

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier-Santé humaine

**Détermination de l'origine endogène ou exogène de la norandrostérone
urinaire par GC/C/IRMS**

Par
Marilyn Cléroux
B. Sc. en biochimie

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Dr F. T. Delbeke
Faculteit Diergeneeskunde
Universiteit Gent

Examineur interne

Dr François Lépine
INRS-Institut Armand-Frappier

Directrice de recherche

Dr Christiane Ayotte
INRS-Institut Armand-Frappier

Mai 2002

Résumé

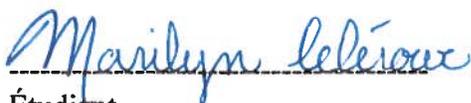
La nandrolone ou la 19-nortestostérone (19-NT) fait partie de la classe des agents anabolisants dont l'utilisation par les athlètes est interdite par le Comité international olympique (CIO). C'est un des stéroïdes les plus utilisés dans le monde sportif, car il a le même pouvoir anabolisant que la testostérone, mais avec seulement 30% de ses effets androgéniques. Sa grande popularité vient également du fait qu'il est très accessible, des précurseurs de 19-NT (dont on ne connaît pas l'efficacité) étant offerts en vente libre comme supplément diététique aux États-Unis et disponibles par Internet. Dans les contrôles anti-dopage, sa détection est liée à la présence de ses métabolites urinaires, soit la norandrostérone et la norétiocholanolone. Le CIO a recommandé les limites de positivité de ces métabolites à 2 ng/mL pour les hommes et à 5 ng/mL pour les femmes, car certaines données de la littérature indiquent l'excrétion de bas niveaux de norandrostérone chez les femmes enceintes et chez les hommes (entre 0,08 et 0,6 ng/mL). Ce stéroïde pouvant être produit naturellement, il était nécessaire d'étudier la possibilité de pouvoir différencier les métabolites de la 19-NT endogène de celle provenant de source commerciale.

Trois groupes différents ont proposé l'utilisation de la spectrométrie de masse d'isotopes stables (IRMS) comme un outil prometteur pour la détection de l'administration de la testostérone. En effet, les stéroïdes endogènes sont biosynthétisés à partir du réservoir de cholestérol humain constitué à partir d'une large variété de matériel végétal consommé par les humains et/ou les animaux ingérés. Les stéroïdes de synthèse disponibles commercialement sont préparés à partir d'un seul type de plante, majoritairement du soya, et ont habituellement une valeur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ inférieure à celle des stéroïdes naturels. Le but de ce projet est donc, d'étudier la possibilité d'utiliser la spectrométrie de masse d'isotopes stables pour la mesure du rapport isotopique des atomes de carbone de la norandrostérone afin d'en déterminer l'origine.

Ce projet est divisé en 3 étapes. Nous avons tout d'abord développé une méthode d'isolement des métabolites de la 19-NT appropriée aux analyses par GC/C/IRMS. Deuxièmement, nous avons évalué les rapports ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$) de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétées suite à la prise de norandrostènedione et de 19-NT. Dernièrement, nous avons par l'analyse d'urine de femmes enceintes obtenu des valeurs « naturelles ».

III

Les résultats obtenus ont permis de vérifier l'utilité de la spectrométrie de masse d'isotopes stables comme outil diagnostique de l'origine des norstéroïdes excrétés. Les quotients ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ ‰}$) des métabolites urinaires provenant de l'administration de nortestostérone ou de norandrostènedione sont significativement différentes de celles mesurées de la norandrostérone excrétée durant la grossesse. Les valeurs de la norandrostérone d'origine synthétique se situent entre -27 et -35 ‰ , tandis que les rapports ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ ‰}$) de l'analogue naturel sont inférieurs à -25 ‰ (selon les valeurs absolues mesurées dans les échantillons de deux volontaires).



Étudiant



Directrice de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de maîtrise, tout spécialement :

- Dr Christiane Ayotte, ma directrice de recherche, pour sa confiance, son appui et sa collaboration tout au long de ces travaux de recherche

- Danielle Goudreault, Alain Charlebois et Anahid Fakirian pour leur disponibilité, leur aide et leurs judicieux conseils

- Toute l'équipe de techniciens du laboratoire anti-dopage pour leur accueil et leur aide quotidienne

- Tous les généreux fournisseurs d'échantillons urinaires, sans les quels mon projet ne se serait pas réalisé

- Johnny pour sa présence, sa patience son aide lors de la rédaction et surtout son amour

- Toute ma famille pour leurs encouragements et leur soutien

Table des matières

Résumé.....	II
Remerciements.....	IV
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Le dopage sportif et son contrôle.....	1
1.2 Les stéroïdes androgènes : Structure, nomenclature, biosynthèse mécanisme d'action et métabolisme.....	2
1.2.1 Biosynthèse des stéroïdes androgènes.....	3
1.2.2 Mécanisme d'action et métabolisme des androgènes.....	5
1.3 Nortestostérone.....	8
1.3.1 Excrétion des métabolites de la nortestostérone.....	9
1.4 Détection de stéroïdes « naturels » par l'emploi de la spectrométrie de masse.....	12
1.4.1 Principe et analyse par spectrométrie de masse d'isotopes stables.....	12
1.5 Problématique et objectif.....	15
1.6 Approche méthodologique.....	16
Chapitre 2 Matériels et méthodes.....	17
2.1 Standards.....	17
2.2 Réactifs.....	17
2.3 Vérification de la pureté des capsules de norandrostènedione commerciale...18	
2.4 Quantification des métabolites par GC/MS.....	18
2.4.1 Isolement et analyses des stéroïdes libres et glucuroconjugués....18	
2.4.2 Analyse GC/MS.....	19
2.4.3 Courbes d'étalonnage et limites de détection de la norandrostérone et de la norétiocholanolone.....	20
2.5 Analyse GC/C/IRMS.....	21

2.5.1	Comparaison des méthodes d'isolement pour l'analyse GC/C/IRMS.....	21
2.5.1.1	Analyse GC/C/IRMS.....	21
2.5.1.2	Méthode basée sur l'emploi du réactif de Girard.....	22
2.5.1.3	Méthode basée sur l'emploi de la chromatographie d'immunoaffinité.....	22
2.5.1.4	Hydrolyse directe des stéroïdes glucuroconjugués et sulfoconjugués.....	23
2.5.1.5	Méthode basée sur l'emploi de la chromatographie liquide à haute performance.....	23
2.5.2	Analyse GC/MS et GC/C/IRMS de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétées suite à la prise de norandrostènedione.....	24
2.5.3	Analyse GC/C/IRMS de la norandrostérone excrétée suite à l'administration de nortestostérone (ou de ses précurseurs).....	26
2.5.4	Isolement et analyse de la norandrostérone endogène excrétée durant la grossesse.....	26
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....		27
3.1	Vérification de la pureté des capsules de norandrostènedione d'origine commerciale.....	27
3.2	Limites de détection et de quantification de la norandrostérone et de la norétiocholanolone.....	28
3.3	Comparaison de l'efficacité des méthodes de préparation des échantillons...30	
3.4	Quantification de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétées suite à la prise de norandrostènedione d'origine commerciale.....	40
3.4.1	Courbes d'étalonnage.....	40
3.4.2	Excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone.....	40
3.5	Analyse GC/C/IRMS de la norandrostérone et de la norétiocholanolone.....	45
Chapitre 4 Conclusion.....		51
Références.....		53

Liste des figures

Figure 1.1 :Structure de l'épiandrosterone.....	3
Figure 1.2 :Biosynthèse de la testostérone et de l'oestradiol.....	4
Figure 1.3 :Réduction 5-ène et 3-céto (phase I).....	6
Figure 1.4 :Glucuroconjugaison et sulfoconjugaison (phase II).....	7
Figure 1.5 :Structure de la 19-nortestostérone, de la 19-norandrostènedione et de la 19-norandrostènediol ainsi que leurs 3 principaux métabolites urinaires.....	9
Figure 1.6 :Voie proposée pour la biosynthèses de la 19-nortestostérone.....	11
Figure 1.7 :Influence de l'apport exogène de nortestostérone sur la valeur des $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$	15
Figure 3.1 :A)Chromatogramme et B) spectre de masse de la norandrostènedione dérivé TMS (200 ng/ μL) provenant d'une capsule commerciale.....	27
Figure 3.2 :Chromatogrammes de l'analyse GC/MS de la norandrostérone (m/z 405) et du standard interne (m/z 407) dérivé TMS isolés par les différentes méthodes de préparation des échantillons.....	33
Figure 3.3 :Chromatogramme GC/C/IRMS de l'analyse de la norandrostérone et de la norétiocholanolone (10 ng injectés).....	37
Figure 3.4 :Comparaison entre les chromatogrammes de l'analyse GC/C/IRMS d'un échantillon contenant plus de 35 ng/mL de norandrostérone et moins de 35 ng/mL de norandrostérone.....	39
Figure 3.5 :Courbe d'étalonnage de la A)norandrostérone et de la B) norétiocholanolone.....	41
Figure 3.6 :Excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone suite à l'administration d'une capsule commerciale de norandrostènedione.....	44
Figure 3.7 :Chromatogramme GC/C/IRMS de la solution de standards authentiques d'une concentration finale injectée de 100 ng/ μL	46

VIII

Liste des tableaux

Tableau I	Urines recueillies après l'administration d'une capsule commerciale de 100 mg de norandrostènedione.....	25
Tableau II	Limites de détection et de quantification de la norandrostérone et de la norétiocholanolone obtenues pour la méthode décrite.....	29
Tableau III	Rendement d'extraction des différentes méthodes de préparation des échantillons.....	32
Tableau IV	Limites de détection du GC/C/IRMS et des différentes méthodes de préparation des échantillons.....	38
Tableau V	Concentrations urinaires de NA, NE, LH et T/E suivant l'administration de 100 mg de norandrostènedione.....	43
Tableau VI	Données analytiques des stéroïdes d'intérêt sous forme non dérivé.....	45
Tableau VII	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ de la NA, NE, A, E, PD et PT de 24 échantillons d'urine d'athlètes positifs aux métabolites de la nortestostérone	48
Tableau VIII	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ de la NA, NE, A, E, PD et PT suite à la prise de 100 mg de norandrostènedione.....	49
Tableau IX	Ratios $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ moyens de la norandrostérone excrétées suite à la prise de norandrostènedione et de nortestostérone et lors de la grossesse.....	50

Liste des abréviations

A : androstérone

ADN : acide désoxyribonucléique

CIO : Comité International Olympique

DHT : dihydrotestostérone

ESTD : standard externe

E : étiocholanolone

FSH : hormone folliculostimulante

GC/MS : chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

GC/C/IRMS : chromatographie en phase gazeuse / combustion / spectrométrie de masse à isotope stable

GC/MS/MS : chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse en tandem

GC/HRMS : chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse à haute Résolution

hCG : human chorionic gonadotropin

IAC : chromatographie d'immunoaffinité

ISTD : standard interne

LH : hormone lutéinisante

LHRH : luteinising hormone releasing hormone

MTBE : *tert* - butyl méthyl éther

m/z : masse/charge

NA : norandrostérone

NE : norétiocholanolone

19-NT : 19-nortestostérone

PD : pregnanediol

PT : pregnanetriol

SHBG : sex hormone binding globuline

SIM : balayage d'ions sélectifs

S/N : signal / bruit de fond

T/E : testostérone / épitestostérone

TMS : triméthylsilyl

Chapitre 1

Introduction

1.1 Le dopage sportif et son contrôle

Laure et Noret ont bien décrit l'histoire du dopage (Laure, 1999 et Noret, 1981). Ils ont constaté que celui-ci remonte à la nuit des temps et s'observe partout, non seulement dans le milieu sportif. Il n'existe pas, en effet, d'aire géographique qui n'ait, depuis des lustres, sélectionné des plantes aux vertus stimulantes. *Ephedra* ou *ginseng* en Asie, *coca*, *mate* ou *guarana* en Amérique du Sud, noix de *cola*, *khat* ou racine d'*iboga* en Afrique, mandragore, noix vomique, café en Europe, l'éventail est riche et largement utilisé.

Dans les premières décennies du 19^{ème} siècle, le dopage connaît un essor considérable sous la double influence des progrès de la médecine et de la renaissance du sport moderne. Les dérivés d'anciens produits comme l'*opium* et l'*ephedra* sont très populaires. Parmi les dérivés de l'*opium*, l'héroïne est très en vogue dans les courses de chevaux, tandis que la morphine fait fureur en boxe et dans les disciplines d'endurance. On la crédite d'ailleurs de la première mort par dopage, celle du cycliste gallois Arthur Linton, âgé de 29 ans en 1879. Puis en 1931, l'*ephedra* sert de support à la synthèse de la benzédrine, la première amphétamine. Celle-ci fait probablement son entrée sur la scène du dopage aux Jeux olympiques de Berlin en 1936 et sera la vedette des produits dopants jusqu'aux années 1960, moment où les accidents qui leur sont attribués deviennent de plus en plus nombreux. C'est également dans les années soixante que les anabolisants font leur entrée remarquée dans l'arsenal thérapeutique. À l'origine, l'emploi des anabolisants a été perçue comme étant réservé à l'haltérophilie et aux disciplines athlétiques exigeant une force musculaire pure. Il

semble maintenant que certains puissent les utilisés en quantité et fréquence variables dans des buts allant de la « ré-équilibration » hormonale à la prise d'agents multiples durant des cycles prolongés. L'usage des médicaments et des drogues est maintenant banni par les autorités sportives internationales dont le C.I.O. Une liste de substances interdites, contenant maintenant plus d'une centaine d'agents dopants, a été établie. Elle est divisée en cinq catégories : les stimulants, les analgésiques narcotiques, les diurétiques, les hormones peptidiques et glycoprotéiniques ainsi que les agents anabolisants. Cette dernière catégorie comprend deux types de substances soient, les agonistes- β et les stéroïdes androgènes anabolisants (C.I.O., 2000).

1.2 Les stéroïdes androgènes : structure, nomenclature, biosynthèse, mécanisme d'action et métabolisme

La structure de base de tous les stéroïdes est celle du phénanthrène complètement réduit, soit le perhydrophénanthrène, auquel un cycle à 5 atomes de carbone a été fusionné. La structure complète est connue sous le nom de noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène (Gower, 1979). Les quatre cycles sont désignés par les lettres A, B, C et D et les carbones sont numérotés selon une séquence propre aux stéroïdes. Par convention, les groupes qui sont situés au-dessus du plan de la molécule sont des substituants β (lignes pleines), tandis que ceux qui sont en dessous de ce plan sont qualifiés de α (lignes pointillées). La structure tridimensionnelle de l'épiandrostérone est dessinée à la figure 1.1 en tenant compte des règles précédemment établies (Volhardt et Shore, 1995 et Gower, 1979).

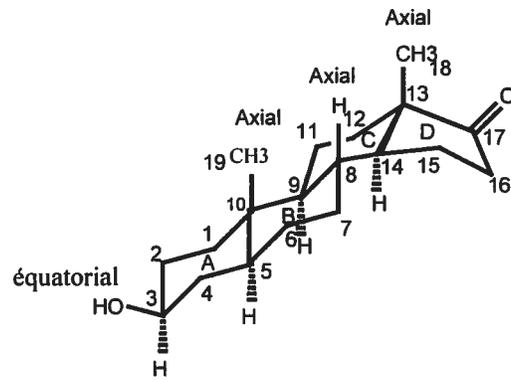


Figure 1.1 Structure de l'épiandrosterone

1.2.1 Biosynthèse des stéroïdes androgènes

Les hormones stéroïdiennes comprennent les hormones corticosurrénales et les hormones gonadiques, soit les progestagènes, les oestrogènes et les androgènes. Les androgènes, qui sont les hormones sexuelles mâles, sont synthétisés à partir du cholestérol dans les testicules (95%) et le cortex surrénalien (5%). Le clivage de la chaîne latérale du cholestérol est l'étape limitante de la stéroïdogénèse et est catalysé par le complexe enzymatique mitochondrial, cytochrome P450. Il existe deux voies pour la biosynthèse des androgènes à partir de la pregnénolone. La première voie implique les métabolites 5-ène-3 β -hydroxystéroïdes tel que la 17 α -hydroxypregnénolone et la déhydroépiandrosterone (DHEA) et est appelée la voie 5-ène (Δ 5). La deuxième voie, 4-ène (Δ 4), utilise les métabolites 4-ène-3-oxostéroïdes tel que la progestérone et la 17 α -hydroxyprogestérone. Dans les testicules et les follicules ovariens, la voie Δ 5 est privilégiée, tandis que dans le corpus luteum c'est la voie Δ 4 (figure 1.2).

