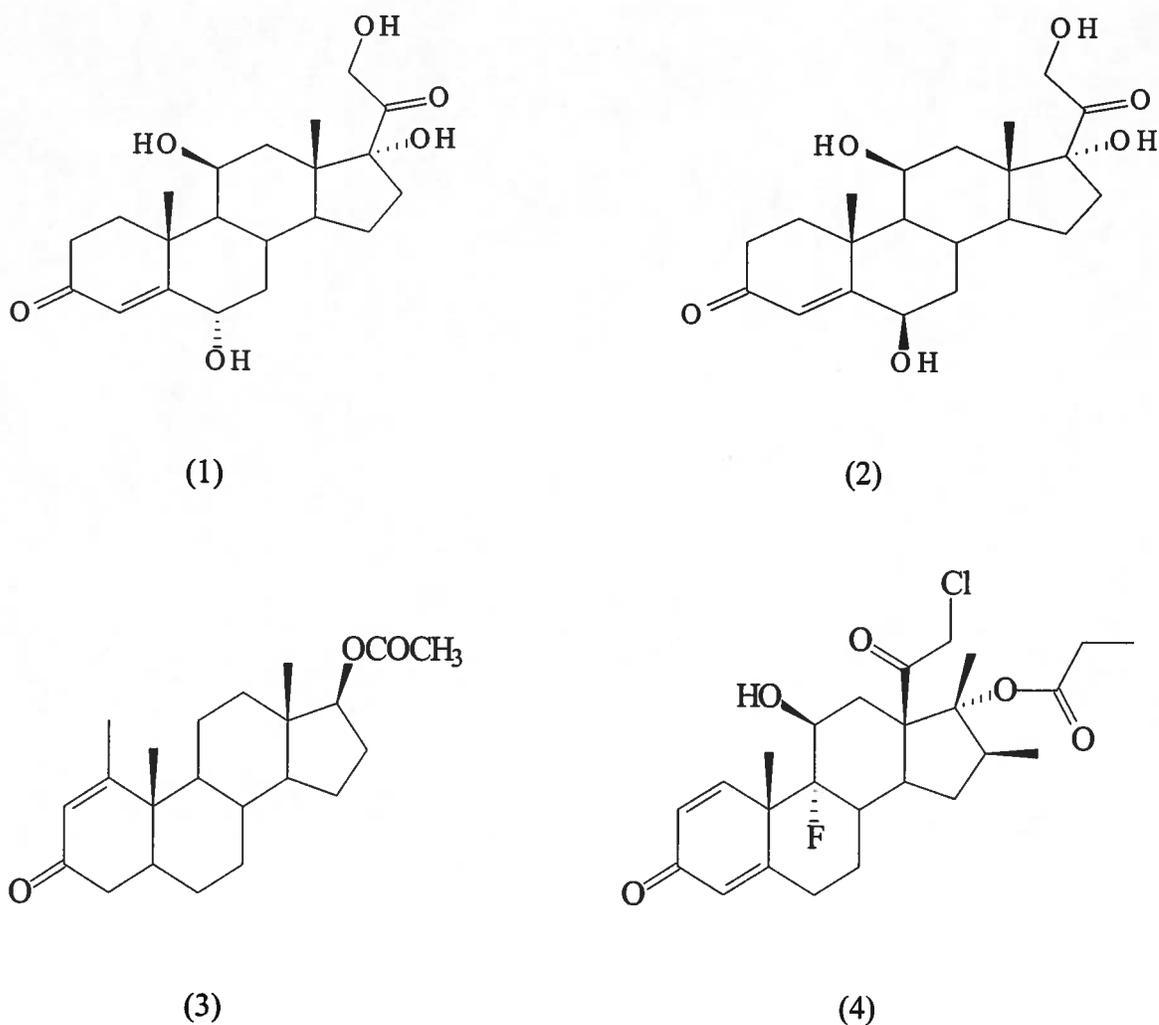
## CHAPITRE 2

### Matériel et Méthodes

#### 2.1 Séroïdes

La  $9\alpha$ -chloro- $16\beta$ -méthyl-pregna-1,4-dièn- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-dione (béclométhasone), la  $17\alpha$ -[butylidènebis(oxy)]pregna-1,4-dièn- $11\beta,21$ -diol-3,20-dione (budésouide), la  $16\alpha,17\alpha$ -[(1-méthyléthylidène)bis(oxy)]pregna-1,4-dièn- $11\beta,21$ -diol-3,20-dione (désouide), la 17-propionate-21-chloro- $9\alpha$ -fluoro- $11\beta,17\alpha$ -dihydroxy- $16\beta$ -méthylpregna-1,4-dièn-3,20-dione (propionate de clobétasol) (étalon externe) (voir figure 2.1 (4)), la 1,4-preg- $11\beta,17,20\beta,21$ -tétrol-3-one ( $20\beta$ -dihydroprednisolone), la pregn-4-ène- $6\alpha,11\beta,17,21$ -tétrol-3,20-dione ( $6\alpha$ -hydroxycortisol) (voir figure 2.1 (1)), la pregn-4-ène- $6\beta,11\beta,17,21$ -tétrol-3,20-dione ( $6\beta$ -hydroxycortisol) (voir figure 2.1 (2)) ont été achetées chez Steraloids Inc. (Newport, RI, USA). La  $9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -méthyl-pregna-1,4-dièn- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-dione (dexaméthasone), la  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- $16\alpha,17$ -[(méthyléthylidène)bis(oxy)]-pregna-1,4-dièn- $11\beta,21$ -diol-3,20-dione (acétonide de fluocinolone), la  $6\alpha,11\beta,16\alpha$ -6,9-difluoro- $11,21$ -dihydroxy- $16$ -méthylpregna-1,4-diène-3,20-dione (diflucortolone), la  $6\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -méthyl-pregna-1,4-dièn- $11\beta,21$ -diol-3,20-dione, la  $17\beta$ -acetoxy-1-méthyl- $5\alpha$ -androst-1-ène-3-one (acetate de méthénolone) (étalon interne) (voir figure 2.1 (3)), proviennent de chez Schering, (Berlin, Allemagne). La pregn-4-ène- $17\alpha,21$ -diol-3,11,20-trione (cortisone), la pregn-4-ène- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-trione (cortisol), ont été achetées chez Supelco (Oakville, Canada). La pregna-1,4-diène- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-dione (prednisolone), la pregna-1,4-diène- $17\alpha,21$ -diol-3,11,20-trione (prednisone), la  $6\beta,9\alpha$ -difluoro- $16\alpha$ -méthylpregna-1,4-diène- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-dione (fluméthasone), proviennent de chez Sigma-Aldrich, (Oakville, Canada). La 9-fluoro-pregna-1,4-diène- $11\beta,16\alpha,17\alpha,21$ -tétrol-3,20-dione (triamcinolone) a été achetée chez Cyanamid (USA). La  $6\alpha$ -méthyl-pregna-1,4-diène- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-dione (méthylprednisolone), la  $9\alpha$ -fluoro-pregna-4-ène- $11\beta,17\alpha,21$ -triol-3,20-dione

(fluorohydrocortisone) ont été achetées chez Upjohn (Kalamazoo, MI, USA). La 9 $\alpha$ -fluoro-16 $\beta$ -méthyl-pregna-1,4-diène-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dione (bétaméthasone) a été achetée chez Glaxo (Brentford, England). La 9-fluoro-16 $\alpha$ ,17-[(méthyléthylidène)bis(oxy)]-pregna-1,4-diène-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-dione (acétonide de triamcinolone) provient de chez Lederle Labs. (Rochester, NY, USA). La 6 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -[(1-méthyléthylidène)bis(oxy)]pregna-1,4-diène-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-dione (flunisolide) a été achetée chez Syntex (Palo Alto, CA, USA).



**Figure 2.1 : Structures des 6 $\alpha$ -hydroxycortisol (1), 6 $\beta$ -hydroxycortisol (2), acétate de méthénolone (étalon interne) (3), propionate de clobétasol (étalon externe) (4).**

## 2.2 Produits chimiques et biologiques

Le méthanol, l'acétonitrile, l'hexane, l'éther diéthylique, l'acide acétique glacial, l'acétate d'ammonium proviennent de chez Caledon (Montréal, Canada). L'éther et l'hexane sont de qualité « distillée sur verre », alors que les autres solvants sont de qualité CLHP. L'acétate de sodium, le bicarbonate de sodium et le phosphate de sodium dibasique ont été achetés chez Fisher Scientific (Montréal, Canada). Le phosphate de sodium monobasique provient de chez VWR (Canada). Le carbonate de sodium a été acheté chez Mallinckrodt (Paris, KY, USA). L'eau a été purifiée par osmose inverse et filtrée par un système Milli-Q avant son utilisation (Millipore, Mississauga, Canada). L'azote de qualité zéro provient de chez Air Liquide Canada (Montréal, Canada). L'enzyme  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*, type IX-A, sous forme lyophilisée et contenant de 1 500 000 à 2 000 000 U/g d'activité  $\beta$ -glucuronidase, a été achetée chez Sigma (St-Louis, MO, USA). Les cartouches Sep-Pak tC18 utilisées proviennent de chez Waters (Milford, MA, USA).

## 2.3 Préparation des tampons et des solutions

### 2.3.1 Tampon acétate 0.1 M (pH 5.2)

Le tampon acétate est préparé à partir de deux solutions diluées, solution A : acide acétique (0.2 M) et solution B : acétate de sodium (0.2 M). La solution A est faite en ajoutant 11.55 mL d'acide acétique glacial à de l'eau déionisée dans un ballon volumétrique de 1000 mL. La solution B est préparée par l'addition de 16.4 g d'acétate de sodium à de l'eau déionisée dans un ballon volumétrique de 1000 mL. Finalement, le tampon acétate est réalisé en ajoutant 105 mL de la solution A à 395 mL de la solution B, puis de l'eau déionisée est ajoutée afin d'obtenir 1000 mL de solution. Le pH est ensuite vérifié et ajusté, si nécessaire, afin d'obtenir pH = 5.2.

### 2.3.2 Tampon phosphate (pH 6.9)

Le tampon phosphate est préparé en ajoutant 6.21 g de phosphate de sodium monobasique à 7.81 g de phosphate de sodium dibasique dans un ballon volumétrique de 1000 mL puis en jaugeant avec de l'eau déionisée. Le pH est ensuite vérifié et ajusté, si nécessaire, afin d'obtenir pH = 6.9.

### 2.3.3 Tampon carbonate (pH 9)

Le tampon carbonate est réalisé en ajoutant 16.8 g de bicarbonate de sodium et 5.3 g de carbonate de sodium dans un ballon volumétrique de 250 mL puis en jaugeant avec de l'eau déionisée. Le pH est ensuite vérifié et ajusté, si nécessaire, afin d'obtenir pH = 9.

### 2.3.4 Tampon acétate d'ammonium 1mM

Ce tampon, utilisé pour la séparation chromatographique, est préparé en ajoutant 38.5 mg d'acétate d'ammonium dans un ballon volumétrique de 500 mL puis en jaugeant avec de l'eau déionisée. La solution doit ensuite être filtrée. Aucun ajustement de pH est nécessaire.

## 2.4 Procédure d'extraction des glucocorticoïdes de l'urine

### 2.4.1 Extraction sur phase solide des stéroïdes libres

5 mL d'urine sont prélevés et déposés dans un tube contenant 2.5 mL de tampon acétate 0.1 M (pH 5.2) et 2 ng d'acétate de méthénolone (étalon interne). La solution est alors passée sur une cartouche Sep-Pak tC18 préalablement rincée avec 5 mL de méthanol puis 5 ml d'eau déionisée. La cartouche est ensuite rincée avec 5 mL d'eau déionisée puis 3

mL d'hexane, les analytes sont finalement élués avec 5 mL de méthanol. La solution ainsi recueillie est évaporée à sec sous jet d'azote. Le culot est dissous dans 1 mL de tampon phosphate (pH 6.9).

#### 2.4.2 Hydrolyse

Une hydrolyse enzymatique est nécessaire pour vérifier si les glucocorticoïdes analysés lors d'études de volontaires se retrouvent dans l'urine sous forme conjuguée à l'acide glucuronique. Si tel est le cas, les métabolites conjugués seront analysés ultérieurement directement par CLHP/SM. Cette étape est réalisée en ajoutant environ 1200 unités de  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli* (solution fraîchement préparée par l'addition de 0.7 mg de  $\beta$ -glucuronidase à 50  $\mu$ L de tampon phosphate 0.1 M (pH 6.9) pour chaque échantillon étudié) au résidu obtenu précédemment. Le mélange réactionnel est alors incubé à 50 °C pendant 1 heure.

#### 2.4.3 Extraction liquide-liquide

400  $\mu$ L de tampon carbonate 1.0 M (pH 9) et 5 mL d'éther diéthylique sont ajoutés à la solution aqueuse obtenue suite à l'extraction en phase solide, ou celle récupérée après l'incubation (si une hydrolyse enzymatique a été effectuée). Après avoir été agitée et centrifugée, la phase organique est extraite. 1 ng de propionate de clobétasol (étalon externe) est ajouté à cette phase organique qui est ensuite évaporée à sec sous jet d'azote.

Le culot est repris dans un mélange constitué de 80  $\mu$ L d'acétonitrile et de 320  $\mu$ L de tampon acétate d'ammonium 1 mM (pH 6.4), ce mélange ayant la même composition que la phase mobile initiale utilisée lors de la chromatographie liquide (CLHP). Ceci est nécessaire pour obtenir une bonne séparation chromatographique.

## 2.5 CLHP / SM

### 2.5.1 Chromatographie liquide de haute performance

Un système CLHP/SM de marque Agilent Technologies modèle 1100 a été utilisé. Le chromatographe liquide est équipé d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV à barrette de diodes. Une colonne de type Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> de 4.6 mm de diamètre interne, de 150 mm de longueur et contenant des particules ayant un diamètre de 3.5 microns, provenant de chez Agilent Technologies (Palo-Alto, CA, USA) est utilisée pour la séparation des analytes. La température de la colonne est maintenue à 25 °C. La phase mobile est constituée de tampon acétate d'ammonium 1mM et d'acétonitrile dont les proportions varient durant l'analyse de 35% à 55% (en 12 min.) puis à 90% (en 17 min.) cette concentration est maintenue pour les 5 dernières minutes de l'analyse. La durée totale d'analyse, incluant le temps de recyclage (6 min.), est de 28 min. Le volume d'injection est de 20 µL. Le débit de la phase mobile est maintenu à 0.75 mL/min. La longueur d'onde d'absorption utilisée est de 246 nm.

### 2.5.2 Spectrométrie de masse

La source utilisée pour l'ionisation est l'ICPA (ionisation chimique à pression atmosphérique). Le nébuliseur est maintenu à une pression de 60 psig (Pounds Per Square Inch Gauge) et à une température de 350°C. L'élément chauffant est maintenu à une température de 400 °C. Le gaz asséchant utilisé est l'azote et circule à un débit de 5 L/min. L'aiguille corona génère une décharge de 4 µA. Le capillaire est maintenu à un voltage de 3000 V. Les glucocorticoïdes ont été analysés en mode d'ionisation positif. L'analyseur de masse est un filtre quadripolaire. Le détecteur sélectif de masse est utilisé en mode de balayage d'ions sélectionnés (SIM) ou complet (full scan mode).

Durant l'analyse, le voltage du fragmenteur est varié en fonction du glucocorticoïde analysé. La plupart des molécules analysées répondent bien à un voltage de 200 V. Seuls

l'acétonide de triamcinolone, le désónide, le flunisolide, la difluocortolone, le propionate de clobétasol (étalon externe) et l'acétate de méthénolone (étalon interne) nécessitent que le voltage du fragmenteur soit baissé à 175 V.

## 2.6 Courbes d'étalonnage

Des solutions stock de tous les glucocorticoïdes étudiés (acétonide de fluocinolone, acétonide de triamcinolone, béclométhasone, bétaméthasone, budésónide, cortisol, cortisone, désónide, dexaméthasone, difluocortolone, 20 $\beta$ -dihydroprednisolone, fluméthasone, flunisolide, fluocortolone, fluorohydrocortisone, 6 $\alpha$ -hydroxycortisol, 6 $\beta$ -hydroxycortisol, méthylprednisolone, prednisolone, prednisone, triamcinolone) ainsi que des étalons interne et externe (acétate de méthénolone, propionate de clobetasol) ont été préparées dans le méthanol, à des concentrations de 10 et 100 ng/ $\mu$ L et gardées à -20 °C. Le dosage des corticoïdes a été effectué par référence à des courbes étalons qui ont été préparées de la façon suivante : des séries de dilution ont été effectuées pour chaque solution stock de glucocorticoïdes, afin d'obtenir des solutions de concentrations finales allant de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L. 5 mL d'urine vierge ont été dopés avec ces solutions dans le but d'obtenir, pour chaque corticoïde, une courbe étalon de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L. Ces échantillons urinaires sont alors extraits selon la procédure décrite précédemment (section 2.3) et analysés par CLHP/SM en mode de balayage d'ions sélectionnés (SIM). La quantification est réalisée par l'obtention du rapport des surfaces sous les pics chromatographiques des ions sélectionnés pour l'analyte et l'étalon externe (propionate de clobétasol).

Le tableau II résume les différents ions (m/z) utilisés pour le dosage des glucocorticoïdes ainsi que les équations des régressions linéaires obtenues pour chacune des courbes étalons.

