# Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier

# Identification in vitro des métabolites de nouveaux stéroïdes : $17\alpha$ -méthylstenbolone, $17\alpha$ -méthylméthénolone et androst-2-en-17-one

# Par

#### Alexandre Sylvestre

Mémoire ou thèse présentée pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.) en sciences expérimentales de la santé

### Jury d'évaluation

Présidente du jury et Annie Castonguay

examinatrice interne INRS-Institut Armand-Frappier

Examinatrice externe Lekha Sleno

Département de chimie

Université du Québec à Montréal

Directrice de recherche Christiane Ayotte

**INRS-Institut Armand-Frappier** 

#### REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier Pre Christiane Ayotte de m'avoir fait confiance pour la réalisation d'un projet de maîtrise stimulant et enrichissant suite à deux stages effectués au laboratoire. Le partage de ses idées ainsi que ses connaissances tout au long du projet de recherche ont permis d'avoir de bons résultats à présenter. J'ai découvert un certain intérêt pour la recherche qui s'est développé au cours du projet ainsi que le plaisir de partager des connaissances.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire et les nombreux stagiaires (particulièrement Ashley et David) pour leur aide pendant ces deux années. Je tiens à souligner tous les bons moments passés au laboratoire ainsi que les multiples 5 à 7 qui m'ont permis d'apprécier mon travail.

Je remercie Alain Charlebois pour son appui avec le fonctionnement des CG-SM ainsi que Alain Arseneault pour son aide essentielle avec le CLUHP. Toute l'équipe de la procédure « P4 » (Carolina, Julie, Marc-André, Marie, Natacha, Pauline, Philippe, Rita et Vicky) pour leur support et participation directe ou indirecte au projet.

Je remercie aussi Philippe Räss pour ses travaux précédents sur la  $17\alpha$ -méthylstenbolone et la  $17\alpha$ -méthylméthénolone ainsi que leur synthèse permettant l'incubation de ceux-ci.

Ce projet a été financé par des subventions de l'Agence mondiale antidopage et du Centre canadien pour l'éthique dans le sport que je remercie.

## **RÉSUMÉ**

La caractérisation des métabolites de nouveaux stéroïdes de synthèse dont la distribution est illégale est la clé pour pouvoir en détecter la prise par les athlètes. L'utilisation de techniques in vitro telles que les incubations avec des hépatocytes cryopréservés est connue pour simuler le métabolisme via la biotransformation au niveau du foie procurant des résultats semblables à ceux obtenus in vivo chez l'humain. L'utilisation de technique in vitro a pour avantage d'éviter tout problème éthique lié au recours à des volontaires humains pour mener des études d'excrétion avec ces molécules dont l'innocuité est inconnue. Le but de ce projet était de produire in vitro des métabolites de différents stéroïdes de synthèse dont la biotransformation est méconnue. L'origine des stéroïdes utilisés pour les incubations varie d'une synthèse organique à l'interne, de manufacturiers certifiés en produits analytiques ou bien de compagnies de suppléments pour conditionnement physique. La pureté de chaque stéroïde a été vérifiée sur CG-SM avant leur utilisation pour des incubations in vitro (une séparation par CLHP a pu être nécessaire). La production des métabolites a été faite avec l'utilisation d'hépatocytes humains cryopréservés, de fractions S9 de foies humains ainsi que d'enzymes recombinantes du CYP450. Des structures ont été proposées pour les métabolites obtenus, suite à l'analyse par CG-SM principalement. Plusieurs métabolites ont été obtenus pour chacun des stéroïdes testés; cinq pour la méthylstenbolone, sept pour la méthylméthénolone et deux principaux pour l'androst-2-en-17-one. En plus de ces trois SAA, des tests sur l'Epitren RX 30, un supplément contenant de la trendione et de l'épistane, ont été réalisés pour en savoir plus sur leurs voies métaboliques. Ces résultats ont permis le développement d'une méthode de dépistage qui a été incorporée aux analyses existantes.

#### **ABSTRACT**

Metabolite characterization of new synthetic steroids, whose distribution is illegal, is the key to detect use by athletes. *In vitro* techniques, such as incubations with cryopreserved hepatocytes, are known to simulate the human metabolism in the liver giving similar results to those obtained in vivo with urine analysis. In vitro techniques are advantageous compared to excretion studies with human volunteers as the safety of the molecules is unknown. The aim of this project was to produce in vitro metabolites of various synthetic steroids whose metabolism was unknown. The origin of these steroids varied from organic synthesis produced in-house, certified analytical product manufacturers and fitness supplement companies. The purity of each steroid was checked on GC-MS prior to in vitro incubation (HPLC purification was sometimes necessary). Production of metabolites was possible from incubations with cryopreserved human hepatocytes, S9 fractions from human liver and recombinant CYP450 enzymes. Structures have been proposed for metabolites primarily following the GC-MS analysis. Several metabolites have been obtained for each of the steroids in question: five for 17-methylstenbolone, seven for 17-methylmethenolone and two principal ones for androst-2-en-17-one. In addition to these three AAS, some tests have been accomplished on Epitren RX 30, a supplement containing trendione and epistane, to get better knowledge of the metabolic pathways involved. These results lead to the development of a screening method that has been incorporated into existing detection methods.

# **TABLE DES MATIÈRES**

1		REVUE DE LA LITTERATURE	3
	1.1	BIOTRANSFORMATION STEROÏDIENNE	4
	1.2	EFFET ANDROGENIQUE/ANABOLIQUE	7
	1.2.1	Potentiel androgénique	7
	1.2.2	Potentiel anabolique	7
	1.2.3	Détermination du potentiel androgénique/anabolique	8
	1.3	LES MODELES D'ETUDES DE VOIES METABOLIQUES	9
	1.4	OBJECTIFS DE L'ETUDE	11
	1.5	STEROÏDES DE SYNTHESES SELECTIONNES	11
	1.5.1	17α-méthylstenbolone et 17α-méthylméthénolone	13
	1.5.2	5α-androst-2-en-17-one	13
	1.5.3	Epitren RX 30 (trendione et épistane)	14
2		MATERIELS ET METHODES	15
	2.1	EXTRACTION ET PURIFICATION DES STEROÏDES CONTENUS DANS DES PRODUITS COMMERCIAUX	16
	2.2	INCUBATION AVEC ENZYMES RECOMBINANTES DU CYP3A4	17
	2.3	INCUBATION AVEC FRACTIONS SUBCELLULAIRES \$9 D'HEPATOCYTES HUMAINS	18
	2.4	INCUBATION AVEC DES HEPATOCYTES HUMAINS CRYOPRESERVES	19
	2.5	ISOLEMENT DES METABOLITES	20
3		RESULTATS ET DISCUSSION	25
	3.1	ÉTUDES PRELIMINAIRES	25
	3.2	17-METHYLSTENBOLONE	30
	3.2.1	Analyse de produits commerciaux à base de 17-méthylstenbolone	43
	3.2.2	Spectre d'ions produits	45
	3.3	17-METHYLMETHENOLONE	49
	3.3.1	Spectre d'ions produits	62
	3.3.2	Résultats SRM	63
	3.4	5A-ANDROST-2-EN-17-ONE	65
	3.5	EPITREN RX 30	69
4		CONCLUSION	77
	41	Perspectives	78

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Methode d'injection sur CLHP pour collecte de fraction	16
TABLEAU 2.2 : METHODE SRM (SELECTION DE REACTIONS MULTIPLES) CREEE POUR L'ANALYSE DE LA 17A-	
METHYLSTENBOLONE ET SES METABOLITES.	22
TABLEAU 2.3: METHODE SRM CREEE POUR LA 17A-METHYLMETHENOLONE ET SES METABOLITES	23
Tableau 3.1 : Éléments présents dans la méthode d'analyse par CG-SM/SM de la méthylstenbol	ONE
ET SES MÉTABOLITES	45

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: EXEMPLE DE REACTION DE PHASE I AVEC SCHEMA SIMPLIFIE DE LA 6B-HYDROXYLATION À PARTIR I	DΕ
LA 5A-DHT	5
FIGURE 1.2: SCHEMA SIMPLIFIE DES REACTIONS DE GLUCURONIDATION ET SULFOCONJUGATION A PARTIR DE LA	4
5A-DHT	5
FIGURE 1.3 : STRUCTURE DE BASE ET NUMEROTATION DE L'ANDROSTANE	6
FIGURE 1.4 : STRUCTURE DES 5 STEROÏDES ETUDIES.	12
FIGURE 2.1: SCHEMA DU PROTOCOLE D'INCUBATION AVEC LES CYP3A4.	18
FIGURE 2.2: SCHEMA DU PROTOCOLE D'INCUBATION DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES S9.	19
FIGURE 3.1 : SCHÉMA DES RÉACTIONS POSSIBLES POST-SULFOCONJUGAISON POUR LES STÉROÏDES AVEC UN	
17a-méthyl (a) (Schanzer et al., 1992) ainsi que la formation enzymatique de 17-CH $_2$ OH (b)	
(SCHÄNZER W <i>ET AL.</i> , 2006)	26
FIGURE 3.2 : SCHÉMA DE LA SULFATATIONSUIVI DE L'ÉPIMÉRISATION EN C-17 CHEZ LES STÉROÏDES 17A-	
MÉTHYLÉS	27
FIGURE 3.3 : CHROMATOGRAMMES DE L'ANALYSE CG-SM (MODE DE BALAYAGE COMPLET) DES EXTRAITS	
D'INCUBATIONS DE LA METHYLSTENBOLONE AVEC DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES S9 (A) ET DES	
HEPATOCYTES CRYOPRESERVES (B) (DERIVES TMS-ETHER, TMS-ENOL)	31
FIGURE 3.4 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE DE LA 17A-METHYLSTENBOLONE PER-TMS EN CG-SM	32
FIGURE 3.5 : A : STRUCTURE PROPOSEE POUR (A) 3A-HYDROXY METHYLSTENBOLONE, (B) 3B-HYDROXY	
METHYLSTENBOLONE. B: SPECTRE DE MASSE DE LA 3A-HYDROXY METHYLSTENBOLONE PER-TMS EN CO	G-
SM	34
FIGURE 3.6 : A : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (A4) 18-HYDROXY	
METHYLSTENBOLONE PER-TMS EN CG-SM. B : SPECTRE DE MASSE DERIVE TMS-ETHER EN CG-SM. C	; :
SPECTRE DE MASSE DERIVE TMS-ETHER-D9 EN CG-SM	37
FIGURE 3.7 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (A5) 6B-HYDROXY	
METHYLSTENBOLONE PER-TMS EN CG-SM.	39
FIGURE 3.8 : A : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (A10) 16-HYDROXY	
METHYLSTENBOLONE PER-TMS EN CG-SM. B : SPECTRE DE MASSE DERIVE TMS-ETHER EN CG-SM	41
FIGURE 3.9 : RESUME DES VOIES METABOLIQUES HEPATIQUES PROPOSEES DE LA METHYLSTENBOLONE	42
FIGURE 3.10 : STRUCTURES DE LA METHYLSTENBOLONE ET DE LA 17-METHYLDROSTANOLONE AVEC SON	
SPECTRE DE MASSE DERIVE PER-TMS EN CG-SM	44
FIGURE 3.11 : RESULTAT DE LA METHODE DE DETECTION SRM SUR CG-SM/SM DE L'INCUBATION AVEC LES	
FRACTIONS SUBCELLULAIRES S9 DE LA METHYLSTENBOLONE.	46
FIGURE 3.12 : RESULTATS DU PROFIL METABOLIQUE DE L'URINE DE REFERENCE AVEC HYDROLYSE DES	
GROUPEMENTS GLUCURONIDES SELON LA METHODE SRM	47

FIGURE 3.13 : CHROMATOGRAMMES DE L'ANALYSE CG-SM (MODE DE BALAYAGE COMPLET) DES EXTRAITS
D'INCUBATIONS DE LA 17-METHYLMETHENOLONE AVEC DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES S9 (A) ET DES
HEPATOCYTES CRYOPRESERVES (B) DERIVES TMS-ETHER, TMS-ENOL
FIGURE 3.14 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE DE LA METHYLMETHENOLONE PER-TMS EN CG-SM51
FIGURE 3.15 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (B1) 3A-HYDROXY-1-
METHYLENE-METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS
FIGURE 3.16 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (B2) 3A-
HYDROXY METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS53
FIGURE 3.17 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR DE L'EPIMETHYLMETHENOLONE EN CG-SM
DERIVE PER-TMS
FIGURE 3.18 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (B3) 18-HYDROXY
METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS55
FIGURE 3.19 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (B4) 6B-HYDROXY
METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS
FIGURE 3.20 : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE POUR LE METABOLITE (B6) 2-HYDROXY
METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS
FIGURE 3.21 : STRUCTURE PROPOSEE DES METABOLITES B7 ET B10
FIGURE 3.22 : A : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE DU METABOLITE (B7) 16-HYDROXY
METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS. B : SPECTRE DE MASSE DERIVE TMS-ETHER EN CG-
SM59
FIGURE 3.23 : A : SPECTRE DE MASSE ET STRUCTURE PROPOSEE DU METABOLITE (B10) 16-HYDROXY
METHYLMETHENOLONE EN CG-SM DERIVE PER-TMS. B : SPECTRE DE MASSE DERIVE TMS-ETHER EN CG-
SM
FIGURE 3.24 : RESUME DES VOIES METABOLIQUES HEPATIQUES DE LA METHYLMETHENOLONE AVEC DES
PROPOSITIONS DE STRUCTURES61
FIGURE 3.25 : RESULTATS OBTENUS DE L'ANALYSE GC-MS/MS EN MODE SRM DE L'EXTRAIT OBTENU DE
L'INCUBATION DE LA METHYLMETHENOLONE AVEC DES FRACTIONS S9
FIGURE 3.26 : SPECTRE DE MASSE EN BALAYAGE COMPLET SUR CG-SM DES ISOMERES 5A-ANDROST-2-EN-17-
ONE (A) ET 5A-ANDROST-3-EN-17-ONE (B)
FIGURE 3.27 : CHROMATOGRAMME DE L'INCUBATION AVEC LES HEPATOCYTES EN BALAYAGE COMPLET SUR CG-
SM
FIGURE $3.28$ : PRINCIPAUX METABOLITES (STRUCTURE PROPOSEE) ISSUS DES DEUX ISOMERES 2-ENE (D7) ET $3$ -
ENE (D8)66
FIGURE 3.29 : SPECTRE DE MASSE DU METABOLITE (D7) 2,3-DIHYDROXY-5A-ANDROSTAN-17-ONE EN CG-SM
DERIVE PER-TMS
FIGURE 3.30 : SPECTRE DE MASSE DU METABOLITE (D8) 3,4-DIHYDROXY-5A-ANDROSTAN-17-ONE EN CG-SM
DEDIVE DED TMS

FIGURE 3.31 : CHROMATOGRAMME DES RESULTATS EN CG-SM DE L'INCUBATION DES FRACTIONS S9 DU PROD	UIT
COMMERCIAL EPITRENRX 30 CONTENANT DE LA TRENDIONE ET DE L'EPISTANE (NON DERIVE)	.70
FIGURE 3.32 : VOIES METABOLIQUES MAJEURES DE LA TRENDIONE (TRENAVAR).	.70
FIGURE 3.33 : SPECTRE DE MASSE DE L'EPITRENBOLONE (17A-TRENBOLONE) EN CG-SM (NON DERIVE)	.71
FIGURE 3.34 : SPECTRE DE MASSE DE LA TRENBOLONE (17B-TRENBOLONE) EN CG-SM (NON DERIVE)	.71
FIGURE $3.35$ : STRUCTURE AINSI QUE LE SPECTRE DE MASSE DE L'EPISTANE (A) (IDENTIQUE A LA $\overline{DMT}$ ) EN $\overline{CG}$	-
SM NON DERIVE ET STRUCTURE DU DMT (B).	.73
Figure $3.36$ : Voies proposees par Okano M. $\it{etal.}$ pour la formation du $\it{5a-}$ androst- $\it{2-}$ en- $\it{17b-}$ ol v	IA
LE MEPITIOSTANOL PAR PYROLYSE	.73
FIGURE 3.37 : STRUCTURE ET SPECTRE DE MASSE DE LA DMT PER-TMS EN CG-SM.	.74
FIGURE $3.38$ : SPECTRE DE MASSE DU METABOLITE DE L'EPISTANE HYDROXYLE EN C- $16$ OBTENU PAR CG-SM	
APRES INCUBATION AVEC LES CYP3A4 (A) ET LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES S9 (B) AINSI QUE SA	
STRUCTURE DERIVEE PER-TMS (C).	.75

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMA: Agence mondiale antidopage

CG-SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CG-SM/SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en

tandem

CLHP: Chromatographie liquide à haute performance

CL-SM: Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

CYP450: Complexe enzymatique du cytochrome P450

DHCMT: Déhydrochlorméthyltestostérone

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CAD: Dissociation activée par collision

HCI: Acide chlorhydrique

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Acide sulfurique

ISTD: Standard interne

OTMS: O-triméthylsilyle

MeOH: Méthanol

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

m/z: Ratio masse/charge

NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH: Dihydronicotinamide-adénine-dinucleotide phosphate

NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonate de sodium

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: ion ammonium

PAPS: Phosphoadenosinephosphosulfate

Per-TMS: per-triméthylsilyle

PO<sub>4</sub>: Phosphate

psi: Pression par pouce carré

p/v: Ratio poids/volume

RMN: Résonance magnétique nucléaire

rpm: Rotation par minute

SAA: Stéroïdes androgéniques anabolisants

SIM: Selective ion monitoring (mesure d'ions sélectifs)

SM: Spectrométrie de masse

SMHR : Spectrométrie de masse à haute résolution

SRM: Selected reaction monitoring (mesure de réactions multiples)

ST: Sulfotransférase

UDPGA: Acide uridinediphospho-glucuronique

UGT: Glucuronosyltransférase

uma: unité de masse atomique unifiée

THF: Tétrahydrofurane

TMCS: Triméthylchlorosilane

TMIS: lodure de triméthylsilyle

CLUHP: Chromatographie liquide ultra haute performance

**UV: Ultraviolet** 

WAADS: World Association of Anti-Doping Scientists

#### Introduction

Les enjeux économiques et sociopolitiques associés aux événements sportifs d'envergure sont énormes pour les athlètes. Des sommes colossales peuvent être attribuées en fonction des performances dans les différentes compétitions d'élite. (Moston S et al., 2016) Non seulement l'utilisation de produits dopants est interdite, mais des conséquences néfastes sur la santé peuvent en découler. L'utilisation des stéroïdes androgéniques anabolisants (SAA) à des fins de dopage, n'est pas un concept nouveau dans le monde du sport. Dans la dernière moitié du 20e siècle, l'Allemagne de l'Est utilisait déjà des dérivés de la testostérone chez leurs athlètes. Les résultats obtenus par ceux-ci renforçant l'image d'un peuple «supérieur» projeté aux autres nations, mais en parallèle s'avérant dévastateurs pour la santé des athlètes (Dennis M et al., 2012). Aujourd'hui, grâce à l'internet, l'accès aux SAA est de plus en plus simple. Le Comité international olympique a cédée le contrôle du dopage sportif à l'Agence mondiale antidopage (AMA) en 1998. La liste des substances interdites est mise à jour annuellement en fonction des avancées dans le domaine. Celles-ci et leurs métabolites sont recherchés dans l'urine principalement lors d'un contrôle antidopage. À l'aide de modèles in vitro (un processus moins nocif qu'une étude d'excrétion chez l'humain), les voies de biotransformation de nouveaux produits peuvent être élucidées. Afin d'avoir un dépistage efficace des plus récents SAA disponibles sur le marché, il est important d'ajouter leurs métabolites lors des contrôles antidopage. C'est grâce entre autres aux nouvelles méthodes de dépistage par l'identification de métabolites persistants et aux avancées technologiques qu'en 2016, suite à une réanalyse de certains échantillons d'urine, 38 nouveaux cas positifs pour les Jeux olympiques de Londres et 60 pour ceux de Beijing ont été découverts (Olympic.org, 2016).