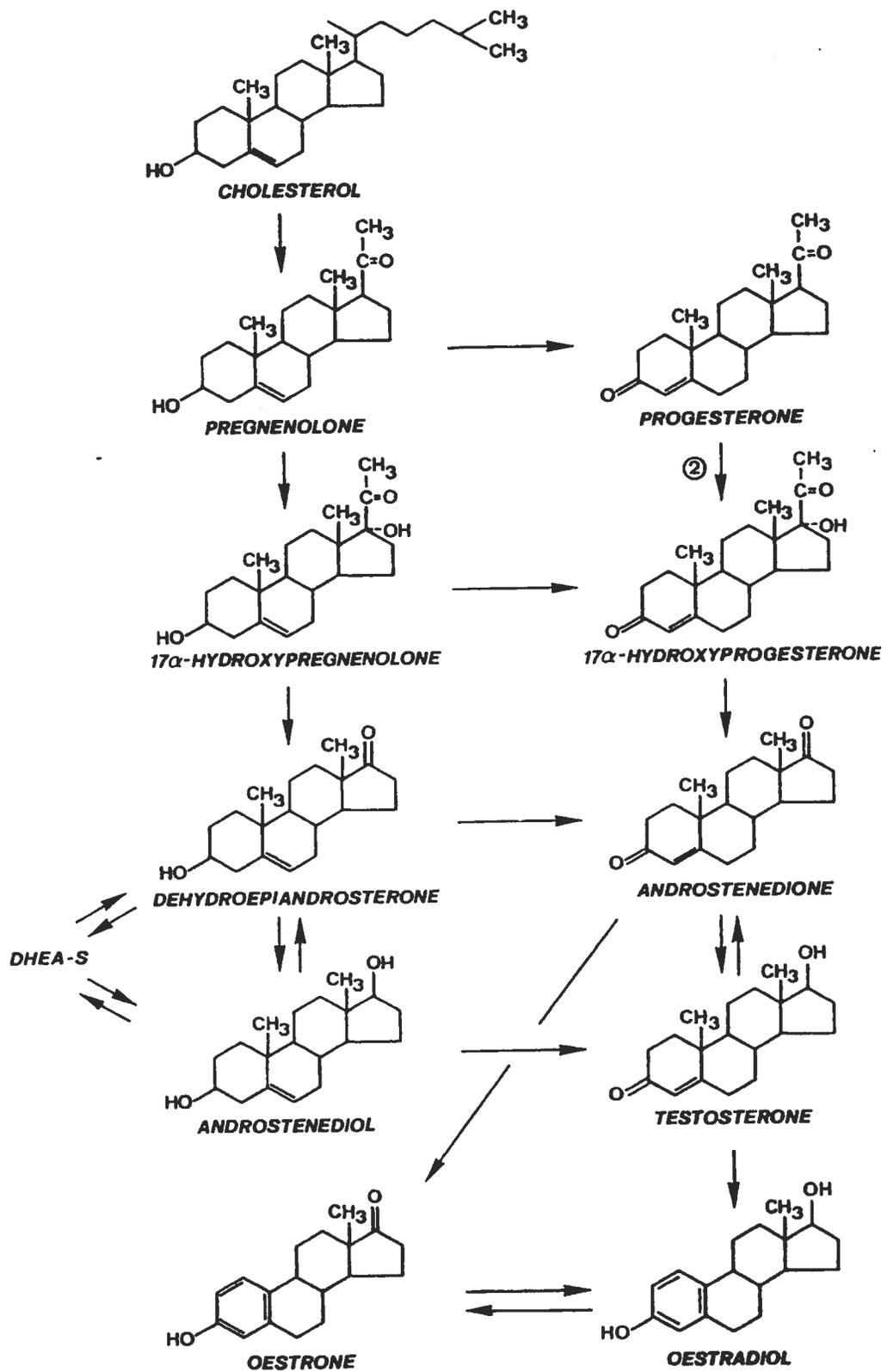


Figure 1.2 : Biosynthèse de la testostérone et de l'oestradiol (Gower, 1979)

La régulation hormonale de la biosynthèse des androgènes testiculaires fait intervenir des interactions entre l'hypothalamus, l'adénohypophyse et les testicules. L'hypothalamus sécrète la LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone) qui régit la libération de la LH, par l'adénohypophyse, d'une manière pulsatile. Cette hormone lutéinisante agit au niveau des cellules de Leydig et stimule la stéroïdogénèse. Une trop grande augmentation des concentrations de testostérone dans le sang amène une rétroinhibition sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse, ce qui inhibe la sécrétion de la LH et arrête la synthèse des androgènes (Gower, 1979 ; Marieb, 1993 ; Venturelli et al, 1995 et Wilson et al, 1995).

1.2.2 Mécanisme d'action et métabolisme des androgènes

Les androgènes ont plusieurs effets physiologiques. Ils contrôlent le développement et le maintien des organes sexuels mâles et ils sont impliqués dans l'apparition des caractéristiques sexuelles secondaires. De plus certains stéroïdes androgènes ont des effets anabolisants, ils entraînent donc la rétention des produits azotés en augmentant le taux de synthèse protéique tout en diminuant le taux de catabolisme protéique.

La testostérone et la 5 α -dihydrotestostérone (DHT), sont les androgènes les plus actifs. La testostérone est convertie en DHT par la 5 α -réductase. Cette conversion est très fréquente dans les organes cibles des androgènes, soit l'épididyme et la prostate, elle augmente ainsi le signal androgénique. La testostérone, quant à elle agit plutôt au niveau du cerveau, de l'hypophyse, des reins, des muscles, de la peau et du système reproducteur mâle. Les androgènes sont amenés aux cellules par des protéines plasmatiques, soit l'albumine et la SHBG. Dès que l'hormone atteint la cellule, elle traverse la membrane plasmique grâce à son caractère lipophile, puis elle se fixe ensuite au récepteur des stéroïdes qui est intracellulaire (la DHT a trois fois plus d'affinité pour le récepteur que la testostérone). Le complexe hormone-récepteur pénètre alors dans le noyau, où

son domaine de fixation à l'ADN va s'attacher aux promoteurs correspondants, ce qui active la transcription du gène-cible (Gower, 1979 et Lodish et al., 1997 ; Wilson et al., 1995).

Quant au métabolisme des androgènes, il se fait au niveau du foie (cytochrome P450) et est divisé en deux phases, la phase I et la phase II. Les réactions de phase I, dont les plus importantes sont les réductions des fonctions 5-ène et 3-céto, ont pour but d'inactiver les stéroïdes et de faciliter leur élimination. La réduction du lien double C-4,5 est l'étape limitante et est irréversible. Les enzymes qui catalysent cette réaction sont la 5 α -réductase et la 5 β -réductase. Immédiatement après, le groupe 3-céto est réduit et les enzymes impliquées sont alors la 3 α - et la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. (Björkem, 1969 et Träger, 1977)(figure 1.3).

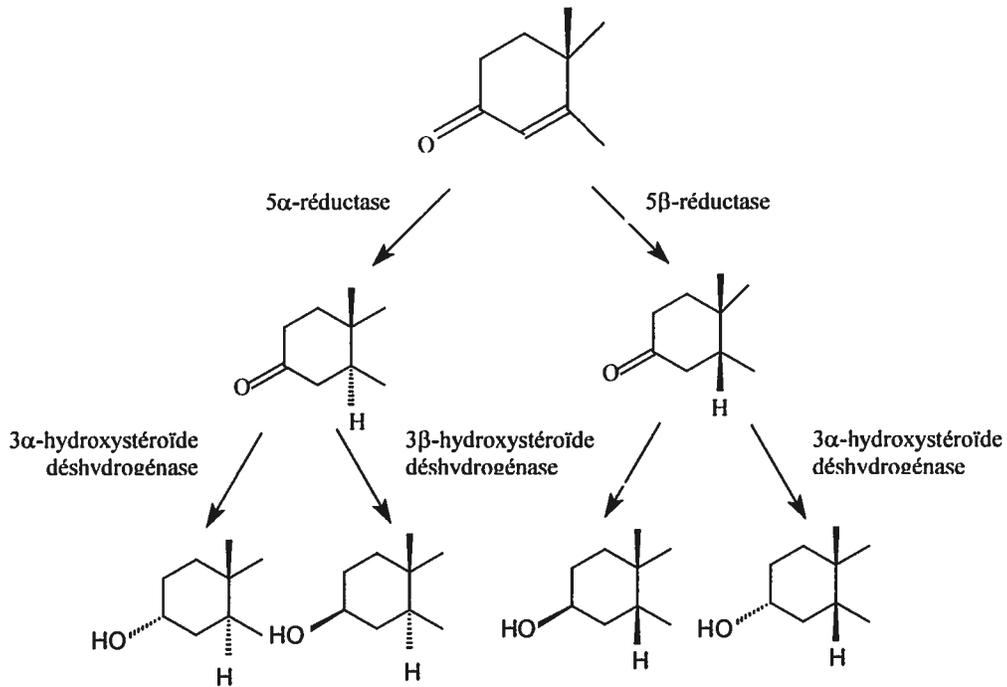


Figure 1.3 : Réduction 5-ène et 3-céto (phase I)(Schänzer, 1996)

Les réactions de phase II agissent en couplant les stéroïdes ou leurs métabolites avec l'acide glucuronique ou le sulfate pour faciliter leur excrétion. Ces deux réactions sont contrôlées enzymatiquement et ont comme substrats, pour la glucuronidation, l'acide UDP-glucuronique et pour la sulfatation, la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate. Suite à la réduction du groupe 3-céto, les stéroïdes possédant une fonction 3α -hydroxy se conjuguent majoritairement avec l'acide glucuronique, tandis que les stéroïdes 3β -hydroxy sont excrétés majoritairement sous forme de sulfates (Träger, 1977). (figure 1.4)

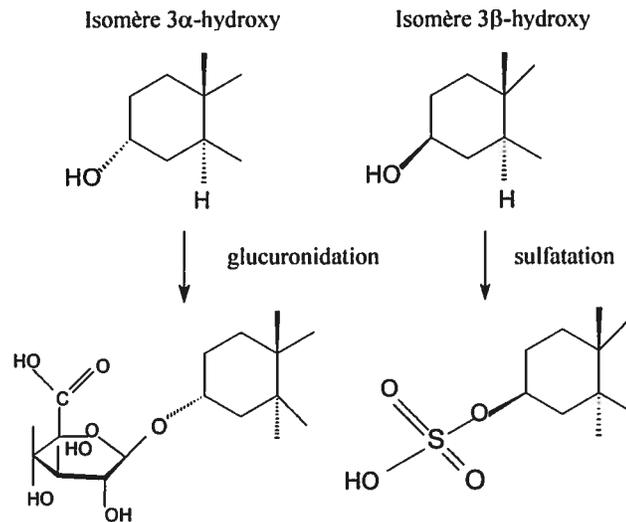


Figure 1.4 Glucoconjugaison et sulfoconjugaison (phase II)

1.3 Nortestostérone

Chaque année, des 100 000 tests effectués dans les laboratoires accrédités par le C.I.O., près de 1200 sont positifs. De 20% à 30% de ces résultats positifs sont causés par l'administration de 19-nortestostérone (CIO, 2000).

La synthèse de la 19-nortestostérone (19-NT) a été réalisée pour la première fois par Birch en 1950 et par Wilds et Nelson en 1953. La substitution du groupe méthyle en C-19 de la testostérone par un atome d'hydrogène cause une diminution appréciable du rapport entre l'activité anabolique et androgénique, ce qui réduit l'apparition des effets secondaires virilisants. Ces propriétés sont à la base de l'utilisation thérapeutique de la 19-NT en médecine vétérinaire et humaine dans le traitement des déficiences protéiniques, de l'ostéoporose et des brûlures. La faible activité androgénique, les propriétés anabolisantes et la disponibilité de ce stéroïde ont fait que son utilisation a été détournée au domaine du sport et à celui des courses de chevaux. La 19-NT a également été employée comme agent promoteur de croissance afin d'accélérer les gains de poids des animaux (Bowers et al, 1962 ; Camerino et al, 1975 ; Heusler et al, 1962 ; Jansen et al.,1984 ; Moretti et al.,1985 et Rapp et al., 1987).

Depuis quelques années, des préparations commerciales, sous forme de comprimés oraux, contenant des précurseurs de la 19-NT, soit la norandrostènedione et la norandrostènediol, sont en vente libre comme supplément diététique aux États-Unis et par Internet. Cette grande disponibilité semble directement à l'origine de l'augmentation de certains cas de dopage à la 19-NT. La norandrostènedione et la norandrostènediol étant administrées oralement, leur élimination est très rapide (effet de premier passage) et leur période de détection drastiquement réduite (environ une semaine) contrairement aux préparations habituelles de 19-NT (ex. 19-NT décanoate), qui disponibles sous forme injectable, peuvent être détectées pendant plusieurs mois (Kintz et al, 1999)(figure 1.5).

1.3.1 Excrétion des métabolites de la nortestostérone

L'excrétion des métabolites de la 19-NT chez l'homme a été étudiée en 1958 par Engel et al. Ils ont alors isolé et identifié, la 5 α -estran-3 α -ol-17-one (19-norandrostérone), la 5 β -estran-3 α -ol-17-one (19-norétiocholanolone) et la 5 α -estran-3 β -ol-17-one (19-norépiandrostérone) comme métabolites urinaires produits suite à l'administration de 19-NT et de 19-NT décanoate. La 5 α -estran-3 α -ol-17-one et la 5 β -estran-3 α -ol-17-one (les deux principaux métabolites) sont excrétées majoritairement conjuguées à l'acide glucuronique (soit respectivement 88% et 80%) tandis que la 5 α -estran-3 β -ol-17-one est excrétée complètement sous forme sulfoconjuguée (Massé et al., 1985). Massé et al.(1985) ainsi que Schänzer (1996) ont confirmé la 5 α -estran-3 α -ol-17-one comme étant le produit urinaire majeur suite à l'administration de 19-NT décanoate, le rapport de l'excrétion des métabolites 5 α /5 β indiquant alors une valeur supérieure à 3 (figure 1.5).

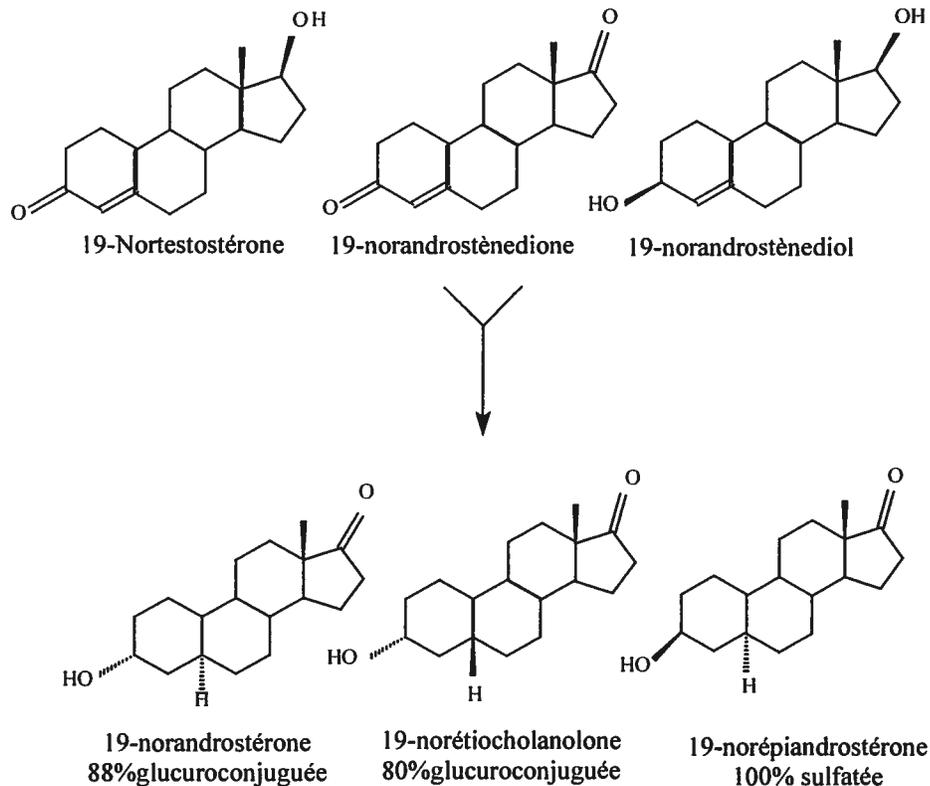


Figure 1.5 : Structure de la 19-nortestostérone, de la 19-norandrostènedione et de la 19-norandrostènediol ainsi que leurs 3 principaux métabolites urinaires

Dans le cadre du contrôle du dopage sportif, la prise de 19-NT est liée à la présence de norandrostérone urinaire en quantité supérieure à 2 ng/mL chez l'homme et à 5 ng/mL chez la femme (CIO, 2000). Cette norme a été proposée en tenant compte de l'expérience des laboratoires et des données de la littérature qui indiquaient l'excrétion de très faibles niveaux endogènes de norandrostérone, principalement lors de la grossesse. Trois études ont démontré en utilisant un important volume d'urine et des méthodes de purification poussées, des niveaux endogènes moyens de norandrostérone de 0,08 ng/mL chez l'homme, les niveaux supérieurs mesurés étant de 0,6 ng/mL. Le seuil de 2 ng/mL proposé par le CIO semble donc conservateur. Chez la femme, les concentrations normales observées sont toutes inférieures à 1 ng/mL (Le Bizec et al., 1999 ; Ciardi et al., 1999 ; Jeanneau et al., 1999 ; Van Eenoo et al., 1999). Alors que durant la grossesse, les niveaux de norandrostérone sont nettement augmentés, avec des valeurs mesurées à près de 23 ng/mL (Mareck-Engelke et al., 1999).