**Tableau II : Poids moléculaires, ions les plus abondants (m/z) servant à la quantification et équations des régressions linéaires ( $y = mx + b$ ) (concentrations de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L) des glucocorticoïdes étudiés.**

Glucocorticoïdes	Poids moléculaire	Ions les plus abondants (m/z)	m	b	r <sup>2</sup>
6 $\alpha$ -hydroxycortisol	378	379	4.66x10 <sup>-2</sup>	1.66x10 <sup>-2</sup>	0.999
Triamcinolone	394	375	6.72x10 <sup>-1</sup>	-8.23x10 <sup>-1</sup>	0.985
Acétonide de triamcinolone	434	435	1.73	-4.09x10 <sup>-1</sup>	0.999
20 $\beta$ -dihydroprednisolone	362	327	4.41x10 <sup>-1</sup>	-8.86x10 <sup>-3</sup>	0.999
Prednisolone	360	343	8.10x10 <sup>-1</sup>	-3.34x10 <sup>-1</sup>	0.997
Prednisone	358	359	1.24	-4.44x10 <sup>-1</sup>	0.993
Cortisol	362	363	4.35x10 <sup>-1</sup>	1.14x10 <sup>-1</sup>	0.999
Cortisone	360	361	2.73x10 <sup>-1</sup>	-6.11x10 <sup>-2</sup>	0.994
Fluorohydrocortisone	380	381	1.75x10 <sup>-1</sup>	-1.20x10 <sup>-1</sup>	0.998
Méthylprednisolone	374	339	1.01	1.12x10 <sup>-1</sup>	0.999
Bétaméthasone	392	373	1.33	1.29x10 <sup>-2</sup>	0.999
Dexaméthasone	392	373	1.29	5.60x10 <sup>-1</sup>	0.999
Fluméthasone	410	411	3.14x10 <sup>-1</sup>	1.76x10 <sup>-2</sup>	0.999
Béclométhasone	408	391	5.73x10 <sup>-1</sup>	2.91x10 <sup>-2</sup>	0.999
Désonide	416	417	1.78	4.72x10 <sup>-1</sup>	0.999
Flunisolide	434	435	1.06	9.40x10 <sup>-2</sup>	0.999
Acétonide de fluocinolone	452	453	6.84x10 <sup>-1</sup>	6.55x10 <sup>-2</sup>	0.999
Fluocortolone	376	339	4.93x10 <sup>-1</sup>	-4.75x10 <sup>-1</sup>	0.995
Diflucortolone	394	395	9.93x10 <sup>-1</sup>	-5.25x10 <sup>-2</sup>	0.999
Budésonide (1 <sup>er</sup> pic)	430	413	7.54x10 <sup>-1</sup>	-5.39x10 <sup>-2</sup>	0.999
Budésonide (2 <sup>e</sup> pic)	430	413	7.44x10 <sup>-1</sup>	-4.36x10 <sup>-2</sup>	0.999
Acétate de méthénolone (étalon interne)	344	345	---	---	---
Propionate de clobétasol (étalon externe)	466	467	---	---	---

## 2.7 Pourcentages de récupération

Les taux de récupération de chacun des stéroïdes étudiés ont été vérifiés à plusieurs reprises en utilisant les urines dopées à des concentrations allant de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L. Ces pourcentages ont été déterminés en comparant l'abondance des pics après extraction à celle des standards injectés directement. Pour ce faire, on utilise :

$$(S_x / S_{\text{ext}})_{\text{extrait}} / (S_x / S_{\text{ext}})_{\text{non-extrait}}$$

Où  $S_x$  = surface du pic de l'analyte ;  $S_{\text{ext}}$  = surface du pic de l'étalon externe (propionate de clobétasol).

## 2.8 Limites de détection

Les limites de détection pour chacun des glucocorticoïdes ont été déterminées en considérant les concentrations requises pour l'obtention d'un pic pour l'ion de plus faible abondance d'un rapport signal/bruit (S/N) supérieur ou égal à 3. Les limites de détection varient selon la matrice urinaire sélectionnée, c'est pourquoi nous avons répété ces déterminations en dopant trois urines vierges de différentes origines, soit celle d'un enfant pré-pubère (agé de 6 ans), d'une femme adulte et d'un homme adulte.

## CHAPITRE 3

### Résultats et discussion

#### 3.1 Introduction

Ce projet portant sur la mise au point d'une méthode analytique permettant la détection et l'identification de métabolites urinaires de glucocorticoïdes est divisé en trois parties. Tout d'abord, une méthode analytique basée sur l'utilisation de la combinaison CLHP/SM a été développée pour permettre l'étude des stéroïdes en question. En second lieu, une procédure pour l'extraction des glucocorticoïdes étudiés de l'urine a été optimisée. Finalement, deux études ont été réalisées sur des échantillons recueillis auprès de volontaires ayant pris une dose unique par voie orale de prednisolone et de prednisone.<sup>1</sup>

#### 3.2 Méthode CLHP/SM

##### 3.2.1 Source d'ionisation

Les tentatives de couplage de la chromatographie liquide haute performance à la spectrométrie de masse ont débuté dans les années 1970 (Niessen, 1999). Ce couplage s'est avéré problématique pour plusieurs raisons. Au niveau instrumental, la difficulté consistait à rendre compatible un analyseur de masse fonctionnant sous vide avec une pompe CLHP. Au niveau analytique, il était nécessaire de combiner la CLHP qui s'adresse à des substances peu ou pas volatiles et souvent thermolabiles avec la SM qui

---

<sup>1</sup> Pour des raisons médicales, consentements éclairés obtenus.

nécessite, au contraire, de produire des ions en phase gazeuse, souvent par apport thermique. Plusieurs interfaces ont alors été développées pour permettre d'ioniser et d'évaporer les analytes provenant de l'effluent du chromatographe CLHP avant qu'ils n'entrent dans le spectromètre de masse, tout en éliminant le solvant de la phase mobile.

De nos jours, les deux interfaces/sources les plus utilisées sont les sources d'ionisation à pression atmosphérique (IPA), soit l'électronébulisation (électrospray, ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (ICPA). Ces sources d'ionisation ont fait leur apparition dans les années 1990 (voir figure 3.1). Plusieurs systèmes CLHP/SM sont fabriqués de manière à ce que ces deux interfaces soient interchangeables facilement (Niessen, 1999 ; Willoughby, Sheehan et Mitrovich, 2002).

L'électronébulisation consiste en la désolvatation d'ions générés sous l'influence d'un champ électrique intense appliqué à la surface d'un liquide. L'échantillon en solution provenant du CLHP doit avoir un faible débit (1-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Un aérosol est formé à la sortie d'une aiguille métallique maintenue à un potentiel d'environ 4 à 5 kV (nébuliseur). Dans ces conditions de haut champ et à pression atmosphérique, les gouttelettes de l'aérosol se chargent. Sous le mode d'utilisation positif, les ions chargés positivement migrent à la surface des gouttelettes alors que les ions chargés négativement induisent une réaction d'oxydation à la surface de l'aiguille. Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, aidé par un jet d'azote, les forces de répulsion coulombiennes deviennent proches de la tension de surface assurant la cohésion des gouttelettes. Une fois cette limite atteinte, les gouttelettes explosent en gouttelettes de plus petite taille. D'explosion en explosion, les ions désolvatés sont finalement émis en phase gazeuse. Enfin, ces ions sont attirés dans le capillaire par une différence de potentiel, sont ensuite focalisés par la lentille tubulaire puis transmis par l'octapôle vers l'analyseur de masse.

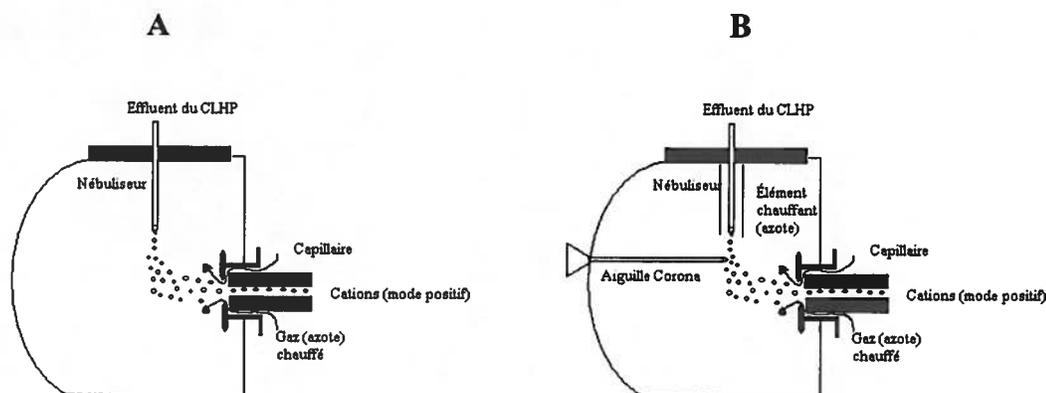
L'ionisation chimique à pression atmosphérique (ICPA) s'appuie sur l'interaction entre un ion réactant et une molécule cible. Tout comme en électronébulisation, un aérosol est formé à la sorti du nébuliseur. Par contre, l'éluant du CLHP est chauffé et un jet d'azote, permet d'évaporer la majeure partie de la phase mobile. Une aiguille corona est utilisée

afin de générer des électrons qui initient la chaîne de réactions chimiques qui produit l'ionisation. La formation des ions pseudomoléculaires peut être résumée ainsi :



À la suite de ces réactions, le reste de la phase mobile est enlevé à l'aide d'azote. Les ions, finalement attirés dans le capillaire grâce à une différence de potentiel, sont focalisés par la lentille tubulaire pour ensuite être transmis par l'octapôle vers l'analyseur de masse, comme en électronebulisation.

L'électronebulisation et l'ICPA se font à pression atmosphérique. Cependant, en ICPA, il y a évaporation avant l'ionisation, ce qui n'est pas le cas en électronebulisation (Niessen, 1999 ; Willoughby, Sheehan et Mitrovich, 2002). Les deux sources sont schématisées à la figure 3.1 suivante :



**Figure 3.1 : Schémas des deux sources d'ionisation à pression atmosphérique : A) électronebulisation, B) ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).**

Nous avons comparé l'efficacité des deux sources compatibles avec le système CLHP/SM utilisé. Avec la source d'électronebulisation, il est essentiel d'utiliser une petite colonne (3.0 x 150 mm) car un faible débit d'éluant est indispensable (1-10

$\mu\text{L}/\text{min}$ ). Toutefois, grâce à la nébulisation pneumatique présente dans la source utilisée, il est possible d'augmenter le débit quelque peu, soit à un maximum de 1 mL/min (Niessen, 1999 ; Agilent Technologies, 2000 ; Willoughby, Sheehan et Mitrovich, 2002). Ce mode d'ionisation a donc été testé avec des standards authentiques de divers glucocorticoïdes, en mode positif et négatif. Il a été noté que le mode négatif était plus sensible que le mode positif.

Par contre, le mode ICPA positif s'est avéré le plus efficace pour les molécules étudiées. En effet, l'ICPA en mode positif permet d'obtenir des signaux de réponse élevés pour tous les glucocorticoïdes d'intérêt. Ce qui confirme des observations également rapportées dans la littérature (Savu et al., 1996 ; Marquet et Lachâtre, 1999 ; Stolker et al., 2000).

Il a aussi été démontré que l'électronébulisation était plus propice aux molécules ionisables de faible et de haut poids ; alors que l'ICPA convenait aux molécules ionisables, polaires ou non. Ceci rend donc cette dernière technique particulièrement intéressante pour les applications pharmaceutiques (Willoughby, Sheehan et Mitrovich, 2002).

### **3.2.2 Paramètres chromatographiques et spectrométriques**

Après avoir été séparés par chromatographie liquide, les glucocorticoïdes sont évaporés et ionisés (par la source d'ionisation) pour finalement être analysés par spectrométrie de masse. Les temps de rétention ainsi que les ions choisis pour effectuer la quantification et l'identification sont présentés au tableau III.

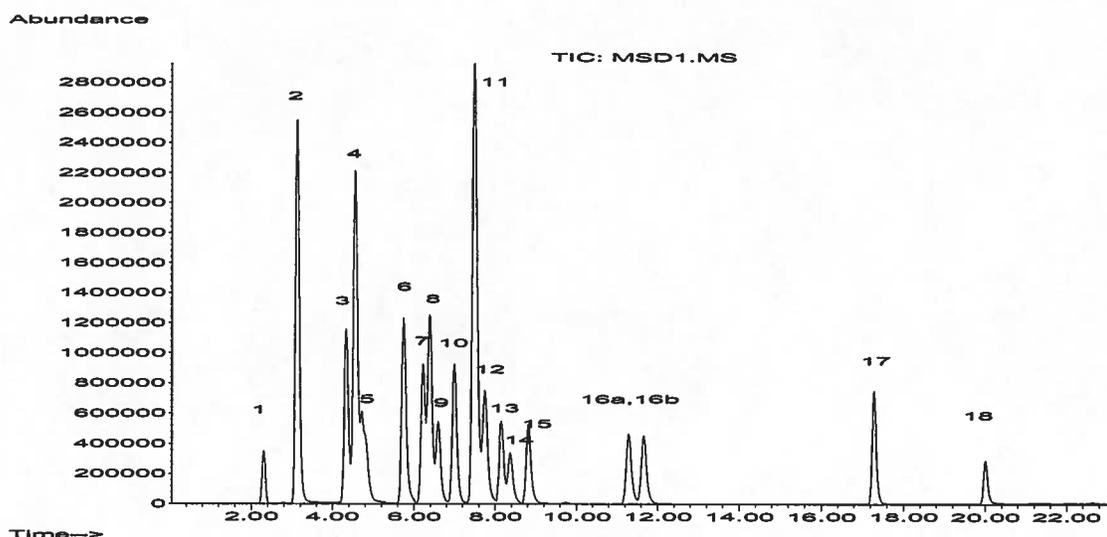
**Tableau III : Paramètres de l'analyse CLHP/SM : temps de rétention relatifs et ions choisis pour le dosage et l'identification.**

Glucocorticoïdes	t <sub>R</sub> absolu	t <sub>R</sub> relatif <sup>1</sup>	Ion utilisé pour la quantification (m/z)	Ions utilisés pour l'identification (m/z)	
6α-hydroxycortisol	2.2 – 2.3	0.12	379.2	343.2	361.2
6β-hydroxycortisol	2.2 – 2.3	0.12	379.2	343.2	361.2
Triamcinolone	3.0 – 3.1	0.16	375.2	357.2	395.1
20β-dihydroprednisolone	3.0 – 3.1	0.16	327.2	309.2	267.2
Prednisolone	4.2 – 4.3	0.22	343.2	325.1	283.2
Cortisol	4.5 – 4.6	0.23	363.2	364.2	303.2
Prednisone	4.5 – 4.6	0.23	359.2	341.2	360.2
Cortisone	4.8 – 4.9	0.24	361.2	362.1	301.1
Fluorohydrocortisone	4.8 – 4.9	0.24	381.1	267.2	343.2
Méthylprednisolone	5.7 – 5.8	0.29	339.2	357.2	297.1
Bétaméthasone	6.2 – 6.3	0.31	373.2	355.2	337.2
Dexaméthasone	6.4 – 6.5	0.32	373.1	355.2	337.2
Fluméthasone	6.6 – 6.7	0.33	411.2	391.2	335.1
Béclométhasone	7.0 – 7.1	0.35	391.2	393.2	355.2
Acétonide de triamcinolone	7.5 – 7.6	0.37	435.2	415.2	339.1
Désonide	7.5 – 7.6	0.37	417.2	399.2	341.2
Flunisolide	7.8 – 7.9	0.39	435.2	339.1	415.2
Acétonide de fluocinolone	8.2 – 8.3	0.41	453.2	433.2	337.2
Flucortolone	8.3 – 8.4	0.42	339.2	377.2	359.2
Diflucortolone	8.7 – 8.8	0.44	395.2	375.2	355.2
Budésonide	11.4 – 11.5	0.56 / 0.58	413.2	323.2	431.2
	11.7 – 11.9				
Propionate de Clobétasol (SE)	17.3	0.86	467.2	373.2	355.1
Acétate de méthénolone (SI)	20.0	1	345.2	285.2	383.3

<sup>1</sup> Par rapport au SI, t<sub>R</sub> = 1 min

Dans le but de développer une méthode analytique pour détecter l'utilisation de glucocorticoïdes par des athlètes, il est indispensable de répondre aux critères de l'AMA. En premier lieu, la méthode utilisée doit permettre la détection d'une dizaine de substances en concentration de 30 ng/mL, ce qui ne requiert pas une très grande sensibilité. Par ailleurs, les critères édictés d'identification reposent sur la présence d'un minimum de trois ions caractéristiques dont l'abondance relative doit être similaire à celle du standard authentique. La méthode développée doit donc favoriser l'identification formelle, ce qui induit une fragmentation plus importante au détriment de l'intensité de l'ion pseudomoléculaire.

On peut remarquer que certains glucocorticoïdes ne sont pas résolus chromatographiquement, tels les couples suivants : le  $6\alpha$ -hydroxycortisol et le  $6\beta$ -hydroxycortisol, la triamcinolone et la  $20\beta$ -dihydroprednisolone, le cortisol et la prednisone, la cortisone et la fluorohydrocortisone, l'acétonide de triamcinolone et le désónide (voir figure 3.2). Ces molécules peuvent toutefois être facilement identifiées grâce à leurs spectres de masse différents.



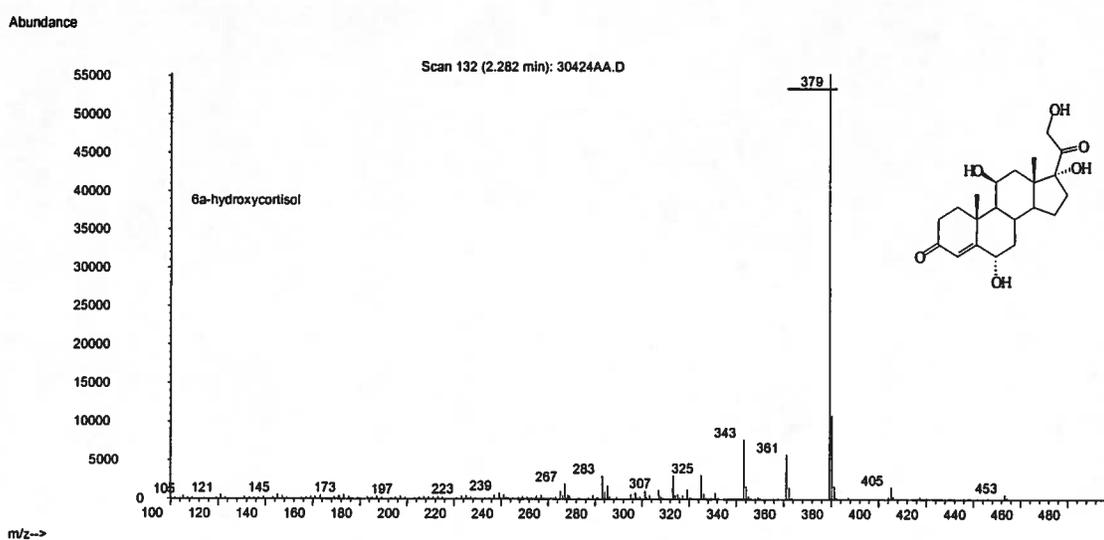
**Figure 3.2 : Chromatogramme ionique total de l'analyse CLHP/SM en mode SIM d'un mélange de standards authentiques de chacun des glucocorticoïdes étudiés ainsi que des étalons interne et externe (10 ng/ $\mu$ L). Pics 1 : 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ -hydroxycortisol ; 2 : Triamcinolone/20 $\beta$ -dihydroprednisolone ; 3 : Prednisolone ; 4 : Cortisol/Prednisone ; 5 : Cortisone/Fluorohydrocortisone ; 6 : Méthylprednisolone ; 7 : Bétaméthasone ; 8 : Dexaméthasone ; 9 : Fluméthasone ; 10 : Bécloéthasone ; 11 : Acétonide de triamcinolone/Désonide ; 12 : Flunisolide ; 13 : Acétonide de fluocinolone ; 14 : Fluocortolone ; 15 : Diflucortolone ; 16a, 16b : Budésonide (2 pics) ; 17 : Propionate de clobétasol (SE) ; 18 : Acétate de méthénolone (SI).**

