

Haute Ecole Valaisanne
Filière: Technologies du Vivant

Travail de diplôme 2006
Orientation : chimie analytique

Développement d'une méthode d'analyse des métabolites conjugués de la nandrolone par LC-MS/MS

RESUME / ZUSAMMENFASSUNG :

Une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (LC-MS/MS) des métabolites conjugués de la nandrolone : 19-norandrostérone glucuronide (NAG), 19-norétiocholanolone glucuronide (NEG), 19-norandrostérone sulfate (NAS) et 19-norétiocholanolone sulfate (NES) a été développée lors de ce travail de diplôme. Cette méthode simple a permis une analyse et une quantification directes des composés sans devoir modifier leur structure chimique ainsi qu'une séparation des deux paires d'énantiomères NAG/NEG et NAS/NES. Cela permet de conserver des informations précieuses sur le métabolisme de la nandrolone. Ces informations permettraient l'identification de marqueurs plus spécifiques afin de discriminer, à basse concentration, une prise de nandrolone d'une production endogène du stéroïde.

Ainsi, trois colonnes d'extraction sur phase solide MAX (Mixed-mode Anion-eXchange), HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) et WAX (Mixed-mode Weak Anion-eXchange) ont été testées afin d'isoler les métabolites conjugués. Puis, une optimisation des méthodes d'extraction a été mise au point pour les colonnes HLB et WAX afin d'obtenir le meilleur rendement dans l'eau avant une application sur une matrice urinaire.

Lors de l'extraction par les colonnes HLB de 20 ng/ml dans l'eau, des rendements compris entre 94.3% et 102.7% ont été obtenus avec des coefficients de variation compris entre 1.4% et 4.4%. Les rendements à l'aide de colonnes WAX varient entre 97.5% et 105.1% avec des coefficients de variation compris entre 2.3% et 8.3%.

Les extractions effectuées sur des échantillons urinaires ont donné des rendements aléatoires et absurdes causés par l'important effet de matrice.

Eine MS/MS gekoppelte LC-Analysemethode der konjugierten Nandrolonmetaboliten (NAG, NEG, NAS, NES) wurde durch diese Diplomarbeit entwickelt. Diese einfache Methode erlaubte eine direkte Analyse und Quantifizierung der Molekülen, ohne ihre chemische Struktur modifizieren zu müssen, wie eine Trennung der zwei Enantiomerpaare NAG/NEG und NAS/NES. Das erlaubt, hochwertige Informationen über Nandrolonmetabolismus zu erhalten. Diese Informationen könnten auch erlauben, mehr spezifische Anzeiger zu identifizieren, um mit niedrigen Konzentrationen eine Nandrolonabsorption von einer endogenen Steroideproduktion zu diskriminieren.

So wurden drei Extraktionskolonnen (MAX, HLB, WAX) getestet, um die konjugierte Metaboliten zu isolieren. Danach, eine Extraktionsmethodenoptimierung wurde für HLB und WAX Kolonnen zuarbeitet, um den besten Ertrag im Wasser zu erhalten, bevor diese Methoden auf eine Urinmatrize anzuwenden.

Während einer HLB Kolonne 20ng/ml im Wasser Extraktion, 94.3% zu 102.7% Erträge mit 1.4% zu 4.4% Variationskoeffizienten wurden erhalten. WAX Kolonnen Erträge schaukeln zwischen 97.5% und 105.1% mit Variationskoeffizienten zwischen 2.3% und 8.3%.

Wegen eines wichtigen Matriceeffekts, Extraktionen in Urinproben ergaben zufällige und unsinnige Erträge.

Mots clefs : Dopage, Nandrolone, Urine, LC-MS/MS.

Stichworte : Doping, Nandrolone, Urin, LC-MS/MS.

Ho Ngoc Huy

REMERCIEMENTS :

Ce travail de diplôme a été effectué au sein de l'Institut Universitaire de Médecine Légale (IUML) dans le Laboratoire suisse d'Analyse du Dopage (LAD).

J'aimerais par ces quelques lignes remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, pour la réalisation de ce rapport.

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Martial Saugy, directeur du LAD, de m'avoir permis d'effectuer ce stage au sein de son laboratoire.

Je souhaite ensuite remercier le Docteur Christophe Saudan qui m'a permis de réaliser ce travail de diplôme grâce à son aide et ses conseils.

J'aimerais également remercier Emmanuel Strahm pour son soutien, sa patience et ses précieux conseils pour m'avoir guidé à travers ce travail de recherche.

Enfin je souhaite remercier toutes les autres personnes travaillant au LAD pour leur accueil et leur gentillesse tout au long de mon stage.

TABLE DES MATIERES :

I.	INTRODUCTION	7
1.	Les stéroïdes androgènes anabolisants (SAA)	8
1.1	Généralités sur les stéroïdes	8
1.2	Structure chimique des stéroïdes	8
2.	Les 19-norstéroïdes	8
2.1	Structure chimique de la nandrolone et de ses métabolites	9
2.2	Biosynthèse	9
2.3	Métabolisme	10
2.4	Effets physiologiques	12
2.5	Effets secondaires	12
3.	Détection d'un dopage à la nandrolone	13
3.1	Méthode GC-MS	13
3.2	Couplage LC-MS/MS	14
3.3	Ionisation à pression atmosphérique	15
3.4	Analyseurs MS	16
3.4.1	Triple Stage Quadripole (TSQ)	17
3.4.2	Linear Trap Quadripole (LTQ)	17
II.	OBJECTIFS	18
III.	PARTIE EXPERIMENTALE	18
1.	Analyse des métabolites de la nandrolone par LC-MS/MS	18
1.1	Echantillons	18
1.2	Produits et solvants	18
1.3	Appareillage	19
2.	Extraction SPE	19
2.1	Mode opératoire pour l'extraction par colonne MAX	19
2.2	Mode opératoire pour l'extraction par colonne WAX	21
2.3	Mode opératoire pour l'extraction par colonne HLB	22

3. Identification et quantification des analytes par LC-MS/MS	23
3.1 Paramètres LC	23
3.2 Paramètres MS/MS	23
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	24
1. Spectrométrie de masse MS et MS/MS	24
1.1 Analyses MS par LTQ	24
1.2 Analyses MS par TSQ	29
2. Interprétation des chromatogrammes du LC	32
3. Extraction sur phase solide (SPE)	34
3.1 Généralités	34
3.2 Colonne HLB	34
3.3 Colonne MAX	35
3.4 Colonne WAX	36
3.5 Optimisation de la méthode d'extraction par SPE sur colonne HLB	37
3.6 Optimisation de la méthode d'extraction par SPE sur colonne MAX	38
3.7 Optimisation de la méthode d'extraction par SPE sur colonne WAX	40
4. Rendements d'extraction	41
5. Effet de matrice	42
V. CONCLUSIONS	44
VI. BIBLIOGRAPHIE	44
VII. ANNEXES	47

ABBREVIATIONS:

AMA	Agence Mondiale Antidopage
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CIO	Comité Internationale Olympique
ESI	Electrospray Ionization
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
d ₄ AS	d ₄ -androstérone sulfate
d ₄ NAG	d ₄ -norandrostérone glucuronide
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPLC	High-performance Liquid Chromatograph
LAD	Laboratoire suisse d'Analyse du Dopage
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem
LTQ	Linear trap quadripole
MAX	Mixed-mode Anion-eXchange
m/z	Rapport masse sur charge
NA	19-norandrostérone
NAG	19-norandrostérone glucuronide
NAS	19-norandrostérone sulfate
NE	19-norétiocholanolone
NEG	19-norétiocholanolone glucuronide
NES	19-norétiocholanolone sulfate
RA	Récepteur aux androgènes
SAA	Stéroïde androgène anabolisant
SPE	Solid Phase Extraction
TSQ	Triple stage quadripole
WAX	Mixed-mode Weak Anion-eXchange

I. INTRODUCTION

L'argent et la médiatisation dans le sport ont été les principaux déclencheurs de l'augmentation de la prise de produits dopants au niveau des athlètes professionnels et amateurs. Contraints à la performance, les sportifs les plus malhonnêtes recourent à la prise de dopants qui vont faciliter leurs efforts et récupérations.