Il semblerait que la biosynthèse de la 19-NT se ferait à partir d'androgènes, qui dans certains tissus, subiraient une aromatisation en oestrogènes. Selon Dehennin, lors de l'aromatisation, une voie mineure (moins de 10%) utilisant la déméthylation produirait les 19-norstéroïdes. Ce procédé serait également stimulé par la prise de hCG¹ (Reznik et al. 2001 ; Dehennin et al., 1999 ; Le Bizec et al., 1999 ; Ciardi et al., 1999 ; Jeanneau et al., 1999 ; Van Eenoo et al., 1999 ; Mareck-Engelke et al., 1999). (figure 1.6)

¹ Hormone gonadostimuline sécrétée par le chorion et par les villosités placentaire au cours de la grossesse. Sa présence dans le sang et les urines est à la base des tests biologiques de grossesse.

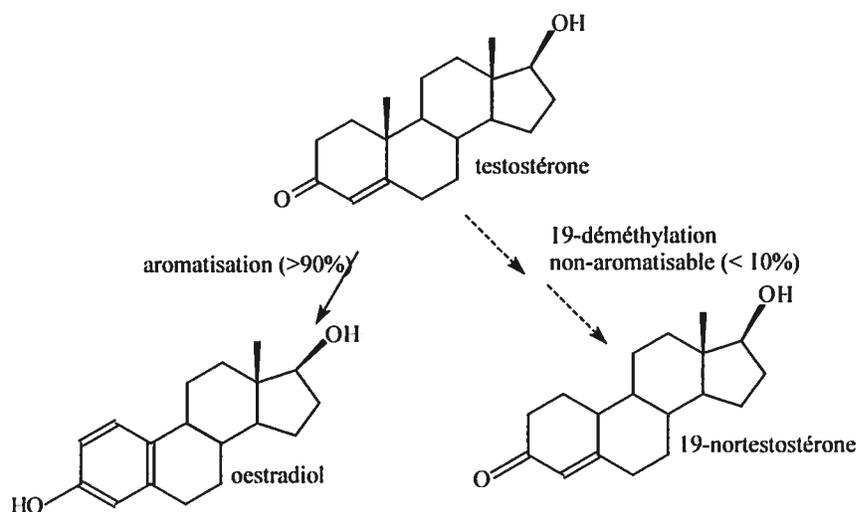


Figure 1.6 Voie proposée pour la biosynthèse de la 19-nortestostérone

Les tissus riches en aromatase seraient les follicules ovariens et le placenta. En plus de ceux-ci, d'autres tissus seraient susceptibles de produire de la 19-NT en moindre quantité, tels que les tissus adipeux, le foie, les muscles et les surrénales et chez l'homme plus particulièrement il y aurait les testicules et la prostate. Il y a également des espèces animales chez lesquelles les isomères 17α - et 17β - de la 19-nortestostérone sont endogènes, comme les étalons, les porcs non castrés, les vaches et les brebis (lors de la gestation). Le Bizec et al. ont démontré la présence de concentrations urinaires de 19-norandrostérone maximales se situant entre 3,1 et 7,5 ng/mL dans les dix heures suivant la consommation de 310 g d'abats (combinaison de cœur, foie, reins et muscles) de porc non castré (Reznik, 1987 ; Clouet et al., 1997 ; Dehennin et al., 1999). Il est à noter que la méthode utilisée par Le Bizec et al. n'est pas encore validée et est différente du protocole établi par les laboratoires accrédités par le CIO (volume supérieur, double chromatographie, HRMS, critères de positivité et non application de correction pour la gravité spécifique).

1.4 Détection de stéroïdes « naturels » par l'emploi de la spectrométrie de masse

Le dépistage et la confirmation de la présence des agents anabolisants dans l'urine humaine se font par la combinaison de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse, généralement de type filtre quadripolaire (GC/MS), à haute résolution (GC/HRMS) ou en tandem (GC/MS/MS), par comparaison des données (temps de rétention, spectres de masse) obtenues avec une urine de référence ou les standards analytiques authentiques.

L'utilisation de la spectrométrie de masse « classique » ne permet pas de distinguer l'origine endogène ou exogène des métabolites, car les spectres de masse générés sont identiques. À la fin des années 1990, trois groupes indépendants ont démontré que l'utilisation de la spectrométrie de masse d'isotopes stables (GC/C/IRMS) permettait de différencier la testostérone d'origine synthétique de celle produite par le corps humain. Cette méthode est maintenant reconnue et peut être utilisée pour détecter l'administration de testostérone et de ses précurseurs en combinaison avec l'analyse GC/MS (Becchi et al., 1994 ; Aguilera et al., 1996 et Shackleton et al, 1997(a)).

1.4.1 Principe et analyse par spectrométrie de masse d'isotopes stables

La GC/C/IRMS, une combinaison par couplage en ligne de la chromatographie gazeuse, du four à combustion qui sert à générer le CO₂ et de l'IRMS, permet donc l'analyse des isotopomères de CO₂. L'application de la spectrométrie de masse d'isotopes stables (IRMS) permet une mesure précise de l'abondance isotopique des atomes de carbone des molécules ciblées, en mesurant le rapport ¹³C/¹²C ou plus exactement le rapport ¹³CO₂/¹²CO₂ (Brand, 1996 et Meier-Augenstein, 1999).

Par convention, le quotient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mesuré, n'est pas absolu, mais représente plutôt la différence (δ) entre la valeur de l'échantillon et celle d'un standard international, un carbonate de calcium de la formation Pee Dee en Caroline du Sud (Pee Dee belemnite ou « PDB »). Ce rapport est calculé comme suit :

$$(\delta \text{ } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ } ^0/_{00}) = [(R_{\text{échantillon}}/R_{\text{standard}})-1] \times 10^3 \text{ où } R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}.$$

La valeur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du PDB est assignée à 0 $^0/_{00}$ sur l'échelle- δ . Les isotopomères de CO_2 produiront 3 ions majeurs, soit à m/z 44 pour $^{12}\text{C} \text{ } ^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, m/z 45 pour $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ou $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ et m/z 46 pour $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ou $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$. Une correction élimine la contribution de l'ion $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ du rapport des ions à m/z 44 et 45, reflétant ainsi la composition des ^{13}C et ^{12}C (Aguilera et al., 1996). Les valeurs $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mesuré seront toujours négatives, car la convention et l'équation sont ainsi faites qu'elles utilisent une référence qui donnera toujours des résultats négatifs.

Le carbone a naturellement deux formes isotopiques stables le ^{13}C et le ^{12}C . Le dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique a un rapport de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de 0,01/1, soit 1,11%. Toute la matière vivante est créée à partir du CO_2 atmosphérique par photosynthèse. Il y a deux voies majeures pour la fixation du CO_2 par les plantes, désignées C3 et C4. Cette nomenclature réfère à la longueur de la chaîne de carbone de chacun des intermédiaires photosynthétiques de chaque voie. La majorité des plantes fixe le CO_2 via la route C3, mais quelques végétaux comme le maïs, utilisent la voie C4. Durant la photosynthèse, le $^{12}\text{CO}_2$ est incorporé en plus grande quantité dans la plante que le $^{13}\text{CO}_2$. Dû à l'implication de différentes enzymes, les plantes C3 n'assimilent pratiquement pas de $^{13}\text{CO}_2$ comparativement aux plantes C4 qui en fixent beaucoup plus. Ainsi les rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des produits provenant de plantes C3 sont plus négatifs que ceux des plantes C4. Les stéroïdes endogènes excrétés dans l'urine humaine, sont biosynthétisés à partir de la réserve de cholestérol. Ce dernier provient d'une large variété de matériel végétal (mélange de plantes C3 et C4) consommé directement et via la viande des animaux. Les stéroïdes disponibles commercialement sont synthétisés,

habituellement, à partir d'un précurseur provenant d'un seul type de plante, majoritairement le soya (une plante C3). Ainsi les stéroïdes « synthétiques » semblent généralement posséder des rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ plus négatifs que ceux des stéroïdes « naturels » (Brand, 1996; Mason et al., 1998).

Comme le montre la figure 1.7, la stratégie utilisée afin de démontrer un apport exogène de stéroïde, est basée sur la différence des valeurs $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des métabolites de stéroïdes provenant de voies en aval du stéroïde analysé et ceux des métabolites du stéroïde d'intérêt. Par exemple, un apport exogène de 19-NT serait mis en évidence par une diminution du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ce stéroïde et de ses métabolites excrétés (norandrostérone et norétiocholanolone), alors que celui des stéroïdes de référence (pregnanediol et pregnanetriol) ne serait pas modifié. Ainsi, l'apport exogène de nortestostérone serait détecté en effectuant un rapport de la valeur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la norandrostérone sur la valeur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la pregnanediol ($\delta\text{NA}/\delta\text{PD}$). Un rapport ayant une valeur supérieure à 1, indiquerait une prise exogène de nortestostérone. Même si la nature de l'alimentation influence la valeur de la composition isotopique des stéroïdes, la comparaison des valeurs de différents métabolites doit permettre d'en établir l'origine commune ou non. Toute variation significative du rapport isotopique entre les métabolites et les stéroïdes de référence reflète l'apport exogène. Le cholestérol, le pregnanediol et le pregnanetriol servent en quelque sorte « d'étalons internes » et leurs valeurs sont propres à chaque individu.

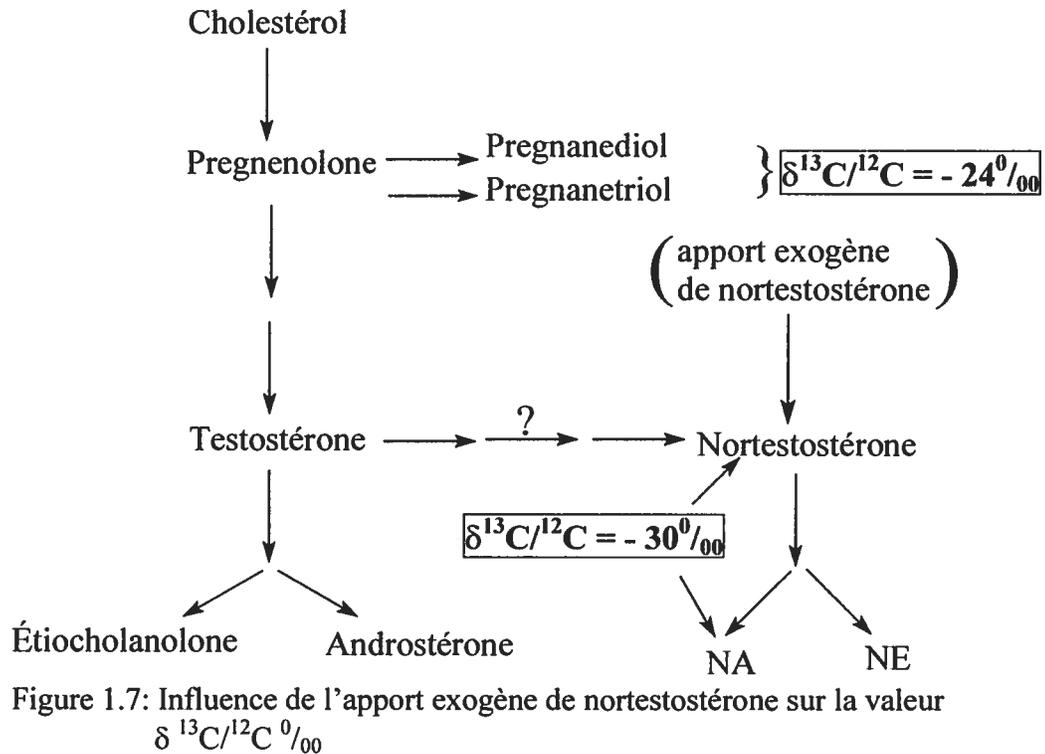


Figure 1.7: Influence de l'apport exogène de nortestostérone sur la valeur $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ‰

1.5 Problématique et objectif

Le corps humain peut excréter naturellement de faibles quantités de norandrostérone (Dehennin et al., 1999 ; Le Bizec et al., 1999 ; Ciardi et al., 1999 ; Jeanneau et al., 1999 Van Eenoo et al., 1999 ; Mareck-Engelke et al., 1999). De plus, la consommation d'abats de porc non castré (pouvant contenir de la 19-NT en concentration suffisante) peut amener la présence des métabolites urinaires de la 19-NT chez ses, toutefois très improbables, consommateurs. Plusieurs autres hypothèses telles, l'effet de la déshydratation, de l'exercice et de l'alimentation ont été proposées pour impliquer une stimulation de la biosynthèse naturelle. L'intérêt d'adapter la GC/C/IRMS au problème de la détermination de l'origine de la nortestostérone est donc incontestable. Aucune étude n'a été réalisée avec des stéroïdes potentiellement endogènes autre que la testostérone.

1.6 Approche méthodologique

Nous voulons dans un premier temps, développer une méthode d'isolement et de purification des métabolites de la 19-NT appropriée aux analyses par GC/C/IRMS. En effet, l'instrument n'est pas très sensible comparativement au GC/MS, un minimum de 10 ng (intensité minimale du pic : 0,25 nA) du produit d'intérêt devant être injecté pour obtenir une mesure significative. Nous voulons comparer l'efficacité de quatre approches basées sur l'utilisation 1) des extractions en phase solide et liquide-liquide (utilisée en contrôle du dopage), 2) de la chromatographie d'immunoaffinité (anticorps spécifiques à la nortestostérone), 3) de la séparation des stéroïdes cétoniques et hydroxylés par l'emploi du réactif de Girard et 4) de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La méthode basée sur l'utilisation du réactif de Girard a été proposée par Shackleton en 1997 (b). Deuxièmement, nous voulons déterminer les rapports ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ }^0/_{00}$) de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétées suite à la prise de norandrostènedione et de nortestostérone. Finalement, nous voulons déterminer les quotients ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ }^0/_{00}$) de la norandrostérone excrétée lors de la grossesse, afin de démontrer la différence des valeurs.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Standards

Les standards authentiques de 5α -androstane- 17β -ol, étiocolanolone, androstérone, norétiocolanolone, norandrostérone, norandrostènedione, pregnanediol, pregnanetriol et 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol viennent de chez Steraloids (Wilton, NH, USA). Le 17α -methyl- 5α -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol (standard interne) provient de chez Amersham/Searle (Oakville, Canada). Les capsules de 19-norandrostènedione commerciale, de chez Power Price (Newport, VA, USA). Pour ce dernier, un permis de Santé Canada pour l'importation a été obtenu.

2.2 Réactifs

L'acide acétique glacial, l'acétate de sodium, le phosphate de sodium monobasique, le phosphate de sodium dibasique, le bicarbonate de sodium, l'hydroxyde de sodium, l'azoture de sodium, le phosphate de potassium, le chlorure de sodium et l'acide sulfurique ont été achetés soit chez J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), Fisher Scientific (Montréal, Canada), BDH (Ville St-Laurent, Canada) ou Malinkrodt (Paris, KY, USA). L'acétonitrile, le méthanol, l'éther diéthylique, le dichlorométhane, le *tert*-butyl méthyl éther et l'hexane proviennent de Caledon (Montréal, Canada). L'éther est de qualité « distillée sur verre » alors que les autres solvants sont de qualité HPLC. Le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA), le triméthyliodosilane (TMIS) et l'éthanethiol proviennent de chez Aldrich (Milwaukee, WI, USA). L'eau a été purifiée par osmose inverse et filtrée par un système Milli-Q avant d'être utilisée

(Millipore, Mississauga, Canada). L'azote de qualité zéro provient de chez Air Liquide Canada (Montréal, Canada). La β -glucuronidase de *Escherichia coli*, type IX-A, sous forme de poudre lyophilisée, contenant de 1 500 000 à 2 000 000 U/g d'activité β -glucuronidase et le réactif T de Girard (chlorure de triméthyl-acéthylhydrazide-ammonium) ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO, USA). La colonne d'immunoaffinité spécifique à la 17β -nortestostérone provient du Laboratoire d'hormonologie (Marloie, Belgique).

2.3 Vérification de la pureté des capsules de norandrostènedione commerciale

La pureté des capsules de norandrostènedione a été vérifiée par comparaison avec le standard authentique. Quatre échantillons ont été analysés par GC/MS, un contenant un standard authentique de 19-nor-androst-4-ène-3,17-dione d'une concentration de 100 ng/ μ L (1mg de standard est dissous dans 10 mL de méthanol) et les 3 autres contenant 200 ng/ μ L de trois capsules commerciales (2 mg de chaque capsule ont été dissous dans 10 mL de méthanol). Un aliquote de 50 μ L de chacun des échantillons est prélevé et déposé dans un vial pour ensuite être évaporé à sec sous jet d'azote à 60°C. L'échantillon est ensuite dérivé par l'ajout dans le vial conique scellé sous azote de 50 μ L d'un mélange contenant 3 mL de MSTFA, 60 μ L d'éthanthiol et 60 μ L d'une solution de TMIS (70 μ L de TMSI, 1 μ L de triéthylamine et 430 μ L de dichlorométhane). La réaction est complétée par chauffage à 70°C pendant 30 min et 1 μ L est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse. Le dérivé triméthylsilyle (TMS) est analysé par GC/MS en mode de balayage complet.