Le but de ce travail est donc de déterminer les métabolites de trois stéroïdes soit la 17α-méthylstenbolone, la 17α-méthylméthénolone ainsi que l'androst-2-en-17-one à l'aide de modèles *in vitro*. Trois ont été utilisés : les hépatocytes humains cryopréservés, les fractions subcellulaires de foies humains ainsi que les enzymes recombinantes du CYP3A4 pour la production des métabolites. Des structures ont été proposées suite à des analyses par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse. L'ensemble de ces tests a permis la création de méthodes d'analyses propres à ces nouveaux stéroïdes et leurs métabolites et ainsi l'avancement de la lutte antidopage.

## 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

L'étude des hormones anabolisantes d'origine testiculaire n'aurait débuté qu'à la fin des années 1800. Un scientifique français âgé se sentant faiblir, chercha un moyen de se redonner de l'énergie pour poursuive ses expériences sur la science des hormones. Brown-Séquard se serait injecté lui-même un extrait préparé à partir de testicules de chiens et de cobayes lui conférant un gain d'énergie sans qu'il en comprenne le mécanisme d'action (Brown-Séquard C, 1889). Cet excédant de vitalité ne fut que de courte durée puisqu'il décéda quelques mois plus tard. Cette «substance mâle» que l'on sait maintenant être la testostérone a finalement été identifiée et isolée dans les années 1930 par des scientifiques allemands. La testostérone a donc été le premier SAA utilisé cliniquement (Mohler ML et al., 2009). Cependant, cette molécule avait quelques lacunes au niveau pharmacocinétique ainsi que pharmacodynamiques (Brueggemier RW et al., 1995). Cela mena à la création de plusieurs dérivés (SAA) aux propriétés pharmacologiques intéressantes (David K et al., 1935;Wettstein A, 1935).

Certaines publications rapportent que 3% des jeunes hommes aux États-Unis, en Europe ainsi qu'au Brésil auraient utilisé au moins une fois dans leur vie des SAA pour différentes raisons (Galduroz JC *et al.*, 2005;Kanayama G *et al.*, 2010;Kokkevi A *et al.*, 2008;McCabe SE *et al.*, 2007).

L'utilisation des SAA a été bannie dès le milieu des années 1970 par la Commission médicale et scientifique du Comité international olympique. Depuis 2004, l'Agence mondiale antidopage (AMA) met annuellement à jour la liste des substances interdites qui comporte les classes suivantes : S0 : Substances non approuvées, S1. Agents anabolisants, S2. Hormones peptidiques, facteurs de croissances, substances apparentées et mimétiques, S3. Agonistes-bêta 2, S4. Modulateurs hormonaux et métaboliques, S5. Diurétiques et agents masquants, S6. Stimulants, S7. Narcotiques, S8. Cannabinoïdes et S9. Glucocorticoïdes. Dans toutes ces classes de composés, de nouvelles molécules ont été ajoutées au fil des découvertes de l'industrie pharmaceutique. Concernant plus spécifiquement les agents anabolisants, de nouveaux stéroïdes de synthèse ont été créés et rendus accessibles pour déjouer les tests antidopage, mais surtout pour tenter de contourner les lois en interdisant l'importation et la distribution. C'est pourquoi la lutte contre le dopage est en constante évolution. Ainsi, la compréhension du métabolisme de ces nouveaux stéroïdes est d'une grande importance pour les laboratoires luttant contre le dopage.

Bien que les hormones stéroïdiennes androgènes soient nécessaires au développement des fonctions masculines et reproductives, certains athlètes en font un usage détourné dans le but d'augmenter leur masse musculaire, d'accélérer la guérison de blessures ou permettre une meilleure récupération par rééquilibrage hormonal. Les effets secondaires sont toutefois nombreux : cardiotoxicité, hépatotoxicité, athérosclérose, agressivité, dépression, etc. (Hartgens F et al., 2004;Sjöqvist et al., 2008). L'amélioration des performances sportives d'athlètes professionnels ou récréatifs se ferait donc souvent au détriment de leur santé (G Pope Jr H et al., 1994).

#### 1.1 Biotransformation stéroïdienne

Le métabolisme général de différents stéroïdes a été étudié et décrit au cours des dernières années afin de se doter d'un outil de détection et de prédiction des voies métaboliques des nouveaux composés (Thieme D *et al.*, 2009). La biotransformation des stéroïdes se fait dans divers tissus (intestin, poumons, reins), mais principalement dans le foie (Makin HLJ *et al.*, 2010). Les métabolites produits proviennent de réactions dites de phase I et II.

La première consiste en des réactions catalytiques dirigées par des actions enzymatiques de réduction, d'oxydation ou d'hydroxylation aboutissant principalement à une meilleure élimination ou inactivation du produit. Les enzymes de phase I sont principalement celles de la superfamille du cytochrome P450 tandis que celles de la phase II pour les stéroïdes sont l'uridinediphosphoglucuronosyl transférase (UGT) et la sulfotransférase (ST) (Jin Y *et al.*, 2001).

Les réactions de phase I les plus fréquemment recensées sont celles impliquant les différentes enzymes, soit les 17α-hydroxylase, 5β-réductase, 3β-déshydrogénase, etc. (Barnes HJ *et al.*, 1991). Les enzymes du CYP450 responsables des réactions d'oxydoréduction et d'hydroxylation sont quant à elles situées dans le réticulum endoplasmique et la membrane interne des mitochondries des cellules hépatiques (Anzenbacher P *et al.*, 2001). Ces complexes protéiques possédant un groupement hème sont en mesure de lier deux atomes d'oxygène et ainsi permettre l'oxydation, voir figure 1.1 (Isin EM *et al.*, 2008). Les niveaux enzymatiques des différents CYP450 varient entre individus (différences au niveau génomique) et diffèrent encore plus entre espèces (Sharer J. E *et al.*, 1995).

Figure 1.1: Exemple de réaction de phase I avec schéma simplifié de la 6β-hydroxylation à partir de la 5a-DHT.

Pour ce qui est du métabolisme de phase II, il s'agit plutôt de réactions de conjugaison avec des groupements acide glucuronique ou sulfate des métabolites issus de la première phase. Ces réactions sont schématisées à la figure 1.2. La conjugaison à un groupement polaire entraine une élimination plus rapide et efficace en augmentant le caractère hydrophile du composé (Lemke TL *et al.*, 2012).

Figure 1.2: Schéma simplifié des réactions de glucuronidation et sulfoconjugation à partir de la 5a-DHT.

Anticiper les voies métaboliques en fonction de la structure chimique des stéroïdes est possible (Fragkaki AG *et al.*, 2009;Schanzer, 1996).

Ainsi, les réactions suivantes sont fréquemment observées:

- Modification en position C-17: isomérisation du 17β-OH en 17α-OH, oxydation du 17β-OH en 17-cétone. Ces réactions sont empêchées par la présence d'un groupement alkyle en C-17;
- 2. Modification en position C-3 réduction de la cétone en 3α-hydroxyle et 3β-hydroxyle;
- 3. Réactions d'hydroxylation en position C-6, C-16 ainsi que C-12 dans le cas de molécules possédant un groupement méthyle en C-17.
- 4. Plus récemment, l'identification de métabolites hydroxylés en C-18 (Masse R *et al.*, 1992) et la formation de 17,17 diméthyle et 17-hydroxyméthyle par réaction de Wagner-Meerwein (Bi H *et al.*, 1992;Hanson JR, 1980).

Le principal mécanisme d'action des stéroïdes provient de leur liaison avec le récepteur androgénique nucléaire (AR) (Dubois V *et al.*, 2012;Maravelias C *et al.*, 2005). L'activation du récepteur favoriserait la transcription des gènes ainsi que le recrutement de cofacteurs pour la traduction efficace de protéines d'intérêt (Evans RM, 1988).

Les stéroïdes androgéniques anabolisants (SAA) sont des dérivés synthétiques des molécules naturellement produites par le corps. La structure de base d'un SAA possède typiquement un squelette cyclopentanoperhydrophénanthrène (polycyclique formé de 17 atomes de carbone) (Rogozkin V. A, 1991). La classe des androstanes comprend deux atomes de carbone supplémentaires en C-18 et C-19 tandis que les estranes n'ont pas de carbone en position C-19; ces structures sont à la base des hormones sexuelles desquelles sont dérivés les SAA connus. La figure 1.3 présente la numérotation des positions des atomes de carbone de l'androstane.

Figure 1.3 : Structure de base et numérotation de l'androstane.

### 1.2 Effet androgénique/anabolique

#### 1.2.1 Potentiel androgénique

Les effets biologiques des différents stéroïdes sont associés à des modifications structurales spécifiques du noyau de base. L'effet androgénique est principalement dû à la présence d'un groupement 17β-hydroxyle. Sans lui, l'effet androgénique est complètement perdu (Gower DB, 1972). Afin de maximiser l'effet androgénique anabolisant, diminuer les effets secondaires et augmenter la biodisponibilité, plusieurs modifications sont possibles d'apporter à la structure de base de la figure 1.3.

L'Introduction de groupements carbonyles vient modifiée l'effet androgénique. La présence d'un groupement cétone en position C-3 serait très efficace pour diminuer le potentiel androgénique d'un stéroïde (Rogozkin V. A, 1991).

De plus, l'introduction de doubles liaisons à l'intérieur des différents cycles à la capacité modifié son potentiel. Par exemple, la présence d'une double liaison entre C-4, C-5 entraînant l'adoption d'une conformation chaise, a pour conséquence d'augmenter ses propriétés androgéniques (Liao S *et al.*, 1973). Par contre, l'addition d'une liaison double dans le cycle A amène l'adoption d'une conformation aplatie ce qui diminue l'activité androgénique.

En modifiant le nombre d'atomes de carbone des cycles, il y a perturbation du potentiel androgénique. Par exemple, l'élimination du groupement méthyle en C-19 réduit le pouvoir androgénique du stéroïde (Liao S *et al.*, 1973).

#### 1.2.2 Potentiel anabolique

Comme c'est le cas pour l'activité androgénique, les effets anaboliques peuvent être modulés avec des modifications structurelles clés. Une 17α-alkylation est un grand facteur dans l'augmentation des effets anaboliques. La présence d'un groupement méthyle en C-17 augmente la stabilité de la molécule et par conséquent sa biodisponibilité en stabilisant le groupement hydroxyle déjà présent, prévenant ainsi sa conversion en une cétone faiblement active (Rogozkin V. A, 1991).

La biodisponibilité des stéroïdes possédant une fonction hydroxyle en position C-17, telle la testostérone, est accrue par leur conversion en esters les rendant plus lipophiles leurs conférant une affinité accrue aux tissus lipidiques (Kam *et al.*, 2005).

Quelques modifications du cycle A élèveraient également l'activité anabolique. Le remplacement d'un atome carbone par un oxygène en position C-2 (formation d'une lactone cyclique) en changeant complètement la conformation du cycle A, élève le potentiel anabolique du composé. L'introduction d'un groupement alkyle en C-1, C-2 et C-7 aurait le même effet. Cependant, la suppression du groupement méthyle en C-19 stopperait l'effet androgénique, au profit d'une augmentation importante de l'effet anabolique (Kicman AT *et al.*, 2003). D'autres modifications viendraient varier l'activité anabolique :

- Modification de la structure des cycles: Introduction d'oxygène dans le cycle A, déshydrogénation (plus d'insaturations dans les cycles) et relocalisation des doubles liaisons (Liao S et al., 1973).
- 2. Substitution des hydrogènes de C-1, C-2,C-4, C-7, C-9, C-13 et C-17 avec différents atomes (CI, F, OH, CH<sub>3</sub>, CHO, etc.) (Liao S *et al.*, 1973).

#### 1.2.3 Détermination du potentiel androgénique/anabolique

La détermination de l'activité androgénique des stéroïdes a longtemps été basée sur la modification du poids de la prostate ventrale ou des vésicules séminales. Une augmentation de leur poids en suggérait la présence. Pour ce qui est de l'activité anabolique, elle était mesurée par différents tests, dont la balance en azote qui correspond à l'activité anabolique des protéines et l'augmentation du poids du rein (Rogozkin V. A, 1991). Plus récemment, une nouvelle approche est utilisée pour mesurer l'activité anabolique/androgénique des stéroïdes. Au lieu d'utiliser les variations sur les organes sensibles aux hormones stéroïdiennes, une méthode basée sur une approche génomique (puce à ADN) a été élaborée (Labrie F et al., 2005). sensibles L'expression des gènes des tissus aux stimulations androgéniques/anabolisantes de souris est mesurée (via un système de coloration) puis comparée à un autre SAA. Le laboratoire a déjà utilisé cette technique en collaboration avec le laboratoire de Ayotte P. pour déterminer le potentiel de la désoxyméthyltestostérone (DMT) (Ayotte C et al., 2006). Il s'agit d'une méthode plus efficace pour déceler le potentiel anabolique/androgénique d'une nouvelle molécule, mais à un coût plus important.

### 1.3 Les modèles d'études de voies métaboliques

Pour simuler la biotransformation des stéroïdes, différents modèles *in vitro* peuvent être utiles. Ceux connus et utilisés sont les hépatocytes frais/cryopréservés, fractions S9 (un mélange d'enzymes cytosoliques et de microsomes), microsomes et CYPs recombinants. De plus, les milieux d'incubation sont moins complexes que la matrice urinaire, facilitant de ce fait l'identification des métabolites produits en réduisant les interférences potentielles.

L'utilisation d'animaux est aussi un moyen de produire de nouveaux métabolites. Par contre, les niveaux et/ou l'absence de certaines enzymes hépatiques importantes de l'humain sont un grand désavantage de ce système *in vivo*. Cependant, certaines espèces peuvent subir des modifications génétiques ou subir des transplantations de tissus humains pour mieux simuler le système chez l'homme. C'est le cas pour les souris chimériques «humanisées» de Leen Lootens et Van Eenoo (Lootens L *et al.*, 2009).

En comparant leurs bénéfices respectifs, on note différents avantages et inconvénients entre les modèles répertoriés dans la littérature scientifique.

Pour les hépatocytes, il existe maintenant des techniques permettant le maintien de l'activité des hépatocytes primaires cryopréservés. Il a été démontré qu'avec cette méthode de préservation, les hépatocytes et leurs enzymes métaboliques de première et de deuxième phase ne subissent aucun effet négatif (Annaert PP et al., 2001;Silva J.M et al., 1999). Ces hépatocytes sont utilisés depuis plusieurs années dans l'élucidation du métabolisme de différents composés puisqu'ils reproduisent efficacement le métabolisme hépatique d'un volontaire humain (Gómez-Lechón MJ et al., 2003). La variabilité interindividuelle au niveau des proportions enzymatiques des donneurs d'hépatocytes est contrecarrée en utilisant des cellules provenant de plusieurs donneurs (20 donneurs de tous âges pour cette étude).

Les fractions subcellulaires S9 sont composées de parties cytosoliques et microsomales. Leur utilisation requiert une solution génératrice de NADPH pour permettre aux enzymes oxydatives (de phase I) d'effectuer leurs actions catalytiques. Pour le métabolisme de deuxième phase, deux cofacteurs doivent être ajoutés: UDPGA pour la glucuronidation et PAPS pour la sulfatation. Les fractions S9 sont une meilleure représentation du métabolisme *in vivo* en comparaison aux microsomes grâce aux enzymes cytosolyques de phase II (Brandon EFA *et al.*, 2003). Un désavantage des fractions subcellulaires S9 est leur plus faible activité

enzymatique vis-à-vis les microsomes (plus grande concentration en enzymes) ce qui peut conclure à des rendements plus faibles en certains métabolites.

L'élucidation des structures chimiques des différents métabolites implique souvent une combinaison de différentes techniques. La chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (CG-SM et CL-SM) sont deux techniques fréquemment utilisées pour l'identification de composés présents en matrices complexes (Leinonen A et al., 2004). La méthode de purification utilisée au laboratoire implique une première extraction en phase solide (SPE), puis l'hydrolyse des stéroïdes glucuroconjugués suivie d'une extraction liquide-liquide et finalement, d'une micro dérivation chimique des groupements hydroxyles et cétones avec la formation régiosélective d'éthers et d'énols triméthylsilylés. Ainsi, les stéroïdes deviennent plus stables et volatiles sur CG-SM ce qui permet une meilleure qualité de chromatographie à haute température (Ayotte C et al., 1996). En CL-SM, la dérivation n'est pas nécessaire, mais la fragmentation ne fournit pas autant d'information sur la structure d'une molécule inconnue. Habituellement, la méthode est conçue pour la détection des fragmentations de masse spécifique créées par dissociation activée par collision (CAD). À un temps de rétention précis, l'instrument analyse une transition possédant une masse définie pour une meilleure sensibilité et ainsi permettre une détection à des concentrations allant du ng/mL au pg/mL dans certains cas. Un balayage complet de toutes les transitions est possible entre un intervalle de masse, mais en sacrifiant de la sensibilité. Plus l'intervalle est large, moins la détection sera sensible. Ainsi, dans de telles conditions, une molécule inconnue de très faible concentration passera inaperçue au détecteur. C'est pourquoi, le laboratoire possède plusieurs CG-SM/SM à triples quadripôles qui sont utilisés pour la recherche de transitions ioniques spécifiques à chaque substance recherchée. Ce type de spectrométrie consiste à sélectionner l'ion précurseur issu du premier quadripôle, à le fragmenter dans une cellule de collision (deuxième quadripôle) pour ensuite mesurer l'intensité d'un ou plusieurs fragment(s) généré(s) après une séparation au niveau du troisième quadripôle. Ce type de fragmentation (idéal pour la quantification) vient considérablement augmenter la sensibilité de détection de l'appareil, lorsque les analytes sont connus (Lopez de Alda MJ et al., 2003).

### 1.4 Objectifs de l'étude

Le but de ce projet est de simuler la biotransformation humaine de différents stéroïdes (figure 1.4) via différentes techniques *in vitro* (hépatocytes et/ou fractions S9). Les stéroïdes produits des incubations sont extraits et analysés selon les procédures développées au laboratoire. Des structures sont proposées suite à des analyses en CG-SM, CG-SM/SM, CL-SM/SM, et lorsque requis, la purification d'un métabolite. Les métabolites serviront à la création de nouvelles méthodes de dépistage.

## 1.5 Stéroïdes de synthèses sélectionnés

Les stéroïdes de synthèses étudiés dans ce mémoire (soupçonnés d'être en circulation) sont deux isomères soit la  $17\beta$ -hydroxy-2, $17\alpha$ -dimethyl- $5\alpha$ -androst-1-en-3-one (1) et la  $17\beta$ -hydroxy-1, $17\alpha$ -dimethyl- $5\alpha$ -androst-1-en-3-one (2) ainsi que l'androst-2-en-17-one (3). Également, un produit disponible commercialement nommé Epitren RX 30 s'est avéré être un mélange de deux stéroïdes majoritaires, l'estra-4,9,11-triene-3,17-dione (4) et le  $2\alpha$ , $3\alpha$ -epithio- $17\alpha$ -methyl- $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane (5). Des incubations d'hépatocytes cryopréservés et de fractions cellulaires S9 ont été utilisées pour produire des métabolites pour lesquels des structures ont été proposées.