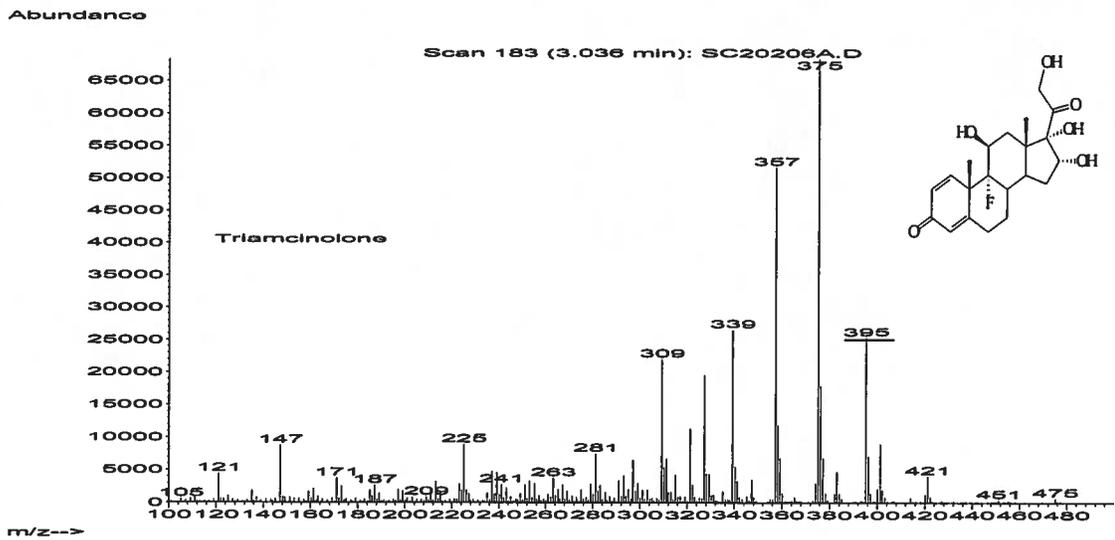
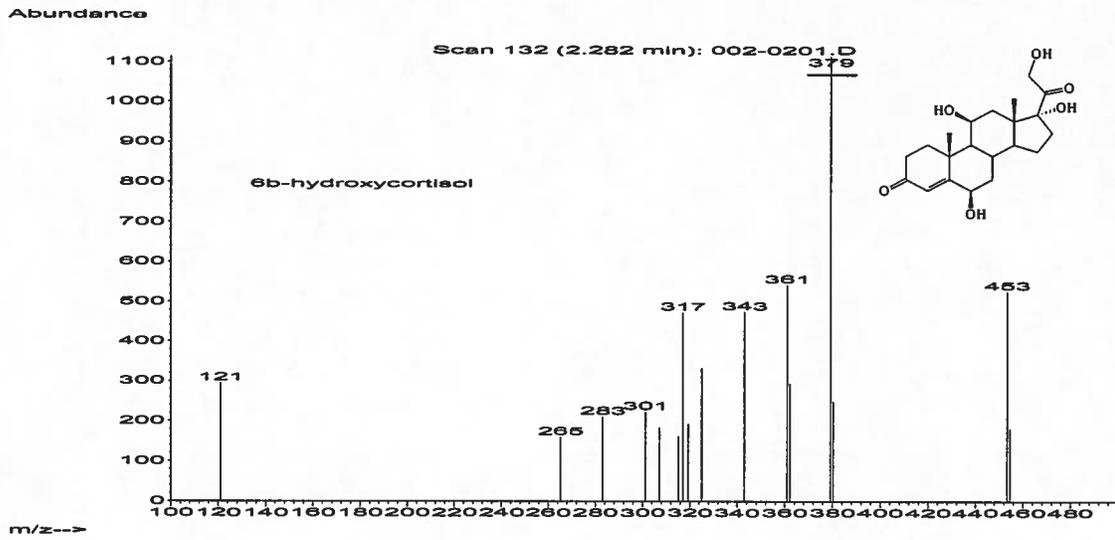
Deux pics sont obtenus pour le budésonide qui est en fait un mélange de deux énantiomères, soient le 22R et le 22S, dans un rapport d'environ 1 : 1 (Roth et al., 1980 ; Lindberg, Paulson et Edsbäcker, 1987). Comme ces deux stéréoisomères diffèrent en polarité, ils sont donc séparés par la colonne chromatographique. Le 22R serait plus polaire, donc élué le premier. De plus, son efficacité thérapeutique serait de deux à trois fois supérieure à celle de l'isomère 22S (Li et al., 1996 ; Volmer et Hui, 1997). Le groupe de Ryrfeldt (Ryrfeldt, Edsbäcker et Pauwels, 1984) a démontré que l'épimère 22R était biotransformé environ deux fois plus rapidement que l'épimère 22S par le foie. Il a également été prouvé que le volume de distribution de l'énantiomère 22R était presque

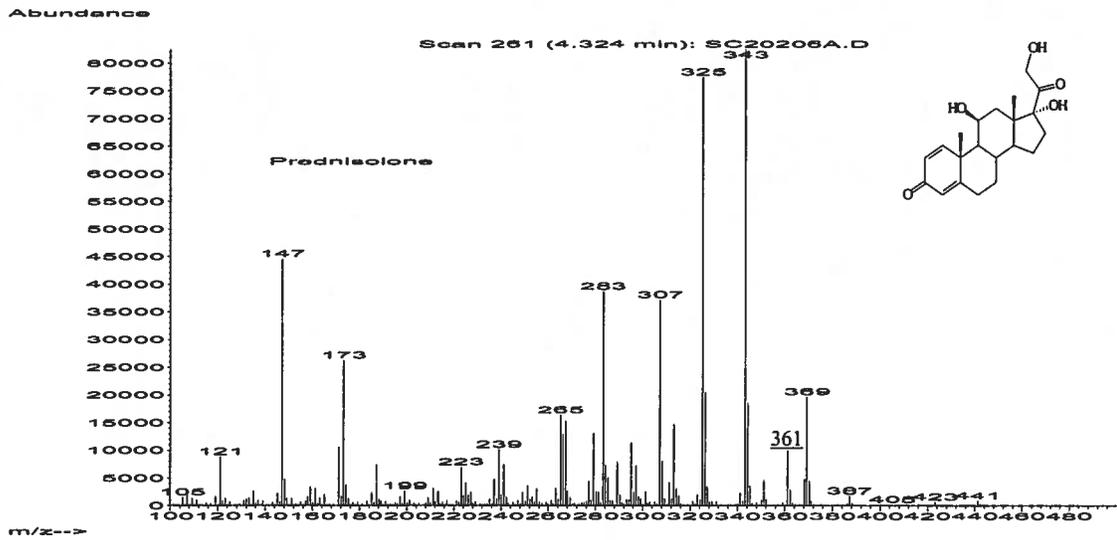
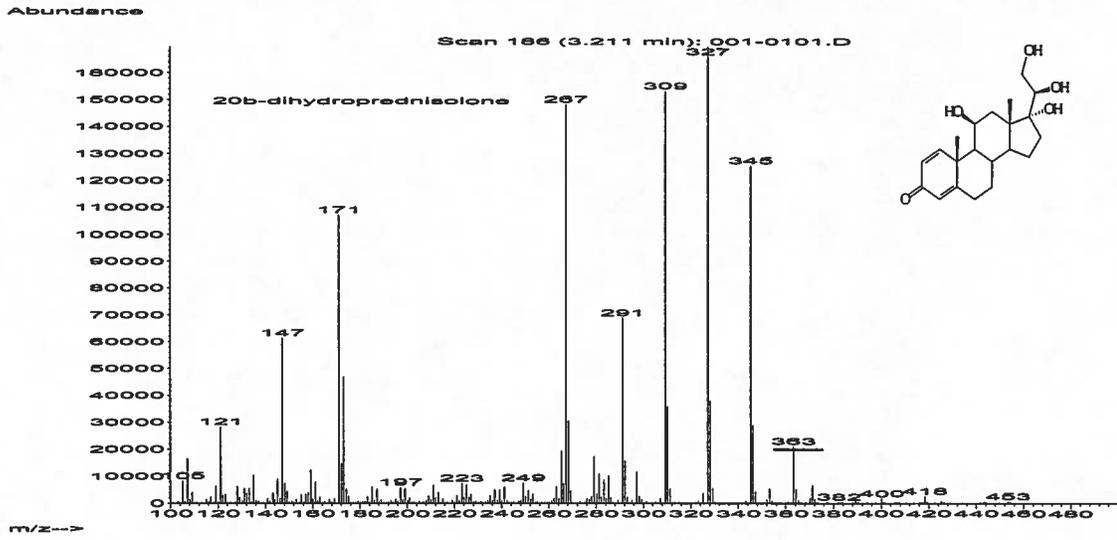
deux fois plus grand que celui de l'énantiomère 22S. Ceci pourrait être expliqué par la supériorité de l'affinité pour les tissus de l'épimère 22R.

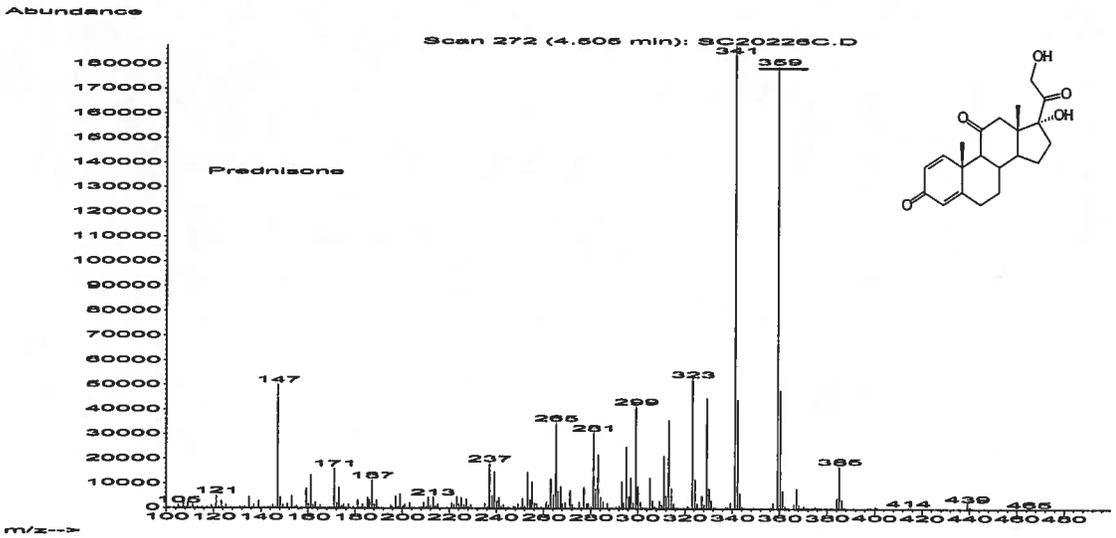
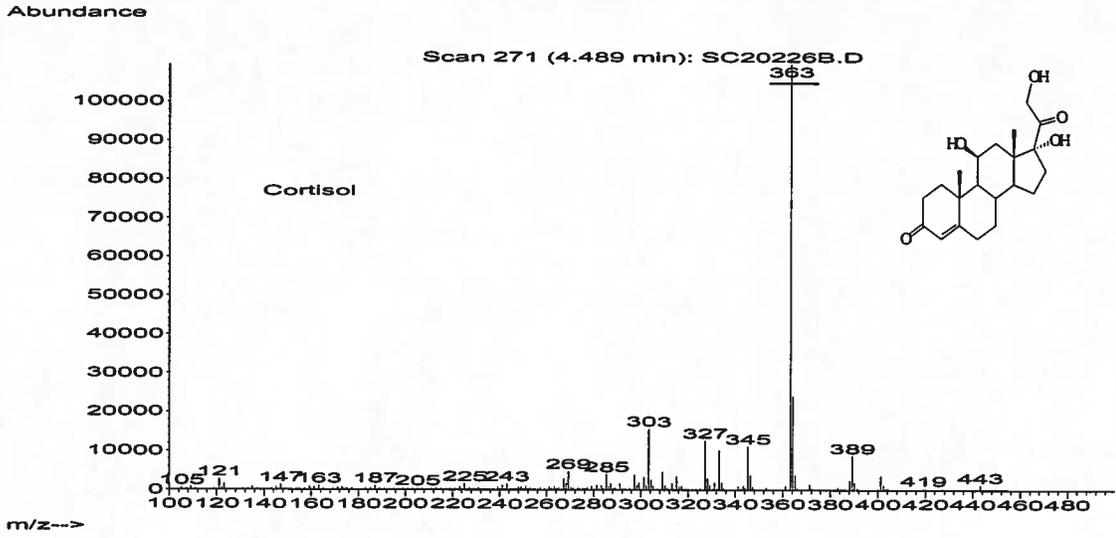
### 3.2.3 Spectres de masse obtenus

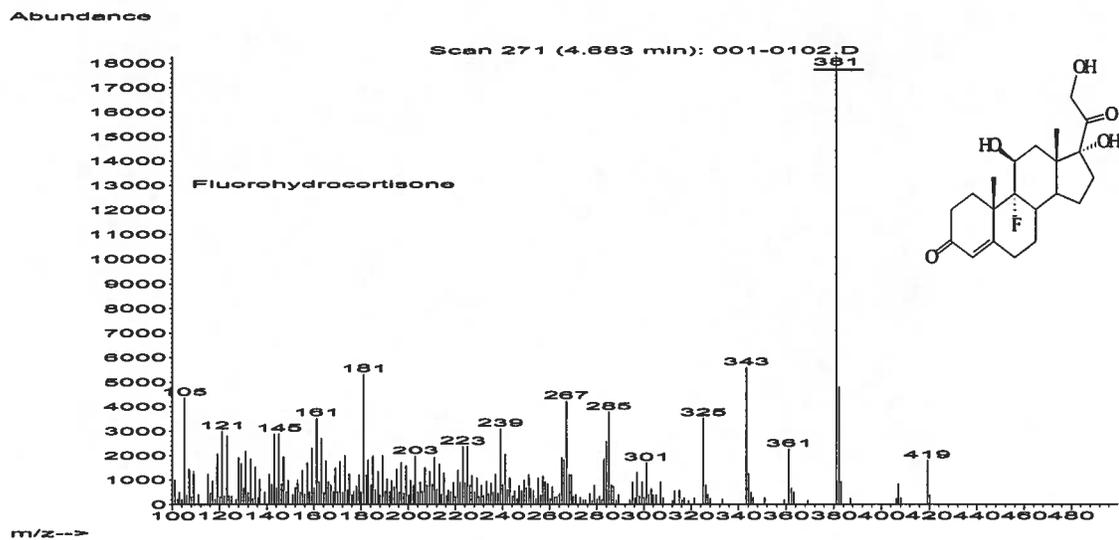
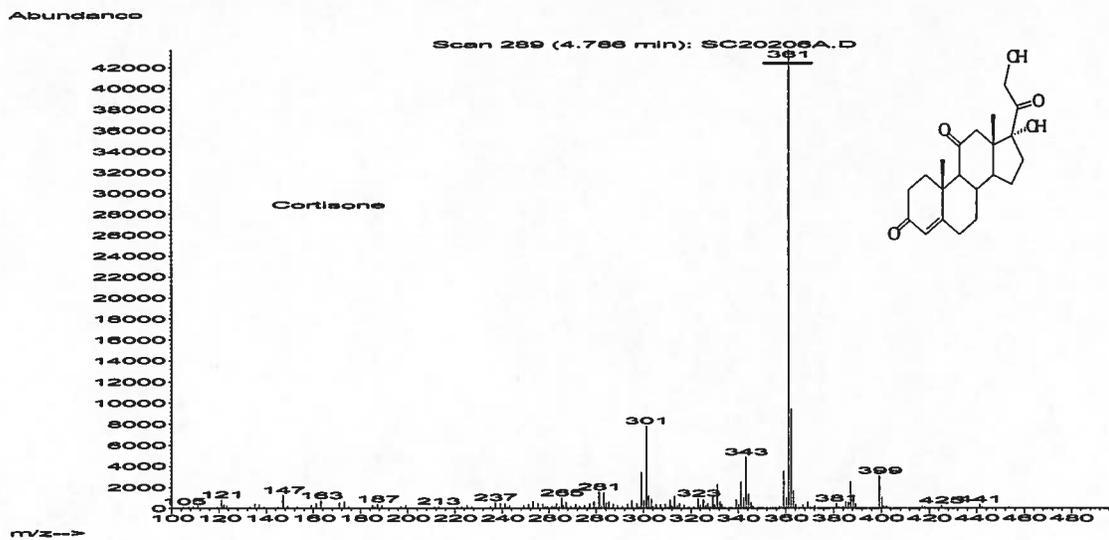
Les spectres de masse obtenus (mode APCI) pour chacun des glucocorticoïdes étudiés, ainsi que pour les standards interne et externe sont présentés ci-dessous.