2.4 Quantification des métabolites par GC/MS

2.4.1 Isolement et analyse des stéroïdes libres et glucuroconjugués

À un volume d'urine variable, prélevé en fonction de la gravité spécifique (g.s.), 250 ng de 5α -estran- 3α , 17β -diol (standard interne) et un volume équivalent de

tampon acétate (0,1 M, pH 5.2) sont ajoutés. Les urines sont passées sur des cartouches Sep Pak C₁₈ (préalablement lavées avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau distillée), rincées avec 6 mL d'eau distillée et 3 mL d'hexane, puis les stéroïdes libres et conjugués sont élués avec 5 mL de méthanol. Le solvant est évaporé à sec sous jet d'azote à 60°C. Le résidu est dissous dans 1 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 6.9) et 50 µL d'une solution contenant 1500 U de β-glucuronidase de *Escherichia coli*. Après une incubation de 1 h à 50°C, l'hydrolysate est refroidi à la température ambiante, puis 400 µL de tampon carbonate (1,0 M, pH 9.0) sont ajoutés afin de modifier le pH du mélange. Les stéroïdes libres et hydrolysés sont ensuite extraits avec soit 5 mL d'éther diéthylique à pH 9 ou soit avec 5 mL d'hexane ou de pentane à pH 11. La phase organique est prélevée et évaporée, puis le culot est dissous dans 200 µL de méthanol, transféré dans un vial conique et également évaporé sous jet d'azote. Le mélange réactionnel de la dérivation TMS est analysé par GC/MS.

2.4.2 Analyses GC/MS

Les extraits urinaires ont été analysés par un détecteur sélectif de masse HP 5970 (Hewlett-Packard, Mississauga, Canada) couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 (Série II) équipé d'un injecteur automatique HP 7673. Le contrôle des instruments et le traitement des données se fait à l'aide d'un ordinateur Hewlett Packard de type Vectra VL2 opérant le logiciel MS ChemStations de Hewlett-Packard. La séparation est effectuée sur une colonne capillaire HP-5 ayant une phase 5% de phényle polyméthyle siloxane (25 m x 0,25 mm de diamètre interne et une épaisseur de phase de 0,33 µm). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur et la programmation de température est la suivante, lors de l'analyse de stéroïdes non dérivés : de 150°C (1min) jusqu'à 280°C (5°C/min) et finalement à 310°C (25°C/min) . La température finale est maintenue pendant 4 min.. La durée totale de l'analyse est de 32,20 min. La température du port d'injection est de 275°C alors que pour l'interface entre le chromatographe et le spectromètre de masse, la température est de 320°C. Lors de l'injection de stéroïdes dérivés, la

programmation est celle-ci : de 100°C (1 min) à 220°C (20°C /min), puis jusqu'à 278°C (4,4°C/min) et finalement à 320°C (10°C/min). La durée totale de l'analyse est de 24,4 min.

2.4.3 Courbes d'étalonnage et limites de détection de la norandrostérone et de la norétiocholanolone

Des solutions méthanoliques de référence de norandrostérone (10 ng/μL), de 5α-estran-3α,17β-diol (5 ng/μL) et de norétiocholanolone (10 ng/μL) sont préparées et conservées à -20°C. Des courbes d'étalonnage ont été préparées pour la quantification de la norandrostérone et la norétiocholanolone dans les échantillons urinaires. Des dilutions sériées de chaque solution de référence des stéroïdes sont effectuées et ajoutées à des aliquotes de 1 mL d'urine vierge (g.s. 1,022) afin d'obtenir des concentrations variant de 0 à 500 ng/mL. Le 5α-estran-3α,17β-diol est utilisé comme étalon interne. Les échantillons obtenus sont préparés selon la méthode préalablement décrite (section 2.4.1) et la quantification est réalisée par l'obtention du rapport des surfaces sous les pics chromatographiques des ions à m/z 405 (norandrostérone et norétiocholanolone) et m/z 407 (5α-estran-3α,17β-diol).

Les limites de détection de la norandrostérone et de la norétiocholanolone ont également été déterminées. La limite de détection est estimée pour un S/N de 3, tandis que la limite de quantification, qui est considérée comme étant la plus basse concentration pouvant être mesurée avec précision et exactitude, est déterminée pour une concentration de 5 à 10 fois la limite de détection. Ces valeurs varient selon la matrice urinaire, l'appareil et la méthode utilisée (Gautschi et al., 1994). Des solutions de référence, d'une concentration de 10 ng/mL, sont préparées pour chacun des stéroïdes. Dix dilutions sont ensuite effectuées et ajoutées à des aliquotes de 1 mL d'urine vierge afin d'obtenir des concentrations variant de 0,02 à 0,5 ng/mL. La limite de détection a été estimée pour un rapport signal sur bruit de fond (S/N) égal à 3, 5 et 10.

2.5 Analyse GC/C/IRMS

2.5.1 Comparaison des méthodes d'isolement pour l'analyse GC/C/IRMS

Pour chacune des méthodes d'isolement, des aliquotes de 5 mL d'une urine provenant d'une étude d'excrétion et contenant de la norandrostérone d'une concentration équivalente à 10 ng/ μ L (concentration finale injectée), ont été utilisées. Chaque échantillon a été analysé, par GC/MS, en triplicata et les rendements de récupération moyens ont été déterminés en comparant la quantité de norandrostérone mesurée après isolement (corrigée par un standard externe) par rapport à un standard contenant une quantité connue (corrigé par un standard externe) de norandrostérone. Les valeurs des $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ‰ sont déterminés par GC/C/IRMS.

2.5.1.1 Analyse GC/C/IRMS

La mesure des rapports isotopiques est effectuée sur un système GC/C/IRMS de PDZ Europa (modèle 20-20) qui est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard modèle 6890 (équipé tel que précédemment décrit) et muni d'une interface Orchid. Le contrôle des instruments et le traitement des données se fait à l'aide d'un ordinateur Hewlett Packard de type Vectra VL2 opérant le logiciel Anca NT version 1.999.

La température du port d'injection est de 275°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur et la programmation de température est la suivante : de 150°C (1min) à 280°C (5°C/min) et finalement à 320°C (25°C/min). La température du four à combustion est de 860°C, le catalyseur oxydant est constitué de 12 fils de cuivre et de 1 fil de platine de 22 cm et l'eau dégagée de la combustion est piégée par une membrane de Nafion.

2.5.1.2 Méthode basée sur l'emploi du réactif de Girard

Cette approche est basée sur la méthode décrite par Schackleton (Schackleton et al, 1997). Au culot de l'hydrolyse décrite précédemment (section 2.4.1), on ajoute 100 μL de méthanol, 3 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 6.9), 100 mg du réactif T de Girard et 500 μL d'acide acétique glacial. Le mélange est chauffé 15 min à 100°C. Les stéroïdes libres et hydroxylés sont extraits deux fois avec 5 mL d'un mélange 1:1 d'hexane : dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée avec 1 mL de NaOH 6 N et évaporée sous jet d'azote à 60°C. Le culot est dissous dans 200 μL de méthanol, transféré dans un vial et évaporé à sec. Le résidu est resuspendu dans 50 μL de MTBE contenant du 5 α -androstan-17 β -ol (100 ng/ μL). À la phase aqueuse (dans laquelle nos stéroïdes d'intérêt se retrouvent), on ajoute 50 μL d'une solution méthanolique de 17 α -méthylandrostandiol (100 ng/ μL) et 3 mL d'une solution aqueuse 4 M de H₂SO₄. La réaction est complétée en 15 min à température ambiante. L'extraction est réalisée avec 5 mL d'hexane. Les échantillons sont repris et traités tel que décrit précédemment. L'identité des pics est vérifiée par GC/MS et les valeurs des $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ }^0/_{00}$ sont déterminés par GC/C/IRMS.

2.5.1.3 Méthode basée sur l'emploi de la chromatographie d'immunoaffinité

La colonne d'immunoaffinité utilisée contient 1 mL de gel de Sepharose couplé à des anticorps anti-nortestostérone dont la capacité maximale est de 80 ng de 19-NT. L'extrait contenant des stéroïdes hydrolysés (voir 2.4.1) est dissous dans 5 mL de tampon PBS 0,01M, pH 7.5 (9 g/L NaCl, 7,9 g/L Na₂HPO₄.H₂O, 0,75 g/L KH₂PO₄ et 1 g/L NaN₃) et 50 μL de méthanol. L'échantillon est déposé sur le gel, préalablement lavé avec 10 mL de tampon PBS (0,01M, pH 7.5). On agite vigoureusement la colonne et on la laisse reposer 5 minutes. Le PBS est aspiré de la colonne, puis celle-ci est lavée avec 5 mL d'eau distillée. Les stéroïdes sont élués avec 5 mL d'un mélange 80 : 20 de méthanol : eau. La fraction contenant les stéroïdes est évaporée à 60°C sous jet d'azote, dissoute dans 200 μL de

méthanol, transférée dans un vial et ré-éaporée sous jet d'azote. L'échantillon est repris et analysé tel que décrit dans la section précédente. La colonne est ré-utilisée. Entre les séparations, elle est lavée avec 5 mL du mélange de méthanol : eau et ré-équilibrée avec 2 fois 5 mL de tampon PBS (0,01M, pH 7,5).

2.5.1.4 Hydrolyse directe des stéroïdes glucuroconjugés et sulfoconjugés

Selon la méthode décrite par Le Bizec (Le Bizec et al., 1999), 2 mL de tampon acétate (0,2 M, pH 5,2) et 100 µL de jus d'*Helix pomatia* (β -glucuronidase 10^5 Fishman U/mL et sulfatase 106 Roy U/mL) sont ajoutés à 5 mL d'urine. Le mélange est incubé 1 h à 60°C. L'échantillon est ensuite passé sur une cartouche Sep Pak C₁₈ (préalablement lavée avec 10 mL de méthanol et 10 mL d'eau ultrapure), puis rincé avec 10 mL d'eau ultrapure et 10 mL d'hexane. Les stéroïdes sont élués avec 5 mL de mélange méthanol : acétate d'éthyle (30:70, v/v). L'éluat est lavé deux fois avec 2 mL d'hydroxyde de sodium 1M. La phase organique est évaporée à sec à 60°C sous jet d'azote. Puis le culot est resuspendu dans 200 µL de méthanol, transféré dans un vial et évaporé sous jet d'azote. L'échantillon est ensuite repris et analysé tel que décrit précédemment (voir 2.5.1.1).

2.5.1.5 Méthode basée sur l'emploi de la chromatographie liquide à haute performance

Selon la méthode décrite par Le Bizec (Le Bizec et al., 2000), l'extrait des stéroïdes hydrolysés et libres (voir 2.4.1) est dissous dans 25 µL de méthanol et l'échantillon en entier est injecté. La phase stationnaire utilisée est une colonne C₁₈ (XDB C₁₈ 4,6mm x 15cm x 3,5µm) et la phase mobile est composée de méthanol et d'eau (gradient de 60:40 à 90:10 (v/v) en 15 min, débit 1 mL/min). Des fractions de 500 µL sont récoltées et la norandrostérone élue entre 9,0 min et 10 min. La fraction contenant le métabolite d'intérêt est évaporée à 60°C sous jet d'azote. Le culot est ensuite dissous dans 200 µL de méthanol et transféré dans un vial puis

encore évaporé. L'échantillon est repris et analysé tel que décrit précédemment (voir 2.5.1.1).

2.5.2 Analyse GC/MS et GC/C/IRMS de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétées suite à la prise de norandrostènedione

Pour la réalisation de l'étude du métabolisme de la norandrostènedione, un homme âgé de 22 ans et sain a été choisi comme volontaire. Des échantillons d'urine ont été recueillis dans des pots de plastique stériles pendant 5 jours suivant l'administration orale d'une capsule commerciale de 100 mg de norandrostènedione. De l'urine témoin du volontaire a été recueillie 24 h avant la prise du stéroïde anabolisant. Tous ces échantillons urinaires ont été congelés à -20°C jusqu'au moment de leur analyse afin de prévenir toute dégradation bactérienne potentielle et la formation d'artéfacts (Massé et al., 1987). La gravité spécifique, le pH et le volume total de chaque miction ont été mesurés et notés (Tableau I).

Des aliquotes de 1 mL de chacun des échantillons d'urine recueillis ont été préparés et analysés selon la méthode décrite auparavant (voir 2.4.1). La quantification de la norandrostérone et de la norétiocholanolone a été effectuée en utilisant les courbes d'étalonnage mentionnées à la section 2.4.3. Puis afin de permettre la comparaison, les valeurs sont données pour une gravité spécifique (g.s.) de 1,020, en corrigeant selon l'équation suivante (Donike et al., 1992) :

$$[\text{concentration}]_{1,020} = [\text{mesurée}] \times (1,020 - 0,998)$$

(g.s. de l'éch.- 0,998)

Ensuite 25 mL de chaque miction ont été prélevés (5 mL seulement pour les échantillons les plus concentrés) et préparés selon la méthode décrite précédemment (voir 2.4.1). La norandrostérone, la norétiocholanolone, l'androstérone, l'étiocholanolone, le pregnanediol et le pregnanetriol ont été identifiés par GC/MS puis analysés par GC/C/IRMS.

Tableau I : Urines recueillies après l'administration d'une capsule commerciale de 100 mg de norandrostènedione

Code	Temps après ingestion (h)	Volume total (mL)	Gravité spécifique	pH
1	-25	500	1,025	5.1
2	-12	240	1,027	5.0
3	-10	90	1,030	5.0
4	0	400	1,028	5.6
5	5	200	1,025	5.6
6	9	200	1,028	5.2
7	13	150	1,031	5.4
8	16	80	1,031	5.1
9	24	300	1,031	5.3
10	26	200	1,019	5.6
11	28	100	1,025	5.1
12	33	200	1,026	5.1
13	35	90	1,032	5.2
14	42	300	1,028	5.1
15	51	400	1,026	5.2
16	55	90	1,033	5.3
17	58	90	1,032	5.1
18	63	200	1,026	5.3
19	64	300	1,009	5.9
20	74	600	1,021	6.4
21	87	300	1,014	5.5
22	95	500	1,020	6.1
23	111	250	1,028	5.6
24	119	450	1,026	5.8
25	135	200	1,026	5.2

2.5.3 Analyse GC/C/IRMS de la norandrostérone excrétée suite à l'administration de nortestostérone (ou de ses précurseurs)

Des urines d'athlètes analysées entre 1992 et 2000, conservées à -20°C depuis leur analyse initiale et contenant de la norandrostérone en quantité variable, ont été préparées tel que décrit auparavant (voir 2.4.1). Des aliquotes de volume variable (5 à 35 mL), de manière à contenir une concentration minimale de 20 ng/μL de norandrostérone, sont préparés et analysés tel que décrit précédemment (section 2.5.1).

2.5.4 Isolement et analyse de la norandrostérone endogène excrétée durant la grossesse

De l'urine, provenant de femme enceinte (entre la 12^{ième} et la 14^{ième} semaine), est récoltée pendant 7 jours. Le volume total est divisé en aliquote de 20 mL et préparé selon la méthode décrite à la section 2.4.1. Les extraits de stéroïdes hydrolysés sont dissous dans 25 μL de méthanol et purifiés par HPLC (voir section 2.5.1.4). Les échantillons récoltés contenant de la norandrostérone ont été combinés. La fraction résultante est évaporée, le culot dissous dans 200 μL de méthanol et transféré dans un vial puis encore évaporé. Le résidu est resuspendu dans 15 μL de MTBE. La norandrostérone non dérivée est identifiée par GC/MS et le rapport $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^{0/00}$ est déterminé par GC/C/IRMS.