Depuis les Jeux de Grenoble et Mexico en 1968, des contrôles anti-dopage ont été instaurés auprès des athlètes. C'est à cette époque que chaque décennie va coïncider avec la lutte contre une classe de produits dopants : 1960 pour les amphétamines, 1970 pour les anabolisants, 1980 pour la testostérone et 1990 pour l'érythropoïétine.^[1]

Aujourd'hui, l'Agence Mondiale Antidopage (AMA) est devenue la référence incontournable en matière de dopage et réglemente les substances prohibées selon la transgression de l'éthique du sport et de la science médicale.

Ainsi, l'AMA redéfinit chaque année une liste dans laquelle figurent trois grandes classes de produits et de méthodes soumises à une réglementation^[2] :

- les substances et méthodes interdites en permanence (en et hors compétition) :
 - agents anabolisants
 - hormones et substances apparentées
 - béta-2 agonistes
 - agents avec activité anti-œstrogène
 - diurétique et autres agents masquants
 - amélioration du transfert d'oxygène
 - manipulation chimique et physique
 - dopage génétique
- les substances et méthodes interdites qui s'ajoutent à la classe précédente lors des compétitions :
 - stimulants
 - narcotiques
 - cannabinoïdes
 - glucocorticoïdes
- les substances interdites dans certains sports :
 - alcool
 - béta-bloquants

Cette liste, qui est approuvée par le Comité International Olympique et les différentes fédérations sportives, est renouvelée chaque année et entre en vigueur le 1^{er} janvier. Le Laboratoire suisse d'Analyse du Dopage (LAD) de Lausanne, est accrédité par l'AMA afin d'effectuer les analyses de routine pour déceler ces produits ainsi que pour développer de nouvelles méthodes de dépistage.

1. Les stéroïdes androgènes anabolisants (SAA)

1.1 Généralités sur les stéroïdes

Les stéroïdes androgènes anabolisants (SAA) sont des dérivés synthétiques de la testostérone qui est une hormone naturelle produite dans les testicules chez l'homme. Cet hormone est responsable des effets androgéniques (développement des caractères masculins) et anabolisants (synthèse endogène de substances).^[3]

1.2 Structure chimique des stéroïdes

Le squelette de base d'un stéroïde est composé de quatre cycles de carbones (1, 2, 3 et 4) formant la partie stéroïdienne (Figure 1).

La structure chimique de base des SAA est celle des androstanes qui est formée par le noyau cyclopentaphénanthrène substitué par des groupes méthyles en C-18 et C-19.^[4] Les androstanes peuvent se différencier par l'orientation de l'atome d'hydrogène en position C-5 pour former les 5 α -androstanes ou les 5 β -androstanes. La structure chimique des SAA peut également contenir d'autres substituants tels que des groupes hydroxyles ou carbonyles en C-3 et C-17 ou encore une double liaison entre le C-4 et C-5.^[5]

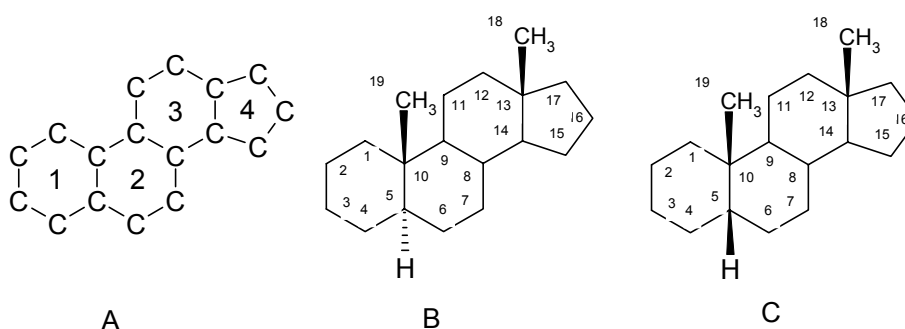


Figure 1 : Structure chimique de base des stéroïdes. A : Noyau stérol ; B : 5 α -androstane ; C : 5 β -androstane.

2. Les 19-norstéroïdes

La nandrolone a été introduite dans la liste des substances interdites par le CIO depuis les Jeux Olympiques de Montréal en 1976. Ce composé est transformé dans l'organisme en plusieurs métabolites dont les deux principaux sont la 19-Norandrostérone (NA) et la 19-Norétiocholanolone (NE). La recherche d'un dopage éventuel à la nandrolone se fait par le biais de la détection de ces deux produits urinaires et notamment de la NA. En 2004, l'Agence Mondiale Antidopage (AMA) a fixé cette limite à 2 ng/ml pour les hommes et les femmes.^[6]

2.1 Structure chimique de la nandrolone et de ses métabolites

La nandrolone fait partie des 19-norstéroïdes qui sont caractérisés par l'absence du substituant méthyle en position C-19 par rapport à la structure de la testostérone (Figure 2a). Suite à sa synthèse par Birch^[7], au début des années 1950, la 19-nortestostérone a été commercialisée sous le nom de nandrolone.

Les préparations pharmaceutiques de la nandrolone sont des dérivés estérifiées en C-17 telles que le Deca-Durabolin[®] qui sont administrés par injection intramusculaire (Figure 2b). L'estérification permet d'augmenter la durée de demi-vie de la 19-nortestostérone et ainsi prolonger son action pharmacologique. Certains produits comme le Keratyl[®] peuvent être vendus sous forme de collyre avec des sels de nandrolone (sulfate sodique de nandrolone) en phase aqueuse (Figure 2c).^[8]

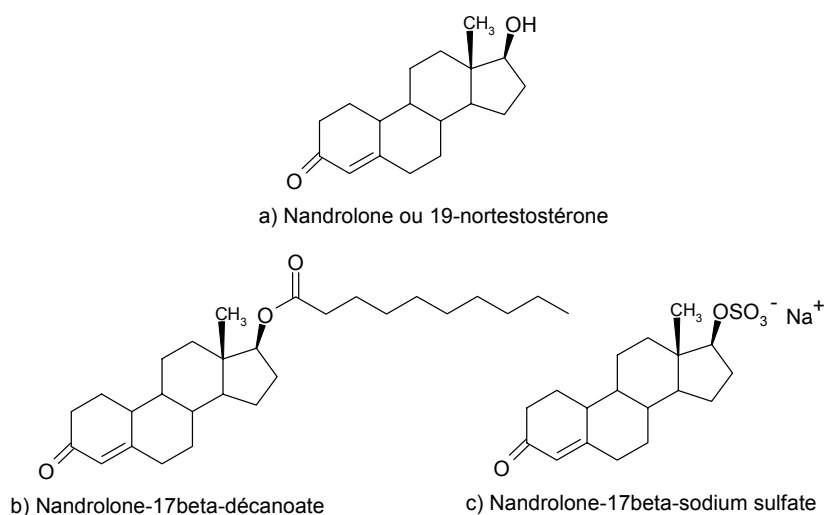


Figure 2 : Structure chimique de la nandrolone et deux exemples de formes estérifiées.

2.2 Biosynthèse

La biosynthèse des 19-norstéroïdes pourrait découler d'une réaction secondaire se produisant lors du processus d'aromatisation par le complexe enzymatique P450arom avec l'élimination du groupement méthyle en position C-19. Une étude^[9] a évalué que l'aromatisation in vitro de la testostérone conduisait à la formation de l'oestradiol et de la 19-nortestostérone dans un rapport 92% / 8% (Figure 3).

Les sites d'aromatisation chez l'être humain sont le placenta chez la femme enceinte, les follicules ovariens pour les femmes pré-ménopausées. Les autres sites sont les testicules, le tissu adipeux, les muscles squelettiques, la peau et le cerveau.^[7]

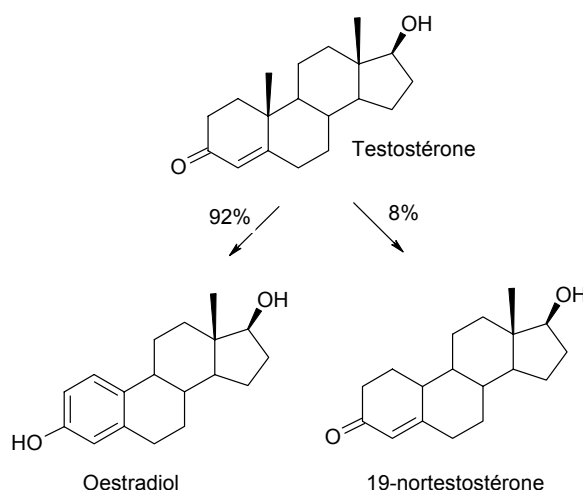


Figure 3 : Action du complexe P450arom sur la testostérone.