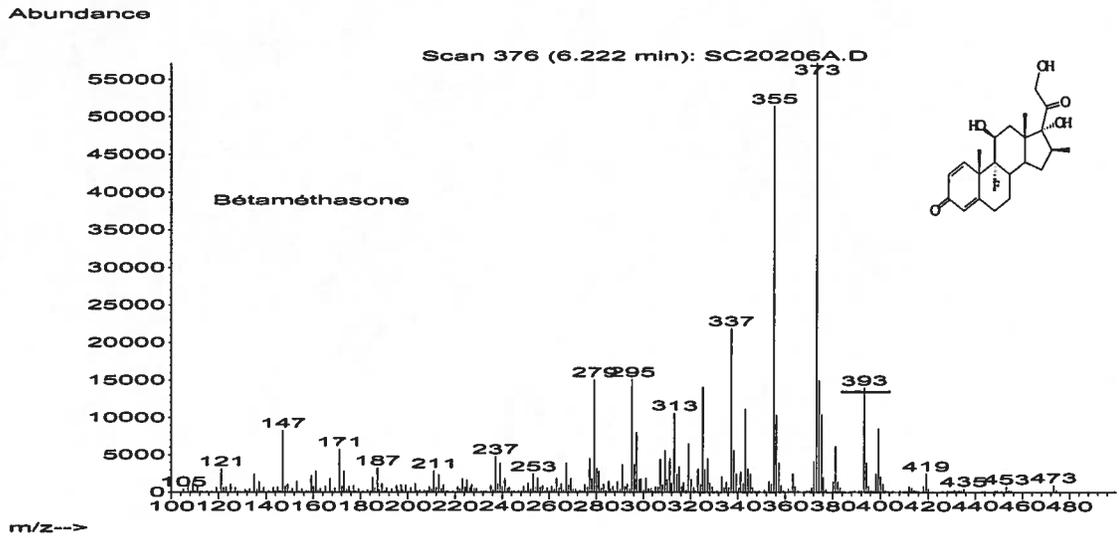
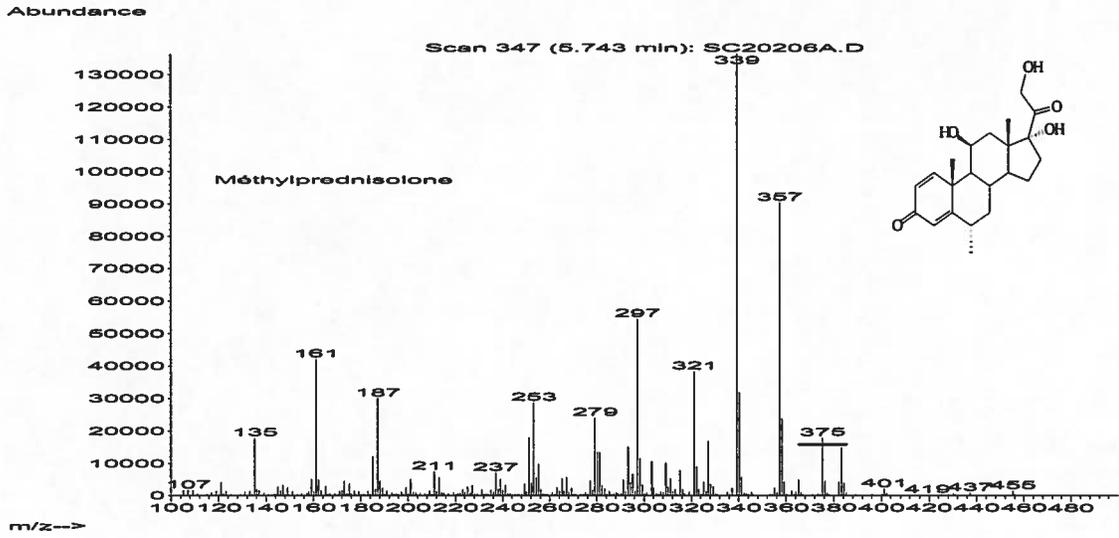


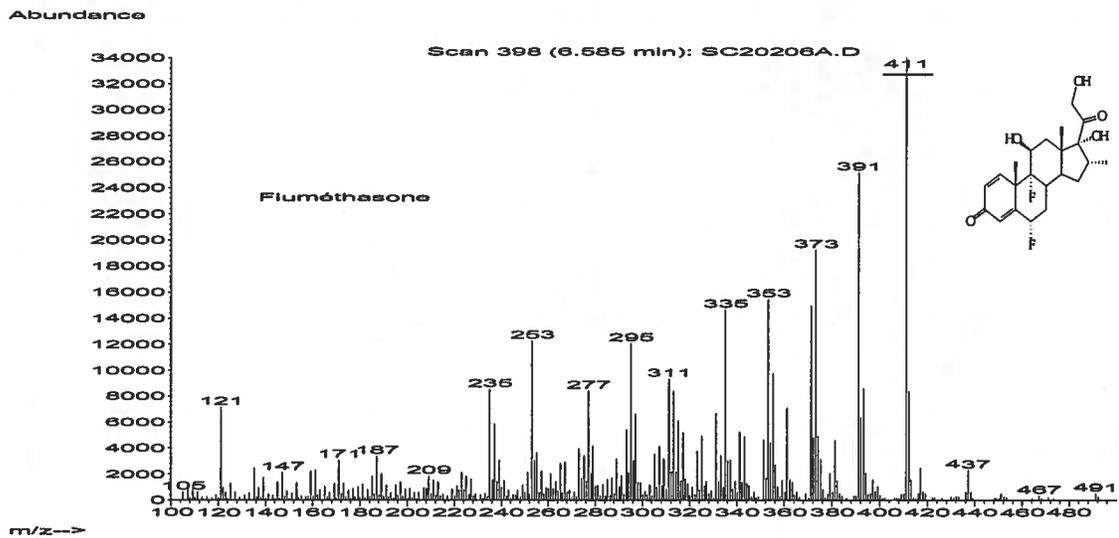
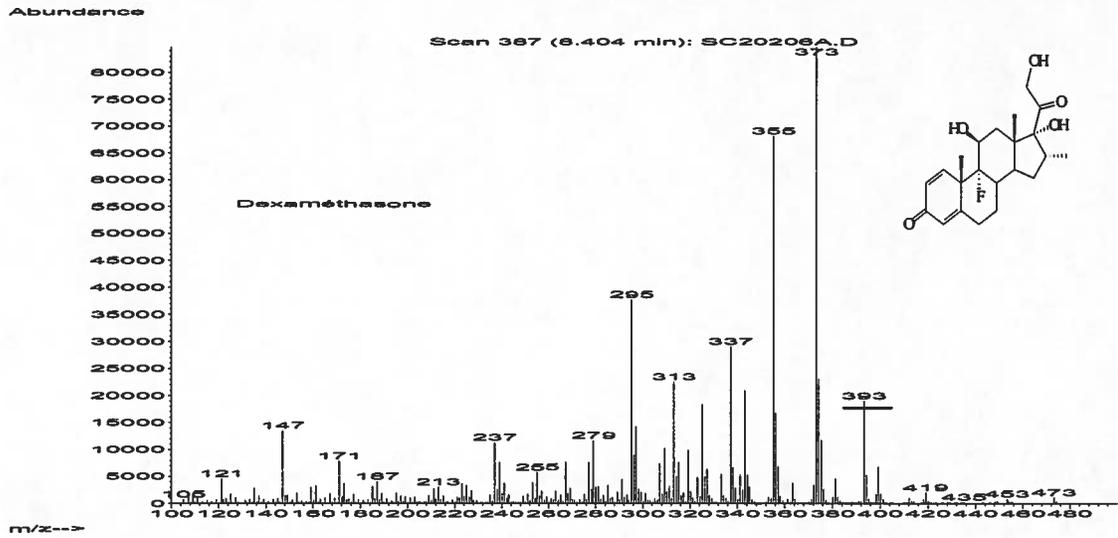


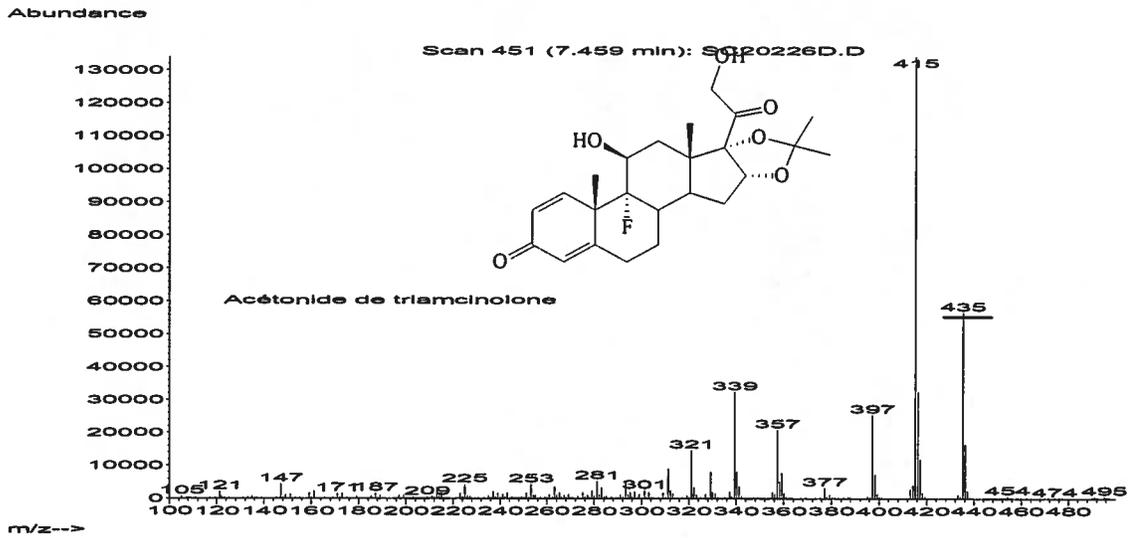
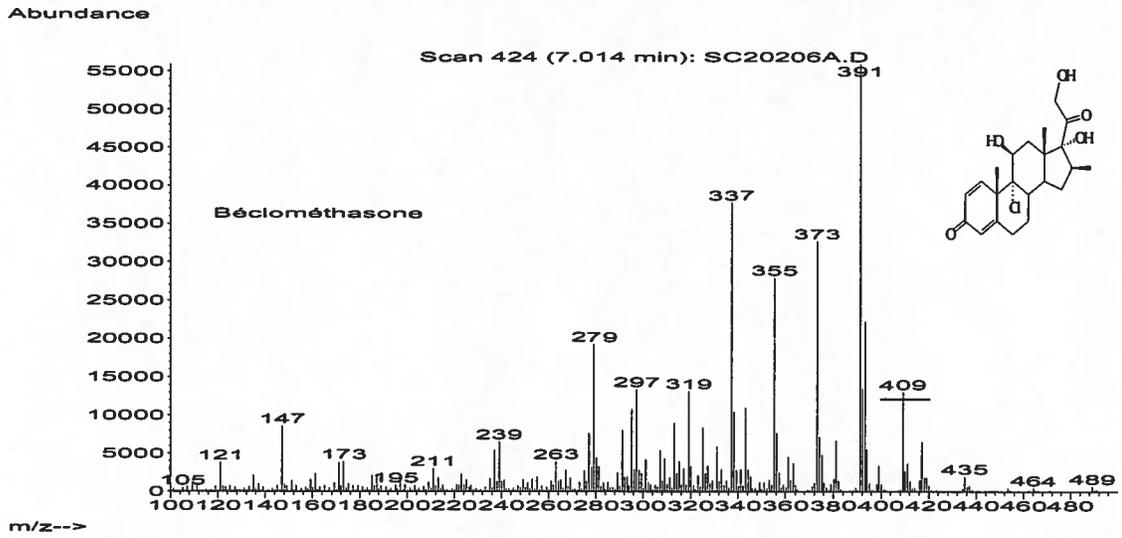


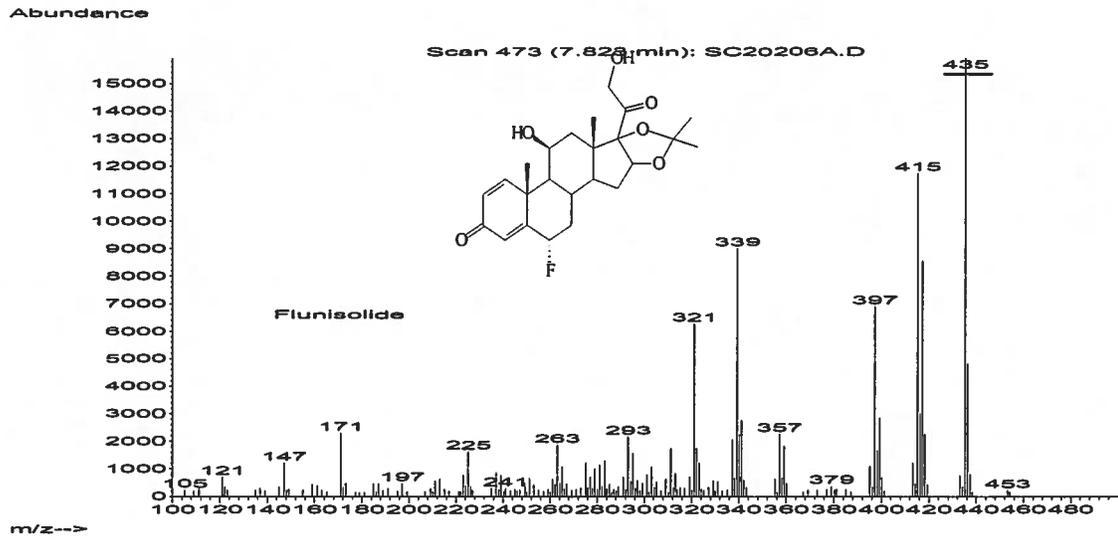
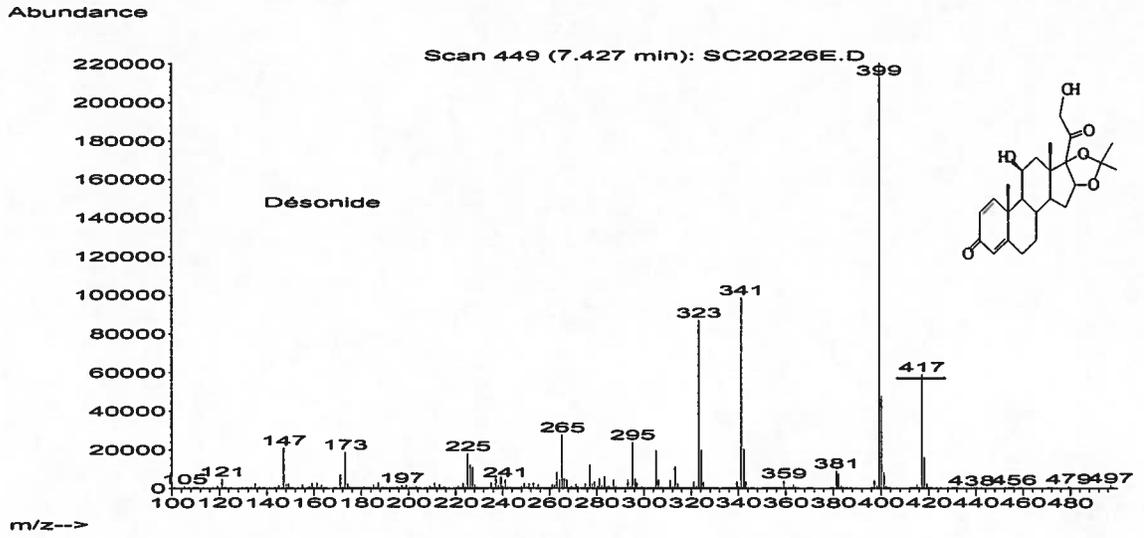


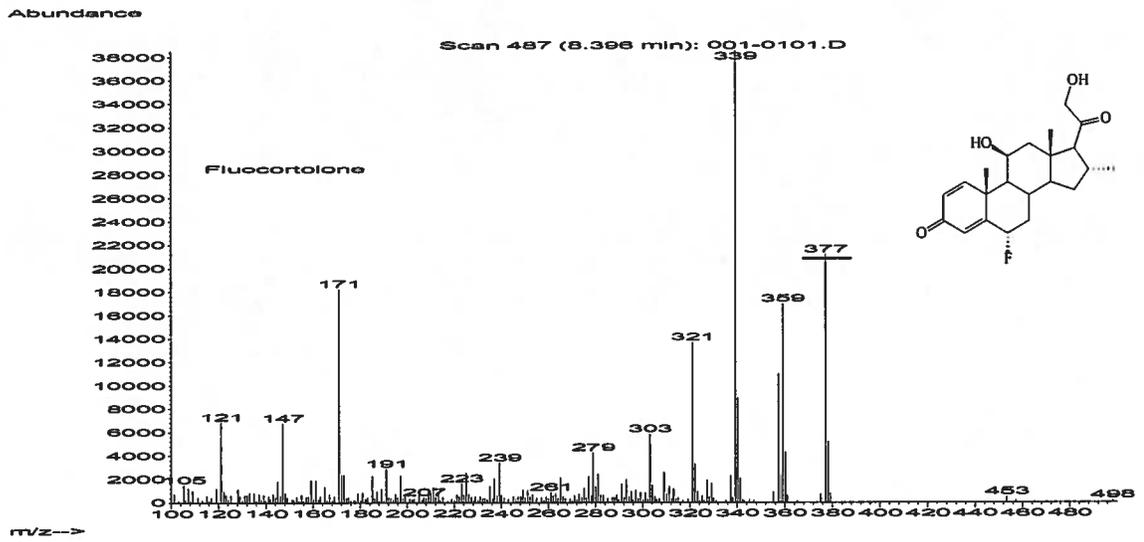
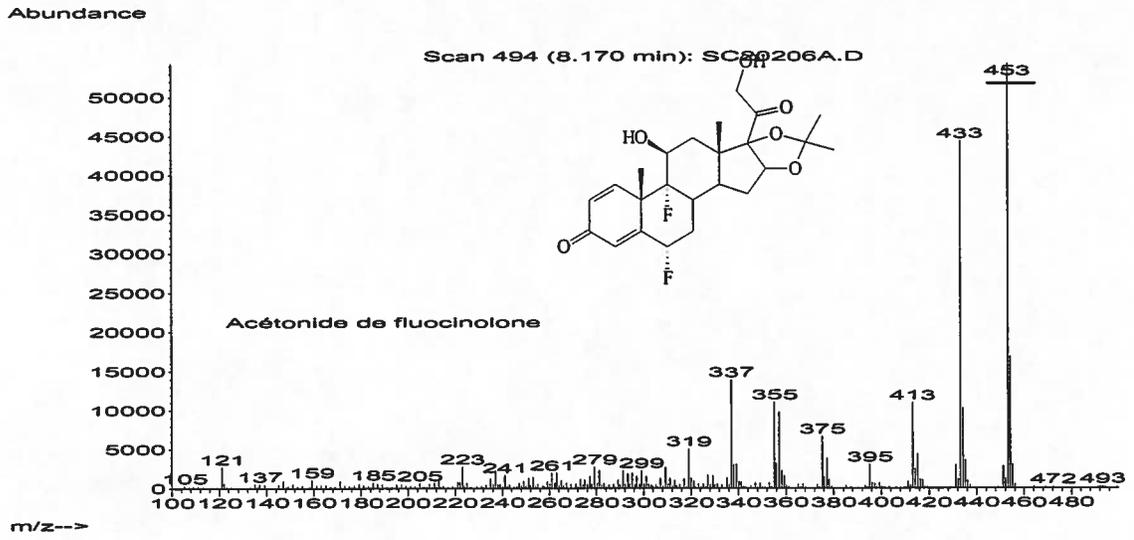