Chapitre 3

Résultats et discussion

3.1 Vérification de la pureté des capsules de norandrostènedione d'origine commerciale

Trois capsules de norandrostènedione de provenance commerciale ont été analysées, par GC/MS, afin de s'assurer de leur pureté en comparaison avec un standard authentique. Le spectre de masse du dérivé TMS-énol présenté à la figure 3.1, est identique à celui du standard authentique. Lors de l'analyse GC/MS

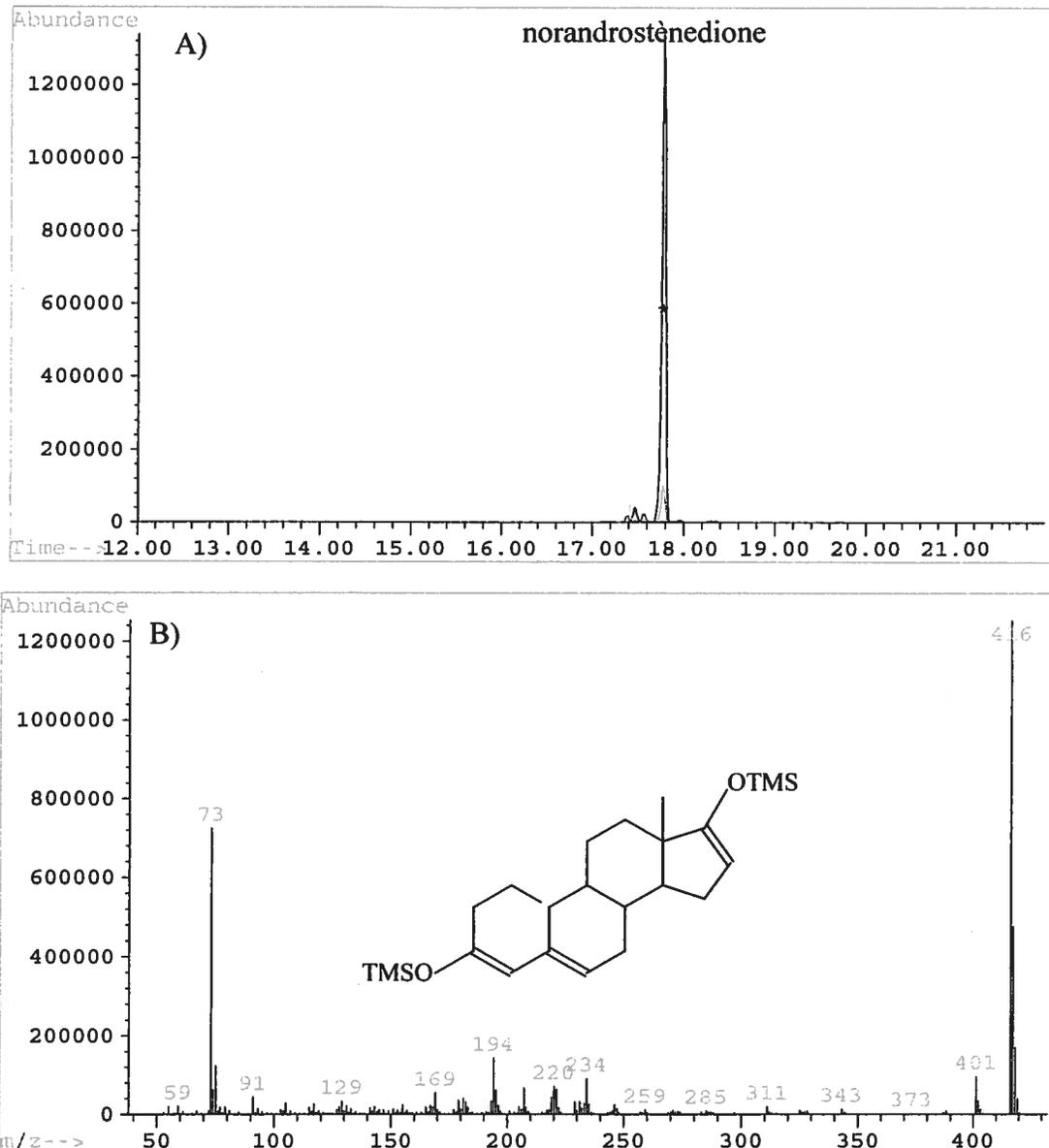


Figure 3.1 : A) Chromatogramme et B) spectre de masse du dérivé TMS de la norandrostènedione provenant d'une capsule commerciale (200 ng/µL)

des capsules commerciales, seuls les pics correspondant à ceux produits par l'analyse d'un standard authentique de norandrostènedione TMS-énol ont été observés. Les pics mineurs ont été identifiés comme étant des pics secondaires de dérivation (figure 3.1).

3.2 Limite de détection et de quantification de la norandrostérone et de la norétiocholanolone

Des urines (d'une gravité spécifique de 1,020) contenant des concentrations de norandrostérone et de norétiocholanolone variant de 20 à 500 pg/mL ont été préparées et analysées par GC/MS tel que décrit à la section 2.4.3.

Les résultats obtenus sont résumés au tableau II et indiquent, que pour des aliquotes de 1 mL préparées et analysées selon cette méthode, la limite de détection pour la norandrostérone et la norétiocholanolone varie de 60 à 100 pg/mL.

Tableau II : Limites de détection et de quantification des dérivés TMS de la norandrostérone et la norétiocholanolone obtenues pour la méthode décrite

S/N	Concentration Norandrostérone	Concentration Norétiocholanolone
	(pg/mL)	(pg/mL)
3	80	80
	80	100
	100	100
5	80	100
	80	200
	200	200
10	300	400
	500	500
	500	500

*volume d'urine extrait : 1 mL

*les 3 valeurs proviennent de 3 urines différentes

3.3 Comparaison de l'efficacité des méthodes de préparation des échantillons

La spectrométrie de masse d'isotope stable (IRMS) permet une mesure précise de l'abondance isotopique des atomes ciblés. Le principal problème, qui est inhérent à la construction de l'instrument est son manque de sensibilité. Il est donc important de trouver une méthode de purification efficace permettant de recueillir autant les stéroïdes de référence que les métabolites d'intérêts, tout en diminuant le plus possible les interférences de la matrice urinaire. De plus, il serait préférable que cette procédure ne soit pas trop longue tout en ne nécessitant pas de trop grands volumes d'urine, pour qu'elle puisse être utilisée comme méthode de confirmation.

Les quatre approches qui ont été comparées afin d'améliorer l'isolement de la norandrostérone, sont basées sur l'utilisation 1) d'extractions en phases solide et liquide-liquide, 2) de la chromatographie d'immunoaffinité, 3) de la séparation par le réactif de Girard et 4) de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Il est à noter que les techniques 2), 3) et 4) impliquaient toutes une extraction solide, une hydrolyse et une extraction liquide-liquide préalable. Nous avons également évalué l'hydrolyse directe des stéroïdes glucuroconjugués et sulfoconjugués qui avait été proposée par Le Bizec (Le Bizec et al, 1999). Dans cette dernière méthode, l'hydrolyse enzymatique est effectuée préalablement aux extractions solide et liquide-liquide. Pour chacune de ces procédures, des aliquotes de 5 mL d'une urine provenant d'une étude d'excrétion et contenant de la norandrostérone d'une concentration équivalente à 10 ng/ μ L (concentration finale injectée), ont été utilisées. Chaque échantillon a été analysé, par GC/MS, en triplicata et les rendements de récupération moyens ont été déterminés en comparant la quantité de norandrostérone mesurée après isolement (corrigée par un standard externe) par rapport à un standard contenant une quantité connue (corrigé par un standard externe) de norandrostérone.

Les analyses GC/MS des différentes méthodes de préparation des échantillons ont été effectuées sur des composés silylés. Le spectre de masse des dérivés TMS de la norandrostérone comprend comme principaux ions, m/z 420 (ion moléculaire,

abondance 80%), m/z 405 (M-CH₃), m/z 315 (M-15-90-CH₃-TMSOH) et m/z 169 (Massé et al., 1985). L'ion m/z 405 est utilisé pour la quantification, puisqu'il est l'ion majeur.

Les chromatogrammes démontrant l'isolement de la norandrostérone par chacune des méthodes de préparation des échantillons sont illustrés à la figure 3.2 et les rendements de récupération résumés au tableau III. La méthode utilisant les extractions en phase solide et liquide-liquide (seule ou en combinaison avec la HPLC) a donné les meilleurs résultats, avec une récupération supérieure à 60%. Lors de l'extraction liquide-liquide, différents solvants organiques ont également été évalués, soit l'éther (pH 9), l'hexane (pH 11) et le pentane (pH 11). Les trois ont obtenu un rendement équivalent, mais seul l'hexane nous a permis de séparer un métabolite de la vitamine E interférant fréquemment avec le pic de la norandrostérone (Ayotte et al., 1996). Même si ce métabolite n'a pas les mêmes ions que la norandrostérone, il faut l'éliminer, car il nuit à la quantification et à l'identification lorsqu'il est présent en quantité importante. L'utilisation de la HPLC nous a permis d'obtenir un échantillon qui se prêtait mieux à l'analyse GC/C/IRMS en séparant la norandrostérone de l'androstérone et de l'étiocolanolone, qui toujours présents en grande concentration dans l'urine (moyenne chez les hommes [A] = 2845 ng/mL, [E] = 1918 ng/mL (Ayotte et al., 1996)) interféraient dans l'analyse du rapport $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ‰ de la norandrostérone et diminuait la fiabilité du résultat.

Tableau III : Rendement de récupération des différentes méthodes de préparation des échantillons

Méthode	Rapport NA/ISTD	Rendement de récupération (%)
Extractions solide et liquide-liquide* :		
a) simple extraction à l'hexane	7,24	62%
b) simple extraction au pentane	6,91	59%
c) simple extraction à l'éther	7,42	63%
d) double extraction à l'hexane	8,04	69%
e) double extraction au pentane	8,00	68%
f) double extraction à l'éther	7,56	65%
g) double extraction hexane + chromatographie d'immunoaffinité	1,90	16%
h) double extraction hexane + réactif de Girard	3,53	30%
i) double extraction hexane + HPLC	7,95	68%
Hydrolyse directe suivie par		
a) <i>Helix pomatia</i>	1,87	16%
b) <i>Escherichia coli</i>	2,90	25%
Référence	11,70	100%

*cartouche C₁₈, hydrolyse, extraction liquide-liquide pH 9

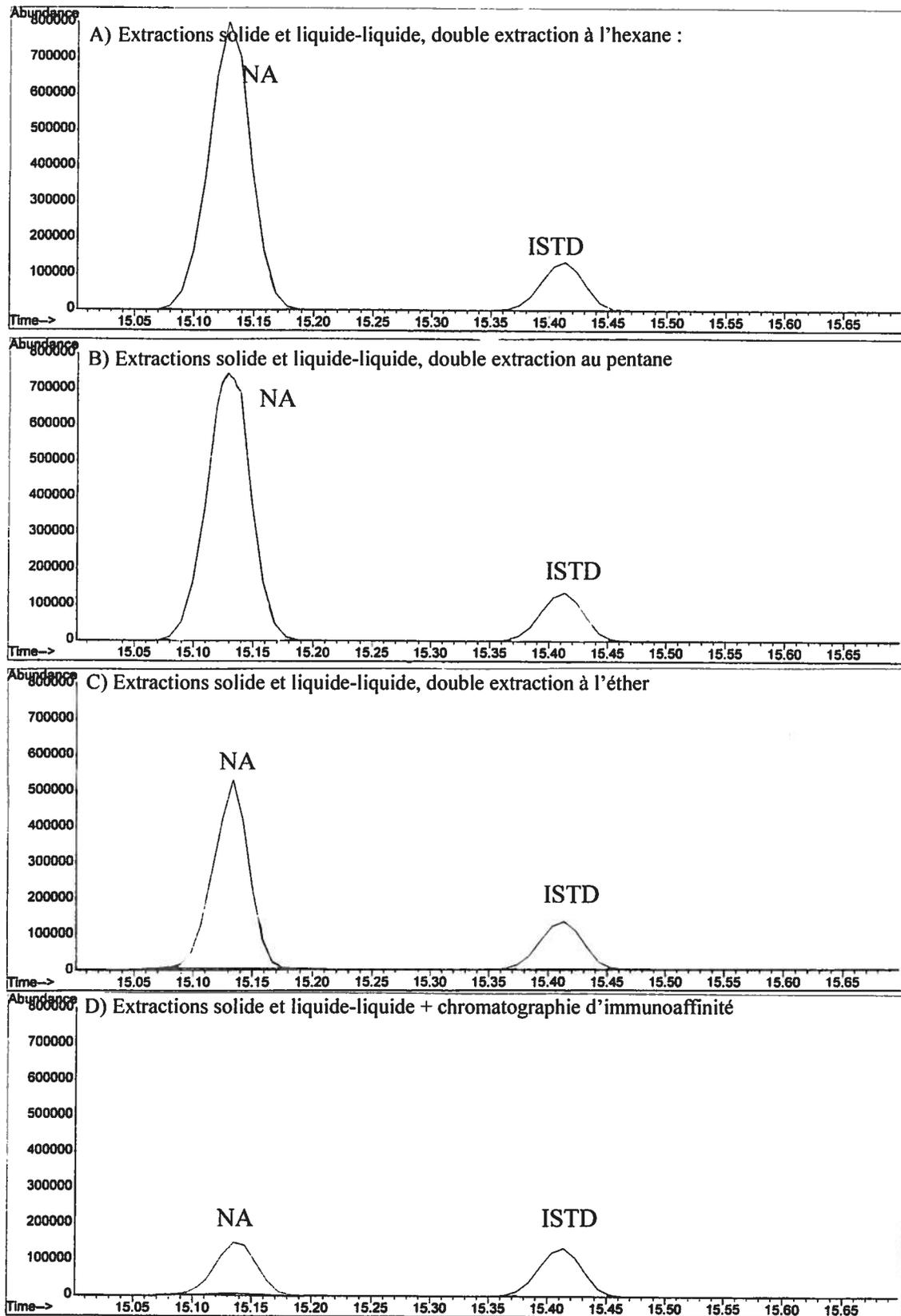


Figure 3.2 : Chromatogrammes de l'analyse GC/MS des dérivés TMS de la norandrostérone (m/z 405) et du standard interne (m/z 407) isolés par les différentes méthodes de préparation des échantillons

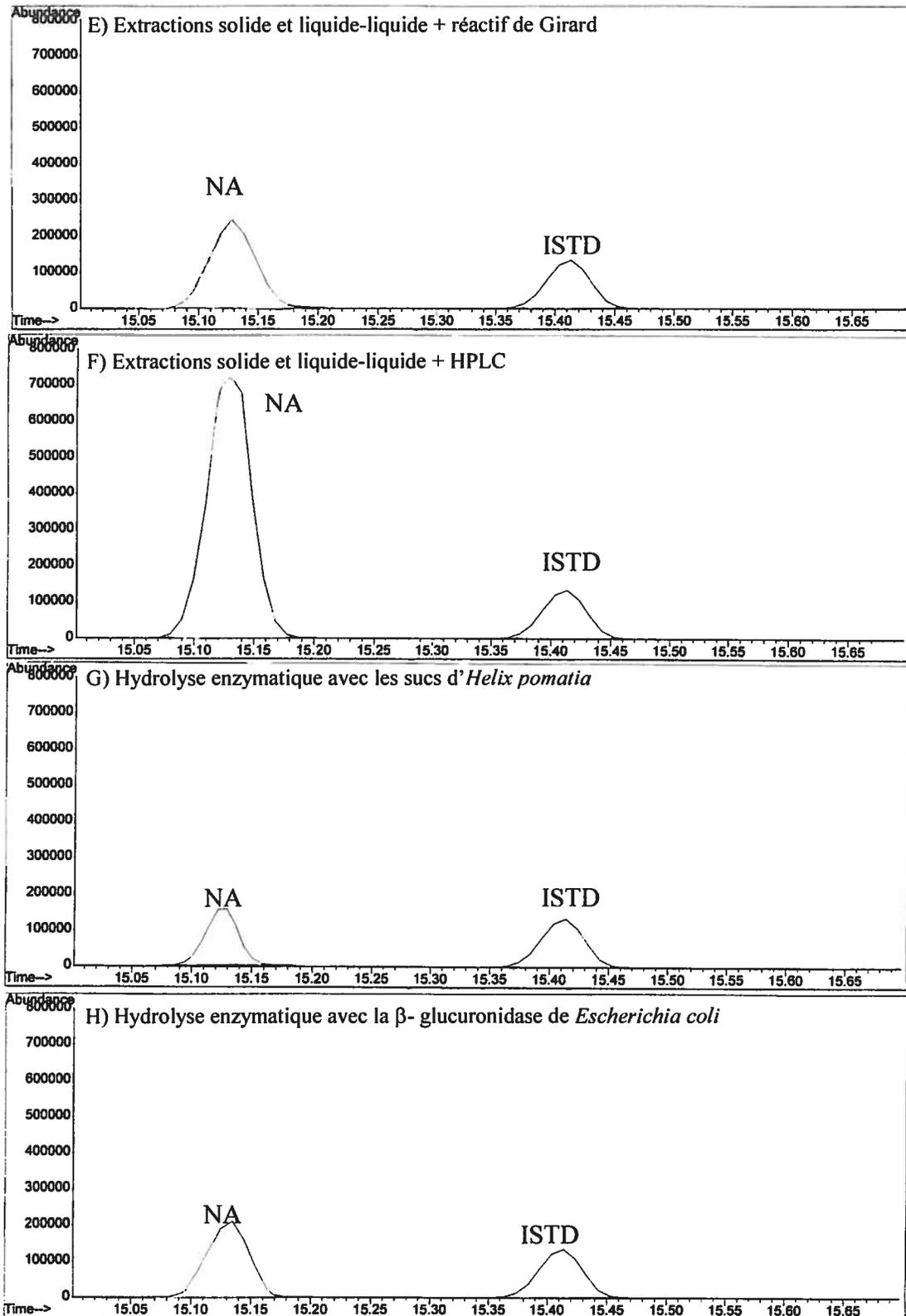


Figure 3.2 (suite) : Chromatogrammes de l'analyse GC/MS des dérivés TMS de la norandrosténone (m/z 405) et du standard externe (m/z 407) isolés par les différentes méthodes de préparation des échantillons

Les trois autres méthodes évaluées afin d'améliorer l'isolement de la norandrostérone ont toutes donné des rendements de récupération inférieurs à 30%. La faible efficacité de la chromatographie d'immunoaffinité pourrait être expliquée par la capacité de la colonne qui est limitée à 80 ng de nortestostérone/mL de gel (Delahaut, 2000) et par le manque de spécificité des anticorps. Ceux-ci étant en effet spécifique à la nortestostérone, l'affinité relative avec la norandrostérone était de seulement 48,5%. La deuxième méthode, l'hydrolyse directe des stéroïdes glucuroconjugués et sulfoconjugués a été effectuée avec deux types d'enzymes, la β -glucuronidase de *Escherichia coli* et les sucs d'*Helix pomatia*. Ce dernier type d'enzyme, a donné un plus faible rendement puisqu'il provient d'un jus d'escargot ne contenant pas seulement des β -glucuronidases et des sulfatases, mais également des 3β -hydroxystéroïde déshydrogénases (3β -HSD/ $\Delta 5-4$) dont l'activité isomérase amène de nombreuses réactions secondaires, comme par exemple, la conversion de l'androstènediol en testostérone (Venturelli et al., 1995). D'autre part, l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique avant l'extraction solide-liquide, qui est une extraction servant à éliminer les sels et tout autres interférences se retrouvant dans l'urine, expliquerait en partie les bas résultats de cette méthode. Ces interférences n'étant pas éliminées, causeraient une inhibition partielle de l'enzyme et l'empêcherait d'agir.