 $17\beta$ -hydroxy-2,17α-dimethyl-5α-androst-1-en-3-one (17-méthylstenbolone) (1)

 $17\beta\text{-hydroxy-1}, 17\alpha\text{-dimethyl-}5\alpha\text{-androst-1-en-3-one (17-m\'ethylm\'eth\'enolone) (2)}$ 

androst-2-en-17-one et androst-3-en-17-one (3)

estra-4,9,11-triene-3,17-dione (trendione) (4)

 $2\alpha$ ,  $3\alpha$ -epithio- $17\alpha$  methyl- $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane (17-méthylépithiostanol) (5)

Figure 1.4 : Structure des 5 stéroïdes étudiés.

#### 1.5.1 17α-méthylstenbolone et 17α-méthylméthénolone

Des études ont été publiées durant les travaux sur la 17α-méthylstenbolone. La première portait sur l'excrétion de métabolites urinaires par un volontaire ayant consommé de l'"Ultradrol", une formule commerciale contenant soi-disant de la 17α-méthylstenbolone (Cavalcanti GA *et al.*, 2013). Les auteurs ont décrit l'obtention de deux métabolites principaux, soit la 16-hydroxyméthylstenbolone ainsi que l'analogue provenant de la réduction du lien double en C-2.

La deuxième, une étude à la fois sur des microsomes et sur des souris chimériques avec le même produit, mais cette fois-ci, après une purification par CLHP (Geldof L *et al.*, 2014). Au total, treize métabolites auraient été détectés, et les auteurs ont proposé des structures pour deux d'entre eux soit : la 18-hydroxyméthylstenbolone et la 4-hydroxyméthylstenbolone.

Pour ce qui est de la  $17\alpha$ -méthylméthénolone, aucune étude n'a encore été publiée sur sa biotransformation.

Des résultats préliminaires effectués d'incubation en présence de S9 (Rass, mémoire de maîtrise) ont montré des voies métaboliques très semblables pour ces deux stéroïdes. La comparaison avec les homologues non méthylés mieux caractérisés, soit la stenbolone et la méthénolone a permis de proposer plus facilement des structures.

#### 1.5.2 5α-androst-2-en-17-one

Les métabolites attendus de l'administration d'un mélange de 5a-androst-2-en-17-one et 5a-androst-3-en-17-one, présents dans les comprimés vendus sous diverses appellations telles D2-R ou 2-androstènone n'ont pas été décrits. Ces isomères possédant une double liaison dans le noyau A, nous pouvons attendre la formation de métabolites similaires à ceux rapportés par Gauthier et al., avec les analogues possédant un groupement méthyle en position C-17, stéroïde connu sous le nom de désoxyméthyltestostérone (DMT) (Gauthier J *et al.*, 2012). Les auteurs ont rapporté la formation d'un diol en position 2,3 (caractérisé par synthèse chimique) à partir de l'isomère principal possédant la double liaison en C-2, ainsi que de métabolites hydroxylés en position allylique pour l'isomère mineur (double liaison en C-3,4).

#### 1.5.3 Epitren RX 30 (trendione et épistane)

Deux autres stéroïdes de synthèse, distribués sous les noms de « trendione » et «épistane» ont été obtenus du site internet de Fortress Supplements. Epitren RX 30, serait un mélange d'estra-4,9,11-triène-3,17-dione (4) et  $2\alpha,3\alpha$ -epithio- $17\alpha$ -méthyl- $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane (5).

Pour la trendione, il s'agirait d'une potentielle source (prohormone) de la trenbolone, un puissant SAA. La formation de trenbolone et d'épitrenbolone est attendue. Une réduction de la cétone C-17 en hydroxyle est très commune chez les stéroïdes par la 17β-hydroxy déhydrogénase. C'est ce qui permet, entre autres, au corps de produire de la testostérone via l'androstènedione (Makin HLJ et al., 2010).

Pour l'épistane (17-méthylépithiostanol), le groupement épithio est sensible à une dégradation causée par la chaleur à l'injection sur CG-SM (Okano M *et al.*, 2015). En tenant compte d'une potentielle pyrolyse dans le port d'injection du chromatographe, la formation d'un intermédiaire : la désoxyméthyltestostérone (DMT).

D'autres stéroïdes dont les métabolites chez l'humain sont bien connus ont été incubés en premier lieu pour s'assurer de la pertinence des modèles *in vitro* utilisés. Nous nous sommes également intéressés à la formation de métabolites de phase II, peu ou pas observés à la suite d'incubations en présence de microsomes humains ou de S9 et même en présence d'hépatocytes humains. Ces enzymes étant les premières perdues à la suite de leur isolement et cryopréservation. En conséquence, les métabolites dits de longue durée, soit ceux provenant de réarrangements effectués sur les métabolites dont la fonction hydroxyle en C-17 est sulfoconjuguée, sont plus faibles et difficilement détectable en balayage sur CG-SM (Einarsson K *et al.*, 1976;Sobolevsky T *et al.*, 2012).

## 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'identité des stéroïdes étudiés a été vérifiée avant les incubations par CG-SM.

Matériel de référence : méthanediènone (17β-hydroxy-17α-methylandrosta-1.4-dien-3-one) et l'oxandrolone (17β-hydroxy-17α-méthyl-2-oxo-5α-androstan-3-one) de Steraloids (Newport, USA). Déhydrochlorméthyltestostérone (DHCMT 4-chloro-1,2-déhydro-17α-methyltestosterone) de VEB Jenapharm en 1985 (Jena, Allemagne). Stanozolol (17β-hydroxy-17α-méthyl-5α-androstano[3,2-c]pyrazole) de Sigma (Oakville, Canada). 17α-méthylstenbolone (17β-hydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-en-3-one) et 17α-méthylméthénolone (17β-hydroxy-1,17α-diméthyl-5α-androst-1-en-3-one)tous deux synthétisés par Ph.Räss, projet maîtrise et Donald Poirier (CHUL). Stenbolone, obtenue par hydrolyse de l'acétate commercial par D.Goudreault 1990 et méthénolone de Schering (Kirkland, Canada). 5α-androst-2-en-17-one et son isomère 3-ène du produit Delta-2 d'Androgenetx . Trenavar (l'estra-4,9,11-triène-3,17-dione) et épistane (2α,3α-epithio-17α-methyl-5α-androstan-17β-ol) proviennent du produit Epitren RX 30 (IronMagLabs). UltraSten et M-Sten de IronFlex supplements et IronMagLabs respectivement.

Les solvants utilisés sont tous de grade CLHP et proviennent de Caledon (Georgetown, USA) : méthanol, hexanes, dichlorométhane, éther diétylique, acétonitrile, acétate d'éthyle. L'eau déionisée a été obtenue d'un système de gradient Milli-Q (Fisher Scientific, Whithy, Canada). Les cartouches Sep-Pak® C-18 ont été achetées de Waters (Milford, USA).

Les poudres pour la préparation des tampons d'extraction ont été achetés chez EMD (Gibbstown, USA) et Fisher Scientific (Whithy, Canada) :phosphate de sodium monobasique, sodium bicarbonate de sodium, carbonate de sodium, acétate de sodium. L'enzyme β-glucuronidase d'*Escherichia coli* type 1X-A provient de Sigma-Aldrich (Oakville, Canada) ainsi que le THF (tétrahydrofurane). L'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium et l'acide sulfurique ont été achetés de Sigma-Aldrich, (Oakville, Canada).

Pour la préparation des dérivatifs : éthanethiol de Acros (Geel, Belgique) , MSTFA (N-triméthylsilyl-N-méthyl trifluoroacétamide), iodotriméthylsilane et TMCS (triméthylchlorosilane) de chez Chemfabrik (Budenheim, Allemagne). La pyridine et la triéthylamine de Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Le N,O-bis (trimethyl-d<sub>9</sub>-silyl)acétamide) et le chlorotriméthyl-d<sub>9</sub>-silane proviennent de C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Canada)

Matériel d'incubation: Bleu trypan (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) pour le décompte cellulaire. Les fractions subcellulaires S9 et les hépatocytes cryopréservés proviennent de chez BioreclamationIVT (Baltimore, USA). Les enzymes recombinantes CYP3A4 sont de Thermo Fisher (Whitby, Canada). Le NADP(nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), glucose-6-phosphate et glucose-6-phosphate-déshydrogénase sont de Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Le milieu d'incubation William's E provient de Gibco by Life Technologies (Whithy, Canada).

# 2.1 Extraction et purification des stéroïdes contenus dans des produits commerciaux

Dans un tube de 15 mL contenant la totalité de la poudre contenue dans une capsule, sont ajoutés de 5 mL de méthanol, suivi d'une agitation sur vortex et centrifugation. 10 µL de la solution méthanolique sont transférés dans un vial, évaporés sous un jet d'azote à 50°C. Puis sont ajoutés 25 µL d'un mélange 30 :70 d'acétate d'éthyle et d'hexane pour l'analyse sur CG-SM.

Certains stéroïdes commerciaux ont dû être purifiés (CLHP) avant d'être utilisés. La méthode générale de séparation comprend une colonne C-18 d'Agilent 5 µm 4,6 x 250 mm avec une précolonne de Phenomenex. La colonne est montée sur un CLHP d'Agilent de série 1100 comprenant un dégazeur, un système de pompe binaire, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV. Deux phases sont utilisées pour la séparation: la phase aqueuse est composée d'eau et de 3% méthanol alors que la phase organique est composée d'acétonitrile et de 3% méthanol.

Tableau 2.1 : Méthode d'injection sur CLHP pour collecte de fraction.

Temps (min)	% phase B	Débit (mL)
0.00	30	1.5
10.00	85	1.5
15.00	100	1.5
21.00	100	1.5
21.01	30	1.5
27.00	30	1.5

Avec un collecteur de fraction (Gilson), l'éluat d'intérêt a été isolé, purifié et concentré avec la méthode de séparation bien établie. Avec cette méthode, en injectant Epitren RX30, le composé Épistane (2a,3a-epithio-17a-methyl-5a-androstan-17b-ol) a été récolté spécifiquement.

Les dérivés TMS-éther, TMS-énol sont obtenus par l'addition de 50 μL d'un mélange MSTFA : TMSI : éthanethiol dont la préparation à été décrite précédemment. (Ayotte C *et al.*, 1996;Massé R *et al.*, 1989) Le mélange réactionnel est chauffé à 70°C pendant 30 min. Le contenu des vials est analysé tel quel par CG-SM en mode de balayage complet (de 50 à 650 amu).La formation de dérivés TMS-éther simples est effectuée telle que décrite par Ayotte 1996. De façon sommaire, les fonctions hydroxyles sont dérivées par l'ajout de 90 μL de pyridine puis de 10 μL de MSTFA et de 2 μL de TMCS. La réaction est effectuée à 70°C pendant 30 min, puis le mélange est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 50 μL d'hexane, transféré dans un vial propre et analysé tel quel par balayage complet sur CG-SM.

## 2.2 Incubation avec enzymes recombinantes du CYP3A4

Le protocole d'incubation avec des enzymes recombinantes a été basé sur celui de BioVision et est décrit ci-dessous (BioVision, 2015). La concentration finale de stéroïde dans chaque tube était d'environ 30 µM. Le système de régénération de NAPDH est constituée de 6,5 mg de NADP, de 14,6 mg de glucose-6-phosphate et de 8 unités d'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase le tout dans 0,9 mL d'eau de pureté Milli-Q. Les incubations sont effectuées dans le tampon phosphate 50 mM de pH 7,4. La décongélation du vial, contenant environ 1000 pmol/mL de CYP3A4, se fait dans la paume de la main, puis le vial est recongelé à -80°C. Les incubations se font dans un bain thermostaté à 37°C avec agitation manuelle délicate ou automatique de faible intensité.

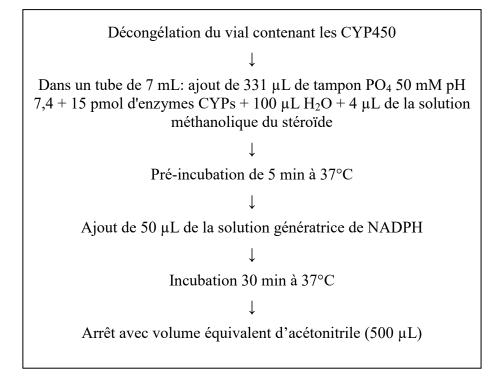


Figure 2.1: Schéma du protocole d'incubation avec les CYP3A4.

Les milieux d'incubations sont traités tels que décrits précédemment.

# 2.3 Incubation avec fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains

Une solution génératrice de NADPH a été préparée dans une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> 2% dans un volume final de 5 mL. La solution est composée de 8,5 mg de NADP, 39,0 mg de glucose-6-phosphate et 30 unités d'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase. Le vial de fractions subcellulaires S9 contient 30 mg de complexes protéiques dans 1.6 mL de tampon Krebs-Henseleit. Les solutions méthanoliques contenant les stéroïdes sont concentrées à 10 mM pour avoir une concentration finale de 50 µM dans le milieu d'incubation. Celle-ci est effectuée dans un bain thermostaté à 37°C avec agitation faible pendant 3 h selon le protocole fourni par BioreclamationIVT. (BioreclamationIVT, 2013)

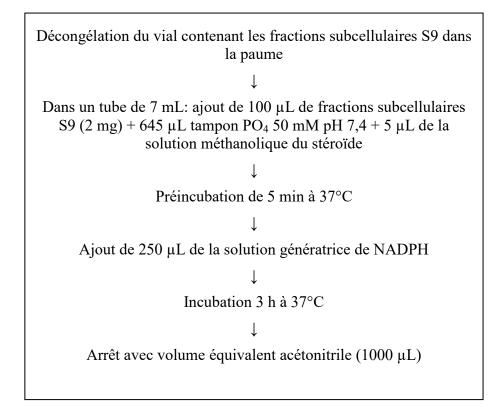


Figure 2.2: Schéma du protocole d'incubation de fractions subcellulaires S9.

# 2.4 Incubation avec des hépatocytes humains cryopréservés

Les hépatocytes cryopréservés proviennent de BioreclamationIVT et sont issus d'un mélange de vingt donneurs différents. La concentration initiale du stéroïde utilisée dans le méthanol est de 4,2 mM pour avoir une concentration finale dans la plaque d'environ 25 µM. Une plaque de 24 puits est utilisée contenant environ 0,75 x10<sup>6</sup> cellules/puits dans du milieu William's E. Ce milieu est préchauffé quelques minutes à 37°C dans un bain thermostaté avant son utilisation. Le protocole utilisé est celui proposé par le manufacturier. (ThermoFisher, 2016)

Le vial contenant au minimum 5 x  $10^6$  cellules est décongelé délicatement dans un bain thermostaté à  $37^{\circ}$ C environ 1.5 min avec légère agitation. Le contenu est transféré dans un tube conique contenant 20 mL de milieu William's E préchauffé, puis centrifugé à 70 tours/minute pendant 10 min. Le surnageant est retiré et il y a rajout de 2 mL de milieu William's E. Un décompte cellulaire est effectué en prélevant 20  $\mu$ L de la suspension cellulaire à laquelle on ajoute 80  $\mu$ L de milieu et 100  $\mu$ L de teinture bleu Trypan 0,4%. La suspension de cellules est

diluée avec le milieu pour obtenir une concentration de  $0,75 \times 10^6$  cellules/mL. Par la suite, 250 µL de la suspension cellulaire sont ajoutés dans chaque puits. Il y a une première incubation de 5 min à 37°C sous atmosphère 5:95 de  $CO_2:O_2$ . Il y a ajout de 247 µL de milieu dans chaque puits et 3 µL de la solution méthanolique du stéroïde. L'incubation est d'une durée de 4 h avec agitation lente d'environ 80 rpm à 37°C sous atmosphère 5:95 de  $CO_2:O_2$ . Les réactions sont stoppées avec l'ajout d'un volume équivalent d'acétonitrile froid. Le contenu de chaque puits est transféré dans un tube et congelé à -20°C jusqu'à son extraction.

#### 2.5 Isolement des métabolites

Selon la méthode décrite précédemment, les métabolites sont isolés des milieux d'incubation de la manière suivante : le solvant est évaporé sous un jet d'azote à  $50^{\circ}$ C puis 3 mL de tampon acétate 0.1 M de pH 5.2 sont ajoutés. L'échantillon est passé sur une cartouche Sep PakC<sub>18</sub>, préalablement conditionnée avec 5 mL d'hexane, 5 mL méthanol et 5 mL d'eau. La cartouche est rincée avec 5 mL d'eau, 5 mL d'hexane et les stéroïdes sont élués avec 5 mL de méthanol dans un tube propre. Le solvant est évaporé sous un jet d'azote à  $50^{\circ}$ C. Pour les incubations avec les hépatocytes, les métabolites glucuroconjugués sont hydrolysés à cette étape par l'ajout de 1 mL de tampon phosphate 0.1 M de pH 6.9 et  $50^{\circ}$ L de  $\beta$ -glucuronidase de *E.coli* suivi d'une incubation à  $50^{\circ}$ C dans un bain-marie avec agitation durant 1 h. Aux milieux refroidis à température ambiante sont ajoutés  $400^{\circ}$  µL de tampon carbonate 1.0 M de pH 9.0 et l'extraction est effectuée avec 5mL d'éther diéthylique. La phase organique est évaporée sous un jet d'azote à  $50^{\circ}$ C, le résidu est dissous dans  $200^{\circ}$  µL de méthanol et transféré dans un vial en verre. Le méthanol est évaporé sous un jet d'azote à  $50^{\circ}$ C puis bouché sous atmosphère d'azote.

L'hydrolyse des métabolites sulfoconjugués par solvolyse chimique est effectuée lorsque nécessaire après l'évaporation des traces d'éther résiduelles de la phase aqueuse puis ajustement du pH entre 5 et 7 avec une solution de HCl 5 N. 2.5 mL de tampon acétate 0.1 M de pH 5.2 sont ajoutés puis l'échantillon est passé de nouveau sur cartouche Sep Pak C<sub>18</sub>, tel que décrit précédemment. La solvolyse est effectuée dans 1 mL de THF auquel sont ajoutés 2 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; la réaction est effectuée par incubation dans un bain-marie à 50°C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% (p/v) est ajouté et l'extraction est effectuée avec l'ajout de 5 mL d'éther diéthylique. La phase organique est transférée et évaporée sous jet d'azote à 50°C. L'échantillon est par la suite traité tel que décrit précédemment.

Les analyses CG-SM ont été faites sur un chromatographe HP6890 muni d'un injecteur automatique modèle Agilent 7683 couplé à un système SM HP5973; la séparation est effectuée sur une colonne DB-5ms, 0.2 mm \* 25 m \* 0.33 µm (Agilent). Le volume d'injection est de 1 µL en mode débit non partagé (température: 270°C et 60 psi). L'analyse est faite en mode de balayage complet de 50 à 550 uma, à 600 uma après 10 min et 650 uma après 14 min. La programmation de température débute à 100°C, tenue pendant 0.5 min, puis augmente de 20°C/min jusqu'à 240°C pour ensuite augmenter de 6°C/min pour atteindre 278°C et finalement augmenter de 10°C/min jusqu'à 320°C (maintenue pendant 5 min).

Une méthode SRM a été créée à partir des résultats obtenus par spectre d'ions produits sur un système CG-SM/SM triple quadripôle 7000C (Agilent Tech.). Les analyses ont été effectuées à différentes énergies de collision avec certains ions précurseurs différents pour augmenter la spécificité.

Tableau 2.2 : Méthode SRM (sélection de réactions multiples) créée pour l'analyse de la 17améthylstenbolone et ses métabolites.