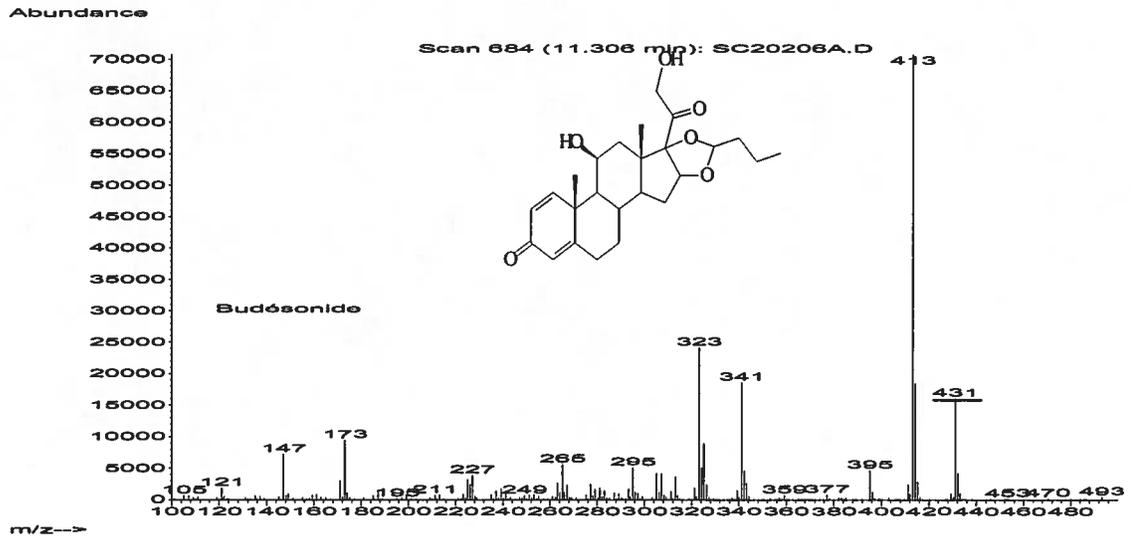
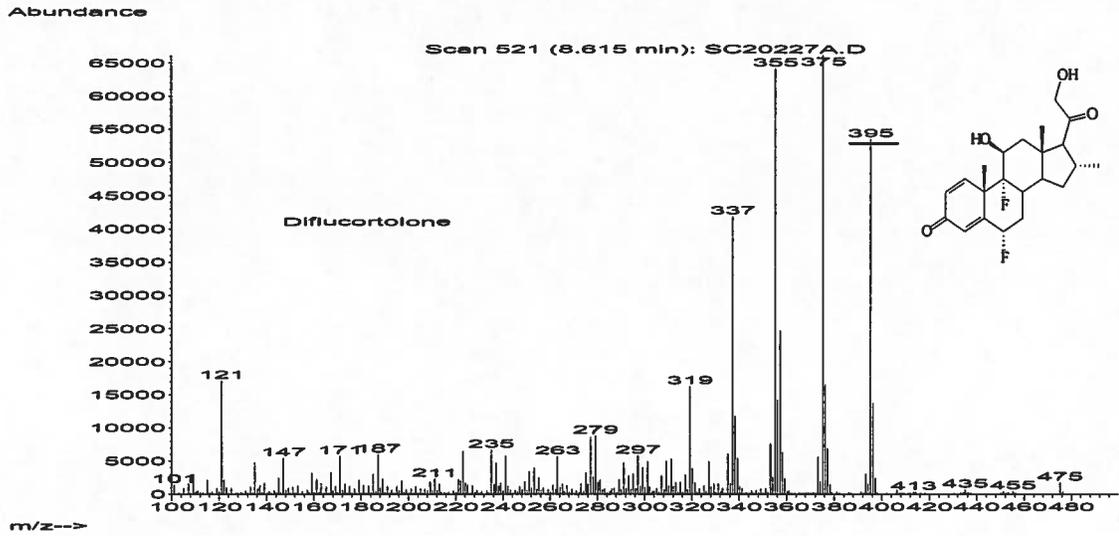


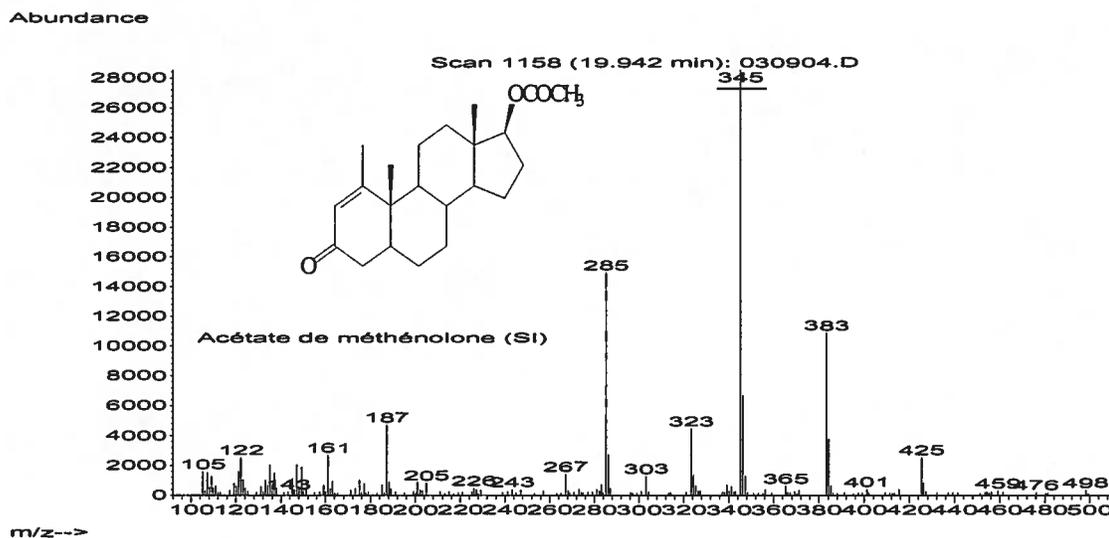
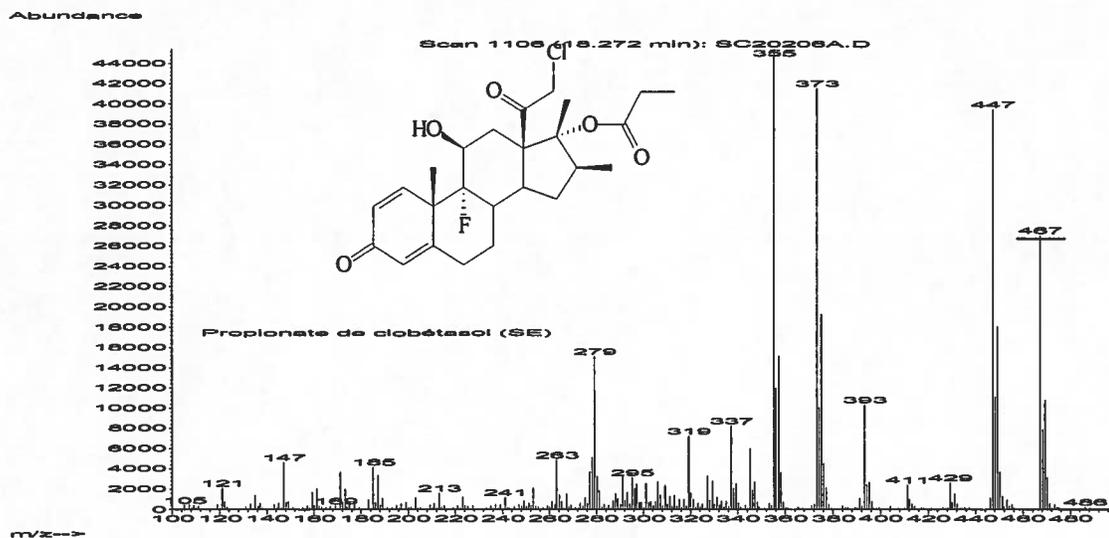












**Figure 3.3 : Spectres de masse obtenus de l'analyse CLHP/SM en mode de balayage complet (SCAN) des solutions de standards authentiques de chacun des glucocorticoïdes étudiés ainsi que des étalons interne et externe (10 ng/μL) ; identité et structure indiquées sur chaque spectre ainsi que l'ion pseudomoléculaire (souligné).**

### 3.2.4 Fragmentation

La présence de plusieurs groupements hydroxyles dans tous les glucocorticoïdes étudiés induit une fragmentation importante (Houghton, Dumasia et Wellby, 1981).

Pour toutes les molécules présentées, on retrouve dans les spectres de masse l'ion pseudo moléculaire ( $H^+$ ). Dans certains cas, il s'agit de l'ion le plus abondant ( $6\alpha$ -hydroxycortisol,  $6\beta$ -hydroxycortisol, cortisol, prednisone, cortisone, fluorohydrocortisone, fluméthasone, flunisolide, acétonide de fluocinolone). On peut également remarquer que pour les composés contenant du fluor (triamcinolone, fluorohydrocortisone, bétaméthasone, dexaméthasone, fluméthasone, acétonide de triamcinolone, flunisolide, acétonide de fluocinolone, fluocortolone, diflucortolone), le pic correspondant à la perte de HF (-20) est intense. Les glucocorticoïdes ayant deux atomes de fluor (fluméthasone, acétonide de fluocinolone, diflucortolone) présentent deux ions importants, chacun correspondant à la perte de HF.

Le composé chloré, la béclométhasone, présente dans son spectre de masse un ion important correspondant à la perte de HCl (-36) à  $m/z$  373, cet ion ne possédant pas de pic à  $P + 2$ , caractéristique des isotopes du chlore. Les autres pics importants correspondent à la perte d'eau (-18) (Guan et al., 2003).

Le reste de la fragmentation des glucocorticoïdes est simple, il y a multiples pertes d' $H_2O$  (-18) (Genard et al., 1968).

La présence d'adduits dans certains spectres de masse est visible. Ce sont en fait des adduits provenant de l'acétonitrile utilisé comme solvant lors de la séparation chromatographique. Le premier étant  $MH^+ + N \equiv CH_3$  et le deuxième  $MH^+ + N \equiv C-CH_3$ . Ceci indique que dans certains cas, l'évaporation du solvant dans la chambre d'ionisation n'est pas complète (Park et al., 1990 ; Guan et al., 2003).

La fragmentation de certains glucocorticoïdes est plus complexe. En effet, le spectre de masse de la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone présente plusieurs ions importants dus à la perte d'eau ( $m/z$  345, 327, 309 et 291). Un autre ion est présent à  $m/z$  267 et correspond à  $MH^+$ -96. Ceci provient de la perte de la chaîne en C-17 ( $C_2H_4O_2$ ) ainsi que de deux molécules d'eau (Compernelle, Vanderhaeghe et Nonclercq, 1972).

La prednisolone se fragmente également en perdant des molécules d'eau (ions à  $m/z$  343, 325, 307). Par contre, on peut observer un pic à  $m/z$  283 qui correspond à  $MH^+$ -78. Comme vu dans le cas de la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone, ceci provient de la perte de la chaîne en C-17 ainsi que d'une molécule d'eau (Compernelle, Vanderhaeghe et Nonclercq, 1972 ; Fiori et al., 1998).

Les trois pics les plus abondants du spectre de la fluorohydrocortisone sont présents à  $m/z$  381, 343 et 267. Le premier correspond à l'ion pseudomoléculaire, celui à  $m/z$  343 est associé à la perte de HF et de  $H_2O$  ( $MH^+$ -38), alors que celui à  $m/z$  267 provient de la perte du groupement HF, de deux molécules d'eau et de la chaîne en C-17 (Cavina et al., 1992).

Le spectre de masse de la méthylprednisolone montre des pics majeurs à  $m/z$  357, 339 et 297. Les deux premiers pics proviennent respectivement de la perte d'une et de deux molécules d'eau. Celui à  $m/z$  297 ( $MH^+$ -78) est dû à la perte d'un groupement  $H_2O$  et de la chaîne en C-17 (Vree et al., 1999).

L'acétonide de triamcinolone, le désonide, le flunisolide et l'acétonide de fluocinolone possèdent tous un groupement acétonide en position C-16 – C-17, ce qui génère des pics caractéristiques dans chacun des spectres de masse (Fluri et al., 2001). Les ions à  $m/z$  339 de l'acétonide de triamcinolone et du flunisolide proviennent de la perte de HF et du groupement acétonide ( $C_3H_6O_2$ ) ( $MH^+$ -94). L'ion à  $m/z$  341 présent dans le spectre de masse du désonide est dû à la perte du groupement acétonide en ( $C_3H_6O_2$ ) C-16 – C-17. Finalement, l'acétonide de fluocinolone se fragmente par pertes consécutives de HF et du groupement acétonide (ion à  $m/z$  337).

Le budesonide présente une chaîne importante en C-16 – C-17 ( $C_4H_8O_2$ ), qui donne à la molécule ses deux stéréoisomères. Cette chaîne est responsable des pics du spectre de masse aux  $m/z$  341 ( $MH^+ - 90 : MH^+ - C_4H_8O_2 - 2H$ ) et 323 ( $MH^+ - 108 : MH^+ - H_2O - C_4H_8O_2 - 2H$ ) (Lindberg, Paulson et Edsbäcker, 1987).

### **3.3 Extraction des glucocorticoïdes de l'urine**

#### **3.3.1 Pourcentages de récupération**

Lors d'essais effectués en dopant de l'urine avec les divers glucocorticoïdes étudiés, la méthode d'extraction développée (voir section 2.3) s'est avérée efficace pour la plupart des analytes (voir tableau IV). De plus, les résultats obtenus montrent qu'une étape d'hydrolyse enzymatique, devrait-elle être nécessaire pour certains produits qui pourraient être excrétés sous leur forme glucuroconjuguée, ne semble pas diminuer les rendements de récupération des glucocorticoïdes.

**Tableau IV : Pourcentages de récupération de l'urine des divers glucocorticoïdes. Urines dopées, de 0.25 à 50 ng/ $\mu$ L. (aire ion majeur / aire SE) extrait / (aire ion majeur / aire SE) non-extrait.**

<b>Glucocorticoïdes</b>	<b>Pourcentages de récupération n = 3 (moyenne <math>\pm</math> écart-type)</b>
6 $\alpha$ -hydroxycortisol	16.0 $\pm$ 1.3
6 $\beta$ -hydroxycortisol	---
Triamcinolone	52.7 $\pm$ 3.1
20 $\beta$ -dihydroprednisolone	31.5 $\pm$ 0.1
Prednisolone	74.2 $\pm$ 6.0
Cortisol	78.3 $\pm$ 8.7
Prednisone	71.2 $\pm$ 3.4
Cortisone	80.2 $\pm$ 5.5
Fluorohydrocortisone	83.8 $\pm$ 7.3
Méthylprednisolone	81.0 $\pm$ 3.3
Bétaméthasone	81.5 $\pm$ 4.6
Dexaméthasone	76.7 $\pm$ 7.7
Fluméthasone	85.9 $\pm$ 6.5
Béclométhasone	85.9 $\pm$ 6.5
Acétonide de triamcinolone	84.5 $\pm$ 8.1
Désonide	86.3 $\pm$ 6.4
Flunisolide	84.7 $\pm$ 7.3
Acétonide de fluocinolone	86.0 $\pm$ 3.4
Fluocortolone	91.5 $\pm$ 3.4
Difluocortolone	87.0 $\pm$ 4.6
Budésonide	85.3 $\pm$ 2.2

Nous avons noté que pour les composés plus polaires, tels le 6 $\alpha$ -hydroxycortisol, le 6 $\beta$ -hydroxycortisol, la triamcinolone et la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone, les pourcentages de récupération sont plus faibles, soient entre 16.0 et 52.7 %. Ce problème a aussi été rapporté dans la littérature (Fluri et al., 2001 ; Tang, Law et Wan, 2001). Pour remédier à la situation, divers essais ont été effectués en ajoutant notamment de l'isopropanol lors de l'extraction liquide-liquide afin d'augmenter la polarité du solvant. L'ajout de 0.25 mL d'isopropanol (soit 5% v/v du volume d'éther) donne les meilleurs pourcentages de récupération pour les glucocorticoïdes plus polaires. Pour le reste des stéroïdes étudiés, les rendements d'extraction ne sont pas affectés par l'augmentation de la polarité du solvant. Les pourcentages de récupération de la triamcinolone et de la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone peuvent ainsi être augmentés de près de 20 %, alors que celui du 6 $\alpha$ -hydroxycortisol atteint 40 %. Par contre, le 6 $\beta$ -hydroxycortisol demeure toujours presque impossible à récupérer. Des problèmes similaires ont été rencontrés par d'autres groupes de recherche (Lykkesfeldt, Loft et Poulsen, 1994). La détection des 6 $\alpha$ - et 6 $\beta$ -hydroxycortisol n'étant pas requise par le programme de contrôle du dopage sportif, nous nous sommes attardés au développement d'une méthode d'extraction efficace pour les glucocorticoïdes synthétiques. La détection des corticostéroïdes dits naturels fera l'objet d'autres travaux.

### 3.3.2 Limites de détection inférieures

Trois urines différentes (une urine d'enfant pré-pubère (agé de 6 ans), une urine de femme adulte et une urine d'homme adulte) ont été utilisées pour vérifier les limites de détection inférieures de chacun des glucocorticoïdes étudiés. Les urines (5mL) ont été dopées et préparées tel que décrit à la section 2.3, en omettant l'étape d'hydrolyse enzymatique. Les limites de détection ont été déterminées en utilisant un rapport signal sur bruit égal à trois (S/N = 3) du troisième ion le plus abondant pour chacun des stéroïdes (voir tableau V). En effet, les critères d'identification formelle requièrent la présence d'un minimum de trois ions en abondance relative similaire à celle des standards authentiques.

**Tableau V : Limites de détection inférieures des divers glucocorticoïdes, S/N = 3 du 3<sup>ème</sup> ion le plus abondant.**

<b>Glucocorticoïdes</b>	<b>Limites de détection inférieures (ng/mL) n = 9 (moyenne ± écart-type)</b>
6 $\alpha$ -hydroxycortisol	80
6 $\beta$ -hydroxycortisol	400
Triamcinolone	16.0 ± 0.0
20 $\beta$ -dihydroprednisolone	10.7 ± 2.3
Prednisolone	12.5 ± 6.0
Cortisol	40
Prednisone	4.8 ± 0.0
Cortisone	40
Fluorhydrocortisone	26.7 ± 9.2
Méthylprednisolone	6.3 ± 1.6
Bétaméthasone	12.0 ± 0.0
Dexaméthasone	4.7 ± 1.1
Fluméthasone	13.3 ± 2.3
Béclométhasone	13.3 ± 2.3
Acétonide de triamcinolone	12.0 ± 0.0
Désonide	3.3 ± 1.1
Flunisolide	16.0 ± 0.0
Acétonide de fluocinolone	21.3 ± 9.2
Flucortolone	8.0 ± 0.0
Diflucortolone	13.3 ± 2.3
Budésonide	8.0 ± 0.0

Bien que ces stéroïdes ne fassent pas l'objet premier de ces travaux, le cortisol, la cortisone, le  $6\alpha$ -hydroxycortisol et le  $6\beta$ -hydroxycortisol étant présents dans l'urine adulte, les limites de détection de ces stéroïdes ont uniquement été vérifiées en utilisant l'urine d'enfant pré-pubère (âgé de 6 ans), qui n'en contient que de faibles niveaux.

Il est également à noter que les limites de détection des divers glucocorticoïdes synthétiques étudiés sont très variables. En effet, elles varient entre 3 et 20 ng/mL. Ces valeurs sont correctes dans le cadre du présent travail, et seront améliorées ultérieurement. En effet, nous avons visé des niveaux minimums de performance pour la détection et l'identification de glucocorticoïdes de 30 ng/mL, tel que requis par le standard de l'Agence mondiale antidopage.