2.3 Métabolisme

C'est à la fin des années 1950 que l'excrétion de NA et de NE dans les urines a été observée lors de l'administration de 19-nortestostérone. Puis, la mise sur le marché des compléments alimentaires a fait apparaître des précurseurs de la nandrolone tels que la norandrostenediol (NAdiol) et la norandrostenedione (NAdione). Etant des prohormones, la NA-diols et NA-dione sont transformées en nandrolone par une voie métabolique (Figure 4).

Après l'administration d'un stéroïde, le corps va procéder à deux phases distinctes ayant pour but son élimination : la phase I (fonctionnalisation) et la phase II (conjugaison). Le but de ces étapes est de modifier la structure des molécules afin de les rendre plus soluble pour faciliter leur élimination par voie urinaire.

Les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation, consistent à modifier le stéroïde par catalyse enzymatique afin d'augmenter le caractère polaire de la molécule. Cette phase englobe les réactions d'oxydations, de réductions ou d'hydroxylations.^[10] C'est à cette étape que les composés peuvent être activés, désactivés ou transformés en produit toxique.

Les métabolites subissent ensuite des réactions de phase II, dites de conjugaison, qui permettent l'ajout d'un conjugué glucuronide ou sulfate (Figure 5). Ces étapes permettent d'augmenter les propriétés hydrophiles de la molécule, de faciliter son transport et d'activer son élimination par voies rénale et biliaire.^[4]

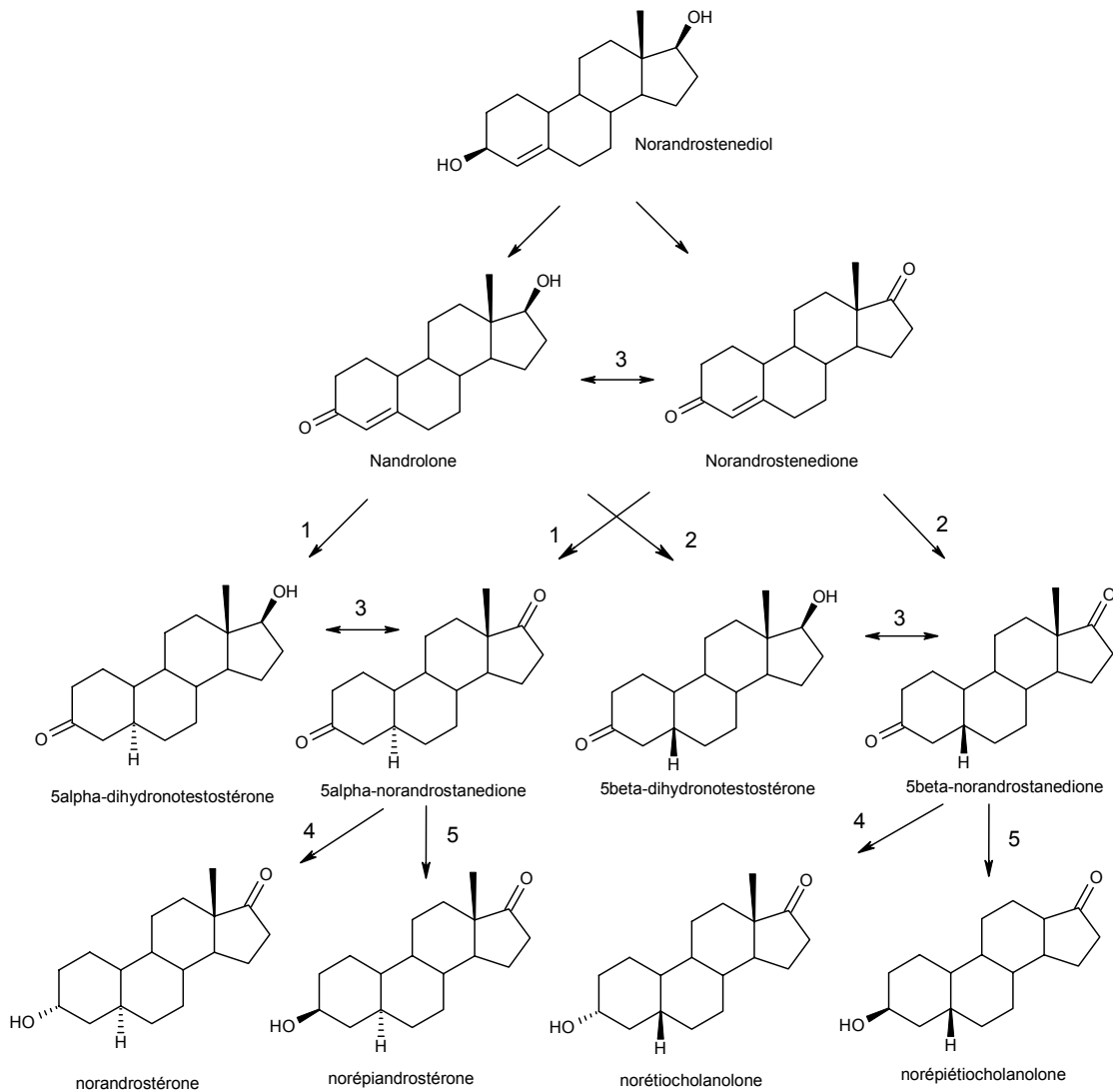


Figure 4 : Catabolisme des 19-norstéroïdes. (1 : 5α-réductase ; 2 : 5β-réductase ; 3 : 17β-HSD ; 4 : 3α-HSD ; 5 : 3β-HSD).

Bien que la majorité des métabolites soient excrétés sous forme conjuguée, il est possible que des molécules échappent à ces réactions et se retrouvent sous forme libre dans les urines.^[11]

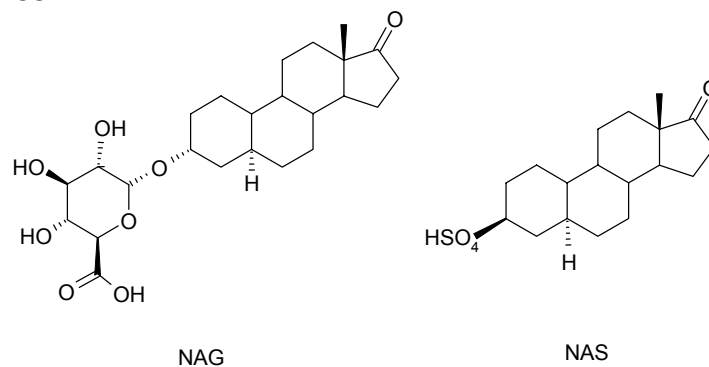


Figure 5 : Structures chimiques du NAG et NAS.

En général, la norandrostérone est majoritaire par rapport à la norétiocholanolone c'est pourquoi le règlement anti-dopage du CIO puis celui édicté par l'AMA se base sur la détection des concentrations de norandrostérone libre après déconjugaisons pour déclarer un cas positif à la nandrolone.^[6]

2.4 Effets physiologiques

Depuis la découverte de l'existence de la testostérone en 1932 et l'apparition des stéroïdes anabolisants de synthèse, ces produits ont rapidement été utilisés par les sportifs afin d'optimiser leurs performances physiques.