	Temps départ (min)	Métabolite <sup>1</sup>	lon	lon produit	Énergie Collision (eV)
Segment 1	13.50	ISTD 2	428.3	260.2	10
Segment 2	3α,17β-dihydroxy- 462.4 419.3 2,17α-diméthyl-5α- 332.3 289.1		462.4	419.3	10
oegment 2		289.1	10		
		17β-hydroxy-	460.3	3 220.1	15
Segment 3	14.80	2,17α-diméthyl-5α-	460.3	193.1	15
		androst-1-en-3-one	460.3	143.1	15
Segment /	15.20	3β,17β-dihydroxy- 2,17α-diméthyl-5α- androst-1-ene	462.3	317.3	10
Segment 4			315.3	183.1	10
Segment 5	15.45	17β,18-dihydroxy- 2,17α-diméthyl-5α- androst-1-en-3-one	548.4	445.2	5
			548.3	354.1	15
		anarost i on o ono	445.2	193.1	5
	ent 7 16.05 $6\beta,17\beta$ -dihydroxy- $548.4$ 458.4 $458.4$ 208.0 $6\beta,17\beta$ -dihydroxy- $2,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ - androst-1-en-3-one $548.4$ 208.0	458.4	15		
Segment 7		2,17α-diméthyl-5α-	548.4	443.2	15
			548.4	208.0	15
Segment 8	16.75	16,17β-dihydroxy- 2,17α-diméthyl-5α- androst-1-en-3-one	548.4	231.2	15
			548.4	218.2	15

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Structure proposée

Tableau 2.3 : Méthode SRM créée pour la 17a-méthylméthénolone et ses métabolites.

	Temps départ	Métabolite <sup>1</sup> proposé	lon	lon produit	Énergie Collision (eV)
Segment 1	13.50	ISTD 2	428.3	260.2	10
Segment 2	14.50	3α,17β-dihydroxy-1- méthylen-17α- diméthyl-5α- androstane	462.3	267.3	15
			462.3	243.1	15
			372.2	315.1	10
			372.2	225.2	10
Segment 3	14.85	3α,17β-dihydroxy- 1,17α-diméthyl-5α- androst-1-ene	462.3	208.3	15
Segment 3			462.3	141.1	15
	15.50	17β-hydroxy-1,17α- diméthyl-5α-androst- 1-en-3-one	460.3	208.1	15
Segment 4			460.3	195.1	15
			460.3	143.1	15
Segment 5	gment 5 16.10 1,17α-diméthyl-5α-		548.4	193.1	20
J		143.2	20		
Segment 6	16.80	2,17β-dihydroxy-1- méthylen-17α- dimethyl-5α- androstane-3-one	548.4	443.4	15
			548.4	231.2	15
			548.4	208.3	15
Segment 7	17.15	16α,17β-dihydroxy- 1,17α-dimethyl-5α- androst-1-en-3-one	548.3	283.2	10
			548.3	195.1	10

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Structure proposée

# **3 RÉSULTATS ET DISCUSSION**

Ce chapitre combine la discussion et les résultats pour tous les stéroïdes ayant subi des tests de métabolisme *in vitro*. Des études préliminaires ont été accomplies pour vérifier l'efficacité des modèles sur des stéroïdes connus avec une structure semblable à ceux de l'étude. Des résultats par balayage complet en CG-SM sont représentés pour les composés d'intérêts. Les fragmentations de certains métabolites ont été analysées afin de proposer une structure adéquate. Des tests sur CG-SM/SM ont été effectués sur les deux stéroïdes de synthèse principaux (17α-méthylstenbolone et 17α-méthylméthénolone) afin de développer une méthode de dépistage en SRM.

L'analyse RMN ou par spectrométrie de masse à haute résolution des métabolites n'a pas été réalisée. Pour engendrer des résultats en RMN, il faut une quantité suffisante d'un produit pure (environ 1 mg), ce qui était impossible à produire avec les modèles *in vitro* pour les différents stéroïdes de l'étude. La stéréochimie des métabolites produits est donc basée sur la littérature sans certitudes. Le laboratoire ne dispose pas d'instruments à haute résolution pour permettre ce type de test.

# 3.1 Études préliminaires

Le but premier de cette étude était de vérifier la pertinence des modèles *in vitro* comme voie de production des principaux métabolites caractéristiques chez l'humain. Quatre stéroïdes choisis, le stanozolol, la méthanediènone, l'oxandrolone et la déhydrochlorméthyltestostérone (DHCMT) portent tous un groupement 17α-méthyle. Par la suite, ces mêmes tests ont été effectués sur les homologues non méthylés en C-17, soit la stenbolone et la méthénolone, pour une meilleure anticipation des métabolites possibles. Les métabolites de ces stéroïdes ont tous été bien caractérisés au fil des années. Ils ont été incubés pour s'assurer de la production de métabolites caractéristiques de ce type de stéroïdes avec les fractions S9 et les hépatocytes. L'obtention d'un spectre de masse intégral en CG-SM en mode de balayage complet n'est possible que lorsque la concentration est d'au moins quelques nanogrammes. Cette limitation rend difficile la détection de ceux produits en faible proportion, principalement des métabolites de phase II, ceux dits de long terme. Ils sont produits à partir des métabolites sulfoconjugués

qui sont plus difficilement produits par les méthodes *in vitro* rapides de métabolisme (fractions S9 et hépatocytes cryopréservés) (Schanzer *et al.*, 1992). En effet, étant donné que l'incubation ne peut durer plus de 4 h avec des cellules en suspensions sans mortalité cellulaire (Duval DL *et al.*, 1995), l'incubation est suffisamment longue pour la formation des principaux métabolites de phase I, mais courte pour une bonne production des produits de phase II. C'est un contraste important avec l'urine où la majorité des métabolites recueillis sont conjugués.

Figure 3.1 : Schéma des réactions possibles post-sulfoconjugaison pour les stéroïdes avec un 17α-méthyl (a) (Schanzer et al., 1992) ainsi que la formation enzymatique de 17-CH₂OH (b) (Schänzer W et al., 2006).

L'épimérisation des stéroïdes possédant un groupement  $17\alpha$ -méthyle et  $17\beta$ -hydroxyle requiert la formation de métabolites de phase II. En effet, pour les stéroïdes  $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -méthyl, le résultat de l'épimérisation n'est pas enzymatique, mais plutôt une attaque nucléophile de l'eau sur le groupement sulfate en C-17 (Edlund PO *et al.*, 1989). Le sulfate est clivé puis l'épimérisation se fait pour produire un métabolite avec l'inversion de la configuration, voir figure 3.2 (Bi H *et al.*, 1992;Schanzer *et al.*, 1992).

$$\begin{array}{c|c} \text{OH} & \text{OSO}_3 \\ \hline \\ \text{OH} & \text{OSO}_3 \\ \hline \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \\$$

Figure 3.2 :Schéma de la sulfatationsuivi de l'épimérisation en C-17 chez les stéroïdes 17α-méthylés.

### Stanozolol

Des rendements décevants ont été obtenus à la suite des incubations en présence du stanozolol (17β-Hydroxy-17α-methyl-5α-androstano[3,2-c]pyrazole). La faible solubilité dans le méthanol (présence visible de particules dans le tube), entraîne des résultats très faibles avec les hépatocytes, mais acceptables avec des fractions subcellulaires S9. L'utilisation d'un solvant plus polaire tel que le DMSO améliore la solubilité, mais affecte les CYP450 en diminuant leur efficacité (Easterbrook J *et al.*, 2001). Toutefois, les principaux métabolites hydroxylés connus chez l'humain ont été identifiés en CG-SM en mode de balayage complet. Il s'agit des 3'-hydroxystanozolol, 4β-hydroxystanozolol et 16α-hydroxystanozolol (Massé R *et al.*, 1989).

#### Méthanediènone

Les incubations en présence de la méthanediènone ( $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methylandrosta-1-4-dien-3-one), ont mené à l'obtention principalement de la  $6\beta$ -hydroxyméthanediènone (Durbeck HW *et al.*, 1978) et également de  $17\alpha$ -hydroxyméthyl- $17\beta$ -méthyl,18-nor-androst-2,4,13-triène-3-one et l'épiméthanediènone, deux métabolites provenant du réarrangement d'un intermédiaire sulfoconjugué (Gómez C *et al.*, 2013;Maria R *et al.*, 2012;Schänzer W *et al.*, 2006). La présence des deux insaturations stabiliserait le cycle A ce qui viendrait limiter la biotransformation au niveau du cycle. Comme pour l'oxandrolone et la méthyltestostérone, il y a une épimérisation en C-17 qui serait dû à la chimie tertiaire du groupement 17- $\beta$  hydroxyle (Bi H *et al.*, 1992).

### Oxandrolone

L'analyse CG-SM de l'extrait de l'incubation de l'oxandrolone ( $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methyl-2-oxo- $5\alpha$ -androstan-3-one) a produit un seul métabolite soit la 17-épioxandrolone, ce qui implique l'intervention du métabolite sulfoconjugué de l'oxandrolone (Guddat S *et al.*, 2013). En effet, il n'a pas été détecté dans les incubations de fractions subcellulaires S9 qui ne peuvent produire les intermédiaires de phase II.

### <u>Déhydrochlorméthyltestostérone (DHCMT)</u>

À la suite des incubations, trois métabolites de la DHCMT (4-chloro-1,2-déhydro-17α-méthyltestostérone) ont été détectés en balayage complet. Il s'agit de la DHCMT ayant subi une double réduction (+4H) et de son épimère et finalement la DHCMT 6β-OH. La présence plus importante des réductases en milieu *in vitro* viendrait favoriser cette voie de biotransformation en plus de la 6β-hydroxylation qui est une étape nécessaire pour la formation des métabolites 6β,12-hydroxyles et 6β,16-hydroxyles (Durbeck HW *et al.*, 1983).

#### Stenbolone et méthénolone

Les deux stéroïdes étudiés portent un groupement méthyle en position C-17 ce qui prolonge la durée de vie en empêchant les réactions d'oxydation en C-17 (Kam *et al.*, 2005). La biotransformation de la stenbolone (2-méthyl-5α-androst-1-en-17β-ol-3-one) et de la méthénolone (1-méthyl-5α-androst-1-en-17β-ol-3-one), les deux analogues non méthylés, a déjà été étudiée par Massé *et al.* (Goudreault D *et al.*, 1990;Goudreault D *et al.*, 1991;Masse R *et al.*, 1992). Leurs études ont été réalisées sur des échantillons recueillis auprès d'un volontaire humain suite à l'ingestion d'acétate de stenbolone et d'acétate de méthénolone (*per os*). Une fois administré, le groupement acétate est clivé pour libérer le stéroïde. Les auteurs ont proposé des structures pour les différents métabolites excrétés et identifiés par CG-SM dont les principaux métabolites provenaient de réactions de réduction (C-3), d'oxydation (C-17), d'épimérisation (C-17) et d'hydroxylation (C-2, C-6, C-16 et C-18). Nous avons soumis ces deux

stéroïdes à des incubations en présence d'hépatocytes afin de vérifier la corrélation des résultats des tests *in vitro* et *in vivo* rapportés par ces auteurs. Tous les métabolites ont été obtenus, cependant, ceux réduits provenant de l'action des réductases sont formés de façon plus importante *in vivo*, les hydroxylases hépatiques étant plus abondantes.

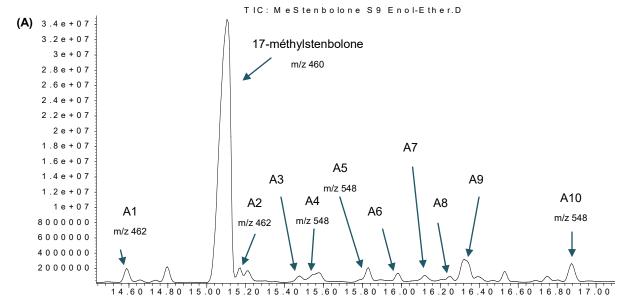
En conclusion, les stéroïdes avec une structure semblable à la méthylstenbolone et à la méthylméthénolone ont tous été métabolisés de façon positive en produisant une variété de métabolites. Ces tests ont donc permis de constater le potentiel des méthodes *in vitro* utilisées avec la formation de métabolites connus.

# 3.2 17-méthylstenbolone

Cette section présente les résultats des différents tests *in vitro* qui ont été effectués avec la méthylstenbolone. L'analyse CG-SM a été l'outil permettant l'identification des différents métabolites issus des incubations en présence de fractions subcellulaires S9 par rapport à un métabolisme plus complexe, soit les hépatocytes cryopréservés.

Bien que les rendements aient été faibles, plusieurs métabolites ont été formés suite aux incubations avec les fractions subcellulaires S9 et les hépatocytes cryopréservés. La figure 3.3 montre un chromatogramme représentatif des résultats obtenus pour chaque technique d'incubation.





T im e -->

Abundance T IC: Methylstenbolone G+LHepa 241114.D (B) 17-méthylstenbolone m/z 460 2.5 e + 0 7 A10 Α1 A2 m/z 548 Α5 m/z 462 m/z 462 m/z 548 m/z 548 A6 5000000

Figure 3.3 :Chromatogrammes de l'analyse CG-SM (mode de balayage complet) des extraits d'incubations de la méthylstenbolone avec des fractions subcellulaires S9 (A) et des hépatocytes cryopréservés (B) (dérivés TMS-éther, TMS-énol).

T im e -->

Les principales différences observées entre l'utilisation de fractions subcellulaires S9 et d'hépatocytes, bien que les analyses soient purement qualitatives, résident dans la nature des métabolites et l'efficacité des réactions.

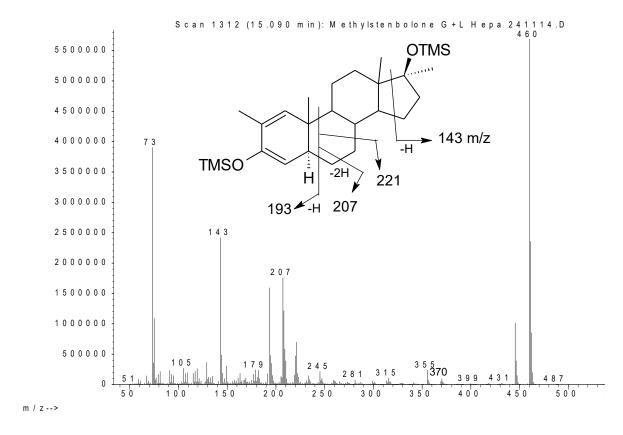


Figure 3.4 : Spectre de masse et structure de la  $17\alpha$ -méthylstenbolone per-TMS en CG-SM.

Métabolites A1:  $3\alpha$ ,17β-dihydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-ene et A2:  $3\beta$ ,17β-dihydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-ene

Les deux premiers métabolites (A1 et A2) ont un spectre de masse (dérivés TMS) avec un ion moléculaire à m/z 462 (deux uma supérieures au produit de départ en figure 3.4). Le spectre de masse du dérivé TMS-éther est identique et suggère la réduction de la cétone en C-3. Les stéroïdes ayant une cétone en C-3 ont tendance à produire l'isomère 3β-hydroxy en plus du 3α-hydroxy plus commun (Schanzer, 1996). Les ions à m/z 372 et 282 proviennent de la perte séquentielle de HOTMS. Ces pertes sont aussi observées pour le produit parent avec les ions à m/z 370 et 281 (-OTMS). L'ion à m/z 141, formé de la brisure des liens au niveau du cycle A ainsi que les ions à m/z 156 ,157 sont typiques des stéroïdes possédant un 3-OTMS, une double liaison en C-1,2 et d'un méthyle en C-1 ou C-2 (Goudreault D *et al.*, 1990;Goudreault D *et al.*, 1991). Le spectre de masse du métabolite A1, plus abondant, est présenté à la figure 3.5. L'isomère 3α élue généralement avant le 3β (tel qu'observé pour la drostanolone et clostébol) et la réaction de réduction favorise généralement la formation d'hydroxyles en 3α (Beaulieu EE *et al.*, 1970;Fotherby K *et al.*, 1972;Gower DB, 1984).

De plus, la fragmentation de la 3-OH méthylstenbolone est identique à celle de la  $17\alpha$ -methyldrostanolone. Une petite différence au niveau du temps de rétention permet de les identifier (Gauthier J *et al.*, 2009).

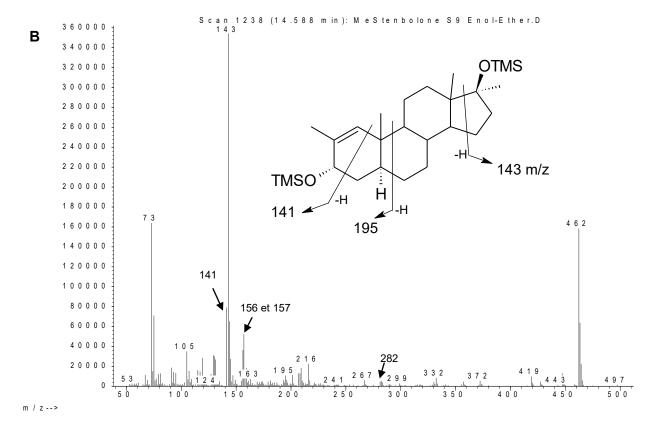
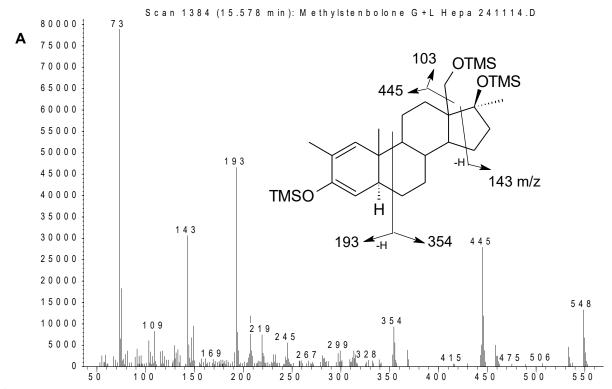


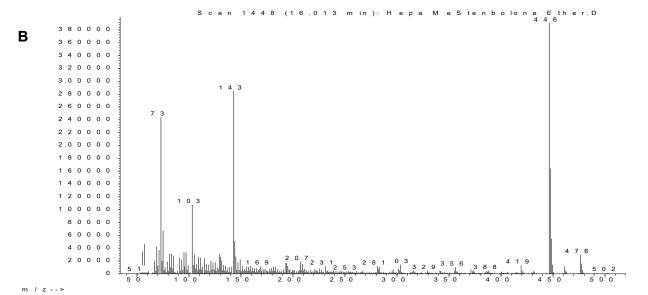
Figure 3.5 : A : Structure proposée pour (a) 3α-hydroxy méthylstenbolone, (b) 3β-hydroxy méthylstenbolone. B : Spectre de masse de la 3α-hydroxy méthylstenbolone per-TMS en CG-SM.

Métabolite A4:  $17\beta$ , 18-dihydroxy-2,  $17\alpha$ -dimethyl- $5\alpha$ -androst-1-en-3-one

Le métabolite A4 possède un ion moléculaire à m/z 548 suggérant la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire. L'ion à m/z 445 représente une perte caractéristique de CH<sub>2</sub>-OTMS (m/z 103) (figure 3.6) ce qui semble indiquer la présence de la fonction hydroxyle en C-18 (Masse R *et al.*, 1992). Le spectre du dérivé TMS-éther montre la présence d'un ion moléculaire à m/z 476 (494, TMS-d<sub>9</sub>) et la présence du fragment à m/z 446 (464, TMS-d<sub>9</sub>) est due à la perte de CH<sub>2</sub>O, caractéristique des stéroïdes possédant un alcool en C-18. Un tel métabolite avait été identifié par Massé R. *et al.* pour la mesterolone, stenbolone et la méthénolone chez l'humain. La présence d'un méthyle en position C-2 stimulerait la formation de composés possédant une fonction C18-hydroxyle (Masse R *et al.*, 1992). De plus, Einarsson *et al.* avaient déjà démontré que des microsomes humains étaient en mesure d'hydroxyler en C-18 l'androsterone, DHEA et 5α-androstane-3α,17β-diol (Einarsson K *et al.*, 1976).