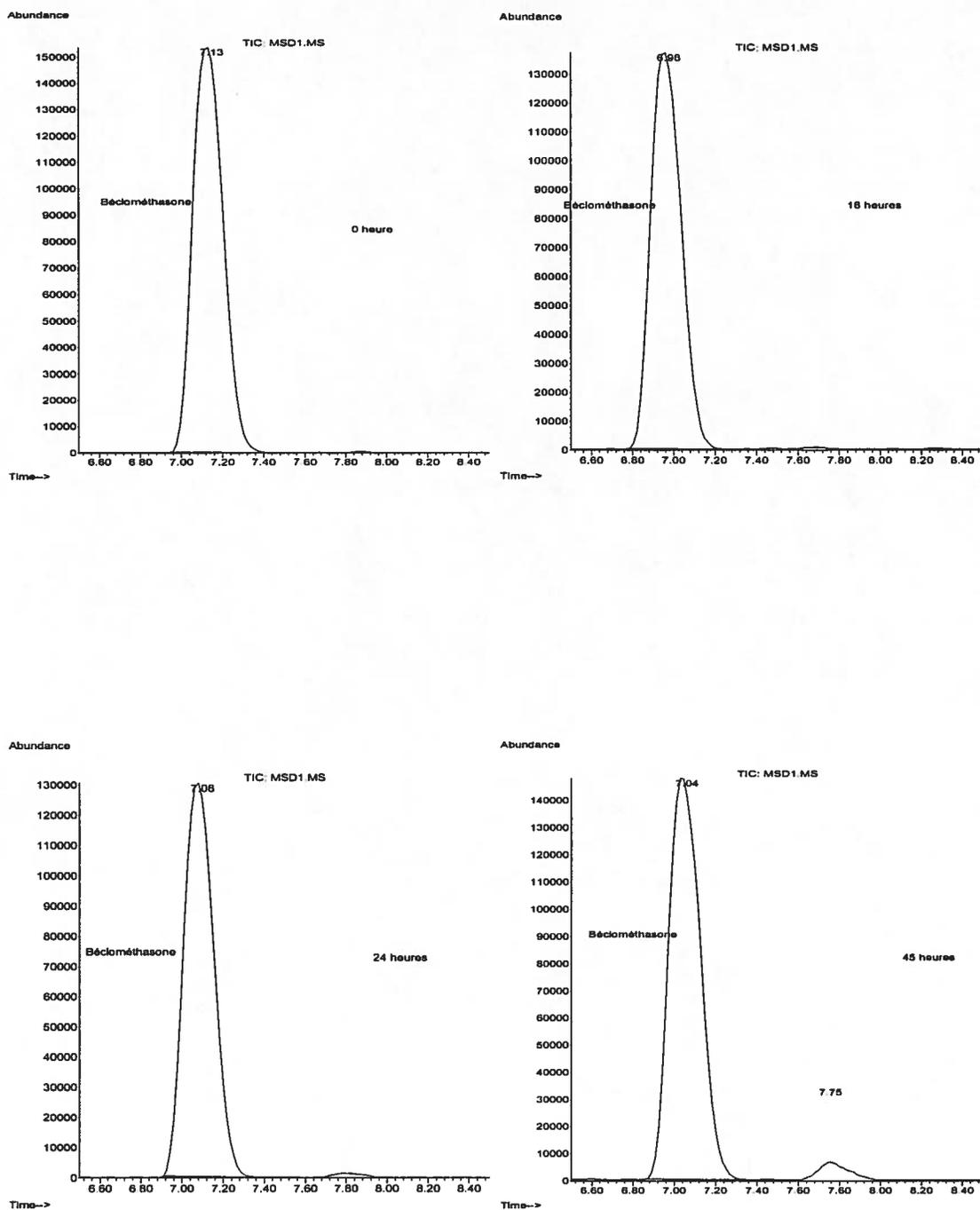
### **3.4 Dégradation de la béclo méthasone**

La béclo méthasone est le seul glucocorticoïde synthétique étudié dans ce projet contenant un atome de chlore (position C<sub>9</sub>). Nous avons constaté qu'un produit secondaire apparaissait lors de la préparation préalable à l'analyse par CLHP/SM. Les résultats obtenus semblent indiquer une certaine dégradation de la molécule suite à l'analyse d'une solution méthanolique du standard authentique (recomposée dans la phase mobile utilisée pour la séparation chromatographique). En effet, en plus du pic de la béclo méthasone apparaissant à 7.0 min en UV (7.1 min en SM), un autre pic est présent à 7.7 min (7.8 min en SM).

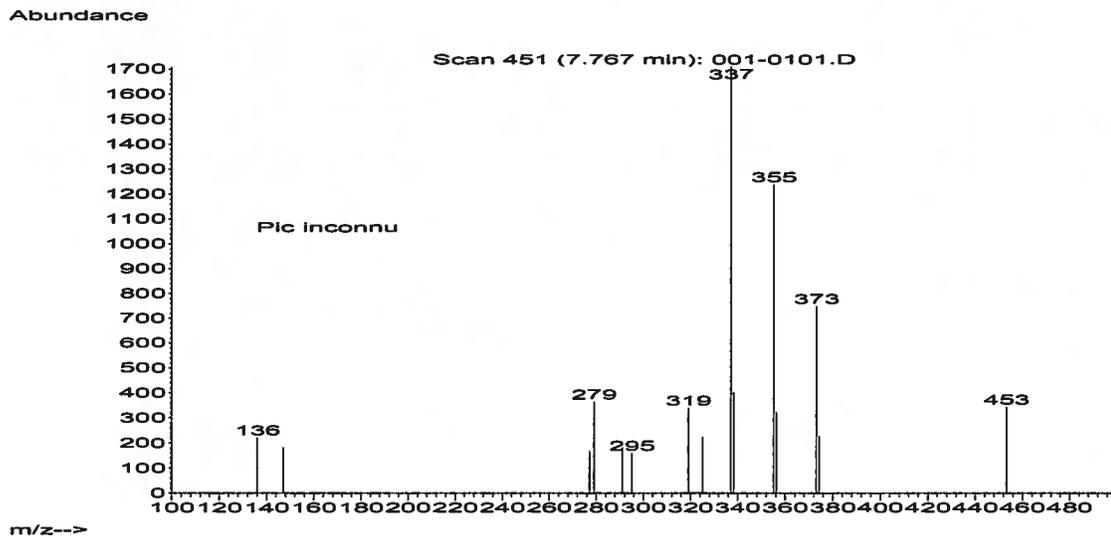
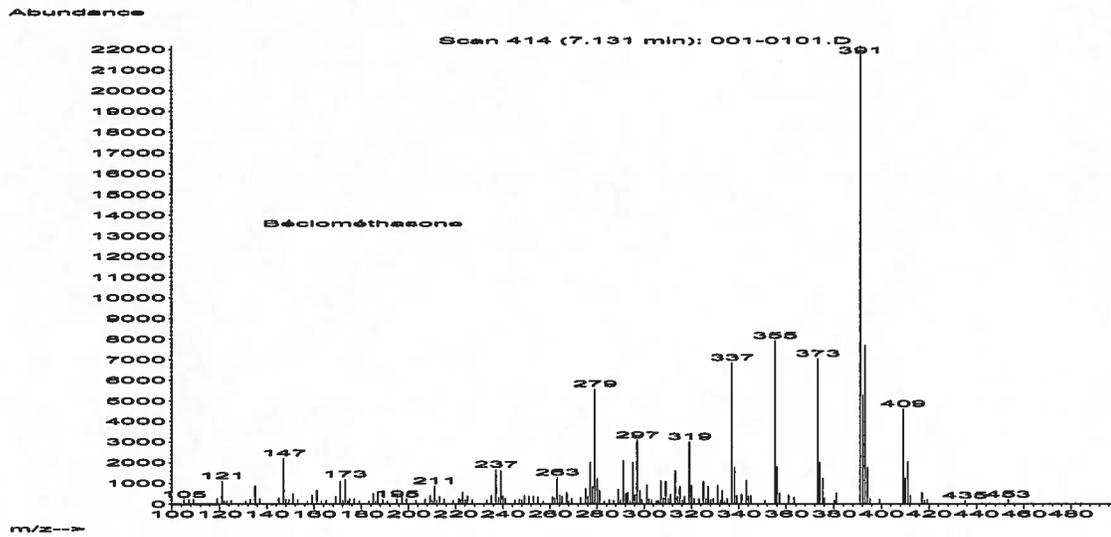
Nous avons vérifié que ce produit provenait bien de la béclo méthasone en analysant à des aliquots prélevés d'une solution méthanolique conservée à température ambiante. Le produit secondaire apparaît rapidement, soit à l'intérieur de 24 heures, mais en faibles concentrations (voir figure 3.4). Après 24 heures, la concentration du produit secondaire de la béclo méthasone devient plus importante et pourrait donc gêner l'analyse. Il est donc important d'analyser les échantillons rapidement après leur préparation.

Des échantillons de standard authentique ont aussi été comparés à des échantillons d'urine dopés avec de la béclo méthasone. Certains ont été extraits selon la procédure décrite à la section 2.3, et d'autres non.

La figure 3.4 montre bien l'évolution de la formation du pic du produit secondaire de la béclo méthasone ( $t_R = 7.8$  min en SM) entre 0 et 45 heures suivant la reconstitution de l'échantillon dans le solvant d'analyse.



**Figure 3.4 : Étude de la dégradation de la béclométhasone. Chromatogrammes obtenus après 0, 18, 24 et 45 heures suivant la préparation de l'échantillon (standard authentique, 10 ng/μL).**



**Figure 3.5 : Spectres de masse de la béclométhasone et du produit de dégradation formé dans des solutions méthanoliques laissées à température ambiante.**

Les spectres de masse obtenus (voir figure 3.5), montrent que le produit de dégradation résulte de l'élimination de HCl de la béclo méthasone. En effet, on remarque une fragmentation similaire mais la nette absence d'ions chlorés démontrée par l'absence d'un ion à  $P + 2$  en abondance reflétant celle des isotopes du chlore (35 et 37 (33%)).

Nous avons aussi noté que dans les échantillons urinaires (préparés en dopant une urine) la béclo méthasone subissait une détérioration moins importante que dans les solutions méthanoliques de standards authentiques, qu'il y ait extraction ou non. Ceci permet de croire que la matrice urinaire protégerait l'élimination de l'atome de chlore. Une hydrolyse enzymatique ne change rien à la dégradation de la béclo méthasone.

Certains groupes de recherche ont montré que des composés chlorés se dégradent lorsque exposés à la lumière (Moore et Tamat, 1980 ; Segarra et al., 1995). Ceci semble être le cas pour la béclo méthasone. Il est donc primordial d'analyser par CLHP/SM rapidement les échantillons urinaires après leur préparation.

### **3.5 Différentiation de la bétaméthasone et de la dexaméthasone, deux stéréoisomères**

La séparation de la bétaméthasone et de la dexaméthasone est ardue (Rizea Savu et al., 1996 ; Tang, Law et Wan, 2001 ; Fluri et al., 2001 ; Antignac et al., 2002). Ces deux glucocorticoïdes sont des stéréoisomères différant seulement par l'orientation de leur groupement méthyle en position C-16, ce qui rend leur séparation par chromatographie liquide délicate. De plus, leurs spectres de masse sont très semblables (voir section 3.2.3), bien qu'il soit possible de les différencier à l'aide des abondances relatives des ions (De Wasch et al., 2001 ; Arthur, Wolff et Carrier, 2004). La méthode développée dans ce projet permet de séparer en partie (résolution incomplète) par CLHP ces deux stéréoisomères.

Ces deux glucocorticoïdes ont donc été identifiés à l'aide de l'intensité relative de l'ion à  $m/z$  355. Les abondances relatives des trois ions principaux ont été déterminées ( $m/z$  373,

355 et 337). Des études ont été faites sur des solutions de standards authentiques ainsi que sur des échantillons urinaires dopés à diverses concentrations, extraits (selon la procédure décrite à la section 2.3), avec ou sans hydrolyse enzymatique. Les résultats obtenus sont résumés au tableau suivant :

**Tableau VI : Résultats obtenus de la détermination des abondances relatives des ions (m/z) de la bétaméthasone et de la dexaméthasone.**

Échantillons	m/z	Bétaméthasone Abondances relatives (moyenne ± écart-type) n = 3	Dexaméthasone Abondances relatives (moyenne ± écart-type) n = 3
Standard authentique (10 ng/μL) n = 5	373	99.5 ± 0.63	98.7 ± 2.81
	355	33.5 ± 0.50	36.7 ± 0.45
	337	15.1 ± 0.30	15.5 ± 0.29

Échantillons	m/z	Bétaméthasone Abondances relatives (moyenne ± écart-type)	Dexaméthasone Abondances relatives (moyenne ± écart-type)	Échantillons	m/z	Bétaméthasone Abondances relatives (moyenne ± écart-type)	Dexaméthasone Abondances relatives (moyenne ± écart-type)
Urine dopée sans hydrolyse (0.25 ng/μL) n = 3	373	98.6 ± 2.37	98.8 ± 2.50	Urine dopée avec hydrolyse (0.25 ng/μL) n = 3	373	99.3 ± 1.27	97.3 ± 4.73
	355	35.5 ± 0.53	40.27 ± 3.26		355	43.7 ± 2.00	52.9 ± 0.31
	337	16.3 ± 0.50	16.63 ± 0.96		337	22.0 ± 1.51	24.7 ± 2.15
Urine dopée sans hydrolyse (1 ng/μL) n = 3	373	99.3 ± 1.27	99.1 ± 1.56	Urine dopée avec hydrolyse (1 ng/μL) n = 3	373	99.1 ± 1.62	98.5 ± 2.60
	355	36.4 ± 0.60	39.6 ± 3.20		355	42.6 ± 1.82	46.1 ± 3.02
	337	16.1 ± 0.15	16.7 ± 1.11		337	21.0 ± 1.50	20.0 ± 0.96
Urine dopée sans hydrolyse (5 ng/μL) n = 3	373	99.7 ± 0.52	97.8 ± 3.87	Urine dopée avec hydrolyse (5 ng/μL) n = 3	373	99.9 ± 0.17	99.5 ± 0.92
	355	36.0 ± 1.11	39.7 ± 2.61		355	41.9 ± 1.18	44.2 ± 1.59
	337	15.9 ± 0.38	17.3 ± 1.65		337	19.6 ± 1.20	19.4 ± 1.29
Urine dopée sans hydrolyse (50 ng/μL) n = 3	373	99.5 ± 0.92	98.9 ± 1.90	Urine dopée avec hydrolyse (50 ng/μL) n = 3	373	99.5 ± 0.92	99.1 ± 1.56
	355	38.0 ± 0.75	41.7 ± 2.17		355	40.8 ± 1.36	42.9 ± 2.24
	337	17.7 ± 0.92	18.6 ± 1.43		337	19.8 ± 1.01	19.6 ± 1.32

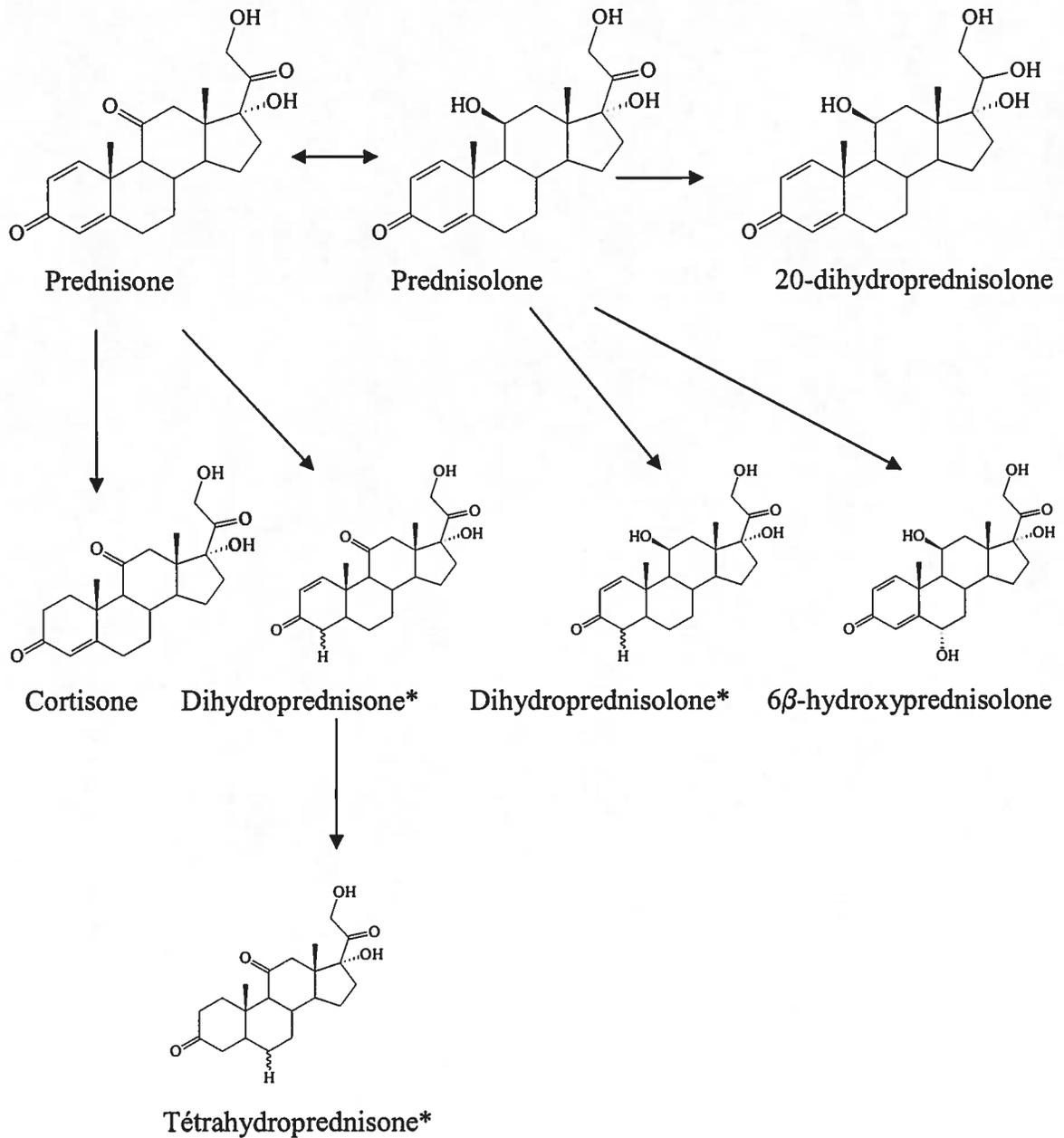
Le tableau VI montre que pour les ions à  $m/z$  373 et 337, les abondances relatives sont identiques pour les deux isomères. Par contre, pour l'ion à  $m/z$  355, on peut constater une différence d'environ 3 à 4 % pour les deux glucocorticoïdes. En effet, l'intensité de cet ion est toujours plus élevée pour la dexaméthasone, peu importe la concentration de l'échantillon ou qu'il y ait eu une hydrolyse enzymatique ou non. Il serait donc possible de différencier qualitativement la bétaméthasone et la dexaméthasone en regardant l'abondance relative du pic à  $m/z$  355.