Ainsi, des changements morphologiques et physiologiques peuvent être visibles et mesurables :

- **Composition corporelle** : La consommation de SAA amène à une augmentation de la masse maigre (somme de l'eau, des os, des organes, en excluant la partie grasse) de l'organisme. L'augmentation de la masse dépend de la dose prescrite.^[12]
- **Force musculaire** : Les athlètes pratiquant des sports demandant de la puissance musculaire tels que l'haltérophilie, l'aviron, le cyclisme ou encore le sprint peuvent être intéressés à développer leur force musculaire à l'aide des SAA. Ces derniers augmentent donc la force musculaire seulement en association avec à un entraînement strict de force. Les performances dépendent également du type de drogue administré, de la dose ingérée ainsi que la durée de traitement.^[13]
- **Action anti-glucocorticoïde** : Les glucocorticoïdes, tels que le cortisol, sont sécrétés dans le sérum à la suite d'un grand stress physique ou psychologique. Les SAA ont des capacités de lier les récepteurs aux glucocorticoïdes agissant ainsi comme antagonistes de ces substances. Ainsi, les SAA sont capables de contrer la dégradation des protéines et des glucides et d'inhiber la dégradation osseuse induite par les glucocorticoïdes.^[14]
- **Endurance et hématologie** : Les SAA ont été utilisés afin de stimuler la production de globules rouges et ainsi traiter les cas d'anémies. Les relations entre les paramètres sanguins et l'augmentation du transport d'O₂ ont rapidement été mises en évidence par les athlètes qui ont alors consommé les SAA afin d'optimiser leurs capacités d'endurance.^[3]

2.5 Effets secondaires

Les effets indésirables peuvent intervenir pendant et également à la suite de l'arrêt de traitement aux SAA. Ainsi les effets secondaires chez les sujets masculins sont une augmentation de la stimulation sexuelle, l'apparition d'acné, une augmentation de la pilosité corporelle et un développement d'un comportement agressif.^[3]

D'autres effets ont été relevés dans une moindre mesure tels qu'une tension artérielle élevée, insomnie, irritabilité, augmentation de l'appétit, de la transpiration, sensation de bien-être, perte de cheveux ou gynécomastie.

Chez les athlètes féminines, des effets comme l'hypertrophie clitoridienne, une augmentation de l'appétit ainsi que de l'agressivité, l'apparition d'acné, des cycles menstruels irréguliers ou encore une perturbation de la libido ont été cités par les consommatrices.^[3]

Des recherches ont été effectuées afin de déceler les principaux domaines sur lesquels les SAA peuvent avoir une influence néfaste :

- **Système reproducteur :** Comme les SAA sont des dérivés de la testostérone, ils ont des effets importants sur le système reproducteur et les hormones sexuelles. Chez l'homme, cela peut mener à une hypertrophie des testicules et une diminution de la quantité et de la qualité de sperme. Une administration au-delà des doses thérapeutiques peut mener à une infertilité temporaire et à l'impuissance. Tous ces effets sont réversibles mais dépendent de la durée de traitement et des doses administrées.^[3]
- **Système cardiovasculaire :** L'abus des SAA peuvent mener à des troubles cardiovasculaires tels que le développement de cardiomyopathies, des accidents cérébraux vasculaires, des infarctus du myocarde, des thromboses ou encore à des morts subites.^[15]
- **Effets psychologiques :** La prise des stéroïdes augmente la dépendance au produit, l'agressivité, les changements d'humeur brutaux, la dépression ou encore la libido.^[3]

3. Détection d'un dopage à la nandrolone

3.1 Méthode GC-MS

Actuellement, les analyses de dépistage de la nandrolone se basent sur une quantification par GC-MS de NA après déconjugaison du glucuronide.^[16]

L'urine est tout d'abord extraite à l'aide d'une colonne d'extraction sur support solide C₁₈. Les métabolites subissent ensuite une hydrolyse enzymatique par β -Glucuronidase d'E. Coli. Les métabolites sont alors séparés par une extraction liquide/liquide avec du méthyltertbutyl éther (TBME). Après évaporation de la phase organique, du N-méthyl-N-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (MSTFA) est ajouté comme réactif de dérivation ce qui a pour but de rendre les composés moins polaires pour abaisser leur point de vaporisation.

Les inconvénients de la méthode actuelle sont les étapes d'hydrolyse et de dérivation. En effet, ces deux étapes ne sont pas contrôlées et peuvent ne pas être complètes ou encore modifier la structure des métabolites. De plus, cette méthode fait perdre l'information du métabolisme par l'hydrolyse de la conjugaison glucuronide et ne tient également pas compte des conjugués sulfates. Il se pose également le

problème de la présence de NA présente naturellement dans le corps et qui peut être pris en compte lors de la quantification.

La technique par LC-MS/MS n'occasionne pas de modifications sur la molécule de base et permettrait donc une quantification directe des métabolites de la nandrolone dans l'urine pour y déceler un cas de dopage. A ce jour, seul l'analyse des formes libres 19-NA et 19-NE est effectuée par LC/MS/MS.^[17]

3.2 Couplage LC-MS/MS

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode de séparation qui utilise une phase mobile et stationnaire très finement divisées sous une pression de plusieurs centaines de bars afin d'obtenir de grands débits constants pour limiter les pertes de charges dans la colonne.^[18]

Les principaux constituants de la HPLC sont :

- *le dispositif de pompage* qui doivent permettre d'obtenir des pressions allant jusqu'à 420 bars, à des débits compris entre 0.1 ml et 10 ml/min tout en supprimant les pulsations et en résistant à la corrosion due aux solvants.
- *le dispositif d'injection* de l'échantillon à l'aide de boucles interchangeables permettant de choisir les volumes d'échantillon compris entre 5 et 500 µl. Ce système permet d'obtenir une reproductibilité des volumes injectés.
- *le fritté* qui est situé entre l'injecteur et la colonne de garde afin de retenir les impuretés grossières.
- *la colonne de garde ou précolonne* qui est une courte colonne placée à l'avant de la colonne chromatographique. Ce dispositif permet de supprimer les poussières et les composés absorbants contenus dans les solvants et dans la matrice des échantillons pour augmenter la durée de vie de la phase stationnaire.
- *la colonne chromatographique* qui est constituée d'acier inoxydable d'une longueur allant de 3 à 30 cm, d'un diamètre interne de 1 à 10 mm avec des tailles particulières de 3 à 10 µm. Le matériau de remplissage le plus courant est de la silice, préparée en agglomérant des particules submicroniques de silice sous la forme d'agrégats plus gros, de diamètre uniforme. Ces micrograins sont souvent recouverts d'un mince film organique qui est physiquement ou chimiquement lié à la surface. Parmi les autres matériaux utilisés, figurent des particules constituées d'alumine, de polymères poreux ou de résines échangeuses d'ions.

Pour pouvoir détecter et quantifier les analytes, un spectromètre de masse (MS) est couplé à l'HPLC. La MS est une méthode de caractérisation de la matière reposant sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des analytes se trouvant dans les échantillons.

Une petite quantité de composé à analyser est transformée en ions par différentes technologies (ionisation par électrospray ou ionisation chimique à pression atmosphérique). Ensuite, ces ions sont soumis à un champ électrique ou magnétique sous vide poussé. Ces forces qui s'exercent sur les ions permettent d'obtenir leur rapport masse sur charge (m/z) caractéristique de la molécule.

Les différentes étapes de la MS sont les suivantes^[19] :

- *Ionisation* : l'échantillon est transformé en un nuage d'ions ou de vapeurs ionisée par un procédé adéquat dans la source de l'appareil.
- *Accélération* : les ions formés sont ensuite focalisés et accélérés à l'aide de lentilles pour accroître leur énergie cinétique.
- *Séparation* : les ions sont sélectionnés par rapport à leur rapport m/z par l'analyseur (ce dernier pouvant être combiné en série).
- *Détection* : les ions sélectionnés viennent frapper le capteur d'un détecteur et le signal résultant est proportionnel au rapport m/z des ions reçus.
- *Spectre* : le traitement du signal envoyé par le détecteur permet l'affichage du spectre de masse.

Un couplage LC-MS/MS constitue donc un outil précieux car il permet d'associer une méthode de séparation à une étude de la structure chimique d'un composé.