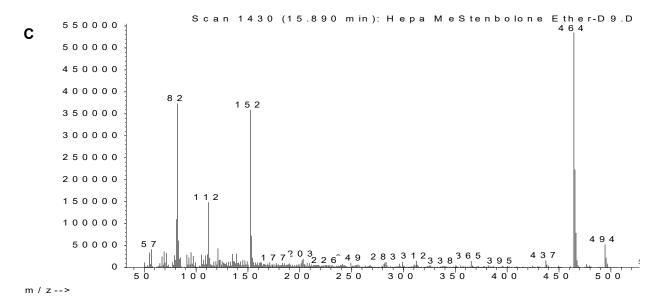


Figure 3.6 : A : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (A4) 18-hydroxy méthylstenbolone per-TMS en CG-SM. B : Spectre de masse dérivé TMS-éther en CG-SM. C : Spectre de masse dérivé TMS-éther-d<sub>9</sub> en CG-SM

Les métabolites A4 et A10 (18-hydroxyle et 16-hydroxyle) ont été détectés en CG-SM après solvolyse. Laatikainen et Vihko ont démontrés que la 18-hydroxyandrosterone disulfate est retrouvé en grande quantité au niveau biliaire (Laatikainen T *et al.*, 1969). Donc, la présence d'un hydroxyle en C-18 favoriserait l'action des sulfotransférases. Selon Goudreault *et al.*, les métabolites de la méthénolone et la stenbolone, ayant subi une hydroxylation en C-16, avaient la particularité d'être excrétés sous forme glucuronidée, mais aussi sulfatée. Ce qui est plus rare et ce peu importent l'orientation α ou β du 16-OH (Goudreault D *et al.*, 1990;Goudreault D *et al.*, 1991). Ces résultats corroborent la présence de 16-hydroxyle méthylstenbolone après solvolyse en CG-SM.

Métabolite A5: 6β,17β-dihydroxy-2,17α-dimethyl-5α-androst-1-en-3-one

Ce métabolite a un ion moléculaire à m/z 548 suggérant aussi une hydroxylation. Les ions caractéristiques de la fragmentation du cycle B à m/z 193 et 207 sont déplacés aux m/z 281 et 295 (+ 88 uma, OTMS). Le cycle D semble intact dû à la présence l'ion à m/z 143. Aucune hydroxylation en C-1 ou en C-4 n'avait été répertoriée pour la stenbolone suggérant la présence de celui-ci plutôt en C-6 (Goudreault D *et al.*, 1991). Cette voie de biotransformation a déjà été observée pour la fluoxymesterone et la méthandiènone en position C-6β (Schänzer W *et al.*, 1995). De plus, la présence de 6β-hydroxy méthyltestostérone comme métabolite de la méthyltestostérone a été identifié suite à une incubation d'hépatocyte (Clouet-Dumas A *et al.*, 2000). L'orientation α ou β du groupement 6-hydroxyle n'a pas été confirmée, mais aucune étude d'excrétion n'a encore détectée de métabolites 6α-hydroxylés (Schanzer, 1996).

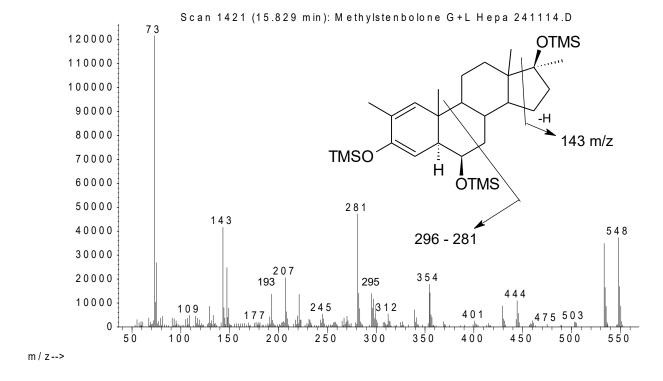


Figure 3.7 : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (A5) 6β-hydroxy méthylstenbolone per-TMS en CG-SM.

Nous avons par la suite tenté d'obtenir sélectivement le métabolite possédant une fonction 6-hydroxyle afin d'en compléter l'identification. À cette fin, nous avons effectué des incubations en présence de CYP3A4. Celui-ci serait impliqué dans la production de tels métabolites pour les stéroïdes ayant un groupement 17α-méthyle (Rendic S *et al.*, 1999). Malheureusement, les résultats des incubations ont montré la formation de plusieurs métabolites, de façon non sélective. La 16-hydroxylation chez l'humain, serait l'œuvre aussi du CYP3A4 (Huang Z *et al.*, 1998). Le CYP3A4 serait donc impliqué dans la production des métabolites A4, A5,et A10, donc trois métabolites sur un total de cinq en comparaison avec les hépatocytes.

Métabolite A10: 16,17β-dihydroxy-2,17 $\alpha$ -dimethyl-5 $\alpha$ -androst-1-en-3-one

Ce métabolite possède un ion moléculaire à m/z 548 suggérant lui aussi la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire. Le cycle A semble intact avec la présence des ions à m/z 193, 207 et 221. Les fragments caractéristiques d'un groupement hydroxyle en C-16 sont présents à m/z 218 et 231 (Gauthier J *et al.*, 2009). Ces ions sont également présents dans le spectre de masse du dérivé TMS-éther dont l'ion moléculaire à m/z 476 est en accord avec la structure proposée. L'orientation  $\alpha$  ou  $\beta$  du groupement 16-hydroxyle n'a pas été déterminée. Ce métabolite est également présent dans la fraction sulfate (voir discussion métabolite A4 pour plus de détails)

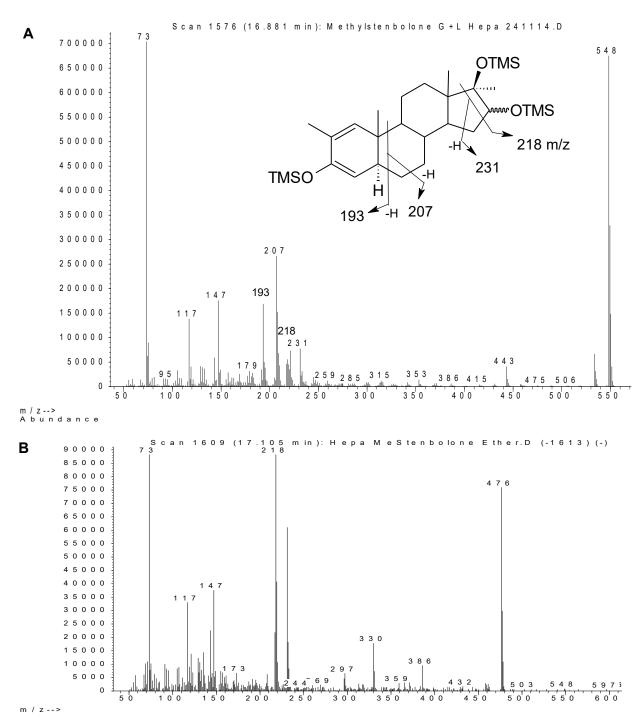


Figure 3.8 : A : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (A10) 16-hydroxy méthylstenbolone per-TMS en CG-SM. B : Spectre de masse dérivé TMS-éther en CG-SM.

Figure 3.9 : Résumé des voies métaboliques hépatiques proposées de la méthylstenbolone.

En résumé, 5 métabolites d'intérêt (A1, A2, A4, A5 et A10) de la 17α-méthylstenbolone ont été produits suite aux incubations avec les hépatocytes cryopréservés.

En n'ayant aucun ion moléculaire à m/z 548 en dérivation TMS-éther, ceci laisse donc sousentendre que la cétone en C-3 est restée intacte dans tous les métabolites dihydroxylés. La présence d'insaturation en C-1,C-2 viendrait stabiliser la cétone en C-3 ce qui diminuerait l'action des déshydrogénases pour la réduction de celle-ci (Goudreault D *et al.*, 1991). L'absence des métabolites A8 et A9 dans le milieu d'incubation avec les hépatocytes cryopréservés est notable (figure 3.3) en comparaison avec les fractions subcellulaires S9. Ces métabolites semblent indiquer un hydroxy méthylstenbolone -2H (546 m/z) (A8) et un artefact de dérivation partielle (476 m/z) (A9). La raison de leur absence pourrait être due à l'aspect plus complexe et sélectif d'une cellule d'hépatocyte. Le niveau en CYP450 dans les fractions S9 est aussi plus important que dans les hépatocytes ce qui tend à produire une plus grande quantité non sélective de certains métabolites (3.2). Une autre différence majeure est l'abondance de A10 qui semble supérieure après une incubation avec des hépatocytes cryopréservés. Les niveaux d'enzymes de la famille des CYP450 au niveau des hépatocytes sont plus représentatifs du métabolisme humain que des fractions subcellulaires S9 où ceux-ci varient.

## 3.2.1 Analyse de produits commerciaux à base de 17-méthylstenbolone

La méthylstenbolone a été synthétisée de travaux précédents (Ph. Räss, mémoire de maîtrise et D. Poirier, CHUL). Nous nous sommes procuré deux produits de compagnies spécialisées en suppléments stéroïdiens soit Ultra-Sten (Iron-Flex Supplements) et M-sten (IronMagLabs) tous deux vendus comme contenant la 17-méthylstenbolone. Le contenu a été analysé tel que décrit précédemment. Nous n'avons pas détecté de méthylstenbolone mais plutôt de la 17-méthyldrostanolone, tel que démontré par l'analyse du standard authentique provenant de travaux précédents (J. Gauthier synthèse).

Méthylstenbolone

17-methyldrostanolone

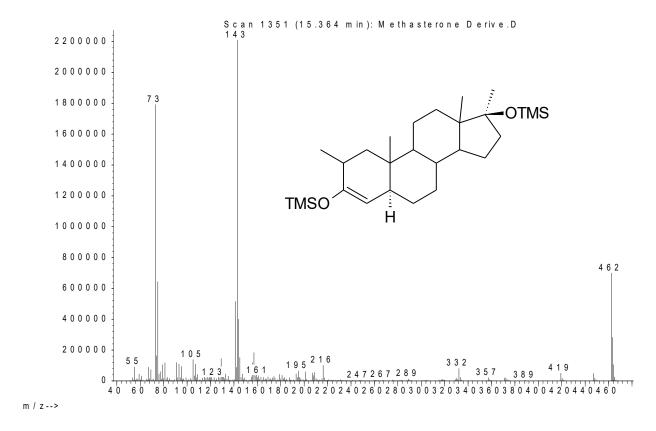


Figure 3.10 : Structures de la méthylstenbolone et de la 17-méthyldrostanolone avec son spectre de masse dérivé per-TMS en CG-SM .

La 17-méthyldrostanolone possède un squelette stéroïdien identique, mais elle n'a pas de double liaison en C-1,C-2 comme la 17α-méthylstenbolone. Ultra-Sten contenait aussi de la déhydrochlormethyltestosterone réduite (+2H) et le M-Sten avait de faible traces de méthylstenbolone. Ces produits à base de méthylstenbolone n'en contiennent plus, ou très peu présentement.

# 3.2.2 Spectre d'ions produits

Nous avons développé à partir des résultats décrits précédemment, une méthode d'analyse par CG-SM/SM pour les métabolites majeurs identifiés préalablement.

Tableau 3.1 : Éléments présents dans la méthode d'analyse par CG-SM/SM de la méthylstenbolone et ses métabolites.

Composés	Temps rétention (min)	Transitions	Énergie collision (év)
	15.1	460.3 → 193.1	15
17α-méthylstenbolone		460.3 → 220.1	15
		460.3 → 143.1	15
3α-hydroxy méthylstenbolone	14.6	462.4 → 419.3	10
(A1)	14.0	332.3 → 289.1	10
3β-hydroxy méthylstenbolone	15.2	462.3 → 317.3	10
(A2)		315.3 → 183.1	10
	15.6	548.4 → 445.2	5
18-hydroxy méthylstenbolone (A4)		548.4 → 354.1	15
		445.2 → 193.1	5
6β-hydroxy méthylstenbolone	15.8	548.3 → 533.4	15
(A5)		548.3 → 281.3	15
16-hydroxy méthylstenbolone	16.9	548.4 → 231.2	15
(A10)	10.9	548.4 → 218.2	15

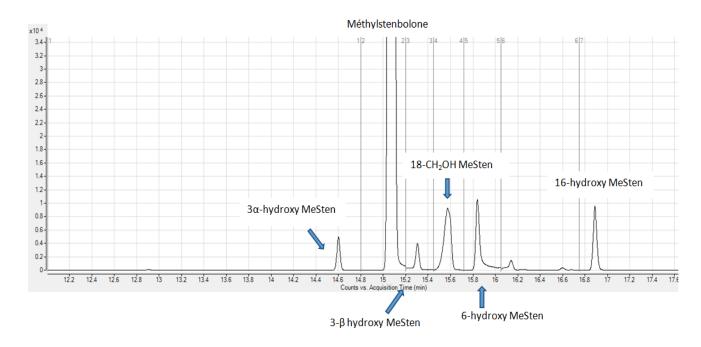


Figure 3.11 : Résultat de la méthode de détection SRM sur CG-SM/SM de l'incubation avec les fractions subcellulaires S9 de la méthylstenbolone.

Nous avons soumis à l'analyse CG-SM/SM, selon ces paramètres, un échantillon de référence (WAADS). L'extraction en phase solide sur cartouche  $C_{18}$  décrite dans la section 2.5 a été effectuée sur 2 mL d'urine. Les résultats sont présentés à la figure suivante :

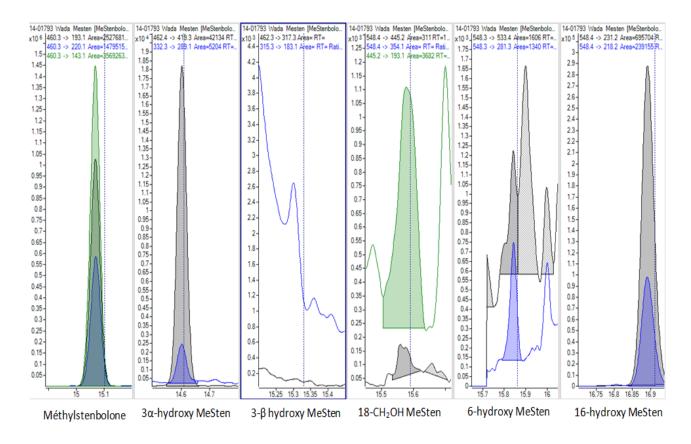


Figure 3.12 : Résultats du profil métabolique de l'urine de référence avec hydrolyse des groupements glucuronides selon la méthode SRM.

Des cinq métabolites surveillés, deux principaux ont été détectés en plus de la méthylstenbolone soit la  $3\alpha$ -hydroxy et la 16-hydroxyméthylstenbolone. Des traces de 6-hydroxy et de 18-hydroxyméthylstenbolone ont été décelées. Nous avons confirmé l'absence de l'isomère de réduction en  $3\beta$ .

Durant la réalisation de ces travaux, deux autres études reliées à la méthylstenbolone ont été publiées. Dans la première (Cavalcanti GA *et al.*, 2013) l'ion majeur m/z 160 de la version non dérivée est complètement absent du spectre de masse. Ce fragment provient de l'ion m/z 258 (M-58) subissant une perte de 98 uma. Cette perte a déjà été décrite par *Goudreault D. et al.* où l'ion intense à m/z 204 provient d'une perte de 98 uma de l'ion moléculaire m/z 302. (Goudreault D *et al.*, 1991) De plus certains des produits décrits ne semblent pas reliés à la méthylstenbolone uniquement ce qui a été suggéré également par *L.Geldof et al.* Les deux métabolites identifiés par *Cavalcanti et al.* sont deux C-16-hydroxyle, le A10 à m/z 548 ainsi que celui avec un m/z 550 qui serait plutôt un produit de la méthasterone qui pourrait, comme nous l'avons observé, se retrouver dans les comprimés censés contenir la méthylstenbolone.

Dans la deuxième étude, Geldof L. *et al.* ont rapporté la formation de plusieurs métabolites à partir d'incubations en présence de microsomes ainsi qu'une étude d'excrétion effectuée sur un modèle de souris immunodéficientes. Ces souris ont subi une transplantation de cellules hépatocytes humaines puisqu'elles surexpriment le gène urokinase plasminogen activator uPA<sup>+/+</sup> ce qui permet d'éviter les rejets (Geldof L *et al.*, 2014). Ainsi, dix métabolites monohydroxylé sont été détectés *in vitro* (seulement deux d'identifiés : 18-OH et 4-OH méthylstenbolone) et deux métabolites dihydroxylés uniquement chez les souris chimériques. Cependant, aucun des métabolites ne correspond à ceux principalement attendus, soit ceux provenant de l'hydroxylation en position C-16. Ainsi l'absence de ces métabolites, très communs chez les stéroïdes 17α-méthylés (Yamada M *et al.*, 2008), jette un doute sur ces résultats.

De plus la faible abondance des métabolites en CG-SM donne des spectres de masse qui pourraient être contaminés par des interférences.

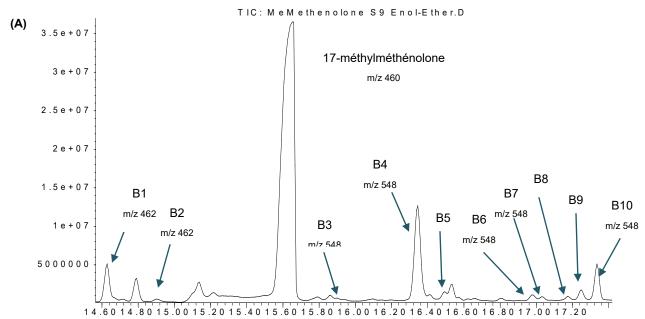
Les résultats obtenus par les tests *in vitro* en laboratoire semblent être plus fiables que ceux décrits précédemment. En effet, nos résultats ont pu être comparés à un échantillon d'urine provenant d'un volontaire ayant consommé de la 17α-méthylstenbolone. Trois des six composés de la méthode SRM de détection en CG-SM/SM ont pu être identifiés et deux autres présentaient des traces. Selon *Geldof*, certains de leurs métabolites correspondaient à une urine de référence qu'il possédait, mais sans plus de détails. (Geldof L *et al.*, 2014) Le seul métabolite commun dans l'étude de *Geldof* et la nôtre est la 18-OH méthylstenbolone. De plus, son modèle animal de souris chimériques a produit les mêmes métabolites que son modèle contrôle non transplanté. Ce qui pourrait indiquer la non-pertinence de son modèle pour ce stéroïde en particulier pour répliquer la biotransformation humaine.

# 3.3 17-méthylméthénolone

Cette section présente les résultats des différents tests *in vitro* qui ont été effectués avec la 17-méthylméthénolone. L'analyse par CG-SM a été l'outil permettant l'identification des différents métabolites issus des incubations en présence de fractions subcellulaires S9 par rapport à un métabolisme plus complexe, soit les hépatocytes cryopréservés.