### 3.6 Première étude d'excrétion (prednisolone)

La prednisolone est le glucocorticoïde synthétique le plus fréquemment utilisé (Frey et Frey, 1982). Il est donc intéressant dans le cadre de nos travaux, de vérifier l'application de la méthode CLHP/SM telle que nous l'avons développée à la détection et à l'identification des métabolites excrétés suite à son administration chez l'humain.

Un volontaire sain ayant reçu de la prednisolone pour des raisons médicales, a accepté de nous fournir un échantillon urinaire. La dose prise oralement était de 2.5 comprimés contenant chacun 20 mg de prednisolone (Solupred, 50 mg total). Un seul échantillon urinaire a été recueilli 5 heures après l'administration. Les concentrations urinaires des métabolites excrétés étant importantes, 1 mL d'urine a été utilisé au lieu de 5 mL. La procédure de purification employée est celle décrite à la section 2.3. Afin d'évaluer si les métabolites étaient excrétés sous leur forme libre ou glucuroconjuguée, deux échantillons ont été préparés et purifiés, dont l'un a été soumis à une hydrolyse enzymatique par l'emploi de  $\beta$ -glucuronidase (*E. coli*). Les échantillons ainsi préparés ont été analysés par CLHP/SM en mode de balayage continu (SCAN) afin d'obtenir les spectres de masse complets pour bien identifier les métabolites présents dans l'urine. La quantification des stéroïdes a également été effectuée lorsque des standards authentiques étaient disponibles (analyse par CLHP/SM en mode SIM).

Rodchenkov et al. ont rapporté le résultat de leurs travaux portant sur le métabolisme de la prednisolone et de la prednisone (Rodchenkov et al., 1991). Leurs résultats sont résumés au schéma suivant :



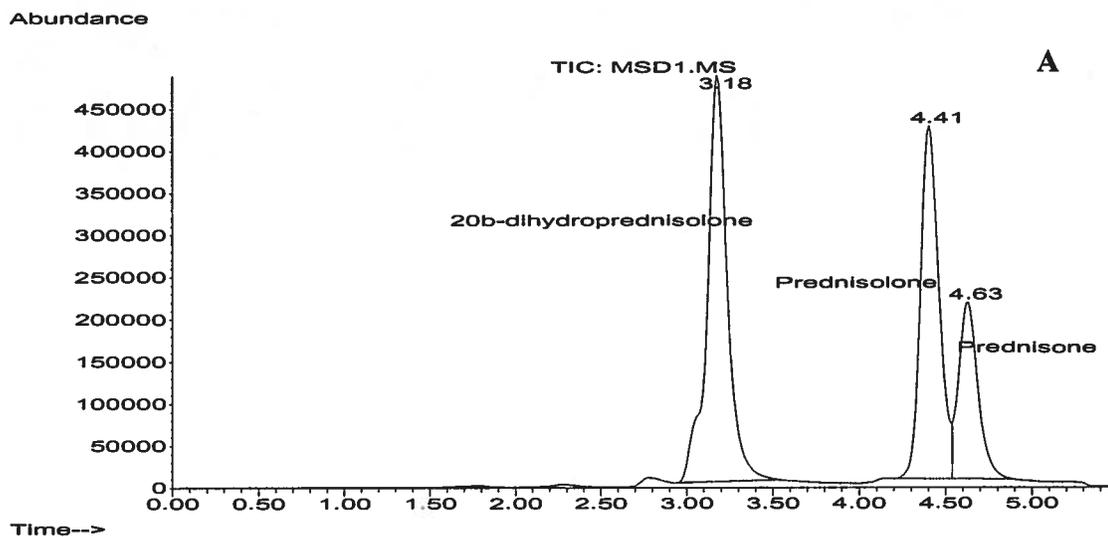
\* Structure proposée

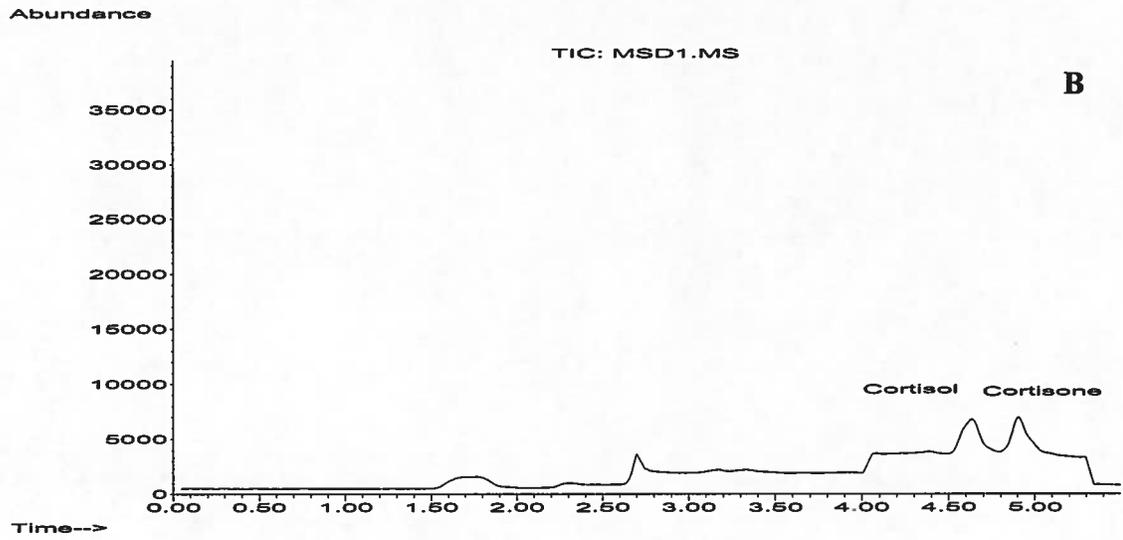
**Figure 3.6 : Schéma métabolique proposé par Rodchenkov et al. pour la prednisone et la prednisolone (1991).**

Nous avons identifié trois glucocorticoïdes dans l'urine recueillie post-administration, soit la prednisolone (produit mère), la prednisone et la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone (métabolites). Le tableau VII résume les résultats obtenus. L'identification a été effectuée par la comparaison des spectres de masse et des temps de rétention avec ceux obtenus de l'analyse de standards authentiques.

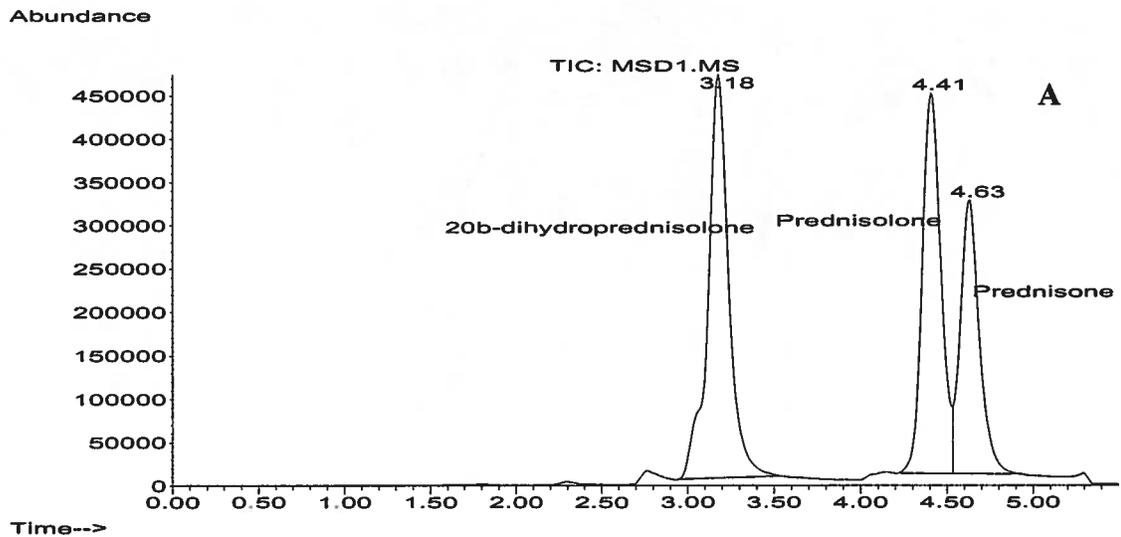
**Tableau VII : Glucocorticoïdes identifiés dans l'urine recueillie 5 heures après administration orale d'une dose unique de 50 mg de prednisolone.**

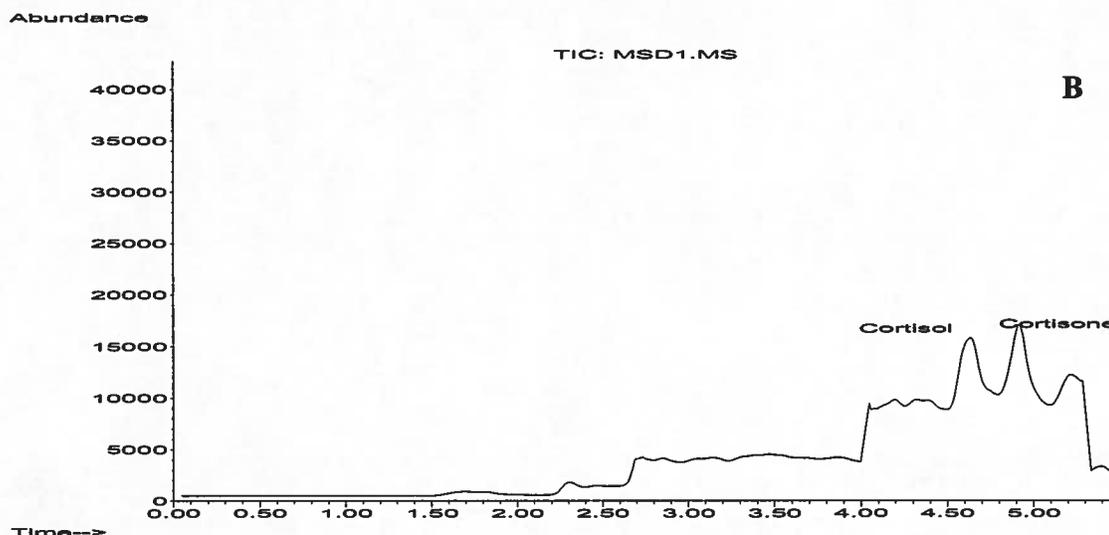
Glucocorticoïdes	Concentrations (ng/mL)	Concentrations (ng/mL)
	n = 4 (moyenne $\pm$ écart-type) <u>sans</u> hydrolyse enzymatique	n = 4 (moyenne $\pm$ écart-type) <u>avec</u> hydrolyse enzymatique
Prednisolone	3107.0 $\pm$ 876	3574.0 $\pm$ 900
Prednisone	698.3 $\pm$ 202	1195.3 $\pm$ 283
20 $\beta$ -dihydroprednisolone	2311.0 $\pm$ 649	2419.4 $\pm$ 493





**Figure 3.7 : Chromatogrammes provenant de l'analyse CLHP/SM de la fraction des stéroïdes libres de A : échantillon recueilli après l'administration de prednisolone (50 mg) et B : échantillon témoin négatif.**





**Figure 3.8 : Chromatogrammes provenant de l'analyse CLHP/SM de la fraction combinée des stéroïdes libres et glucuroconjugués de A : échantillon recueilli après l'administration de prednisolone (50 mg) et B : échantillon témoin négatif.**

Les résultats montrent que 5 heures après l'administration, la prednisolone, produit mère, est le glucocorticoïde retrouvé en plus grande concentration dans l'urine. Le métabolite principal est la  $20\beta$ -dihydroprednisolone. Enfin, de petites concentrations de prednisone ont aussi été retrouvées. On peut également remarquer la présence de faibles quantités de cortisol et de cortisone dans l'urine vierge utilisée comme contrôle (urine d'enfant pré-pubère).

Il existe très peu de différence dans les concentrations des stéroïdes excrétés qu'il y ait eu hydrolyse enzymatique ou non. Ce qui semble indiquer que les trois métabolites urinaires, prednisolone, prednisone et  $20\beta$ -dihydroprednisolone, sont excrétés principalement sous leur forme libre et qu'ils sont très peu conjugués à l'acide glucuronique suite à l'administration orale de prednisolone. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits précédemment (Rodchenkov et al., 1991). Ces auteurs ont également noté une augmentation de la sécrétion de cortisone suite à la prise orale de prednisolone ou de

prednisone. Malheureusement, comme nous ne possédions pas d'échantillon urinaire du volontaire de notre étude avant sa prise de prednisolone, nous n'avons pu confirmer cette observation.

Deux groupes de recherche (Frey et Frey, 1982 ; Teng et Benet, 1989) ont démontré qu'après administration par voie intraveineuse de prednisolone (sur divers sujets, de doses allant de 40 à 58 mg) on retrouve dans l'urine de la prednisolone, et en moindre quantité de la prednisone et de la 6 $\beta$ -hydroxyprednisolone. Il n'est pas question dans ces recherches du métabolite 20 $\beta$ -dihydroprednisolone.

Un autre groupe (Garg et Jusko, 1991), a rapporté le métabolisme lors d'une injection par voie intraveineuse de 49.3 mg de prednisolone. Conformément aux observations précédemment décrites, la prednisolone a été retrouvée en quantité significative dans l'urine, ainsi que la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone, la 6 $\beta$ -hydroxyprednisolone et la prednisone. Dans l'échantillon étudié, aucune trace de 6 $\beta$ -hydroxyprednisolone n'a été trouvée. Le groupe de Garg (1991) a de plus observé que la prednisolone et ses métabolites pouvaient être détectés en concentrations significatives durant les 12 premières heures suivant l'injection d'une dose unique de 49.3 mg de prednisolone ; aucun métabolites n'est détectable après 32 heures.

La conversion de la prednisone en prednisolone a aussi été démontrée ; en effet, suite à une administration de prednisone (50 mg, voie orale), la prednisolone est retrouvée en plus grande quantité que la prednisone dans l'urine (Rose et Jusko, 1979). En fait, la prednisone est en même temps une pro-drogue et un métabolite de la prednisolone. La prednisone, après son administration, est rapidement transformée par le foie en prednisolone, qui est le composé possédant l'activité pharmacologique (Garg et Jusko, 1994 ; Martindale, 2003).

Suite à des études de perfusion, le groupe de Rocci (Rocci et Jusko, 1981) a confirmé que la prednisolone était bien transformée en prednisone par les reins et que ces deux stéroïdes étaient également transformés en dérivés 20 $\beta$ -hydroxylés.

### 3.7 Deuxième étude d'excrétion (prednisone)

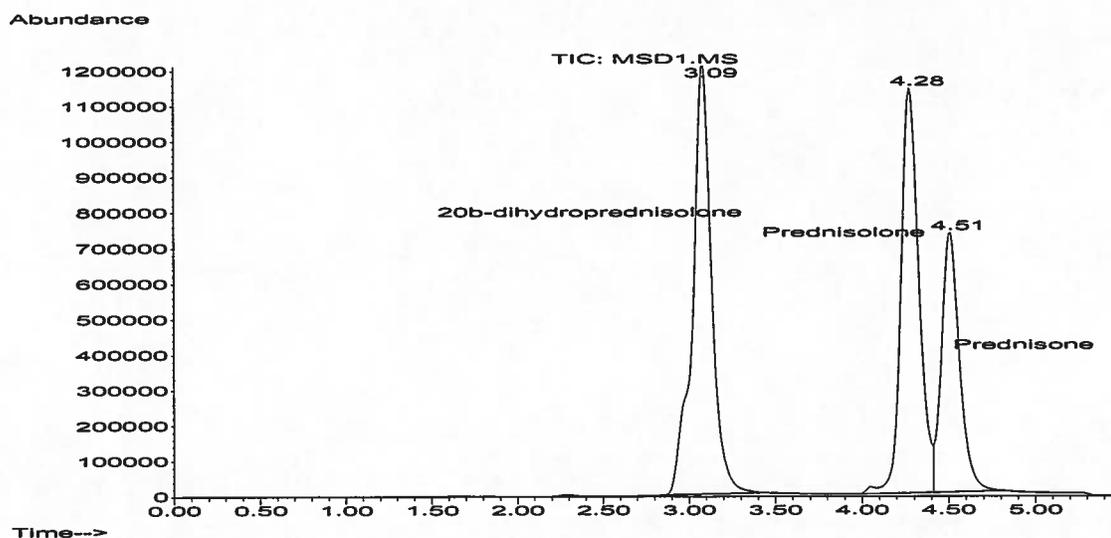
Un volontaire sain ayant reçu de la prednisone pour raisons médicales, a accepté de nous fournir des échantillons urinaires. La dose orale était de 5 comprimés contenant chacun 5 mg de prednisone (Apo-Prednisone, 25 mg total). Des échantillons urinaires ont été recueillis 3, 10, 19, 25 et 28 heures après l'administration.

Les concentrations des métabolites étant importantes, nous avons dû utiliser des volumes inférieurs d'urine, soit 1 mL pour les échantillons recueillis après 3 et 19 heures, 0.5 mL pour l'échantillon prélevé 10 heures suivant l'administration, alors que ceux recueillis plus de 24 heures après l'administration du glucocorticoïde ont été traités normalement (5 mL). Les échantillons ont été traités tel que décrit précédemment (voir section 2.3). Encore ici, afin d'évaluer si les métabolites étaient excrétés sous leur forme libre ou glucuroconjuguée, deux échantillons ont été préparés et purifiés, dont l'un a été soumis à une hydrolyse enzymatique avec l'emploi de  $\beta$ -glucuronidase (*E. coli*). Les extraits obtenus ont été analysés par CLHP/SM en mode de balayage continu (SCAN) afin d'obtenir les spectres de masse complets pour bien identifier les métabolites excrétés, ainsi qu'en mode SIM pour la quantification.

Tel que présenté à la figure 3.6, et comme nous avons pu l'observer lors de l'étude d'excrétion à la prednisolone, trois métabolites ont été retrouvés dans l'urine, soit la prednisone (produit mère), la prednisolone et la  $20\beta$ -dihydroprednisolone (métabolites). L'identification a été effectuée par comparaison des spectres de masse et des temps de rétention avec les données obtenues de l'analyse dans des conditions similaires de standards authentiques. Les tableaux VIII et IX et la figure 3.9 résument les résultats obtenus.