3.3 Ionisation à pression atmosphérique

La formation des ions a lieu dans une chambre d'ionisation. A cet effet, plusieurs méthodes sont utilisées. Le choix de la méthode est fonction de l'état physique et de la volatilité du produit ainsi que de la stabilité thermique des molécules. Un couplage direct est réalisé ce qui implique que la solution issue du chromatographe en phase liquide soit vaporisée à travers une source telle que l'ionisation par électrospray (ESI) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).^[20]

Le problème de base à résoudre lors d'un couplage entre un chromatographe liquide et un spectromètre de masse est l'augmentation de la pression dans la source due aux solvants. Deux autres problèmes peuvent également exister. Tout d'abord, il faut pouvoir transformer l'échantillon liquide en vapeur en utilisant un dispositif spécifique. Puis, il est impossible pour le spectromètre de masse de recevoir dans la source des quantités importantes de solvant sortant du chromatographe.

L'ionisation par ESI est une méthode, dite douce, car des ions monochargés, pseudo-moléculaires sont formés avant d'entrer dans le spectromètre.^[19]

Le principe de l'ESI, qui est une méthode d'ionisation à pression atmosphérique, repose sur le fait que le produit et le solvant sont transformés sous forme de gouttelettes à la sortie d'un capillaire de silice (Figure 6). Le système de vaporisation est composé de deux capillaires. D'une part le capillaire interne en silice qui est utilisé pour introduire l'échantillon dans la chambre d'ionisation. D'autre part, le capillaire externe en acier inoxydable qui permet de diffuser de l'azote et aide à la formation de fines gouttelettes.^[21]

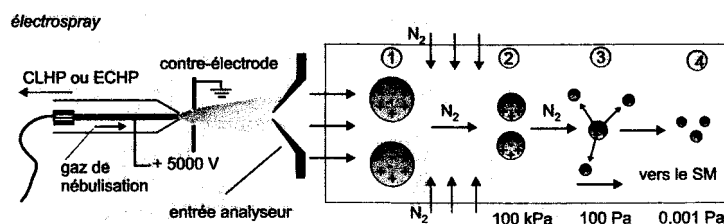


Figure 6 : Schéma du système ESI.^[19]

Durant le trajet vers le MS, la densité de charge électrique à la surface des gouttes augmente et la répulsion électrostatique est plus grande que la tension de surface. Ce processus provoque la division des gouttes en de fines gouttelettes. Ce mécanisme se répète jusqu'à créer un nuage d'ions qui est introduit dans le MS par le capillaire de transfert.^[22]

L'ESI produit malgré tout des espèces neutres ou des amas d'ions avec des molécules neutres qui doivent être séparés des ions à analyser avant l'introduction dans le MS. Pour cela, l'utilisation d'un courant de gaz d'azote permet de conduire les éléments chargés vers l'orifice du détecteur à l'aide d'un champ électrique.^[23] Un cône métallique à l'entrée du détecteur MS permet également de faire une barrière mécanique contre les gouttes résiduelles et les impuretés.^[22] Les spectres obtenus par ESI présentent des pics aux ions monochargés de type $[M+H]^+$ en mode positif et de type $[M-H]^-$ en mode négatif.

3.4 Analyseurs MS

Les analyseurs MS couplés à la LC fonctionnent grâce à un champ électrique et se basent sur l'utilisation de filtres quadripolaires pour trier et sélectionner les ions. Pour l'identification de chaque substance, deux spectres de masse peuvent être obtenus. Tout d'abord un spectre MS^1 qui donne le spectre de masse général de ce qui est injecté. Ensuite, le spectre MS^2 obtenu par le couplage MS/MS qui permet d'obtenir une meilleure sensibilité et sélectivité afin d'identifier et quantifier les produits à analyser. En effet, il est possible de fragmenter l'ion pseudo-moléculaire préalablement choisi afin d'obtenir ses ions fils caractérisant la molécule. Typiquement, l'énergie de collision est sélectionnée lorsque l'intensité du pic de l'ion parent est de faible intensité par rapport aux ions-fils formés.

Pour chaque substance à analyser, une optimisation des paramètres du MS est effectuée en polarité négative ou positive afin d'obtenir le pic de base $[M-H]^-$ le plus intense pour effectuer une transition vers un ion-fils sélectionné. Il s'agit tout d'abord de la pression du sheat gaz et du gaz auxiliaire. Ces deux pressions interviennent notamment lors de la nébulisation du mélange. Un des gaz est présent lors de l'entraînement du mélange à travers le capillaire d'introduction dans la chambre de nébulisation et l'autre est situé dans la gaine du capillaire aidant à la formation des fines gouttelettes du mélange. La focalisation des ions à travers le MS qui est réglée automatiquement (*tube lens offset*) lors des procédures initiales (*tuning*) peut également améliorer l'intensité du pic sélectionné

3.4.1 Triple Stage Quadrupole (TSQ)

Le système à trois quadripôles est réalisé en combinant trois analyseurs en série (Figure 7). Chaque quadripôle est composé de quatre barres de section hyperbolique raccordées électriquement deux à deux entre lesquelles une tension est appliquée. Une séparation des ions est possible selon les composantes des vecteurs vitesse et la variation des champs électriques appliqués sur les filtres quadripôlaire.^[24]

Le premier quadripôle (Q1) a un rôle de filtre en offrant la possibilité de sélectionner un ion précurseur par son rapport m/z . Puis, le quadripôle central (Q2) constitue la chambre de collision et possède un rôle de focalisateur.^[19] Enfin, le troisième quadripôle (Q3) possède également un rôle de filtre en permettant de sélectionner un rapport m/z propre à un ion fils afin d'observer une transition spécifique.

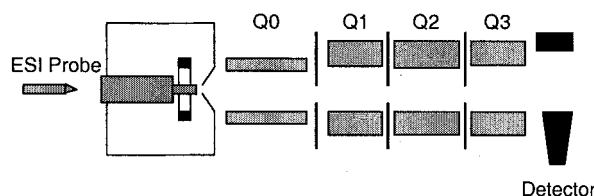


Figure 7 : Schéma du TSQ.^[25]

3.4.2 Linear Trap Quadrupole (LTQ)

Dans le cas de la trappe (Figure 8), les ions sont confinés entre des électrodes de formes particulières, sous l'effet d'un champ électrique variable.

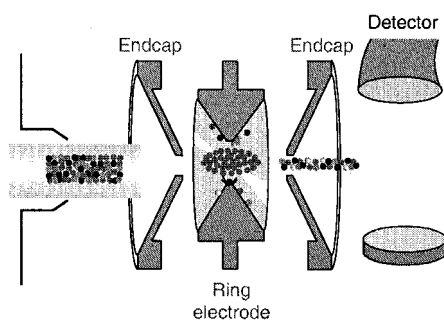


Figure 8 : Schéma du LTQ.^[25]

Le volume délimité par les électrodes constitue à la fois la source et le filtre de masse. Le principe est que l'analyte qui est introduit dans la cavité est ionisé par un bombardement de très courte durée défini par une électrode de contrôle. Une radiofréquence fixe est appliquée aux ions sous une faible pression d'hélium. Les ions formés dans la source sont ainsi confinés selon des trajectoires complexes.^[24]

L'analyse des ions se fait en les extrayant dans l'ordre des masses croissantes par augmentation des tensions continues et alternatives. Les ions qui traversent l'électrode de sortie, percée en son centre, atteignent le détecteur.

II. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail de diplôme est de développer une méthode d'analyse des métabolites conjugués de la nandrolone par LC-MS/MS. La méthode actuelle par GC-MS reste robuste et performante mais elle inclut des étapes d'hydrolyse et de dérivation qui modifient les métabolites avant leur détection. De plus, seule la NA sous forme déconjuguée est quantifiée pour déclarer un cas positif à la nandrolone ce qui peut amener à discuter sur la présence endogène de ce métabolite dans le corps.

Ainsi, différentes colonnes d'extraction sur phase solide (SPE) ont été testées afin d'isoler les métabolites conjugués. Puis, différentes méthodes d'extraction ont été développées afin d'obtenir le meilleur rendement dans l'eau avant une application sur une matrice urinaire.

Cette méthode simple permet une analyse et une quantification directes des composés sans devoir modifier leur structure chimique. Cela permet de conserver des informations précieuses sur le métabolisme de phase II de la nandrolone.

Ces informations pourraient permettre l'identification de marqueurs plus spécifiques afin de discriminer, à basse concentration, une prise de nandrolone d'une production endogène du stéroïde.