Bien que les rendements aient été faibles, plusieurs métabolites ont été formés suite aux incubations avec les fractions subcellulaires S9 et les hépatocytes cryopréservés. La figure 3.13 montre un chromatogramme représentatif des résultats obtenus pour chaque technique d'incubation.





T im e -->

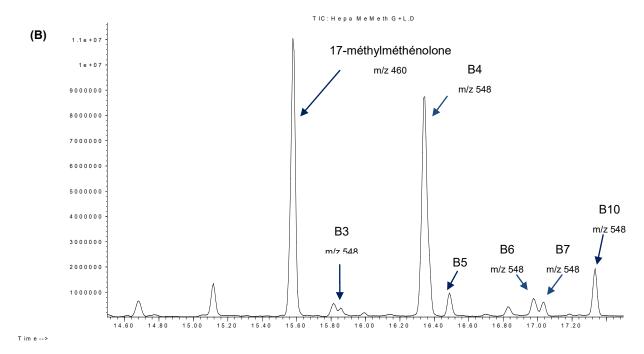


Figure 3.13 : Chromatogrammes de l'analyse CG-SM (mode de balayage complet) des extraits d'incubations de la 17-méthylméthénolone avec des fractions subcellulaires S9 (A) et des hépatocytes cryopréservés (B) dérivés TMS-éther, TMS-énol.

Comme pour la 17α-méthylstenbolone, les méthodes d'incubations *in vitro* ainsi que l'extraction des métabolites sont les mêmes pour permettre une analyse par CG-SM. Les principales différences observées entre l'utilisation de fractions subcellulaires S9 et d'hépatocytes, bien que les analyses soient purement qualitatives, résident dans la nature des métabolites et l'efficacité des réactions d'une expérience à l'autre. De façon générale, en ayant reproduit les différentes incubations au moins deux fois pour chaque composé, on constatait la présence des métabolites d'intérêts à des niveaux semblables.

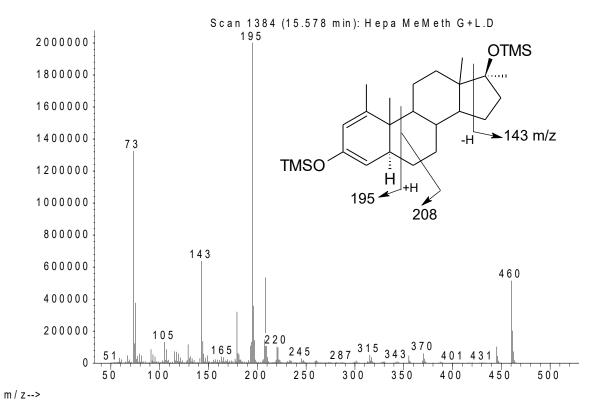


Figure 3.14 : Spectre de masse et structure de la méthylméthénolone per-TMS en CG-SM.

#### Métabolite B1: 3α,17β-dihydroxy-1-méthylen-17α-dimethyl-5α-androstane

Ce métabolite possède un ion moléculaire à m/z 462 (dérivés TMS) de deux unités supérieures au produit de départ. Étant donné la présence de métabolites réduits en C-3 avec la méthénolone, la même réduction devrait se produire (ici principalement avec les fractions S9, plus riches en réductases) pour la 17-méthylméthénolone. Par contre, les ions m/z 141 et 156 sont absents du spectre de masse. Il ne s'agit donc pas que d'une simple réduction de la cétone en C-3. Les ions 142 et 155 semblent indiquer que ce métabolite a aussi subi une isomérisation pour former 1-méthylène déjà démontré avec la méthénolone par Goudreault et al. (Björkhem I et al., 1983;Goudreault D et al., 1990). La position 3OH alpha est la plus probable d'après les résultats obtenus avec la méthénolone, mais une RMN est nécessaire pour confirmer l'orientation.

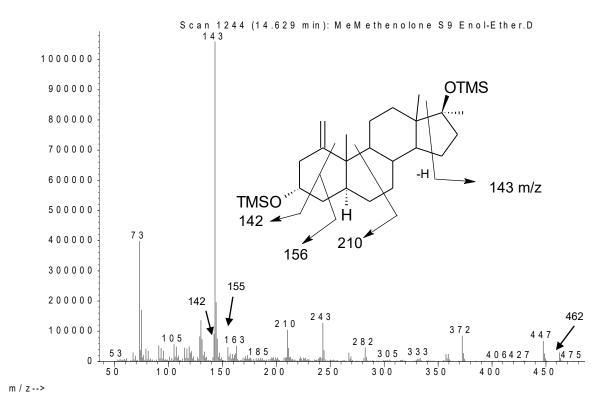


Figure 3.15 : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (B1) 3α-hydroxy-1-méthylèneméthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS.

#### Métabolite B2: 3α,17β-dihydroxy-1,17α-dimethyl-5α-androst-1-ene

Ce métabolite possède lui aussi un spectre de masse (dérivés TMS) avec un ion moléculaire à m/z 462. L'ion à m/z 141, formé de la brisure des liens au niveau du cycle A ainsi que les ions m/z 156,157 sont typiques des stéroïdes possédant un 3-OTMS, une double liaison en C-1,2 et d'un méthyle en C-1 ou C-2 (Goudreault D *et al.*, 1990;Goudreault D *et al.*, 1991). La conformation alpha de l'hydroxyle en C-3 est généralement favorisée (Beaulieu EE *et al.*, 1970;Fotherby K *et al.*, 1972;Gower DB, 1972) comme c'était le cas pour le métabolite A1 de la méthylstenbolone. Par contre, ce n'est qu'avec une RMN que la structure du métabolite peut être identifiée sans équivoque.

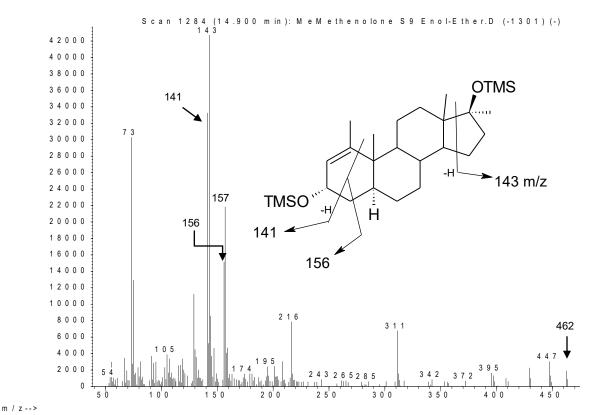


Figure 3.16 : Spectre de masse et structure proposée proposée pour le métabolite (B2) 3α-hydroxy méthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS.

### 17-Épiméthylméthénolone: 17α-hydroxy-1,17β-dimethyl-5α-androst-1-en-3-one

Métabolite ayant une fragmentation très semblable à la méthylméthénolone, ce métabolite a été identifié comme étant l'épimère en C-17, réaction très fréquentechez les stéroïdes possédant un groupement 17-α méthyle (Schanzer, 1996).

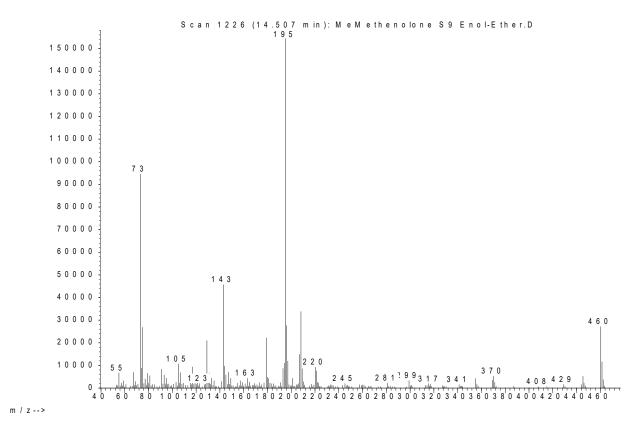


Figure 3.17 : Spectre de masse et structure proposée pour de l'épiméthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS.

### Métabolite B3: 17β,18-dihydroxy-1,17α-dimethyl-5α-androst-1-en-3-one

Le métabolite B3 possède un ion moléculaire à m/z 548 (dérivé per-TMS) suggérant la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire. La perte de l'ion à m/z 103 donnant le fragment à m/z 445 est une perte caractéristique d'un CH<sub>2</sub>-OTMS. L'hydroxylation ne semble pas être dans le cycle A sur le méthyle en C-1 ni en C-19, car les ions m/z 193, 208 et 221 sont présents. Elle n'est pas non plus au niveau du méthyle en C-17 avec la présence de l'ion m/z 143. C'est donc au niveau du C-18 tel que déjà observé avec la méthénolone (Masse R *et al.*, 1992) que l'hydroxylation se produit. Le pic à m/z 281 proviendrait de l'ion m/z 355 (l'ion m/z 445 avec un OTMS en moins) avec une perte d'un TMS.

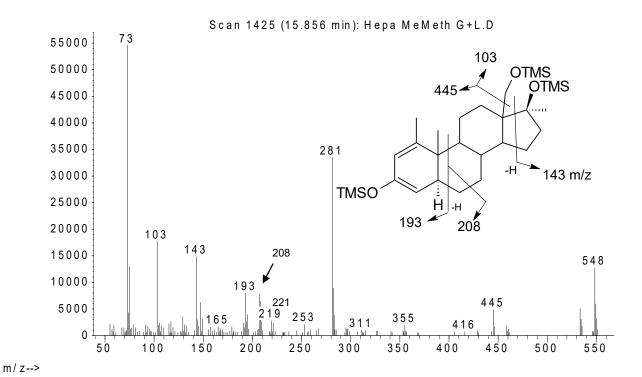


Figure 3.18 : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (B3) 18-hydroxy méthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS.

### Métabolite B4: $6\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,17 $\alpha$ -dimethyl- $5\alpha$ -androst-1-en-3-one

Ion moléculaire très intense (m/z 548) pour ce métabolite ce qui rappelle la fragmentation du métabolite 6β-hydroxy méthénolone (Goudreault D *et al.*, 1990). La présence des ions 281 et 295 m/z et l'action habituelle de la 6β-hydroxylase, une conformation en 6β est tout indiquée, comme c'est le cas pour différents stéroïdes de synthèses (Durbeck HW *et al.*, 1983;Rongone *et al.*, 1963). Pour plus de détails, voir le métabolite A5 qui représente la même voie de biotransformation.

Abundance

m / z -->

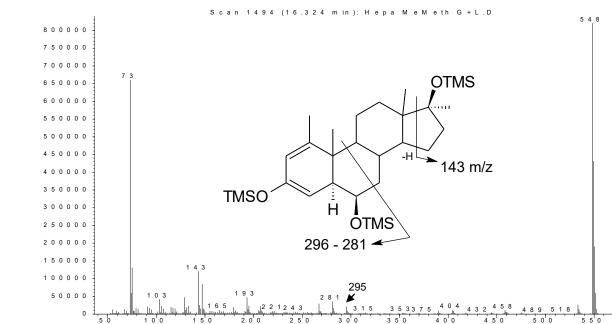


Figure 3.19 : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (B4) 6β-hydroxy méthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS.

### Métabolite B6: 2,17 $\beta$ -dihydroxy-1-méthylen-17 $\alpha$ -dimethyl-5 $\alpha$ -androstane-3-one

Ce métabolite possède un ion moléculaire à m/z 548 indiquant la présence d'une fonction alcool supplémentaire. L'ion m/z 143 inaltéré suggère que le cycle D est intact. Les ions m/z 147, 191 et 283 suggèrent une structure avec un hydroxyle en C-2 par comparaison avec le métabolite décrit par Goudreault *et al.* Une fragmentation similaire a été trouvée pour son dérivé 2-OH méthénolone (Goudreault D *et al.*, 1991). L'hydroxylation en C-2 a été décrite pour les stéroïdes (drostanolone et méthyldrostanolone) avec une cétone en C-3 n'ayant pas d'insaturation dans le cycle A (Gauthier J *et al.*, 2009). L'orientation α ou β du groupement 2-hydroxyle n'a pas été confirmée.

#### Abundance

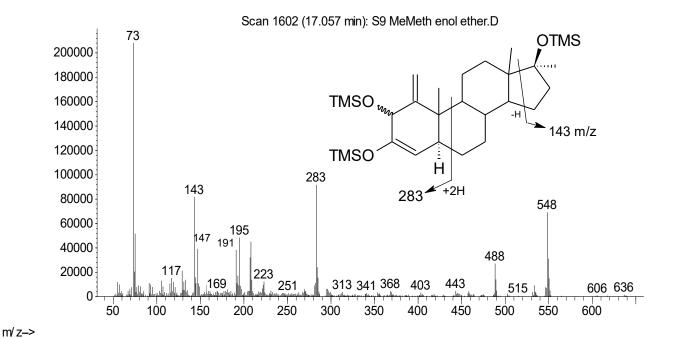


Figure 3.20 : Spectre de masse et structure proposée pour le métabolite (B6) 2-hydroxy méthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS.

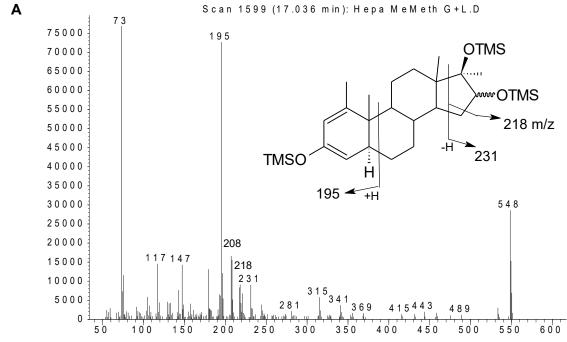
#### Métabolites B7 et B10:

 $16\alpha,17\beta$ -dihydroxy-1,1 $7\alpha$ -dimethyl- $5\alpha$ -androst-1-en-3-one

 $16\beta$ ,  $17\beta$ -dihydroxy-1,  $17\alpha$ -dimethyl- $5\alpha$ -androst-1-en-3-one

Ces deux métabolites (B7 et B10) possèdent un ion moléculaire à m/z 548, donc un groupement hydroxyle supplémentaire. Le spectre de masse de ces stéroïdes ressemble à celui de la 16-hydroxy méthylstenbolone avec la présence des ions caractéristiques à m/z 218 et 231. Ces ions sont également présents dans le spectre de masse du dérivé TMS-éther dont l'ion moléculaire à m/z 476 est en accord avec la structure proposée. Le cycle A semble intact avec la présence des ions m/z 195, 208. Cela vient confirmer le fait qu'une hydroxylation en C-16 est favorisée par la présence de groupement 17-alkyle ou d'une cétone en C-17 (Schanzer, 1996). Une particularité de ces métabolites c'est qu'ils sont présents sous deux isomères: 16αhydroxy et 16β-hydroxy. Le métabolite B10 est plus abondant que le B7. Même si dans l'étude de Goudreault et al., l'épimère en  $16\beta$  est plus abondant qu'en  $16\alpha$ , ce n'est pas nécessairement le cas dans nos incubations. Il existe une certaine disparité d'abondance métabolique entre les modèles in vitro et les études d'excrétions chez l'humain. Suite à une solvolyse, ces deux métabolites ont été détectés en CG-SM ce qui indique une sulfoconjugaison hépatique. Goudreault et al. avait démontré aussi la présence des isomères 16-OH de la méthénolone dans la fraction sulfate, (Goudreault D et al., 1990) ce qui concorde avec nos résultats.

Figure 3.21 : Structure proposée des métabolites B7 et B10.



m / z -->

Abundance

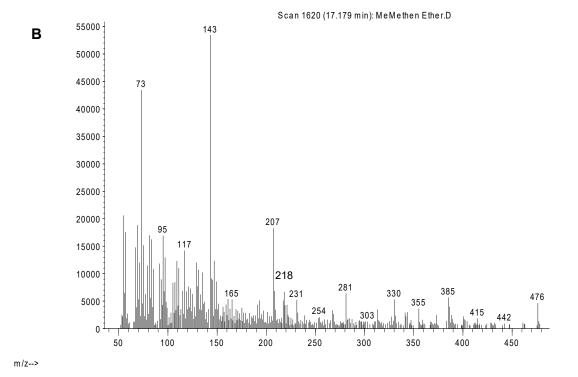
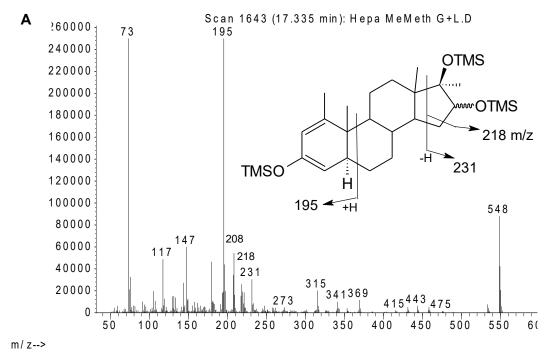


Figure 3.22 : A : Spectre de masse et structure proposée du métabolite (B7) 16-hydroxy méthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS. B : Spectre de masse dérivé TMS-éther en CG-SM.



A b und ance

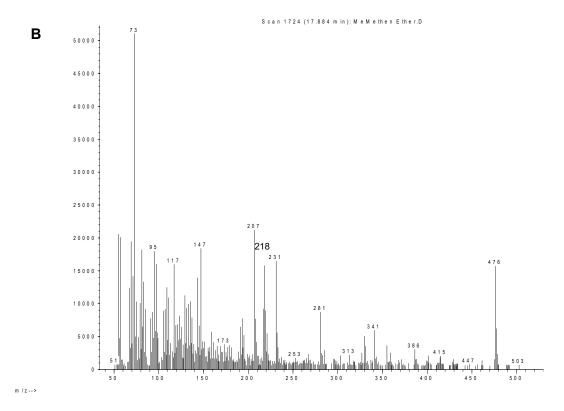


Figure 3.23 : A : Spectre de masse et structure proposée du métabolite (B10) 16-hydroxy méthylméthénolone en CG-SM dérivé per-TMS. B : Spectre de masse dérivé TMS-éther en CG-SM.

Figure 3.24 : Résumé des voies métaboliques hépatiques de la méthylméthénolone avec des propositions de structures.

Avec les fractions subcellulaires S9, la 17α-méthylméthénolone a produit dix métabolites, dont quatre (B1, B2, B8 et B9) absents de l'incubation avec les hépatocytes. Les métabolites B8 et B9 ont été exclus des analyses, faute de références pouvant les associer à une fragmentation typique. Les métabolites B1 et B2 ont été tout de même conservés puisqu'ils correspondent à des réductions qui ont été aussi faiblement observées pour la méthylstenbolone.

N'ayant produit aucun métabolite de 548 uma en dérivation TMS-éther, ceci laisse sousentendre que la cétone en C-3 est restée intacte chez tous les métabolites hydroxylés comme pour son isomère la 17α-méthylstenbolone.

## 3.3.1 Spectre d'ions produits

Comme pour la méthylstenbolone, la création d'une méthode de détection en SRM sur CG-SM/SM est nécessaire pour le dépistage efficace du profil métabolique de la méthylméthénolone. Une analyse des spectres d'ions produits des métabolites a été nécessaire pour maximiser l'abondance des transitions d'intérêt avec les bonnes énergies de collision.

# 3.3.2 Résultats SRM

Nous avons développé à partir des résultats décrits précédemment, une méthode d'analyse par CG-SM/SM pour les métabolites majeurs identifiés précédemment.