**Tableau VIII : Glucocorticoïdes identifiés dans l'urine recueillie 3, 10, 19, 25 et 28 heures après administration orale d'une dose unique de 25 mg de prednisone.**

Temps post-administration (Prednisone, 25 mg)	Glucocorticoïdes	Concentrations (ng/mL) <u>sans</u> hydrolyse enzymatique n = 4 (moyenne ± écart-type)	Concentrations (ng/mL) <u>avec</u> hydrolyse enzymatique n = 4 (moyenne ± écart-type)
3 Hrs	Prednisone	174.2 ± 67	300.0 ± 49
	Prednisolone	817.4 ± 115	900.1 ± 100
	20β-dihydroprednisolone	56.5 ± 22	71.6 ± 14
10 Hrs	Prednisone	859.3 ± 198	1535.1 ± 433
	Prednisolone	3205.7 ± 555	3887.6 ± 846
	20β-dihydroprednisolone	1272.5 ± 304	1504.0 ± 430
19 Hrs	Prednisone	348.2 ± 110	598.9 ± 216
	Prednisolone	563.2 ± 154	709.8 ± 222
	20β-dihydroprednisolone	916.7 ± 314	1035.9 ± 375
25 Hrs	Prednisone	39.7 ± 3	63.3 ± 3
	Prednisolone	41.7 ± 2	47.1 ± 1
	20β-dihydroprednisolone	79.1 ± 10	97.5 ± 12
28 Hrs	Prednisone	39.2 ± 3	81.9 ± 2
	Prednisolone	41.4 ± 2	53.9 ± 1
	20β-dihydroprednisolone	94.1 ± 13	147.7 ± 13



**Figure 3.9 :** Chromatogramme provenant de l'analyse CLHP/SM (mode SIM) de la fraction des stéroïdes libres d'un échantillon recueilli 19 heures après l'administration de prednisone (25 mg).

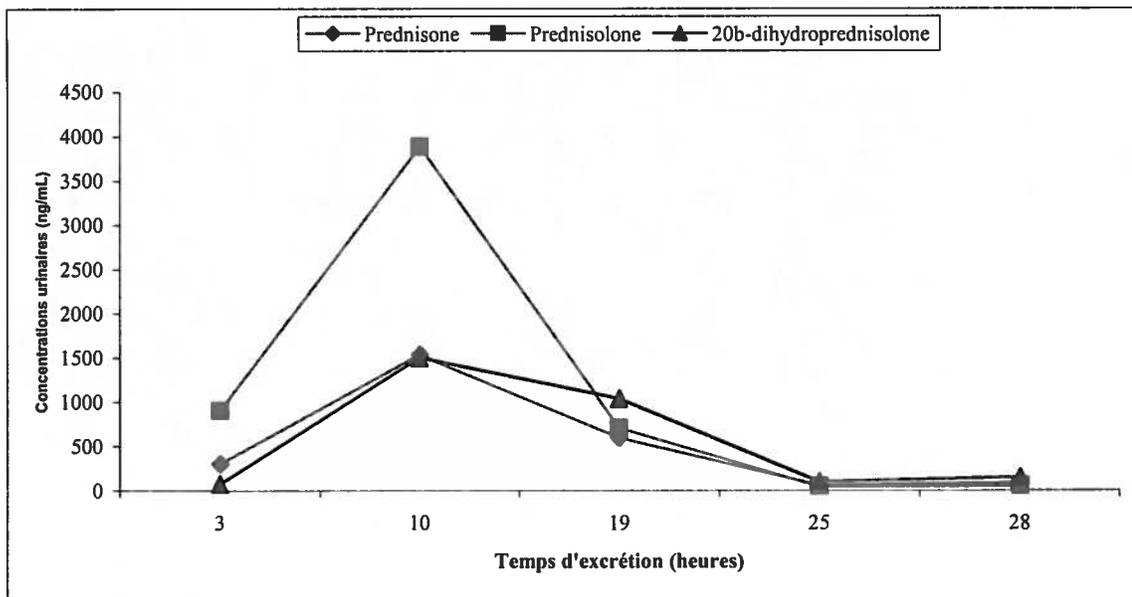
**Tableau IX :** Concentrations totales des glucocorticoïdes excrétés suite à l'administration d'une dose unique de 25 mg de prednisone.

Glucocorticoïdes	Concentrations (ng/mL) <u>sans</u> hydrolyse enzymatique n = 4 (moyenne ± écart-type)	Concentrations (ng/mL) <u>avec</u> hydrolyse enzymatique n = 4 (moyenne ± écart-type)
Prednisone	1460.6 ± 382	2579.3 ± 706
Prednisolone	4669.3 ± 829	5598.5 ± 900
20β-dihydroprednisolone	2419.0 ± 665	2856.7 ± 846

Nos résultats montrent que la prednisolone est le glucocorticoïde majoritairement excrété suite à l'administration de prednisone, ce qui est en accord avec les observations rapportées par Rose et Jusko (1979). Ceci est dû au fait que la prednisone est rapidement

transformée par le foie en prednisolone qui est le composé pharmacologiquement actif (Garg et Jusko, 1994 ; Martindale, 2003). Encore ici, la  $20\beta$ -dihydroprednisolone est aussi un métabolite important, étant en fait retrouvé en plus grandes quantités que le produit mère, la prednisone.

Les métabolites sont majoritairement excrétés sous leur forme libre comme le démontre l'obtention de concentrations similaires qu'il y ait eu une hydrolyse enzymatique ou non. La prednisone semble être quelque peu conjuguée à l'acide glucuronique, mais pas de manière très significative. La figure 3.10 présente les profils d'excrétion des trois glucocorticoïdes de 3 à 28 heures suivant l'absorption des 25 mg de prednisone.



**Figure 3.10 : Profil d'excrétion des métabolites (total après hydrolyse enzymatique) provenant de l'administration orale de 25 mg de prednisone.**

Déjà 3 heures après la prise orale de 25 mg de prednisone, de la prednisone, de la prednisolone et de la  $20\beta$ -dihydroprednisolone sont retrouvées dans l'urine. Leurs

concentrations maximales sont observées 10 heures après l'administration. De plus, on peut retrouver ces trois glucocorticoïdes dans l'urine pendant au moins 28 heures.

Il est intéressant de remarquer que durant les 10 premières heures suivant la prise orale de prednisone, la prednisolone est le métabolite le plus important. Par contre, la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone se retrouve en plus grande concentration que la prednisolone dans l'urine après cette période. On peut donc conclure que la prednisolone est excrétée plus rapidement que la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone.

Comme nous ne possédions pas d'échantillon urinaire du volontaire de notre étude avant sa prise de prednisone, il nous a été impossible de vérifier si une augmentation de la sécrétion de cortisone était notable. De plus, nous n'avions pas d'échantillons urinaires prélevés plus de 28 heures après l'administration du glucocorticoïde, ce qui ne nous a donc pas permis de vérifier jusqu'à quel moment la prednisone, la prednisolone et la 20 $\beta$ -dihydroprednisolone étaient quantifiables.

## CHAPITRE 4

### Conclusion

Dans le cadre de ce mémoire, une méthode analytique permettant la détection et l'identification des glucocorticoïdes dans le contexte de leur usage interdit aux athlètes a été mise sur pied. Une méthode d'extraction efficace pour l'ensemble des glucocorticoïdes visés a tout d'abord été vérifiée. Puis, les paramètres de l'analyse de ces composés basée sur l'utilisation de la combinaison chromatographie liquide à haute performance et spectrométrie de masse en ionisation chimique à pression atmosphérique CLHP/ICPA/SM ont été optimisés afin d'obtenir la meilleure séparation chromatographique possible, ainsi que de bons spectres de masse. Finalement, nous avons étudié les métabolites excrétés suivant l'administration de deux des corticostéroïdes les plus fréquemment prescrits et utilisés, soit la prednisolone et la prednisone.

Les spectres de masse des glucocorticoïdes choisis ont été décrits, les fragmentations principales expliquées ; nous avons par la suite choisi trois ions caractéristiques pour valider la méthode d'identification et de quantification.

Les taux de récupération pour chaque stéroïde ont été déterminés ; ainsi nous avons vérifié l'efficacité d'un solvant d'extraction de plus grande polarité pour les composés également plus polaires, soit le  $6\alpha$ -hydroxycortisol, le  $6\beta$ -hydroxycortisol, la triamcinolone et la  $20\beta$ -dihydroprednisolone. Des limites de détection très variables, de 3 à 20 ng/mL, ont été obtenues, cependant adéquates dans le cadre du présent travail. Il n'est pas autrement surprenant qu'une méthode regroupant des molécules relativement différentes quant à leur polarité et nombre de fonctions hydroxyles par exemple, ne puisse conduire à une détection également sensible.

Au niveau individuel, nous avons observé que les extraits préparés de béclo méthasone, seul glucocorticoïde chloré, n'étaient pas stables à la température ambiante et qu'il était possible de

différencier la bétaméthasone de la dexaméthasone, deux stéréoisomères, à l'aide de leurs rapports d'ions caractéristiques respectifs.

Finalement, l'analyse des extraits recueillis suite à l'administration orale de prednisolone et de prednisone a démontré l'excrétion de prednisone, prednisolone et  $20\beta$ -dihydroprednisolone sous leur forme libre, c'est-à-dire que ces molécules ne semblent pas, ou très peu, conjuguées à l'acide glucuronique. Nous avons aussi montré que la prednisolone est un métabolite important de la prednisone.

Des travaux se poursuivront pour réaliser d'autres études d'excrétion dans le but d'étudier le métabolisme des divers glucocorticoïdes présentés dans ce mémoire. La détection des corticostéroïdes dits naturels devra aussi être étudiée.

### Références

AGILENT TECHNOLOGIES. 2000. Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD techniques and software operation, course number H1181A, Student manuel, USA, Agilent Technologies, Inc.

ANTIGNAC, J-P., Le Bizec, B., Monteau, F., Andre, F. 2002. « Differentiation of betamethasone and dexamethasone using liquid chromatography/positive electrospray tandem mass spectrometry and multivariate statistical analysis ». Journal of Mass Spectrometry, volume 37, p. 69-75

ARAKI, Y., Yokota, O., Kato, T., Kashima, M., Miyazaki, T. 1965. « Dynamics of synthetic corticosteroids in man ». Steroids dynamics. Proceedings of the symposium on the dynamics of steroid hormones held in Tokyo, may, 1965, Academic Press, Inc.

ARTHUR, K. E., Wolff, J-C., Carrier, D. J. 2004. « Analysis of betamethasone, dexamethasone and related compounds by liquid chromatography / electrospray mass spectrometry ». Rapid Communications in Mass Spectrometry, volume 18, p. 678-684

BELLOCQ, F. 1991. Sport et Dopage, la grande hypocrisie, Paris, Éditions Du Félin

BRIGGS, M., H. 1970. Steroid Biochemistry and pharmacology, London, Academic Press Inc.

CAVINA, G., Valvo, L., Gallinella, B., Porrà, R., Savella, A. L. 1992. « The identification of related substances in 9 $\alpha$ -fluoroprednisolone-21 acetate by means of high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry ». Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, volume 10, p. 437-446

COMPERNOLLE, F., Vanderhaeghe, H., Nonclercq, M. 1972. « Detection and identification of trace steroids in prednisolone ». Journal of Pharmacy and Pharmacology, volume 24, p. 429-433

CPS, Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques. Association des pharmaciens du Canada 2002

DE WASCH, K., De Brabander, H. F., Van de Wiele, M., Vercammen, J., Courtheyn, D., Impens, S. 2001. « Differentiation between dexamethasone and bethamethasone in a mixture using multiple mass spectrometry ». Journal of Chromatography A, volume 926, p. 79-86

FIORI, M., Pierdominici, E., Longo, F., Brambilla, G. 1998. « Identification of main corticosteroids as illegal feed additives in milk replacers by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry ». Journal of Chromatography A, volume 807, p. 219-227

FLURI, K., Rivier, L., Dienes-Nagy, A., You, C., Maître, A., Schweizer, C., Saugy, M., Mangin, P. 2001. « Method for confirmation of synthetic corticosteroids in doping urine samples by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry ». Journal of Chromatography A, volume 926, p. 87-95

FREY, B. M., Frey, F. J. 1982. « Simultaneous measurement of prednisone, prednisolone and 6 $\beta$ -hydroxyprednisolone in urine by high-performance liquid chromatography coupled with a radioactivity detector ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 229, p. 283-292

GARG, V., Jusko, W. J. 1991. « Simultaneous analysis of prednisone, prednisolone and their major hydroxylated metabolites in urine by high-performance liquid chromatography ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 567, p. 39-47

GARG, V., Jusko, W. J. 1994. « Bioavailability and reversible metabolism of prednisone and prednisolone in man ». Biopharmaceutics and Drug Disposition, volume 15, p. 163-172

GENARD, P., Palem-Vliers, M., Coninx, P., Margoulies, M. 1968. « The mass spectrometric behavior of some adrenal cortical steroids and their lactonic derivatives ». Steroids, volume 12, p. 763-776

GENARD, P. 1974. Contribution à la détermination de la configuration et de la conformation moléculaires des corticostéroïdes, Paris, Masson et Cie, Éditeurs

GUAN, F., Uboh, C., Soma, L., Hess, A., Luo, Y., Tsang D. S. 2003. « Sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of beclomethasone dipropionate and its metabolites in equine plasma and urine ». Journal of Mass Spectrometry, volume 38, p. 823-838

HARPER, H. A. 1977. Précis de Biochimie, Québec, les presses de l'Université Laval

HEFTMANN, E. 1975. Chromatography. A laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods, 3<sup>rd</sup> edition

HOUGHTON, E., Dumasia, M. C., Wellby, J. K. 1981. « The use of combines high performance liquid chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry to confirm the administration of synthetic corticosteroids to horses ». Biomedical Mass Spectrometry, volume 8, p. 558-564

LI, Y. N., Tattam, B., Brown, K. F., Seale, J. P. 1996. « Determination of the epimers 22R and 22S of budesonide in human plasma by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 683, p. 259-268

LINDBERG, C., Paulson, J., Edsbäcker, S. 1987. « The use of on-line liquid chromatography/mass spectrometry and stable isotope techniques for the identification of budesonide metabolites ». Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, volume 14, p. 535-541

LYKKESFELDT, J., Loft, S., Poulsen, H. E. 1994. « Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 $\beta$ -hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity ». Journal of Chromatography B, volume 660, p. 23-29

MAKIN, H., L., J. 1984. Biochemistry of steroid hormones, 2<sup>nd</sup> edition, London, Blackwell Scientific Publications

MARIEB, E. N. 1999. Anatomie et Physiologie humaines, Québec, Éditions du renouveau pédagogique

MARQUET, P., Lachâtre, G. 1999. « Liquid chromatography-mass spectrometry : potential in forensic and clinical toxicology ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 733, p. 93-118

MARTINDALE. 2003. The complete drug reference, thirty-third edition. London, Chicago, Pharmaceutical Press

MCKERNS, K., W. 1968. Functions of the adrenal cortex, États-Unis, Meredith Corporation

MOORE, D. E., Tamat, S. R. 1980. « Photosensitization by drugs: photolysis of some chlorine-containing drugs ». Journal of Pharmacy and Pharmacology, volume 32, p. 172-177

NIESSEN, W., M., A. 1999. Liquid chromatography-Mass spectrometry, Second edition, revised and expanded, Chromatographic science series, volume 79, New-York, USA, Marcel Dekker, Inc.

ORTH, D., Kovacs, W. J. 2001. Up to date, volume 9, No.3, 2001

PARK, S-J., Kim, Y-J., Pyo, H-S., Park, J. 1990. « Analysis of corticosteroids in urine by HPLC and thermospray LC/MS ». Journal of Analytical Toxicology, volume 14, p. 102-108

RIZEA SAVU, S., Silvestro, L., Haag, A., Sörgel, F. 1996. « A confirmatory HPLC-MS/MS method for ten synthetic corticosteroids in bovin urines ». CCC, p. 1351-136

ROCCI, M. L. Jr., Jusko, W. J. 1981. « Analysis of prednisone, prednisolone and their 20 $\beta$ -hydroxylated metabolites by high-performance liquid chromatography ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 224, p. 221-227

RODCHENKOV, G. M., Vedenin, A. N., Uralets, V. P., Semenov, V. A. 1991.  
« Characterization of prednisone, prednisolone and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 565, p. 45-51

ROSE, J. Q., Jusko, W. J. 1979. « Corticosteroid analysis in biological fluids by high-performance liquid chromatography ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 162, p. 273-280

ROTH, G., Wikby, A., Nilsson, L., Thalén A. 1980. « High-performance liquid chromatographic determination of epimers, impurities, and content of the glucocorticoid budesonide and preparation of primary standard ». Journal of Pharmaceutical Sciences, volume 69, p. 766-770

RYRFELDT, A., Edsbacker, S., Pauwels, R. 1984. « Kinetics of the epimeric glucocorticoid budesonide ». Clinical Pharmacology and Therapeutics, volume 35, p. 525-530

SAVU, S. R., Silvestro, L., Haag, A., Sörgel, F. « A confirmatory HPLC-MS/MS method for ten synthetic corticosteroids in bovine urines ». CCC, p. 1351-1363

SCHLEIMER, R. P., Claman, H., N., Oronsky, A. 1989. Anti-inflammatory steroid action, San Diego, California, Academic Press, Inc.

SEGARRA, V., Carrera, F., Fabregas, J-L., Claramunt, J. 1995. « Degradation profile and identification of the major degradation products of dobutride under several conditions by GC/MS and HPLC-particle beam/MS ». Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, volume 13, p. 987-993

SEGURA, J., Venatura, R., Jurado, C. 1998. « Review. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents ». Journal of chromatography B, volume 713, p.61-90

STOLKER, A. A. M., Schwillens, P. L. W. J., van Ginkel, L. A., Brinkman, U. A. 2000. « Comparison of different liquid chromatography methods for the determination of corticosteroids in biological matrices ». Journal of Chromatography A, volume 893, p. 55-67

TANG, P. W., Law, W. C., Wan, T. S., M. 2001. « Analysis of corticosteroids in equine urine by liquid chromatography-mass spectrometry ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 754, p. 229-244

TENG, R-L., Benet, L. Z. 1989. « Letter to the editor. Simultaneous measurement of prednisone, prednisolone and 6 $\beta$ -hydroxyprednisolone in urine by high-performance liquid chromatography using dexamethasone as the internal standard ». Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, volume 493, p. 421-423

VOLIN, P. 1995. « Review. High-performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids ». Journal of Chromatography B, volume 671, p.319-340

VOLMER, D. A., Hui, J. P. M. 1997. « Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass spectrometry ». Rapid communications in mass spectrometry, volume 11, p. 1926-1934

VREE, T. B., Verwey-van Wissen, C. P. W. G. M., Lagerwerf, A. J., Swolfs, A., Maes, R. A. A., van Ooijen, R. D., van Eikeman Hommes, O. R., Jongen, P. J. H. 1999. « Isolation and identification of the C6-hydroxy and C20-hydroxy metabolites and glucuronide conjugate of methylprednisolone by preparative high-performance liquid chromatography from urine of patients receiving high-dose pulse therapy ». Journal of Chromatography B, volume 726, p.157-168

WILLOUGHBY, R., Sheehan, E., Mitrovich, S. 2002. A global view of LC/MS. How to solve your most challenging analytical problems, 2<sup>nd</sup> edition, Pennsylvania, USA, Global view publishing