III. PARTIE EXPERIMENTALE

1. Analyse des métabolites de la nandrolone par LC-MS/MS

1.1 Echantillons

Les échantillons d'urine négative utilisée lors des tests d'extractions ont été fournis par un enfant caucasien de sexe féminin âgé de 4 ans. Les urines négatives utilisées lors des tests sur l'effet de matrice ont été fournies par six adultes de sexe masculin, âgés de 23 à 35 ans, pesant entre 67 et 75 kg. Tous les échantillons ont été collectés dans des flacons de 20-50 ml et conservés à -20°C avant leur utilisation.

1.2 Produits et solvants

Les analytes 5 α -Estran-3 α -ol-17-one glucuronide (NAG), 5 α -Estran-3 α -ol-17-one glucuronide sulfate (NAS), 5 β -Estran-3 α -ol-17-one glucuronide (NEG) et 5 β -Estran-3 α -ol-17-one sulfate (NES) ainsi que les standards internes d₄-5 α -Estran-3 α -ol-17-one glucuronide (d₄NAG) et d₄-5 α -Androstan-3 α -ol-17-one sulfate (d₄AS) proviennent de chez NARL (Pymble, Australie). Le méthanol (99.9%), l'acide formique (p.a. 89-91%), l'acétate de sodium (99%) et l'acide chlorhydrique (37%) proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide acétique (99.9%), le tetrahydrofurane (99.5%) et l'hydroxyde d'ammonium (28%) proviennent de chez Fluka (Buchs, Suisse). L'acétonitrile (99.9%) provient de chez Biosolve (Valkenswaard, Pays-Bas). L'eau Ultrapure a été obtenue par un système Synergy 185 muni d'un système defiltre Simpact 2 (Millipore, Billerica, USA). Le gaz de collision, l'hélium 99% Alphagaz, est fourni par Carbagaz (Domdidier, Suisse). L'azote est produit par un générateur N₂-Mistral-O de chez DBS Analytical Instruments (Vigonza, Italie).

1.3 Appareillage

Les échantillons ont été tout d'abord centrifugés sur un appareil Heraeus Multifuge 3s provenant de chez Kendro (Osterode, Allemagne). Les extractions ont été développées sur des colonnes HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance), MAX (Mixed-mode Anion-eXchange and reversed phase sorbent for acids) et WAX (Mixed-Mode Weak Anion-eXchange and Reversed-Phase Sorbent for Strong Acids) (60 mg, diamètre des particules : 30 µm), provenant de chez Waters (Milford, USA) et sur des colonnes C₁₈ de 6 ml contenant 500 mg d'octadécylsilane Bakerbond SPE provenant de chez JT Baker (Deventer, Hollande). Puis, les solvants des échantillons ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur à flux d'azote Turbo Vap LV de chez Zymark (Hopkinton, USA).

Les analyses sont effectuées par LC-MS/MS composé d'une pompe Rheos 2000 CPS-LC system (Flux Instrument, Bâle, Suisse) muni d'une colonne chromatographique C₁₈ Uptisphere 120Å ODB (150 mm x 3.0 mm, 5 µm) provenant de chez Interchim (Montluçon, France) précédée d'une colonne de garde Uptisphere ODB (10 mm x 4.0 mm, 5 µm) provenant de Interchim (Montluçon, France). Un fritté (0.5 µm) de chez Agilent (Palo Alto, USA) est également placé entre l'injecteur et la colonne d'analyse afin de retenir les impuretés grossières.

Ce système est couplé à une trappe linéaire (LTQ-MS, ThermoFinnigan, San Jose, USA) munie d'une source d'ionisation ESI ion MAX. L'autre système se compose d'une pompe Rheos 2200 LC system (Flux Instrument, Bâle, Suisse) couplé à un triple quadripôle (TSQ-MS, ThermoFinnigan, San Jose, USA) avec les mêmes sources ESI et APCI. Ces deux systèmes sont équipés d'un autosampler HTS PAL de chez CTS Analytics (Zwingen, Suisse).

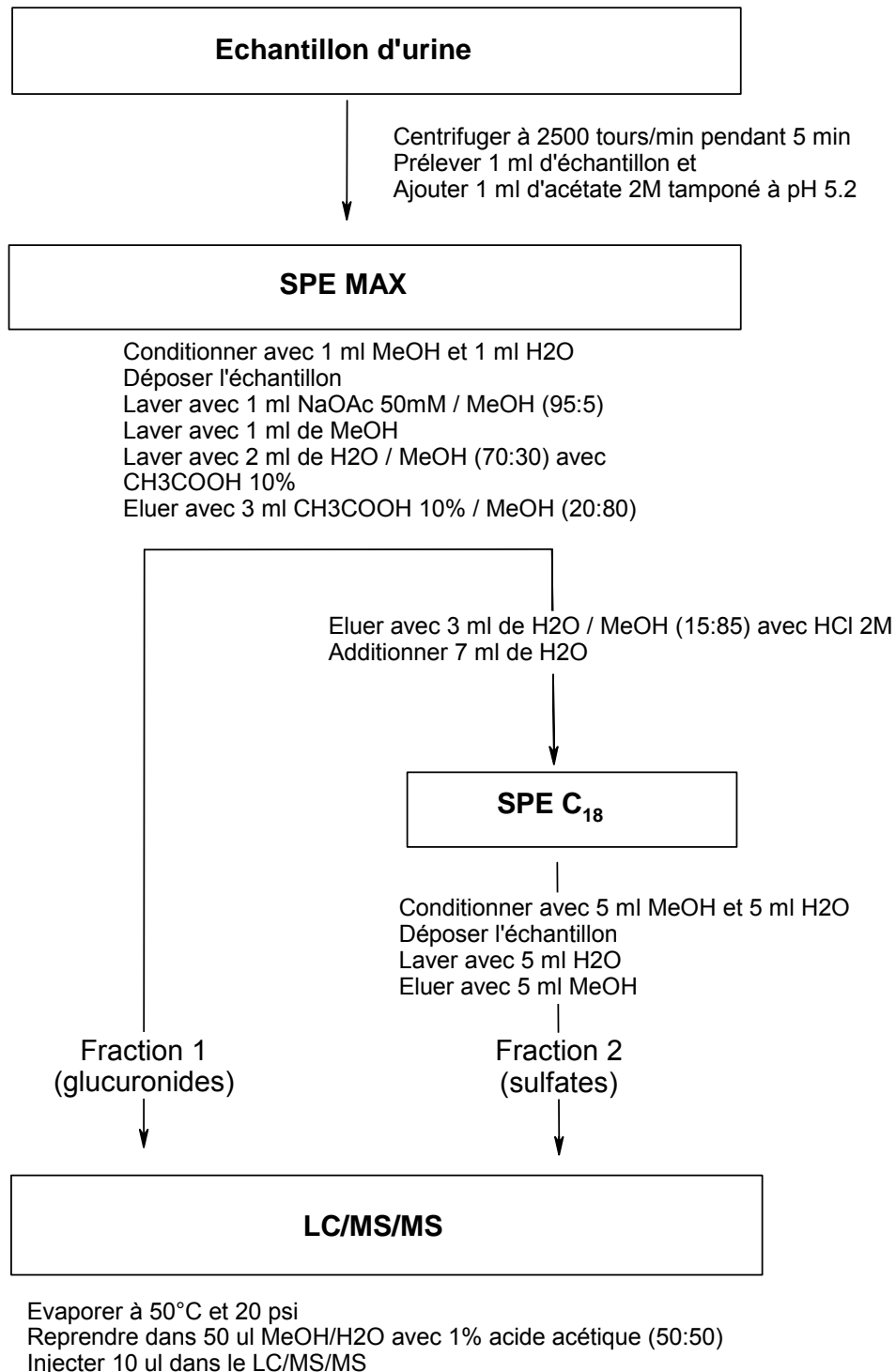
2. Extraction SPE

Trois procédures d'extraction ont été développées sur différents supports solides composés de polymères fonctionnalisés.