La troisième approche utilisée, était la séparation par le réactif de Girard. Ce composé permet d'isoler les stéroïdes cétonés des stéroïdes hydroxylés en formant des hydrazones (solubles dans l'eau) avec les cétones (Girard et al., 1936). La norandrostérone possédant une cétone en C-17, aurait dû se retrouver entièrement dans la phase aqueuse, mais nous n'en avons récupéré que 30%. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce faible rendement, comme par exemple, une trop faible concentration d'acide sulfurique lors de l'hydrolyse des hydrazones. Cette situation empêcherait la séparation complète des stéroïdes cétonés et du réactif de Girard, ce qui amènerait une récupération partielle de la norandrostérone. Des travaux sont présentement en cours afin d'améliorer le rendement de cette méthode.

Le tableau IV résume les limites de détection obtenues pour les analyses GC/C/IRMS en fonction des différentes méthodes de préparation des échantillons. Le seuil de détection de l'appareil a été établi à 10 ng/μL (concentration finale injectée; intensité du pic de NA : 0,27 nA), ce qui est conforme aux spécifications du fabricant (figure 3.3). Tandis que pour les différentes méthodes d'isolement de la norandrostérone, la plus basse limite de détection, pour une concentration finale injectée de 20 ng/μL, a été obtenue par l'approche utilisant les extractions solide et liquide-liquide (seule ou en combinaison avec la HPLC).

En conclusion, nous avons démontré que lorsque les concentrations de norandrostérone urinaire initiales sont égales ou supérieures à 35 ng/mL, une purification par des extractions solide et liquide-liquide est suffisante. Mais lorsque ces concentrations sont inférieures à 35 ng/mL, l'utilisation de cette approche en combinaison avec la HPLC s'avère indispensable pour séparer la norandrostérone de l'androstérone et de l'étiocolanolone, qui présents en concentration considérable dans l'échantillon, interfèrent avec l'analyse. Un important volume d'urine étant fréquemment nécessaire pour l'obtention de la concentration minimale de 20 ng/μL de norandrostérone requise pour l'analyse par GC/C/IRMS, des concentrations élevées d'androstérone et d'étiocolanolone sont donc souvent présents dans les échantillons (figure 3.4).

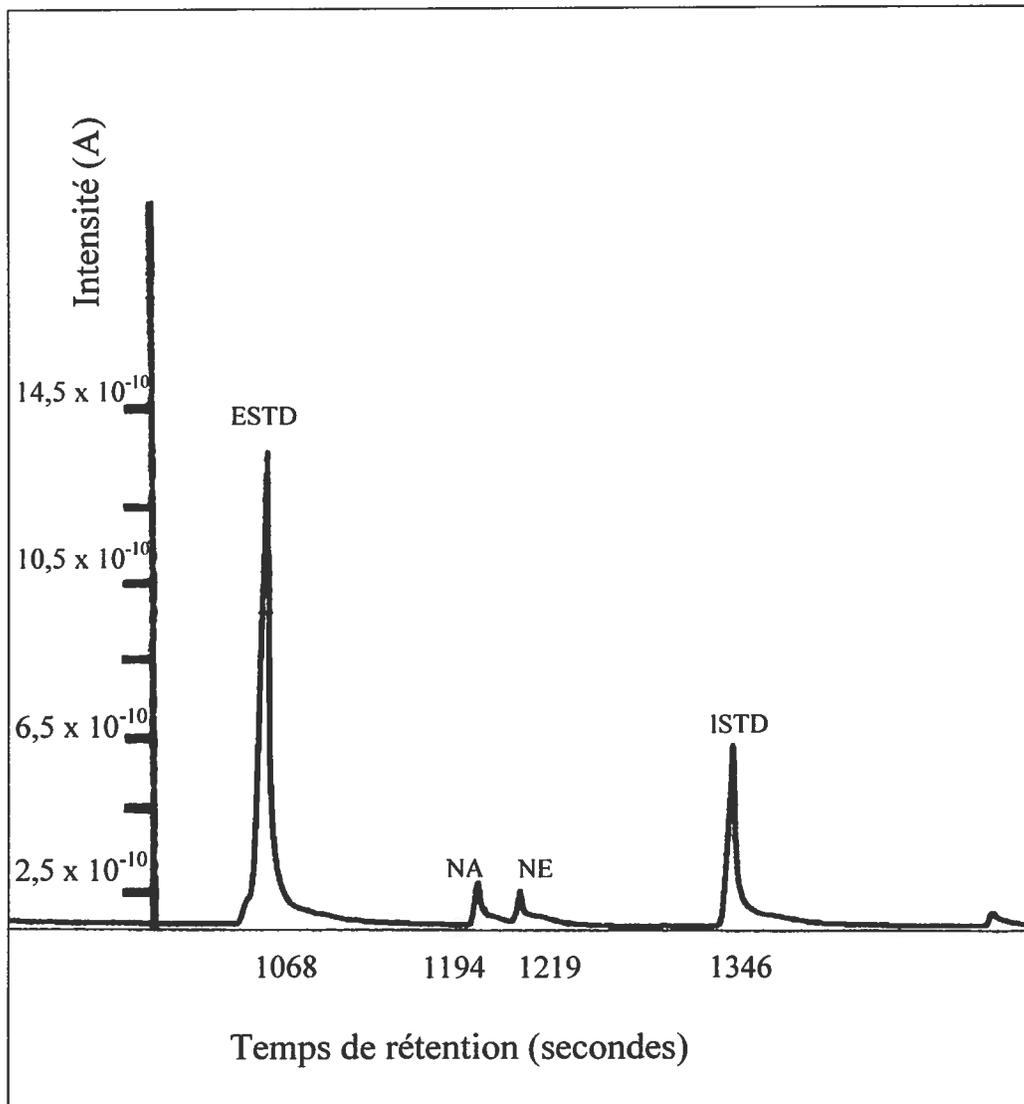


Figure 3.3 : Chromatogramme GC/C/IRMS de l'analyse de la norandrosténone et de la norétiocolanone (10 ng injectés)

Tableau IV : Limites de détection du GC/C/IRMS et des différentes méthodes de préparation des échantillons

Méthode	Limite de détection (ng/μL de NA) ^a
Extractions solide et liquide-liquide :	
a) simple extraction à l'hexane	20
b) simple extraction au pentane	20
c) simple extraction à l'éther	20
d) double extraction à l'hexane	20
e) double extraction au pentane	20
f) double extraction à l'éther	20
g) double extraction hexane + chromatographie d'immunoaffinité	>50
h) double extraction hexane + réactif de Girard	50
i) double extraction hexane + HPLC	20
Hydrolyse directe	
a) <i>Helix pomatia</i>	> 50
b) <i>Escherichia coli</i>	> 50
Seuil GC/C/IRMS^b	10

^a Concentration de NA à l'injection et détectée par le GC/C/IRMS

^b Cartouche C₁₈, hydrolyse, extraction liquide-liquide pH9

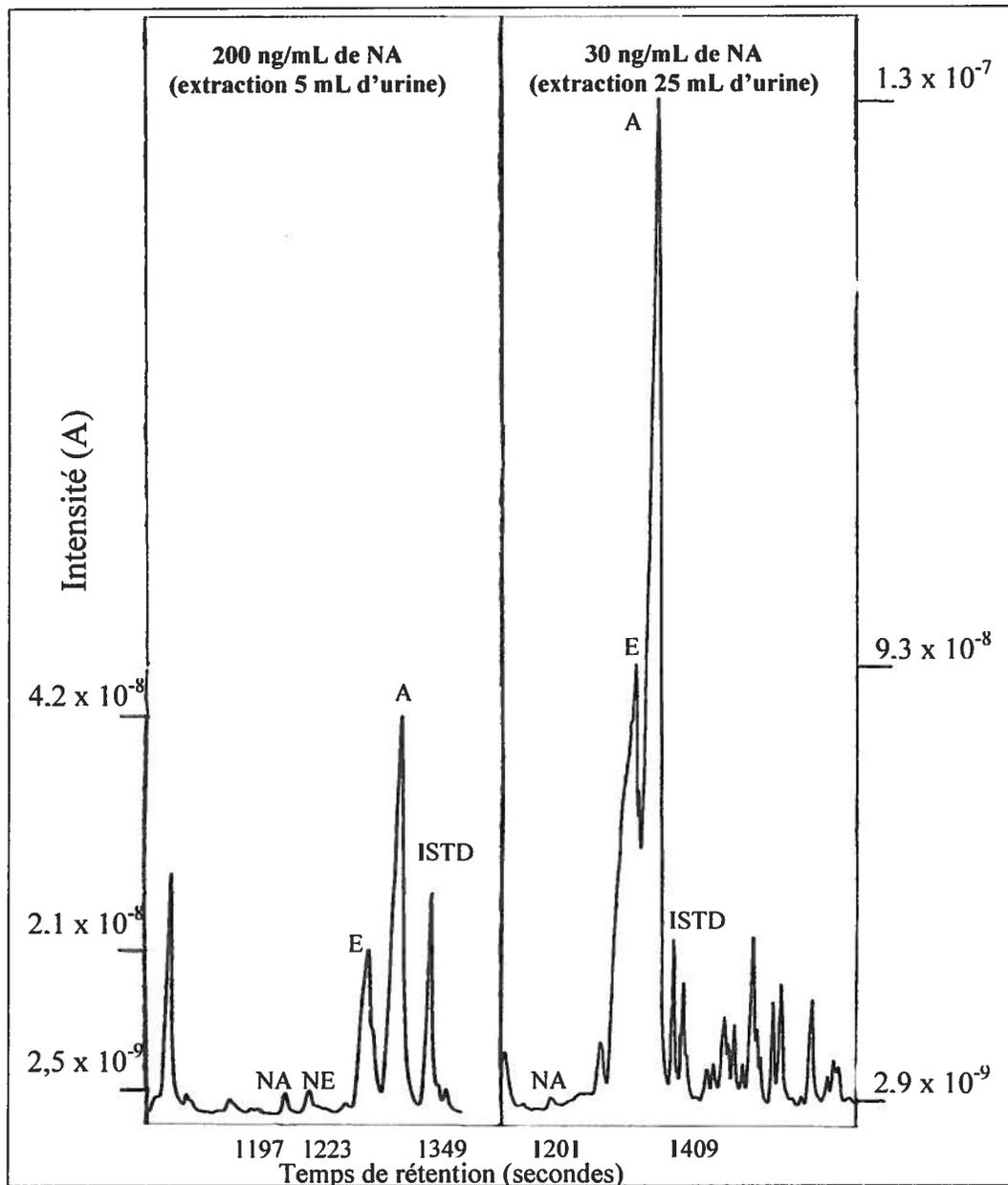


Figure 3.4 : Comparaison entre les chromatogrammes de l'analyse GC/C/IRMS d'un échantillon contenant plus de 35 ng/mL de norandrosterone et moins de 35 ng/mL de norandrosterone

3.4 Quantification de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétés suite à la prise de norandrostènedione d'origine commerciale

3.4.1 Courbes d'étalonnage

La norandrostérone et la norétiocholanolone sont quantifiées sous forme de dérivés TMS. Les courbes d'étalonnage sont composées de neuf points, de concentration allant de 0 à 500 ng/mL. Elles ont été préparées à partir d'une urine vierge rehaussée. Les équations de régression linéaire des courbes sont de $y = 0,166x - 0,163$ pour la norandrostérone et de $y = 0,145x - 0,178$ pour la norétiocholanolone, où y est le rapport des concentrations du stéroïde d'intérêt (norandrostérone ou norétiocholanolone) et du standard interne et x le rapport des surfaces des pics chromatographiques de la norandrostérone ou de la norétiocholanolone et de la 5α -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol (ISTD). Les coefficients de corrélation sont de 0,9975 pour la norandrostérone et de 0,9947 pour la norétiocholanolone (figure 3.5).

3.4.2 Excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone

La figures 3.6 illustre l'excrétion urinaire de la norandrostérone et de la norétiocholanolone suivant l'administration orale d'une capsule commerciale de 100 mg de norandrostènedione à un volontaire sain. Dans ce cas, la norandrostérone et la norétiocholanolone ont été détectées dans l'urine de 5 h à 135 h post-administration, cependant la norétiocholanolone n'était plus quantifiable après 42 h. L'excrétion a atteint son niveau maximal 5 h après l'administration de norandrostènedione avec des concentrations de 50,9 $\mu\text{g/mL}$ pour la norandrostérone et de 9,7 $\mu\text{g/mL}$ pour la norétiocholanolone. La norandrostérone est demeuré le métabolite majeur tout au long de l'étude avec un rapport $5\alpha/5\beta$ (norandrostérone/norétiocholanolone) égal ou supérieur à 3. De ce profil, deux phases distinctes sont observées. Premièrement, une phase d'élimination rapide entre 5 h et 16 h suivie d'une excrétion plus lente, chacune correspondant fort probablement aux phases de distribution et d'élimination de ce stéroïde.

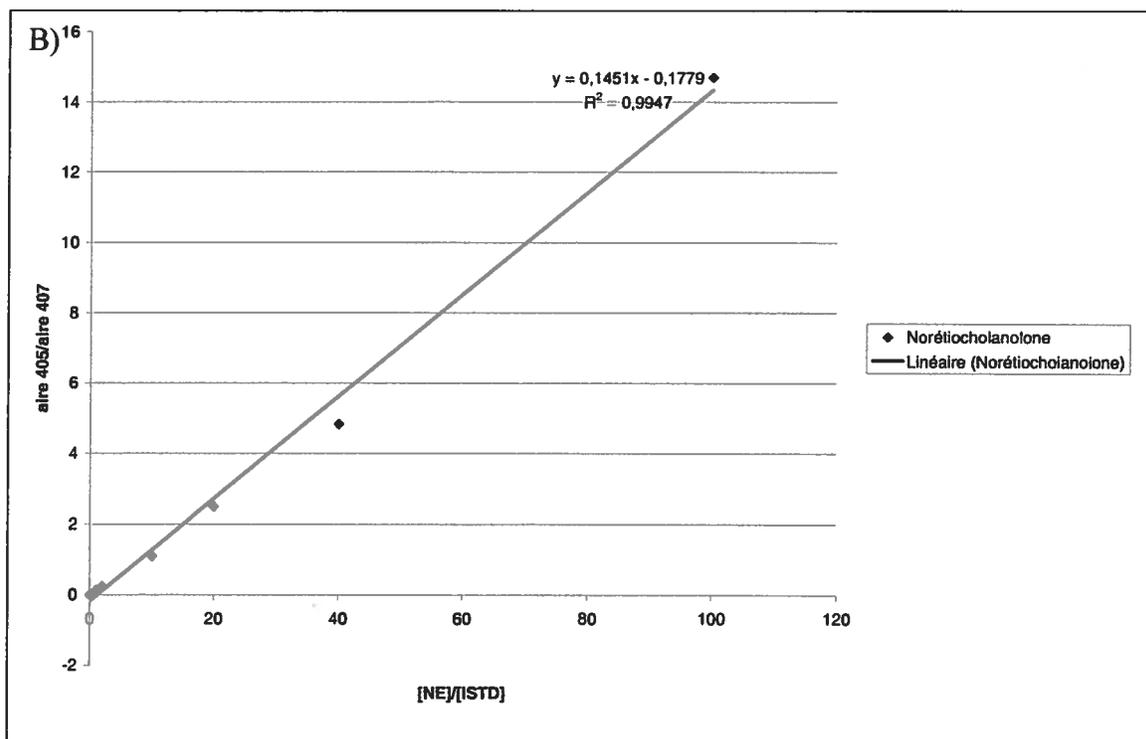
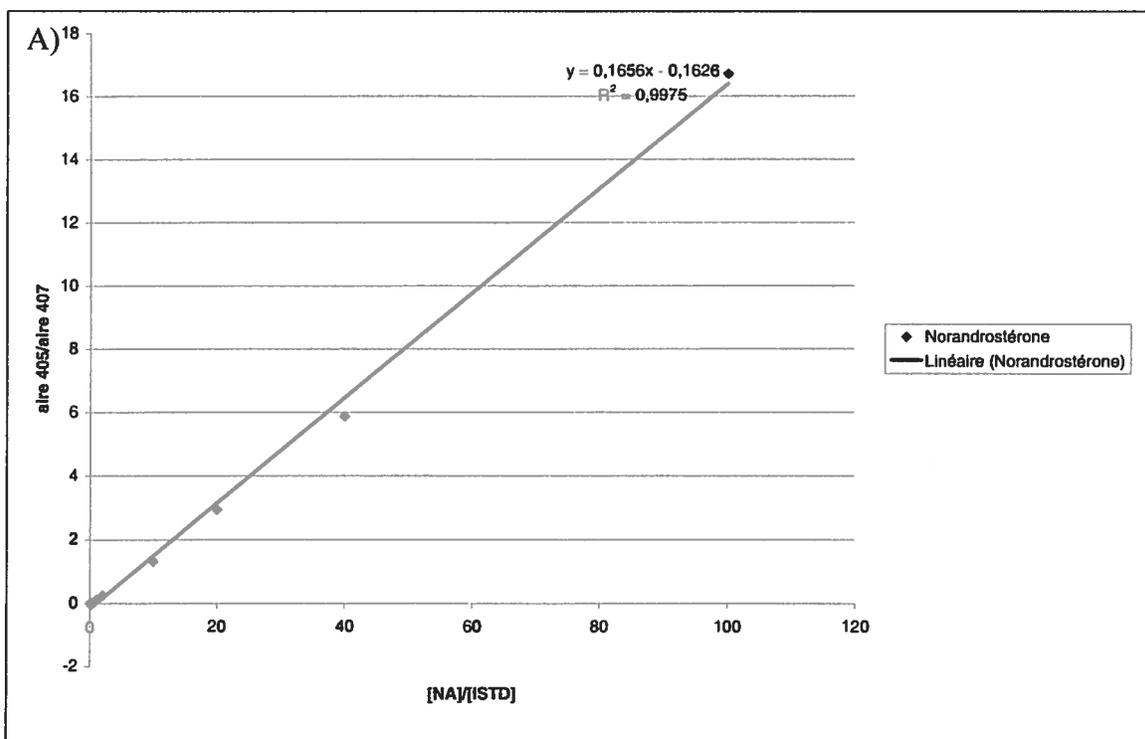