Composés	Temps rétention (min)	Transitions	Énergie collision (év)
17α-méthylméthénolone	15.6	460.3 → 195.1	15
		460.3 → 208.1	15
		460.3 → 143.1	15
3α-hydroxy-1-méthylène méthylméthénolone (B1)	14.6	462.4 → 267.3	15
		462.3 → 243.1	15
		372.2 → 315.1	10
		372.2 → 225.2	10
3α-hydroxy méthylméthénolone (B2)	14.9	462.3 → 208.3	10
		315.3 → 183.1	10
6β-hydroxy méthylméthénolone (B4)	16.3	548.4 → 193.1	20
		548.4 → 143.2	20
2-hydroxy méthylméthénolone(B6)	17.0	548.3 → 283.2	10
		548.3 → 195.1	10
16-hydroxy méthylméthénolone (B10)	17.3	548.4 → 443.4	15
		548.4 → 231.2	15
		548.4 → 208.3	15

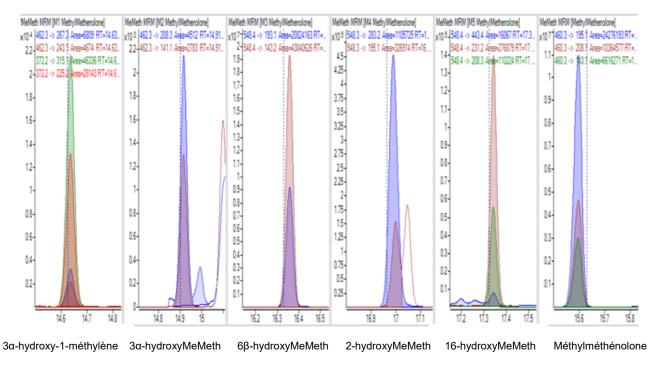


Figure 3.25 : Résultats obtenus de l'analyse GC-MS/MS en mode SRM de l'extrait obtenu de l'incubation de la méthylméthénolone avec des fractions S9.

Certains métabolites présents en très faible abondance en balayage complet (B1 et B2) sont plus facilement détectables en SRM grâce à cette méthode.

Contrairement à la méthylstenbolone, aucune comparaison entre les résultats *in vitro* et une urine de référence n'a été possible, car nous n'en possédons pas.

### 3.4 $5\alpha$ -androst-2-en-17-one

Cette section présente les résultats des différents tests *in vitro* qui ont été effectués avec la 5α-androst-2-en-17-one. L'analyse CG-SM a été l'outil permettant l'identification des différents métabolites issus des incubations avec les hépatocytes cryopréservés.

Notre intérêt pour ces deux stéroïdes a débuté lorsque un échantillon d'urine reçue au laboratoire dans le cadre des analyses de routine effectuées (à l'aveugle) a montré la présence de plusieurs stéroïdes inconnus en concentration importante. Afin d'en permettre l'identification, nous avons isolé par CLHP les stéroïdes urinaires (voir conditions décrites précédemment). La structure proposée pour le métabolite principal suite à diverses analyses de RMN (Donald Poirier, Centre de recherche, Université Laval) correspondait au 2,3-dihydroxy-5a-androstan-17-one (Ayotte C *et al.*, 2016). Le laboratoire s'est procuré par internet, le produit commercial pouvant être à la source de ce métabolite soit la 5α-androst-2-en-17-one, vendue sous le nom de D2-R (Androgenetx). L'analyse du contenu des gélules a été effectuée par CG-SM (mode balayage complet) et a montré la présence de deux isomères soit la 5α-androst-2-en-17-one et la 5α-androst-3-en-17-one tel que montré à la figure 3.26.

Abundance

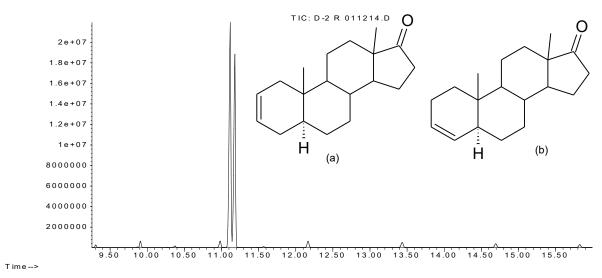


Figure 3.26 : Spectre de masse en balayage complet sur CG-SM des isomères  $5\alpha$ -androst-2-en-17-one (a) et  $5\alpha$ -androst-3-en-17-one (b).

Les incubations d'hépatocytes cryopréservés en présence de ces deux isomères, obtenus selon les méthodes décrites précédemment, ont produit une quantité importante de plusieurs métabolites. En tout, 16 métabolites ont été détectés. Par contre, les deux métabolites principaux identifiés sont le D7 et le D8 (voir figure 3.28).

A b u n d a n c e

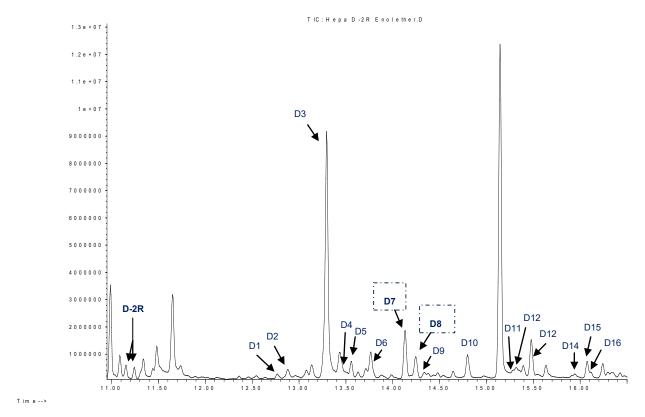


Figure 3.27 : Chromatogramme de l'incubation avec les hépatocytes en balayage complet sur CG-SM.

Figure 3.28 : Principaux métabolites (structure proposée) issus des deux isomères 2-ène (D7) et 3-ène (D8).

Métabolites : D7 (2,3-dihydroxy-5a-androstan-17-one) et D8 (3,4-dihydroxy-5a-androstan-17-one)

Métabolites avec deux hydroxyles supplémentaires et ayant subi une hydrogénation avec un ion moléculaire de m/z 522 (344 + 176→ 2(OTMS)+2H. Les cycles C et D ne montrent aucun signe de modification avec la présence des ions 169, 182 et 195.

L'isomère 2-ène subirait une double hydroxylation pour donner le métabolite 2,3-dihydroxy-5a-androstan-17-one (D7) comme c'est le cas pour la DMT (17α-méthyl-5α-androst-2-ène-17β-ol) ayant un cycle A identique (Gauthier J *et al.*, 2012). Ce métabolite était attendu puisqu'il avait été retrouvé dans l'urine en grande quantité et identifié par RMN (Ayotte C *et al.*, 2016).

Pour le métabolite D8, la présence de l'ion 393 est unique à cette structure. Ceci peut s'expliquer par une perte de 129 qui favorise l'ionisation du fragment 393. L'isomère 3-ène subirait une double hydroxylation pour donner le métabolite 3,4-dihydroxy-5a-androstan-17-one comme c'est le cas pour l'isomère 2-ène, mais en C2-C3.

Les résultats de Gauthier *et al.* avec la DMT vont dans le même sens pour ces incubations cellulaires. Ces résultats corroborent avec la multitude de métabolites détectés pour l'androst-2-en-17-one et l'androst-3-en-17-one par les incubations hépatocytaires. De plus, le laboratoire de synthèse organique du Pr Donald Poirier a synthétisé ces métabolites. Les produits correspondent effectivement aux  $2\beta$ , $3\alpha$ -dihydroxy-5a-androstan-17-one et  $3\alpha$ , $4\beta$ -dihydroxy-5a-androstan-17-one.

Abundance

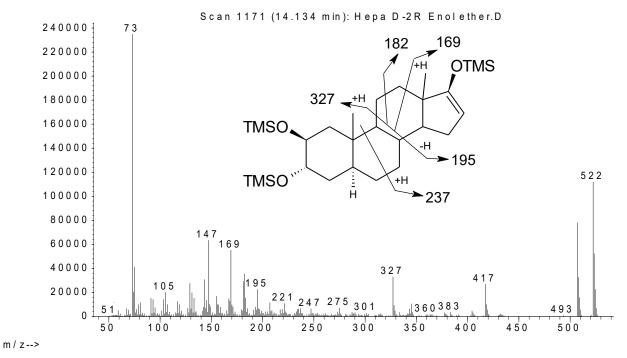


Figure 3.29 : Spectre de masse du métabolite (D7) 2,3-dihydroxy-5a-androstan-17-one en CG-SM dérivé per-TMS.

Scan 1188 (14.249 min): Hepa D-2R Enolether.D (-) 7 3 70000 65000 169 182 60000 **OTMS** 5 5 0 0 0 327. 50000 45000 40000 195 m/z 35000 **TMSO** 5 2 2 30000 25000 **ŌTMS** 20000 393 169 15000 3 9 3 147 10000 4 1 7 5000 3 5 9 473498 0 5 0 3 5 0 100 250 400 5 0 0 m / z -->

Figure 3.30 : Spectre de masse du métabolite (D8) 3,4-dihydroxy-5a-androstan-17-one en CG-SM dérivé per-TMS.

# 3.5 Epitren RX 30

Des tests effectués sur le supplément Epitren RX 30 contenant de l'estra-4,9,11-triene-3,17-dione (que les distributeurs ont nommé, trendione) 15 mg, et  $2\alpha,3\alpha$ -epithio-17 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol (baptisé, épistane) 15 mg ont confirmé la présence des deux produits dans la gélule.

### Trendione

Il existe différentes sources de trenbolone ou de produits reliés sur le marché des SAA. Ce sont principalement ce que l'industrie nomme des prohormones et des dérivés estérifiés tels que l'acétate et l'énanthate de trenbolone ainsi que l'hexahydrobenzylcarbonate (McCoy et al., 2012;Pottier et al., 1981). Une fois administré, le groupement ester est clivé et le stéroïde redevient actif. Quant à la trendione (Trenavar), celle-ci serait un précurseur de la trenbolone et de l'épitrenbolone formés après l'ingestion.

Chez le bœuf, la voie métabolique majeure de la  $17\beta$ -trenbolone est l'oxydation en trendione pour ensuite être réduite en  $17\alpha$ -trenbolone (figure 3.32) (Pottier *et al.*, 1981). L'épimérisation de la trenbolone ( $17\beta$ -hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one) en épitrenbolone ( $17\alpha$ -hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one) vient réduire l'efficacité du composé en diminuant le potentiel anabolique à seulement 5% (Schiffer B *et al.*, 2001). La cétone en C-17 doit être réduite par l'action de la  $17\beta$ -HSD ainsi que la  $17\alpha$ -HSD, comme c'est le cas pour la conversion de la testostérone en épitestostérone (Bellemare V *et al.*, 2005) qui ne se fait pas ou très rarement. La  $17\alpha$ -trenbolone est détectée plus souvent et en plus grande quantité que la  $17\beta$ -trenbolone principalement due à une plus grande excrétion pour la  $17\alpha$  que son isomère  $17\beta$  selon certains auteurs (Durhan EJ *et al.*, 2006;Schiffer B *et al.*, 2001). Pour nos résultats, c'est plutôt le contraire qu'on observe au chromatogramme (figure 3.31).

Les incubations en présence de fractions S9 ont produit de l'épitrenbolone et de la trenbolone tel qu'attendu. Contrairement aux autres SAA testés, l'analyse s'est effectuée sans dérivation sur CG-SM, les méthodes de dérivation usuelles produisant plusieurs produits secondaires.

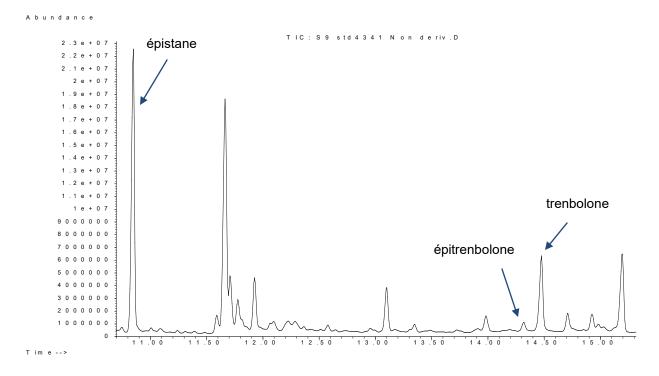


Figure 3.31 : Chromatogramme des résultats en CG-SM de l'incubation des fractions S9 du produit commercial EpitrenRX 30 contenant de la trendione et de l'épistane (non dérivé).

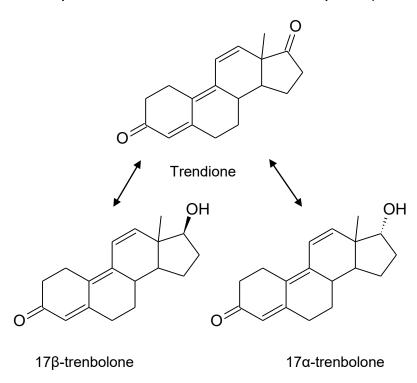


Figure 3.32 : Voies métaboliques majeures de la trendione (Trenavar).

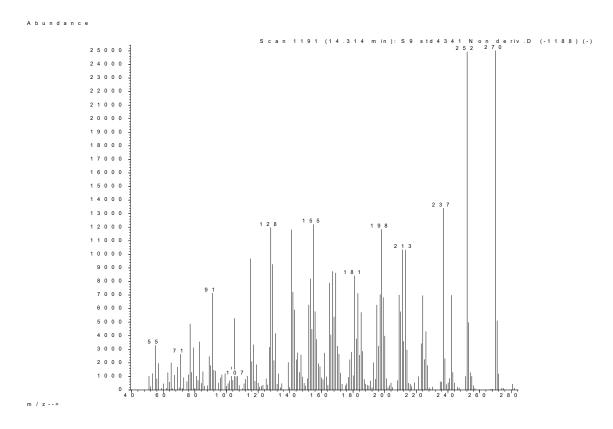


Figure 3.33 : Spectre de masse de l'épitrenbolone (17α-trenbolone) en CG-SM (non dérivé).

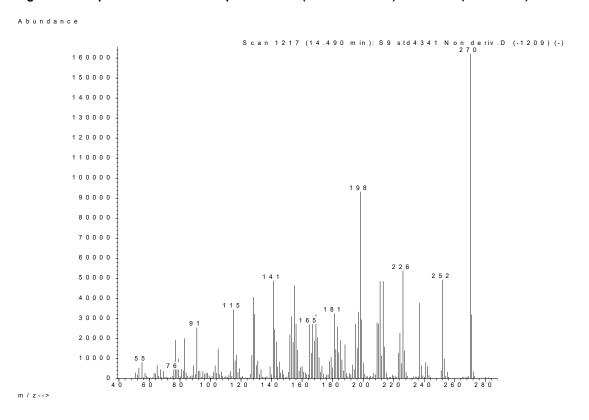


Figure 3.34 : Spectre de masse de la trenbolone (17β-trenbolone) en CG-SM (non dérivé).

## Épistane

Pour le deuxième produit, l'isolement de l'épistane (17α-méthylépitiostanol) du mélange de stéroïdes contenu dans la gélule a été fait pour permettre une sélectivité métabolique accrue. Okano M. *et al.* avait démontré que l'épithiostanol, le dérivé non méthylé, étant thermosensible en CG-SM, subissait une pyrolyse via l'intermédiaire sulfoxyde pour former le dérivé oléfine 5α-androst-2-en-17β-ol (figure 3.36) (Okano M *et al.*, 2015). En tenant compte de cette observation, la formation d'un intermédiaire est possible ce qui donnerait de la désoxyméthyltestostérone (DMT). En CG-SM, l'injection du 17α-méthylépitiostanol donne le même spectre de masse que la DMT (figure 3.35). Le groupement épithio est sensible à une pyrolyse à l'injection ce qui correspond à l'oléfine 17α-methyl-5α-androst-2-en-17β-ol (DMT).

La caractérisation des voies de biotransformations de la DMT a fait partie du projet de maîtrise et doctorat de Julie Gauthier. Les métabolites sont identifiés et synthétisés. (Gauthier J *et al.*, 2012).

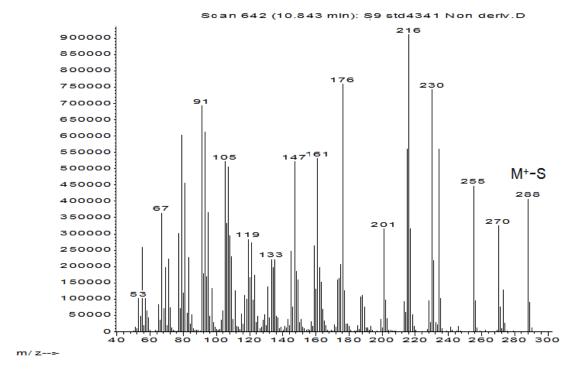


Figure 3.35 : Structure ainsi que le spectre de masse de l'épistane (a) (identique à la DMT) en CG-SM non dérivé et structure du DMT (b).

Figure 3.36 : Voies proposées par Okano M. *et al.* pour la formation du 5α-androst-2-en-17β-ol via le mepitiostanol par pyrolyse.

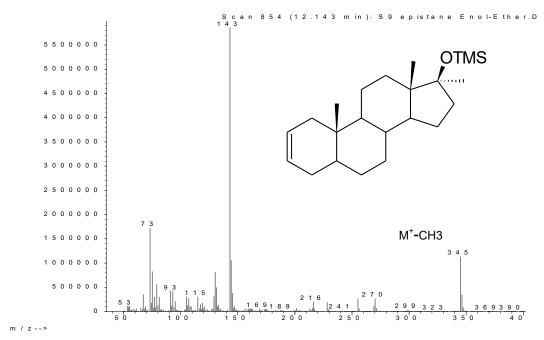
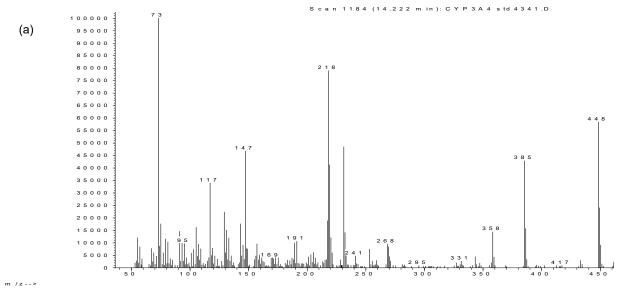
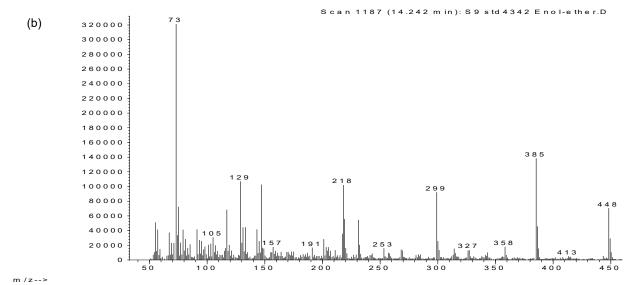


Figure 3.37 : Structure et spectre de masse de la DMT per-TMS en CG-SM.

Les fractions subcellulaires S9 ne semblent pas être en mesure de métaboliser le groupement thiol du 17α-méthylépitiostanol en sa version oléfine (DMT) étant donné l'absence du métabolite majeur de la DMT : 17a-methyl-2b,3a,17b-trihydroxy-5a-androstane. Avec le cycle A protégé par le groupement thiol, la double hydroxylation en C2 et C3 est improbable. En effet, aucun signal en balayage complet ne correspondait à l'ion moléculaire m/z 538. La présence de la DMT et des métabolites mineurs avec les fractions S9 serait donc due à la thermosensibilité du groupement thiol ayant subi une pyrolyse en CG-SM à l'injection. En effet, les métabolites typiques des 17α-méthyle (C-16 hydroxyles) sont présents avec un ion moléculaire à m/z 448 et les ions m/z 218 et 231 tant au niveau de l'incubation avec les CYP3A4 qu'avec les fractions subcellulaires S9 (figure 3.38) (Gauthier J *et al.*, 2009). Leurs présences attendues indiquent que les incubations ont fonctionné sur l'épistane. Le développement d'une méthode d'analyse sur CL-SM/SM pourrait confirmer si ces métabolites proviennent ou non du 17α-méthylépitiostanol ou bien de la DMT puisque le groupement épithio serait conservé avec une différence de 32 amu. Pour l'instant, la seule différence entre les résultats de l'incubation de la DMT ou d'épistane sur CG-SM est la présence ou non du métabolite majeur de la DMT.