2.1 Mode opératoire pour l'extraction par colonne MAX

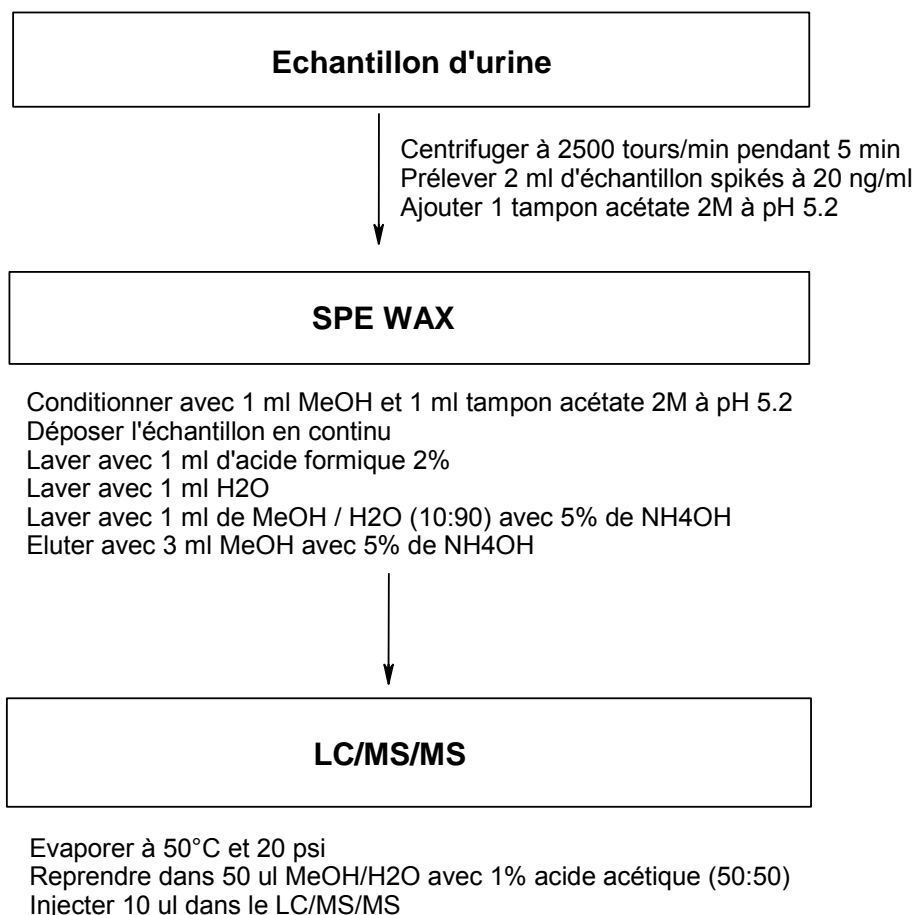
- Prélèvement de 2 ml d'une urine préalablement centrifugée à 2500 tours/minute pendant 5 minutes.
- Ajout de 10 ng/ml de métabolites glucuronides et 2 ng/ml de sulfates provenant d'une solution standard dans MeOH.
- Addition de 1ml de tampon acétate 2M à pH 5.2 (par HCl).
- Conditionnement des colonnes MAX avec 1ml de MeOH et 1ml de H₂O.
- Dépôt de l'échantillon d'urine sur la colonne.
- Lavages successifs avec 1 ml NaOAc 50mM / MeOH (95:5), 1 ml de MeOH et 2 ml de H₂O / MeOH (70:30) avec 10% de CH₃COOH.
- Elution de la fraction glucuronide avec 3 ml de CH₃COOH 10% / MeOH (20:80).
- Elution de la fraction sulfate avec 3 ml de H₂O / MeOH (15:85) avec HCl 2M.

- Addition de 7 ml de H₂O.
- Conditionnement des colonnes C₁₈ avec 5 ml de MeOH et 5 ml de H₂O.
- Dépôt des échantillons et lavage avec 5 ml de H₂O.
- Elution de la fraction sulfate avec 5 ml de MeOH.
- Evaporation des deux fraction à 50°C sous une pression de 20psi puis reprise dans 100 µl de MeOH / CH₃COOH 1% (50:50) avant l'injection dans le LC-MS/MS.



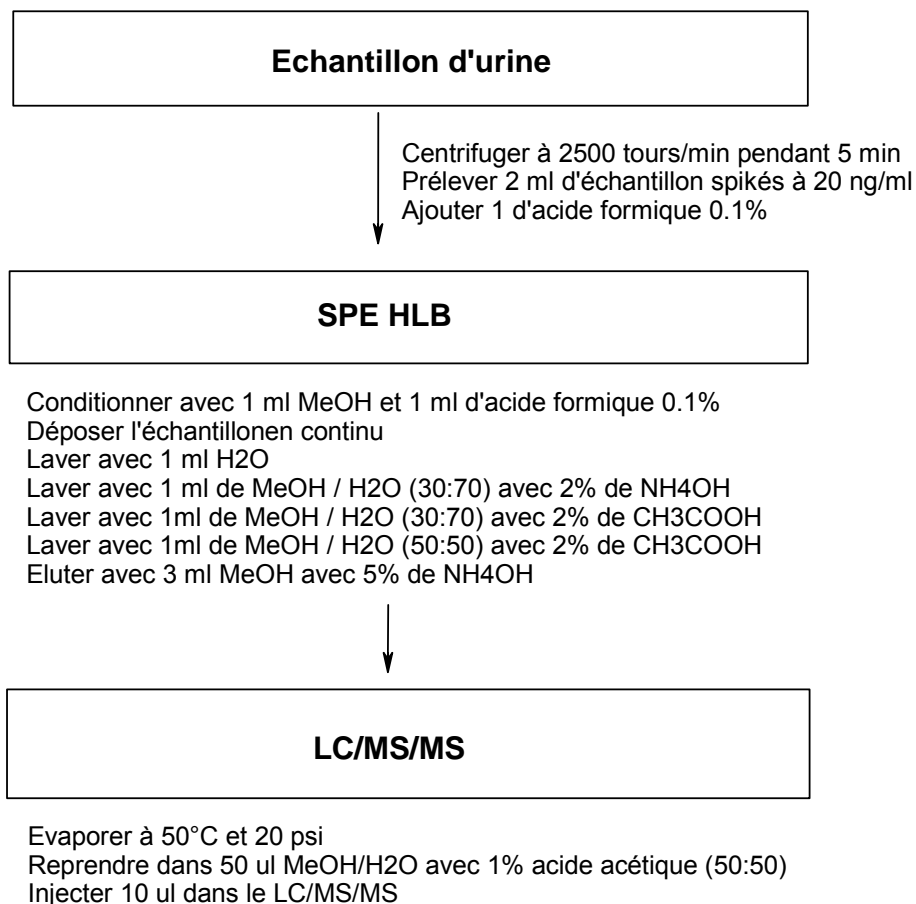
2.2 Mode opératoire pour l'extraction par colonne WAX

- Prélèvement de 2 ml d'une urine préalablement centrifugée à 2500 tours/minute pendant 5 minutes.
- Ajout de 20 ng/ml de métabolites glucuronides et sulfates provenant d'une solution standard dans MeOH.
- Addition de 1ml de tampon acétate 2M à pH 5.2 (par HCl).
- Conditionnement des colonnes WAX avec 1ml de MeOH et 1ml du tampon acétate 2M à pH 5.2
- Dépôt de l'échantillon d'urine en continu sur la colonne.
- Lavages successifs avec 1 ml d'acide formique 2%, 1 ml de H₂O et 1 ml de MeOH / eau (10:90) avec 5% de NH₄OH.
- Elution avec 3 ml de MeOH avec 5% de NH₄OH.
- Evaporation à 50°C sous une pression de 20psi puis reprise dans 50 µl de MeOH / CH₃COOH 1% (50:50) avant l'injection dans le LC-MS/MS.



2.3 Mode opératoire pour l'extraction par colonne HLB

- Prélèvement de 2 ml d'une urine préalablement centrifugée à 2500 tours/minute pendant 5 minutes.
- Ajout de 20 ng/ml de métabolites glucuronides et sulfates provenant d'une solution standard dans MeOH.
- Addition de 1ml d'acide formique 0.1% a été ajouté.
- Conditionnement des colonnes HLB avec 1ml de MeOH et 1ml d'acide formique 0.1%.
- Dépôt de l'échantillon d'urine en continu sur la colonne.
- Lavages successifs avec 1 ml d'H₂O, 1 ml de MeOH / H₂O (30:70) avec 2% de NH₄OH, 1ml de MeOH / H₂O (30:70) avec 2% de CH₃COOH et 1ml de MeOH / H₂O (50:50) avec 2% de CH₃COOH.
- Elution avec 3 ml de MeOH avec 5% de NH₄OH.
- Evaporation à 50°C sous une pression de 20psi puis reprise dans 50 µl de MeOH / CH₃COOH 1% (50:50) avant l'injection dans le LC-MS/MS.