Figure 3.5: Courbes d'étalonnage de la A) norandrosterone et de la B) norétiocloanolone

Ces résultats, concernant l'excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone suite à la prise de norandrostènedione, ne sont pas en concordance avec l'étude de Kintz et al. (1999), qui ont obtenu un rapport $5\alpha/5\beta$ inférieur à 1 pendant les 48 premières heures de la cinétique d'élimination. Ces données de Kintz peuvent apparaître surprenantes à première vue. En effet les études précédemment effectuée suite à l'administration de nortestostérone ont démontré une excrétion des métabolites réduits en 5α nettement supérieure à celle des isomères 5β (Massé et al, 1985 et Schänzer, 1996). Cependant, Uralets et al. (1999), ont par la suite démontré que des ratios NA/NE inversés sont obtenus suite à l'administration de 19 nor $\delta 5$ stéroïdes.

Tableau V : Concentrations urinaires de NA, NE, LH et T/E suivant l'administration de 100 mg de norandrostènedione

Code	Temps après Ingestion (h)	Concentration de NA (ng/mL)	Concentration de NE (ng/mL)	Concentration LH (mUI/mL)	T/E
1	-25	0	0	4.1	1.2
2	-12	0	0	3.6	1.4
3	-10	0	0	2.5	1.6
4	0	0	0	2.6	1.2
5	5	50 912	9761	4.4	-
6	9	11 431	2726	2.4	-
7	13	5111	1439	3.4	-
8	16	1511	587	3.8	1.8
9	24	503	240	4.4	1.4
10	26	135	61	4.3	1.3
11	28	233	112	3.6	1.4
12	33	93	54	4.4	1.6
13	35	213	65	3.4	1.8
14	42	54	13	4.6	2.2
15	51	31	< liq	4.8	1.8
16	55	54	< liq	4.6	1.9
17	58	33	< liq	4.3	1.2
18	63	18	< liq	4.0	1.6
19	64	23	< liq	2.2	1.6
20	74	9	< liq	2.7	1.1
21	87	12	< liq	2.4	1.4
22	95	7	< liq	3.7	1.1
23	111	6	< liq	3.7	1.3
24	119	6	< liq	3.5	1.2
25	135	5	< liq	1.9	1.5

*liq = limite inférieure de quantification

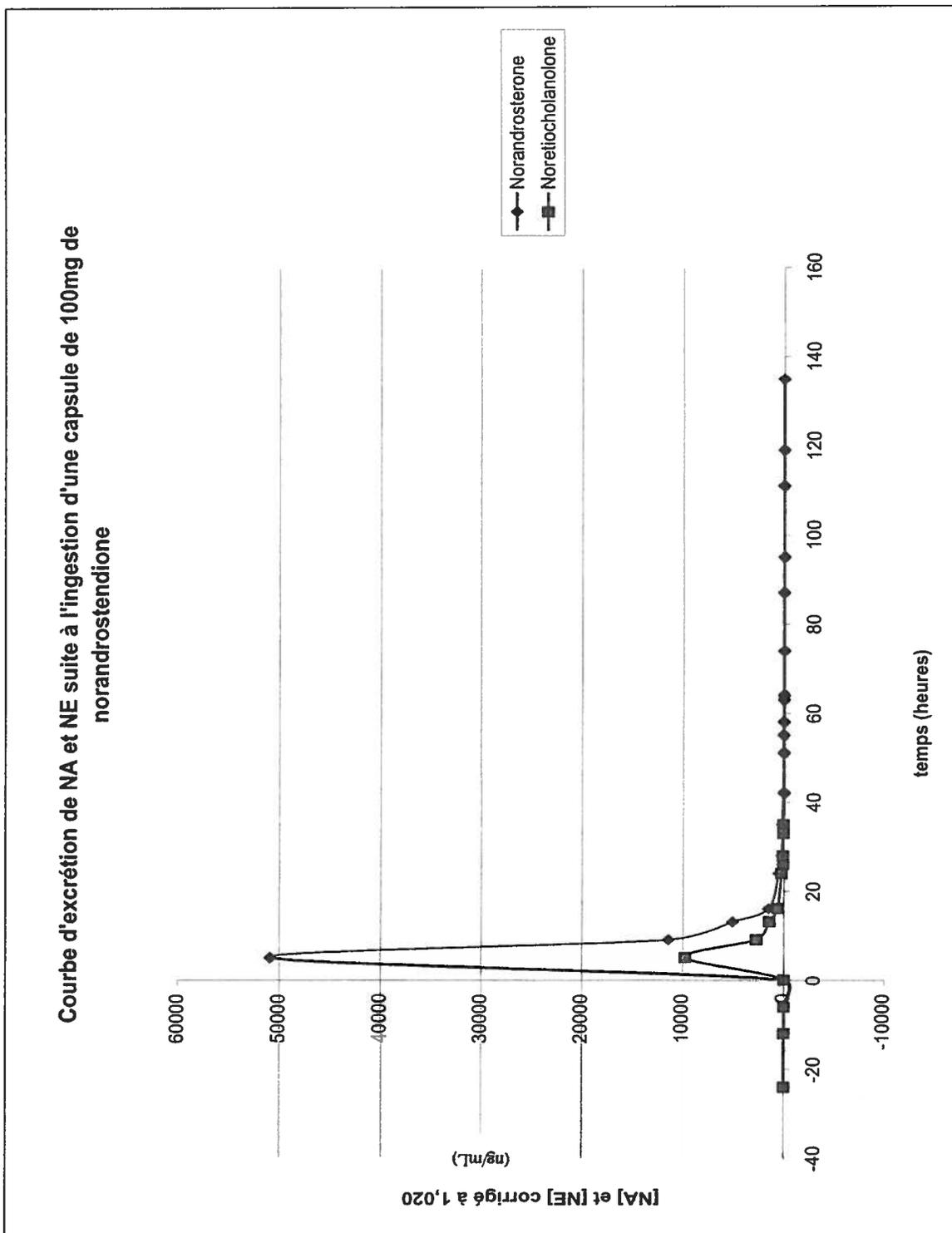


Figure 3.6 : Excrétion de la norandrosterone et de la noretiocholanolone suite à l'administration d'une capsule commerciale de 100 mg de norandrosténone

3.5 Analyse GC/C/IRMS de la norandrostérone et de la norétiocholanolone

Un mélange de standards authentiques des stéroïdes d'intérêt, d'une concentration de 100 ng/ μ L, est injecté en GC/MS et en GC/C/IRMS afin d'établir les temps de rétention, les ions caractéristiques (GC/MS) et la stabilité des ratios isotopiques (GC/C/IRMS). L'analyse est effectuée sous forme non dérivée, car l'utilisation d'un agent dérivant cause des dommages au four à combustion du GC/C/IRMS en plus de modifier le rapport $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des molécules. Ces données sont résumées à la figure 3.7 et au tableau VI.

Tableau VI : Données analytiques des stéroïdes d'intérêts sous forme non dérivé

Stéroïdes	T_{RR}^a GC/MS et GC/C/IRMS	Ions caractéristiques m/z	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
5 α -androstane-17 β -ol (ESTD)	0,803	276, 261, 217, 149	-37,5
Norandrostérone	0,892	276, 258, 232, 201	-32,8
Norétiocholanolone	0,911	276, 258, 232, 201	-31,7
Étiocholanolone	0,950	290, 274, 257, 215	-28,4
Androstérone	0,973	290, 274, 257, 215	-37,2
17 α - méthylandrostandiol (ISTD)	1,000	306, 291, 273, 233	-41,1
Pregnanediol	1,069	302, 234, 216, 201	-35,2
Pregnanetriol	1,151	318, 291, 273, 255	-34,3

^a T_{RR} donné selon le standard interne qui a un $T_R = 25,9$ min

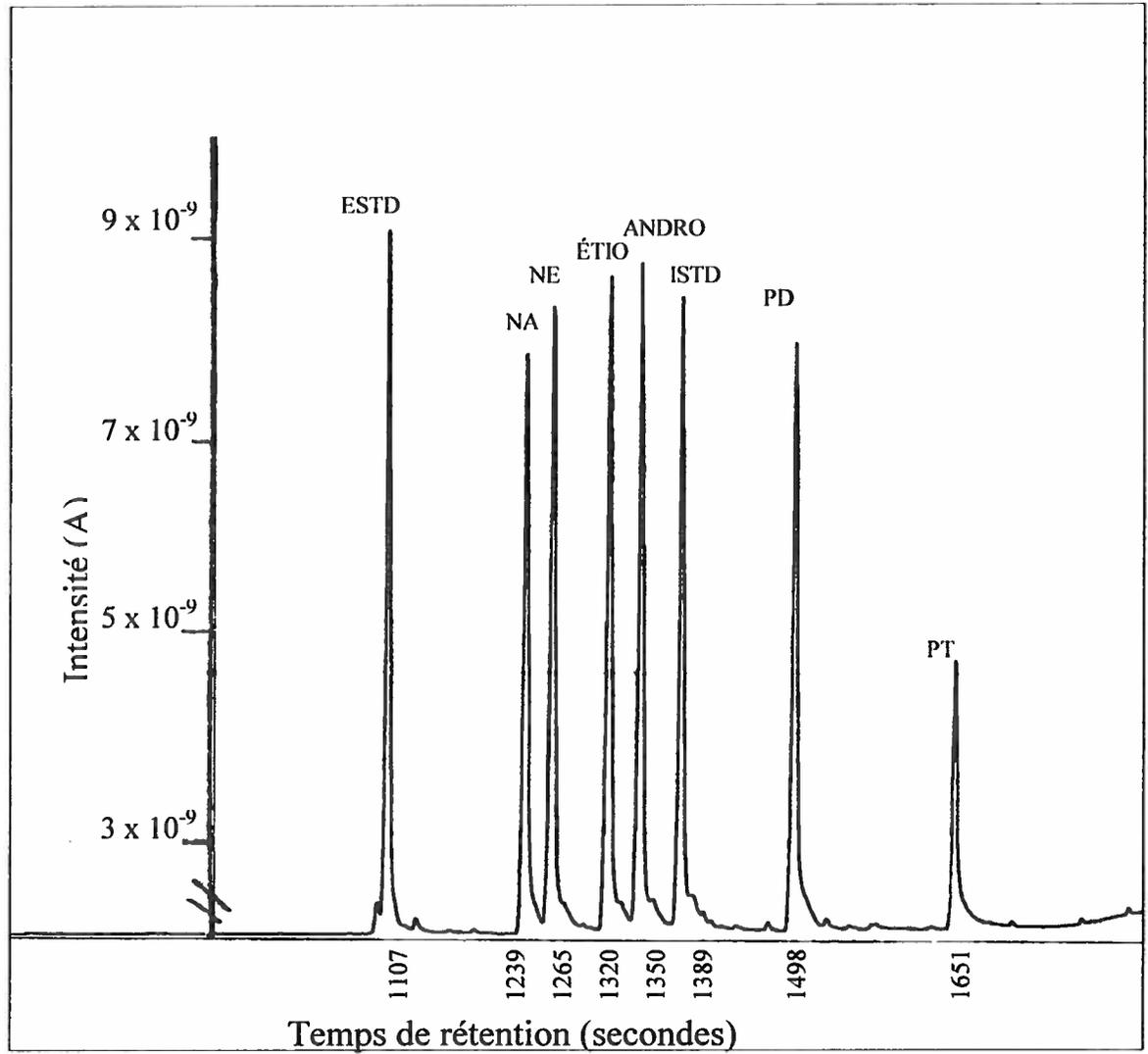


Figure 3.7 : Chromatogramme GC/C/IRMS de la solution de standards authentiques d'une concentration finale injectée de 100 ng/ μ L

Vingt-quatre échantillons d'urine, recueillis auprès d'athlètes, analysés entre 1992 et 1999 et contenant de la norandrostérone en concentration variable (entre 35 et 11 000 ng/ml), ont été ré-analysés par GC/C/IRMS. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ mesurées pour la norandrostérone et la norétiocholanolone excrétées, sont significativement différentes de celles des stéroïdes endogènes de référence (pregnanediol et pregnanetriol) et de celles des métabolites androgènes, androstérone et étiocholanolone, sauf bien sûr, dans les échantillons où des valeurs T/E (testostérone/épitestostérone) élevés sont mesurées. Les valeurs de T/E supérieures à 6 indiquant la prise conjointe de testostérone ou de précurseurs de la testostérone, il est alors évident que les ratios isotopiques obtenus pour l'androstérone et l'étiocholanolone (métabolites urinaires de testostérone) seront anormaux dans ces échantillons. Les résultats sont résumés au tableau VII.

Des échantillons d'urine récoltés suite à l'administration de norandrostènedione (norandrostènedione commerciale) ont également été analysés par GC/C/IRMS (Tableau VIII). Les valeurs $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétés varient entre $-27^0/_{00}$ et $-35^0/_{00}$ et leurs rapports $\delta\text{NA}/\delta\text{PD}$ sont nettement supérieurs à 1. Ces résultats prouvent que suite à l'administration de norstéroïdes, les métabolites urinaires (norandrostérone et norétiocholanolone) ont des rapports isotopiques proches de ceux de leur substance parente administrée ($-32,7^0/_{00}$) et sont différents des rapports $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ des stéroïdes endogènes de référence (pregnanediol et pregnanetriol). Afin de corroborer ce fait, nous avons réussi, avec succès, à isoler et analyser de la norandrostérone endogène (en concentration estimée à environ 2 ng/mL), excrétée durant la 12^{ième} et la 14^{ième} semaine de grossesse par deux différentes personnes. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ alors mesurées sont très similaires aux autres stéroïdes endogènes, soit l'androstérone, l'étiocholanolone, le pregnanediol et le pregnanetriol. Ces résultats sont résumés au tableau IX.