OTMS
OTMS
OTMS
Pyrolyse

Figure 3.38 : Spectre de masse du métabolite de l'épistane hydroxylé en C-16 obtenu par CG-SM après incubation avec les CYP3A4 (a) et les fractions subcellulaires S9 (b) ainsi que sa structure dérivée per-TMS (c).

# 4 CONCLUSION

Des tests préliminaires sur des stéroïdes semblables à ceux de l'étude ont été menés afin de s'assurer du potentiel des méthodes *in vitro*. Les principaux métabolites ont été détectés en balayage complet sur CG-SM confirmant la pertinence des modèles et des techniques de détections utilisées.

Suite aux de tests *in vitro* faits sur la 17α-méthylstenbolone ainsi que sur la 17α-méthylméthénolone, ces deux stéroïdes de synthèse ont mené à l'identification de cinq métabolites et sept respectivement avec des voies métaboliques semblables. Ces stéroïdes ont subi des hydroxylations en C-2, C-6, C-16, C-18 ainsi que des réductions en C-3 et finalement une épimérisation en C-17 pour la méthylméthénolone. Ce qui indique que la présence d'un méthyle en C-1 ou en C-2 influence peu le potentiel métabolique d'un stéroïde du moins avec le modèle *in vitro* choisi. La fiabilité des méthodes *in vitro* a été vérifiée par l'incubation de stéroïdes déjà caractérisés possédant tous un groupement 17α-méthyle.

Avec les incubations de fractions subcellulaires S9, le  $5\alpha$ -androst-2-en-17-one et son isomère le  $5\alpha$ -androst-3-en-17-one ont produit seize métabolites comprenant des mono, des di et des trihydroxyles dont les deux métabolites identifiés/caractérisés dans l'urine ( $2\beta$ , $3\alpha$ -dihydroxy-5a-androstan-17-one). (Ayotte C *et al.*, 2016).

La trendione a été identifiée comme étant une prohormone permettant la production des SAA trenbolone et l'épitrenbolone au même titre que les dérivés esters plus communs de ceux-ci.

L'épistane (17-méthylépithiostanol) et ces métabolites proposent des spectres de masse en CG-SM identiques à ceux de la désoxyméthyltestostérone (DMT), mais ne semblent pas se métaboliser en celle-ci. Une analyse en CL-SM serait nécessaire pour identifier la source des signaux d'acquisitions associés puisque le groupement épithio serait conservé.

Des méthodes ont été développées sur CG-SM/SM afin d'évaluer la présence de certains métabolites dans des échantillons d'urine.

## 4.1 Perspectives

Plusieurs moyens disponibles auraient permis de supporter davantage la caractérisation des structures proposées.

Première possibilité, une analyse par RMN viendrait confirmer sa stéréochimie. Cependant, il faut produire une bonne quantité du métabolite pour effectuer ce genre de test ce qui n'est pas envisageable avec des systèmes *in vitro* couteux. Une tentative avait été faite avec l'utilisation de microsomes unique du CYP3A4 (moins dispendieux) pour cibler spécifiquement un métabolite abondant. Par contre, plusieurs autres métabolites avaient été formés, ce qui aurait nécessité de longues purifications.

Deuxième possibilité, la synthèse organique d'un métabolite important est une option. Celle-ci permettrait de confirmer la nature du métabolite en comparant les résultats de sa fragmentation et de son temps de rétention sur un système CG-SM avec le produit issu de la synthèse. Pour augmenter le pouvoir d'identification, il existe des systèmes d'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution et haute exactitude (SMHR). Ce type d'analyse permet d'avoir la masse exacte sur plusieurs décimales et donc sa composition chimique.

Des études plus approfondies sur le métabolisme de phase II seront exécutées sur CLUHP. En ayant une meilleure compréhension du métabolisme hépatique de ces différents SAA, les méthodes d'extractions pourront être adaptées en conséquence.

L'augmentation de la sensibilité des instruments analytiques, due à l'avancement et au raffinement des technologies, permettrait d'avoir des résultats de meilleures résolutions en diminuant les limites de détections. Ce qui pourrait mener à la découverte de nouveaux métabolites et donc à une meilleure caractérisation des voies métaboliques du produit initial.

## **5 REFERENCES**

- Annaert PP, Turncliff RZ, Booth CL, Thakker DR & Brouwer KL (2001) P-glycoprotein-mediated in vitro biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 29(10):1277-1283.
- Anzenbacher P & Anzenbacherová E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(5):737-747.
- Ayotte C, Goudreault D & A. C (1996) Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 687(1).
- Ayotte C, Goudreault D, Cyr D, Gauthier J, Ayotte P, Larochelle C & Poirier D (2006) Characterisation of chemical and pharmacological properties of new steroids related to doping of athletes. *Recent Advances in Doping Analysis* 14.
- Ayotte C, Sylvestre A, Charlebois A & Poirier D (2016) Detection of 5α-androst-2-en-17-one and variants: Identification of main urinary metabolites in human urine samples by GC-MS and NMR. *Drug Test Anal* 8(11-12):1174-1185.
- Barnes HJ, Arlotto MP & Waterman MR (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13):5597-5601.
- Beaulieu EE & Robel P (1970) Catabolism of testosterone and androstenedione. The Androgens of the Testis. New-York
- Bellemare V, Faucher F, Breton R & Luu-The V (2005) Characterization of 17α-hydroxysteroid dehydrogenase activity (17α-HSD) and its involvement in the biosynthesis of epitestosterone. *BMC Biochemistry* 6(12).
- Bi H & Massé R (1992) Studies on anabolic steroids—12. Epimerization and degradation of anabolic 17β-sulfate-17α-methyl steroids in human: Qualitative and quantitative GC/MS analysis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 42(5):533-546.
- BioreclamationIVT (2013) Cultured Hepatocyte Xenobiotic Metabolism Assay. BioreclamationIVT, Baltimore),
- BioVision (2015) Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) Activity Assay Kit (Fluorometric). BioVision, California, USA),
- Björkhem I & Ek H (1983) Detection and quantitation of 3 alpha-hydroxy-1-methylen-5 alpha-androstan-17-one, the major urinary metabolite of methenolone acetate (Primobolan) by isotope dilution--mass spectrometry. *J Steroid Biochem.* 18(4):481-487.
- Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH & Schellens JHM (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 189(3):233-246.
- Brown-Séquard C (1889) Des effets produits chez l'homme par des injections souscutanées d'un liquide retiré des testicules frais de cobaye et de chien. *C R Soc Biol* 41:415-419.

- Brueggemier RW, Miller DD & Witiak DT (1995) Principles of Medicinal Chemistry; Cholesterol, Adrenocorticoids, and Sex Hormones. Wolters Kluwer, Baltimore, 4th
- Cavalcanti GA, Leal FD, Garrido BC, Padilha MC & de Aquino Neto FR (2013) Detection of designer steroid methylstenbolone in "nutritional supplement" using gas chromatography and tandem mass spectrometry: elucidation of its urinary metabolites. *Steroids* 78(2):228-233.
- Clouet-Dumas A, Le Bizec B, Le Pape M, Maume D, Monteau F & Andre F (2000) Biosynthesis of 6beta-hydroxymethyltestosterone using bovine hepatocyte cultures. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(1-2):57-62.
- David K, Dingemanse E, Freud J & Laquer E (1935) Uber Krystallinisches mannliches Hormon Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin Bereitetes Androsteron. *Physiol. Chem* 233:281-282.
- Dennis M & Grix J (2012) Sport under Communism, Behind the East German 'Miracle. Palgrave Macmillan UK,
- Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D & Claessens F (2012) Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(10):1651-1667.
- Durbeck HW, Buker I, Scheulen B & Telin B (1978) Gas chromatographic and capillary column das chromatographic--mass spectrometric determination of synthetic anabolic steroids. I. Methandienone and its metabolites. *J Chromatogr* 21(167):117-124.
- Durbeck HW, Buker I, Scheulen B & Telin B (1983) GC and capillary column GC/MS determination of synthetic anabolic steroids. II. 4-chloro-methandienone (oral turinabol) and its metabolites. *J Chromatogr Sci* 21(9):405-410.
- Durhan EJ, Lambright CS, Makynen EA, Lazorchak J, Hartig PC, Wilson VS, Gray LE & Ankley GT (2006) Identification of metabolites of trenbolone acetate in androgenic runoff from a beef feedlot. *Environ Health Perspect* 114(1):65-68.
- Duval DL, Sieg DJ & Billings RE (1995) Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 316(2):699-706.
- Easterbrook J, Lu C, Sakai Y & Li AP (2001) Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 29(2):141-144.
- Edlund PO, Bowers L & Henion J (1989) Determination of methandrostenolone and its metabolites in equine plasma and urine by coupled-column liquid chromatography with ultraviolet detection and confirmation by tandem mass spectrometry. *J Chromatogr* 487(2):341-356.
- Einarsson K, Gustafsson JA, Ihre T & Ingelman-Sundberg M (1976) Specific metabolic pathways of steroid sulfates in human liver microsomes. *J Clin Endocrinol Metab* 43(1):56-63.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854):889-895.

- Fotherby K & James F (1972) Metabolism of synthetic steroids. In Advance in Steroid Hormones. Academic Press, New-York
- Fragkaki AG, Angelis YS, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M & Georgakopoulos C (2009) Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer steroids in human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 115(1-2):44-61.
- G Pope Jr H & Katz DL (1994) Psychiatric and Medical Effects of Anabolic-Androgenic Steroid Use: A Controlled Study of 160 Athletes. *Archives of general psychiatry* 51(5):375-382.
- Galduroz JC, Noto AR, Nappo SA & Carlini EA (2005) Household survey on drug abuse in Brazil: study involving the 107 major cities of the country-2001. *Addict. Behav* 30(3):545-556.
- Gauthier J, Goudreault D, Poirier D & Ayotte C (2009) Identification of drostanolone and 17-methyldrostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes. *Steroids* 74(3):306-314.
- Gauthier J, Poirier D & Ayotte C (2012) Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes. *Steroids* 77(6):635-643.
- Geldof L, Lootens L, Polet M, Eichner D, Campbell T, Nair V, Botre F, Meuleman P, Leroux-Roels G, Deventer K & Eenoo PV (2014) Metabolism of methylstenbolone studied with human liver microsomes and the uPA(+)/(+)-SCID chimeric mouse model. *Biomedical chromatography: BMC* 28(7):974-985.
- Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV & Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 4(4):292-312.
- Gómez C, Pozo OJ, Garrostas L, Segura J & Ventura R (2013) A new sulphate metabolite as a long-term marker of metandienone misuse. *Steroids* 78(12-13):1245-1253.
- Goudreault D & Massé R (1990) Studies on anabolic steroids--4. Identification of new urinary metabolites of methenolone acetate (Primobolan) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37(1):137-154.
- Goudreault D & Massé R (1991) Studies on anabolic steroids--6. Identification of urinary metabolites of stenbolone acetate (17 beta-acetoxy-2-methyl-5 alpha-androst-1-en-3-one) in human by gas chromatography/mass spectrometry. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 38(5):639-655.
- Gower DB (1972) 16-Unsaturated C 19 steroids. A review of their chemistry, biochemistry and possible physiological role. *Journal of Steroid Biochemistry* 10.1016/0022-4731(72)90011-8.
- Gower DB (1984) Part1: Steroid catabolism and urinary excretion. In Biochemistry of Steroid Hormones. London, 2nd
- Guddat S, Fussholler G, Beuck S, Thomas A, Geyer H, Rydevik A, Bondesson U, Hedeland M, Lagojda A, Schanzer W & Thevis M (2013) Synthesis, characterization, and detection of new oxandrolone metabolites as long-term markers in sports drug testing. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405(25):8285-8294.

- Hanson JR (1980) Terpenoids and Steroids volume 12. The Royal Society of Chemistry, London
- Hartgens F & Kuipers H (2004) Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sports Medicine* 34(8):513-554.
- Huang Z, Guengerich FP & Kaminsky LS (1998) 16Alpha-hydroxylation of estrone by human cytochrome P4503A4/5. *Carcinogenesis* 19(5):867-872.
- Isin EM & Guengerich FP (2008) Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and bioanalytical chemistry* 392(6):1019-1030.
- Jin Y & Penning TM (2001) Steroid 5α-reductases and 3α-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15(1):79-94.
- Kam PCA & Yarrow M (2005) Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia* 60(7):685-692.
- Kanayama G, Hudson JI & Graham Pope Jr H (2010) Illicit Anabolic-Androgenic Steroid Use. *Hormones and Behavior* 58(1):111-121.
- Kicman AT & Gower DB (2003) Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann Clin Biochem* 40(Pt 4):321-356.
- Kokkevi A, Fotiou A, Chileva A, Nociar A & Miller P (2008) Daily exercise and anabolic steroids use in adolescents: a cross-national European study. *Subst. Use Misuse* 43(14):2053-2065.
- Laatikainen T & Vihko R (1969) Identification of 18-hydroxyandrosterone in human bile. *Steroids* 13(5):615-621.
- Labrie F, Luu-The V, Calvo E, Martel C, Cloutier J, Gauthier S, Belleau P, Morissette J, Lévesque MH & Labrie C (2005) Tetrahydrogestrinone induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid. *J Endocrinol* 184(2):427-433.
- Leinonen A, Kuuranne T, Kotiaho T & Kostiainen R (2004) Screening of free 17-alkyl-substituted anabolic steroids in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids* 69(2):101-109.
- Lemke TL & Williams DA (2012) Foye's principles of medicinal chemistry. Wolters Kluwer. 1520 p
- Liao S, Liang T, Fang S, Castenada E & Shao TC (1973) Steroid structure and androgenic activity. *J. Biol. Chem* 248(17):6154-6162.
- Lootens L, Van Eenoo P, Meuleman P, Pozo OJ, Van Renterghem P, Leroux-Roels G & Delbeke FT (2009) Steroid metabolism in chimeric micewith humanized liver. *Drug Test Anal* 1(11-12):531-537.
- Lopez de Alda MJ, Díaz-Cruz S, Petrovic M & Barceló D (2003) Liquid chromatography— (tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000(1-2):503-526.
- Makin HLJ & Gower DB (2010) Steroid Analysis. Springer Netherlands, London, New York. 1224 p

- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M & Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicology Letters* 158(3):167-175.
- Maria R & G L (2012) Confirmation of long term excreted metabolites of metandienone by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Sci. Bull* 74(2).
- Massé R, Ayotte C, Bi HG & R. D (1989) Studies on anabolic steroids. III. Detection and characterization of stanozolol urinary metabolites in humans by gas chromatographymass spectrometry. *J Chromatogr.* 29(497):17-37.
- Masse R & Goudreault D. MR (1992) Studies on anabolic steroids--11. 18-hydroxylated metabolites of mesterolone, methenolone and stenbolone: new steroids isolated from human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 42(3-4):399-410.
- McCabe SE, Brower KJ, West BT, Nelson TF & H. W (2007) Trends in non-medical use of anabolic steroids by U.S. college students: results from four national surveys. *Drug Alcohol Depend* 90(2-3):243-251.
- McCoy SC, Yarrow JF, Conover CF, Borsa PA, Tillman MD, Conrad BP, Pingel JE, Wronski TJ, Johnson SE, Kristinsson HG, Ye F & Borst SE (2012) 17beta-Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one (Trenbolone) preserves bone mineral density in skeletally mature orchiectomized rats without prostate enlargement. *Bone* 51(4):667-673.
- Mohler ML, Bohl CE, Jones A, Coss CC, Narayanan R, He Y, Hwang DJ, Dalton JT & DD. M (2009) Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): Dissociating the Anabolic and Androgenic Activities of the Androgen Receptor for Therapeutic Benefit *Journal of Medicinal Chemistry* 52(12):3597-3617.
- Moston S & T E (2016) Detecting doping in sport. Routledge,
- Okano M, Sato M, Kojima A & S. K (2015) Determination of mepitiostane metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for sports drug testing. *J Pharm Biomed Anal* 10(115):236-244.
- Olympic.org (2016) SECOND WAVE OF REANALYSIS REVEALS BANNED SUBSTANCES IN 45 ATHLETES FROM BEIJING AND LONDON.),
- Pottier J, Cousty C, Heitzman RJ & Reynolds IP (1981) Differences in the biotransformation of a 17 beta-hydroxylated steroid, trenbolone acetate, in rat and cow. *Xenobiotica* 11(7):489-500.
- Rendic S, Nolteernsting E & W. S (1999) Metabolism of anabolic steroids by recombinant human cytochrome P450 enzymes. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 735(1):73-83.
- Rogozkin V. A (1991) *Metabolism of Anabolic Androgenic Steroids*. CRC Press, United States. 200 p
- Rongone E & Segaloff A (1963) In vivo metabolism of  $\Delta$ ,  $17\alpha$ -methyltestosterone in man. *Steroids* 1(2):179-184.
- Schanzer W (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical chemistry* 42(7):1001-1020.

- Schänzer W, Geyer H, Fusshöller G, Halatcheva N, Kohler M, Parr MK, Guddat S, Thomas A & M. T (2006) Mass spectrometric identification and characterization of a new long-term metabolite of metandienone in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(15):2252-2258.
- Schänzer W, Horning S & M. D (1995) Metabolism of anabolic steroids in humans: synthesis of 6 beta-hydroxy metabolites of 4-chloro-1,2-dehydro-17 alpha-methyltestosterone, fluoxymesterone, and metandienone. *Steroids* 60(4):353-366.
- Schanzer W, Opfermann G & Donike M (1992) 17-Epimerization of 17 alpha-methyl anabolic steroids in humans: metabolism and synthesis of 17 alpha-hydroxy-17 beta-methyl steroids. *Steroids* 57(11):537-550.
- Schiffer B, Daxenberger A, Meyer K & Meyer HH (2001) The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies. *Environ Health Perspect* 109(11):1145-1151.
- Sharer J. E, Shipley L. A, Vandenbranden M. R, Binkley S. N & A. WS (1995) Comparisons of phase I and phase II in vitro hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgus monkey. *Drug Metabolism and Disposition* 23(11):1231-1241.
- Silva J.M, Day S.H & D.A. N-G (1999) Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chemico-biological interactions* 121(1):49-63.
- Sjöqvist F, Garle M & Rane A (2008) Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *The Lancet* 371(9627):1872-1882.
- Sobolevsky T & Rodchenkov G (2012) Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 128(3-5):121-127.
- ThermoFisher S (2016) In vitro Assessment of Metabolic Stability in Suspension Cryopreserved Hepatocytes.),
- Thieme D & Hemmersbach P (2009) Doping in Sports. Springer. 540 p
- Wettstein A (1935) Uber die kunstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron. Schweiz Med 16:912.
- Yamada M, Aramaki S, Kurosawa M, Saito K & Nakazawa H (2008) Detection of urinary metabolites common to structurally related 17alpha-alkyl anabolic steroids in horses and application to doping tests in racehorses: methandienone, methandriol, and oxymetholone. *J Anal Toxicol* 32(5):387-391.