Tableau VII : $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ de NA, NE, A, E, PD et PT de 24 échantillons d'urine d'athlètes positifs aux métabolites de la 19-NT

Éch.	[NA] ng/ml	[NE] ng/ml	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ NA	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ NE	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ andro	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ étio	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PD	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PT	T/E	Volume (ml)	[NA] vial ng/ μL	$\delta\text{NA}/$ δPD
96s2219	-----	-----	-30,1	-29,3	-22,1	-25,4	-22,2	-22,2	0,8	20	-----	1,4
97s0791	79,1	-----	-27,8	-29,8	-30,1	-32,1	-24,9	-21,9	30,4	20	31,64	1,1
99s0184	11000	-----	-31,3	-34,7	-37,2	-34,8	-24,8	-23,1	8,3	5	1100	1,3
99s1450	100	30	-31,5	-30,5	-19,9	-23,1	-19,2	-19,1	1,1	20	40	1,6
92s1321	36,4	10,4	-28,7	-27,8	-25,0	-----	-24,6	-24,1	-----	30	21,84	1,2
92s1385	63,9	32,4	-29,6	-29,7	-32,4	-33,6	-25,9	-23,9	50,0	13	16,61	1,1
92s1419	64,9	13,9	-28,4	-----	-25,8	-26,9	-24,1	-26,4	-----	25	32,45	1,2
92s2138	74,6	20,9	-32,0	-----	-20,5	-22,5	-20,3	-21,6	0,3	25	37,30	1,6
92s2344	262,9	42,3	-29,2	-33,7	-22,5	-23,2	-25,2	-26,0	2,3	15	78,87	1,2
93s0828	147,0	42,5	-32,2	-33,3	-25,2	-26,0	-26,9	-25,9	2,8	15	44,10	1,2
93s1160	40,82	22,4	-34,5	-37,0	-28,6	-28,5	-26,3	-25,5	-----	30	24,49	1,3
93s1424	86,3	5,5	-34,4	-----	-25,9	-26,9	-21,8	-22,3	-----	25	43,15	1,6
93s1635	36,7	8,5	-28,2	-----	-20,5	-23,4	-22,6	-22,1	1,4	30	22,02	1,2
93s2352	112,8	12,2	-33,8	-32,6	-29,5	-30,6	-25,3	-23,7	7,8	15	33,84	1,3
94s0774	35,6	13,3	-33,2	-34,7	-29,1	-30,0	-23,9	-25,4	9,2	35	24,92	1,4
94s1817	69,9	22,0	-27,2	-----	-24,3	-23,9	-23,6	-22,5	3,6	20	27,96	1,2
950556	37,4	21,3	-30,8	-31,7	-22,8	-23,4	-20,1	-23,3	0,6	30	22,44	1,5
95s1579	1401,9	548,7	-30,5	-30,4	-28,1	-27,5	-21,6	-20,6	6,4	10	280,4	1,4
95s1584	3019,6	971,4	-31,5	-26,3	-30,0	-31,0	-21,0	-20,0	27,5	10	603,8	1,5
95s1587	177,2	69,2	-36,2	-34,7	-31,8	-31,8	-20,4	-21,6	9,3	10	35,44	1,8
96s2215	490,1	62,5	-32,9	-31,0	-31,3	-30,6	-20,3	-21,8	1,4	4	49,00	1,6
97s1702	71,7	-----	-29,4	-----	-23,9	-22,0	-23,4	-23,2	2,0	15	21,51	1,3
980623	208,1	11,8	-30,5	-----	-29,6	-----	-19,3	-21,4	91,0	9	37,46	1,6
99s1795	3150	1800	-31,6	-29,5	-32,4	31,6	-24,8	-22,3	9,2	5	315,0	1,3
Moy:	-----	-----	-31,2	-31,6	-----	-----	-23,2	-23,0	-----	-----	-----	1,4
Écart type	-----	-----	2,3	2,8	-----	-----	2,3	1,9	-----	-----	-----	-----

Tableau VIII : $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{\text{‰}}$ de la NA, NE, A, E, PD et PT suite à la prise de 100 mg de norandrostèdione*

Éch.	Heures après t=0	[NA] ng/mL	[NE] ng/mL	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ NA	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ NE	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ A	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ E	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PD	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PT	$\delta\text{NA}/\delta\text{PD}$
0	0	0	0	----	----	-23,5	-23,7	-22,9	-24,0	----
5	5	50 912	9761	-30,9	-31,9	-----	-24,8	-22,5	-21,5	1,4
6	9	11 431	2726	-33,2	-33,6	-23,5	-23,0	-21,8	-23,1	1,5
7	13	5111	1439	-34,6	-34,7	-24,6	-22,7	-24,4	-21,4	1,4
8	16	1511	587,4	-31,3	-32,2	-22,7	-22,8	-23,4	-22,1	1,3
9	24	503,3	239,6	-30,2	-28,4	-23,2	-21,1	-22,8	-21,4	1,3
10	26	135,1	60,7	-30,9	-30,6	-22,9	-23,6	-22,7	-21,7	1,4
11	28	233,0	111,6	-30,1	-26,7	-21,6	-22,5	-22,5	-21,4	1,3
12	33	92,7	54,4	-31,6	-29,3	-21,6	-22,4	-22,9	-21,9	1,4
13	35	212,9	64,7	-31,0	-32,2	-23,3	-23,3	-24,5	-23,4	1,3
14	42	54,1	12,6	-33,5	----	-23,1	-24,8	-23,7	-21,0	1,4
15	51	54,2	----	-31,8	----	-22,2	-23,4	-23,7	-21,6	1,3
16	55	33,1	----	----	----	-24,4	-23,6	-24,6	-22,8	----
17	58	17,5	----	----	----	-24,6	-23,6	-20,1	-23,7	----
18	63	23,2	----	----	----	-22,6	-22,6	-24,3	-22,0	----
19	64	8,9	----	----	----	-21,1	-22,8	-24,5	-23,1	----
20	74	11,6	----	----	----	-21,9	-24,0	-24,2	-24,1	----
21	87	7,2	----	----	----	-20,3	-23,2	-24,9	-22,8	----
22	95	6,3	----	----	----	-21,7	-23,2	-23,8	-23,7	----
23	111	6,2	----	----	----	-20,3	-22,8	-22,9	-22,2	----
24	119	4,5	----	----	----	-20,3	-23,4	-24,5	-22,1	----
25	135	5,1	----	----	----	-22,2	-23,0	-23,2	-23,9	----
Moyenne				-31,7	-30,4	-22,7	-23,2	-23,4	-22,4	1,4
Écart type				1,4	2,5	1,8	0,8	1,1	1,0	----

* La valeur $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{\text{‰}}$ moyenne de 3 capsules commerciales : -32,7⁰/_‰

Tableau IX : Ratios $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$ moyens de la norandrostérone excrétées suite à la prise de norandrostènedione et de nortestostérone et lors de la grossesse.

	NA	NE	A	PD	PT	NA/PD
Nortestostérone ⁷	-31,1	-31,5		-23,0	-23,0	1,4
Norandrostènedione ⁸	-31,6	-30,4	-22,7	-23,4	-22,4	1,4
Enceinte 12 ^{ième} semaine ⁹	-23,6	-	-24,9	-23,1		1,0
Enceinte 14 ^{ième} semaine ¹⁰	-23,0	-	-26,1	-23,0		1,0

⁷ n = 24 échantillons d'urine

⁸ Résultats d'une étude d'excrétion. La moyenne des capsules commerciales est de -32,7

⁹ n=1 échantillon : extraction de 560 mL

¹⁰ n=1 échantillon : extraction de 380 mL

Chapitre 4

Conclusion

La nandrolone ou la 19-nortestostérone (19-NT) fait partie de la classe des agents anabolisants dont l'utilisation par les athlètes est interdite par le Comité international olympique (CIO). Sa grande popularité vient du fait qu'elle est très accessible, des précurseurs de la 19-NT (dont on ne connaît pas l'efficacité) étant offerts en vente libre comme supplément diététique aux États-Unis et disponible par Internet. Dans les contrôles antidopage, sa détection est liée à la présence de ses métabolites urinaires, soit la norandrostérone et la norétiocholanolone. Puisque certaines données de la littérature indiquaient l'excrétion de bas niveaux de norandrostérone chez les femmes enceintes et chez les hommes, il était nécessaire de pouvoir différencier les métabolites de la 19-NT endogène de celle provenant de source commerciale.

Le but de ce projet était, donc, d'étudier la possibilité d'utiliser la spectrométrie de masse d'isotopes stables pour la mesure du rapport isotopique des atomes de carbone de la norandrostérone afin d'en déterminer l'origine. Il était divisé en 3 étapes. Nous avons tout d'abord à développer une méthode d'isolement des métabolites de la 19-NT pour les analyses par GC/C/IRMS. Deuxièmement, nous avons à évaluer les ratios ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$) de la norandrostérone et de la norétiocholanolone excrétées suite à la prise de norandrostènedione et de 19-NT. Dernièrement, nous avons à analyser de l'urine de femmes enceintes afin d'obtenir des valeurs « naturelles » de norandrostérone.

Cette étude a démontré que les extractions solide et liquide-liquide étaient l'approche la plus efficace pour isoler la norandrostérone. Utilisée en combinaison avec la chromatographie liquide à haute performance, cette méthode

s'avère indispensable pour l'isolement de faibles concentrations urinaires de ce métabolite (<35 ng/mL).

De plus, l'utilité de la spectrométrie de masse d'isotopes stables a également été prouvée comme outil diagnostique de l'origine des norstéroïdes excrétés. Les données obtenues nous ont permis d'observer que les valeurs ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$) des métabolites urinaires provenant de l'administration de la nortestostérone ou de la norandrostènedione sont significativement différentes de celles mesurées pour la norandrostérone excrétée durant la grossesse. Les valeurs de la norandrostérone synthétique se situent donc, entre -27 et $-35^0/_{00}$, tandis que les ratios ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}^0/_{00}$) de l'analogue naturel excrété durant la grossesse sont inférieur à $-25^0/_{00}$.

En conclusion, ce projet a fait les premiers pas afin de permettre l'utilisation du GC/C/IRMS dans la détermination de l'origine naturelle ou synthétique de stéroïdes potentiellement endogènes autres que la testostérone. Dans un futur rapproché, cet appareil sera, certainement, très efficace comme méthode de confirmation dans tous les laboratoires accrédités par le CIO. Des recherches supplémentaires sont cependant nécessaires afin d'améliorer sa sensibilité.

Références

AGUILERA, R., M. Becchi et H. Casabianca. 1996. « Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids ». Journal of mass spectrometry, volume 31, p 169-176

AGUILERA, R., D. Catlin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, RS. Swerdloff, HG. Pope et CK. Hatlon. 1999. « Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstandiol ». Journal of chromatography B, volume 727, p.95-105.

AYOTTE, C., D. Goudreault et A. Charlebois. 1996. « Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine ». Journal of chromatography, volume 687, p.3-25.

BECCHI, M., R. Aguilera, Y. Farizon, MM. Flament, H. Casabianca et P. James. 1994. « Gas chromatography/ Combustion/ Isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport ». Rapid communications in mass spectrometry, volume 8, p.304-308.

BIRCH, J.A.1950. « Hydroaromatic steroid hormones I. 10 nortestosterone ». Journal of chemical society, p. 367-368.

BJÖRKEM, I. 1969. « Mechanism and stereochemistry of the enzymatic conversion of a Δ^4 -3-oxosteroid into a 3-oxo-5 α -steroid ». European journal of biochemistry, volume 8, p.345-351.

BOWERS, A., R. Villotti, R. Edwards, E. Denot, O. Halpenn. 1962 Journal of american chemical society, volume 84, p.3204-3205.

BRAND WA. 1996. « High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry ». Journal of mass spectrometry, volume 31, p.225-235.

CAMERINO, B. et R. Sciaky. 1975. Pharmacological therapy B, volume 1(2), p.233-275.

CIARDI, M., R. Ciccoli, MV. Barbarulo et R. Nicoletti. 1999. « Presence of norandrosterone in “normal” urine samples ». Recent Advances in Doping Analysis, p.97-101

CIO. 2000. Commission Médicale du CIO, Statistiques annuelles, communications personnelles

CLOUET, AS., B. LeBizec, MP. Montrade, F. Monteau et F. André. 1997. « Identification of endogenous 19-nortestosterone in pregnant ewes by GC/MS ». Analyst, volume 122, p. 471-474.

DEHENNIN, L., Y. Bonnaire et PH. Plou.1999. « Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man : quantitative analysis by gas chromatography / mass spectrometry ». Journal of chromatography B., volume 121, p.301-307.

DELAHAUT, J. 2000. « Communication personnelle »

- DONIKE, M., S. Rauth et A. Wolanski. 1992. « Unknown » dans A. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Angelke et S. Rauth, Proceedings of the 10th Cologne Workshop dope analysis, Sport und Buch Strausse, Edition Sport, Köln, p.185.
- ENGEL, L.L., J. Alexander et M. Wheeler. 1958. « Urinary metabolites of administered 19- nortestosterone ». Journal of biological chemistry, volume 231, p.1674-1675
- GAUTSCHI, K., B. Keller, H. Keller, P. Pei et D.J. Vonderschmitt. 1994. « A new look at the limits détection (LD), quantification (LQ) and power of definition (PD) ». European journal of clinical biochemistry, volume 32 (1), p.43-44.
- GIRARD, A. et G. Sandulesco. 1936. « Sur une nouvelle série du groupe carbonyle, leur utilisation à l'extraction des substances cétoniques et à la caractérisation microchimique des aldéhydes et cétones ». Helvetica Chimia Acta, volume 19.
- GOWER D.B. 1979. Steroid hormones. London. Croom Helm Ltd. Publishers.
- HEUSLER, K., J. Kalvoda, C. Mestre, H. Verberwassen, P. Wieland, G. Anner et A. Wettstein. 1962. Experientia, volume 8, p.464-466.
- JANSEN, E.H.J.M., H. van Blitterswijk et R.W. Stephany.1984. Veterinary Q, p.141-147.

JEANNEAU, T., P. Kintz, V. Cirimele et B. Ludes. 1999. « Détermination des concentrations physiologiques de la norandrostérone et de la norétiocolanolone, métabolites urinaires de la nandrolone par GC/MS ». Toxicorama, volume XI, no.1, p.25-29.

KINTZ, P., V. Cirimele et B. Ludes. 1999. « Norandrostérone et norétiocolanolone...les métabolites révélateurs ». Acta Clinica Belgia Supplément, volume 1, p.68-73.

LAURE, P. 1999. « Une vieille histoire ». Science et vie Hors Série, No.206, p.4-9.

LE BIZEC, B., F. Monteau, F. Gaudin et F. André. 1999. « Evidence for the présence of endogenous 19-norandrosterone in human urine ». Journal of chromatography B.Biomed Sci Appl., volume 783, p. 157-172.

LE BIZEC, B., F. Gaudin, F. Monteau, F. André, Impens, De Wash et DeBrabander. 2000. « Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites I. Mass spectrometric detection and quantification of 19-norandrosterone and 19-norétiocolanolone in human urine ». Rapid communications in mass spectrometry, volume 14, p. 1058-1065.

LODISH, Baltimore, Berk, Ziperski, Matsudaira et Darnell. 1997. Biologie moléculaire de la cellule . New York, De Boeck University.

MARIEB, EN. 1993. Anatomie et physiologie humaines, Montréal, Éditions du renouveau pédagogique.

MARECK-ENGELKE, Geyer et Schänzer.1999. « The interpretation of female steroid profile » Recent Advances in Doping Analysis (4) - Proceedings of the 16th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Bush Strauß, p. 119-129.

MASON, PM, SE Hall, I. Gilmour, E. Houghton, C. Pillinger et MA. Seymour. 1998. « The use of carbon isotope analysis to detect the abuse of testosterone in cattle ». Analyst, volume 123, p.2405-2408.

MASSÉ, R. C. Laliberté, L. Tremblay et R. Dugal. 1985. « Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone urinary metabolites in man » Biomedical mass spectrometry, volume 12, numéro 3, p.115.

MEIER-AUGENSTEIN, W. 1999. « Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry ». Journal of chromatography A., volume 842, p.1351-1371.

MORETTI, G., G. Cavina, R. Alimenti, P. Cammarata et L. Valvor. 1985. Analytical chemistry, volume 23, p. 471-477.

NORET, A.1981. Le dopage, Paris, Éditions Vigot.

RAPP, M. et H.H.D. Meyer. 1987. Arc. Lebensmittelhyg, volume 38, p. 35-41

REZNIK, Y. 1987. « Rising levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy: Determination by radioimmunoassay and validation by GC/MS » Journal of clinical endocrinology and metabolism, volume 64, p.1086-1088.

REZNIK, Y., L. Dehennin, C. Coffin, J. Mahoudeau et P. Leymarie. 2001. « Urinary nandrolone metabolites of endogenous origin in man : a confirmation by output regulation under human chorionic gonadotropin stimulation » The Journal of clinical endocrinology and metabolism, volume 86, p146-15

SCHÄNZER, W. 1996. « Metabolism of anabolic androgenic steroids ». Clinical chemistry, volume 42, no.7, p.1001-1020.

SHACKLETON, CHL., A. Phillips, T. Chang et Y. Li. 1997. « Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstandiols ». Steroids, volume 62, p.379-387.(a)

SHACKLETON, CHL., E. Roitman, A. Phillips et T. Chang. 1997. « Androstandiol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone and dehydroepiandrosterone : Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry ». Steroids, volume 62, p.665-673.(b)

TRÄGER, L.1977.« Steroid hormone biosynthesis». Stoffwechsel Wirkung Berlin: Springer-Verlag, p.175-177.

URALETS, VP et PA Gillette. 1999. « Over-the-counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 β , 17 β -diol; 19-nor-4-androsten-3,17-dione : excretion studies in men », in recent advance in doping analysis (7), Proceedings of the Manfred Donike Workshop;17th Cologne Workshop on dope analysis, March 1999, W. Schanzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke (eds), Sport & Buch StauB, Koln, p.121.

VAN EENOO, P, FT. Delbeke, FH. De Jong et P. De Backer. 1999. « Urinary metabolites of endogenous nandrolone in women : a case study ». Schänzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A. et Mareck-Angelke, U.(eds): Recent advances in doping analysis, Proceedings of 16th Cologne workshop on dope analysis, Cologne, p.131-143.

VENTURELLI, E., A. Cavalleri et G. Secreto. 1995. « Methods for urinary testosterone analysis ». Journal of chromatography B., volume 671, p. 363-380.

VOLHARDT et Shore. 1995. Traité de chimie organique, 2ème éditions, Bruxelles, De Boeck Université.

WILDS, A.L. et N.A. Nelson. 1953. « The facile synthesis of 19-nortestosterone and 19-norandrostenedione from estrone ». Journal of american chemical society, volume 75, p.5366-5369.

WILSON, JD.1995. « Androgens ». dans J.G. Hardman, A. Goodman Gilman, L.E. Linbird, 9ième édition, Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutic, New York, P.B. Molinoff & R.W. Ruddon editors, p. 1441-1457.