3. Identification et quantification des analytes par LC-MS/MS

Tout le développement de ce travail a été effectué sur le LTQ. Les analyses MS et MS/MS des métabolites (NAS, NES, NAG et NEG) et des standards internes (d₄AS et d₄NAG) ont été obtenues en mode négatif. Le mode positif donne des signaux de plus basses intensités à concentration égale de métabolites. Une analyse des spectres de masse a également été réalisée sur le TSQ afin de comparer les performances des deux appareils.

3.1 Paramètres LC

Le volume d'injection est de 10 µl pendant un temps d'analyse de 15 minutes avec un débit de la phase mobile de 700 µl/min et un gradient décrit par le tableau 1.

Tableau 1 : Gradient des concentrations constituant la phase mobile.

Temps [min]	MeOH [%]	CH ₃ COOH 1% [%]
0	50	50
12.00	23	77
12.10	0	100
14.00	0	100
14.01	50	50
15.00	50	50

3.2 Paramètres MS/MS

Les paramètres du LTQ et TSQ par la source ESI sont résumés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Paramètres du LTQ et TSQ (ESI, -).

	Voltage Electrospray [V]	Voltage Capillaire [V]	Température Capillaire [°C]	Pression Gaz de la source [Torr]	Pression Gaz auxiliaires [Torr]	Voltage du tube de la lentille [V]
LTQ	5	-9	300	40	10	-100
TSQ	4	-10	250	48	25	-150

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Spectrométrie de masse MS et MS/MS

1.1 Analyses MS par LTQ

Les spectres MS² ont été obtenus sur le LTQ en sélectionnant des transitions et des énergies de collision suffisantes pour la fragmentation de l'ion parent (Tableau 3).

Tableau 3 : Transitions et énergies de collision sélectionnées pour l'analyse MS par LTQ.

	Ion parent [m/z]	Energie de collision ^a [%]	Ion fils [m/z]	Activation Q ^b [-]	Temps d'activation [ms]
NAG	451.4	25	433.2	0.2	30
NEG	451.4	35	433.2	0.2	30
d ₄ NAG	455.4	30	437.4	0.2	30
NAS	355.3	38	96.8	0.2	30
NES	355.3	35	96.8	0.2	30
d ₄ AS	373.4	40	97.8	0.2	30

a : L'énergie de collision, donné en pourcent, permet de sélectionner les amplitudes de la radio-fréquence utilisées pour la fragmentation des ions.

b : L'activation Q permet de sélectionner la fréquence de la radio-fréquence pour la fragmentation des ions.

Lors du passage dans le spectromètre, le NAG est ionisée par la source ESI en mode négatif donnant l'ion [M-H]⁻ avec un m/z = 451 (Figure 9). La déprotonation a lieu sur la conjugaison glucuronide et non sur la structure stéroïdienne car la délocalisation de la charge négative par la fonction carbonyle permet de stabiliser l'ion.^[26] Le pic moléculaire possède ainsi le signal le plus intense sur le spectre MS¹ et des pics de plus faible intensité à 452, 453 et 454 sont également observables correspondant aux différents isotopes des atomes composant le NAG.

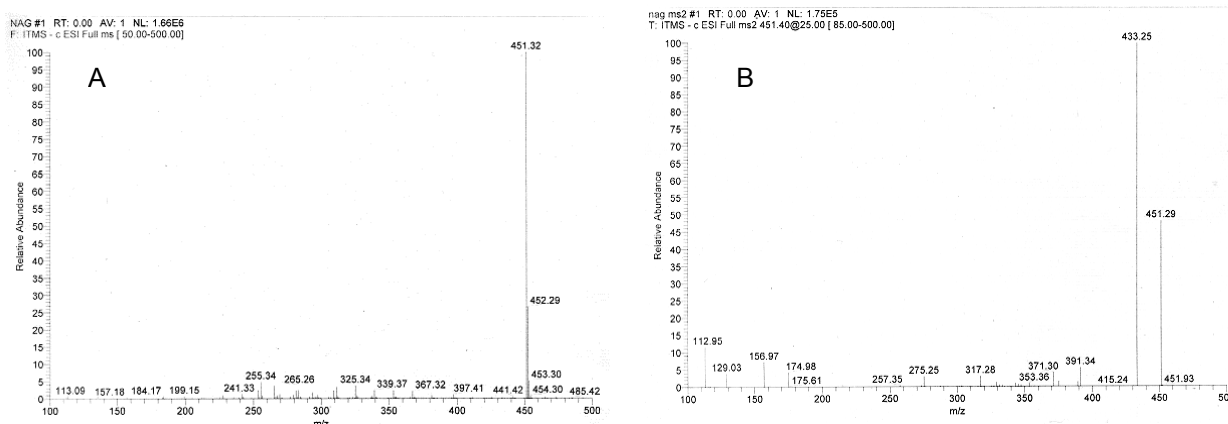


Figure 9 : Analyse par LTQ (A) MS¹ et (B) MS² de NAG avec l'ion précurseur m/z = 451.

Pour obtenir le spectre MS², l'ion parent a été soumis à une énergie de collision de 35 V afin que plusieurs ions fils soient produits. L'énergie de collision appliquée pour effectuer la fragmentation implique que le pic pseudo-moléculaire devient de faible. Le spectre MS2 présente de nombreux pics de faible intensité ainsi qu'un pic de base qui est à un m/z 433. Ce pic correspond à la perte d'une molécule d'eau de l'ion précurseur : $[M-H-H_2O]^-$.^[26]

Pour certains des pics observés sur les spectres, des hypothèses doivent être émises pour expliquer leur valeur m/z. Ainsi, les pics à m/z 317 et 391 correspondraient à différentes fragmentations subies par la conjugaison glucuronide (Figure 10).^[27] Ces deux fragmentations seraient spécifiques à la molécule du NAG car ils caractérisent la liaison entre la partie stéroïde et le glucuronide. Mais, du fait de leur faible intensité, ces transitions n'ont pas été choisies pour l'enregistrement du spectre.

La formation d'autres ions non-spécifiques du métabolite tels que les signaux à m/z 275 et 257 pourrait être représentée sur le spectre. Ces deux fragments définiraient la perte de la conjugaison glucuronide selon la position de la rupture sur la liaison éther. Puis des fragments de la conjugaison glucuronide peuvent donner certains signaux tel que le pic à m/z 175 représentant la fonction glucuronide libre déprotonée $[Glu-H]^-$.^[27] Le glucuronide libre qui a perdu un proton et une molécule d'eau $[Glu-H-H_2O]^-$ pourrait être donné par le pic à m/z 157^[26] alors que le signal à m/z 113 correspondrait à la perte d'une molécule d'eau et de dioxyde de carbone $[Glu - H_2O - CO_2]^-$.^[27]

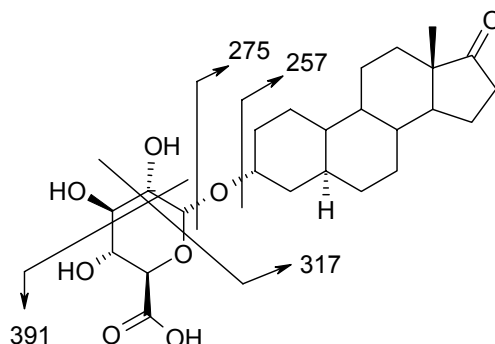


Figure 10 : Fragmentations du NAG.

Le NEG (m/z = 451) possède en principe les mêmes fragmentations que le NAG car ce sont deux énantiomères dont la seule différence dans la structure chimique réside dans l'orientation de l'hydrogène sur le carbone C-5 (Figure 11). Malgré tout, certains ions fils ne sont pas visibles comme pour le NAG tel que le pic à m/z 257.

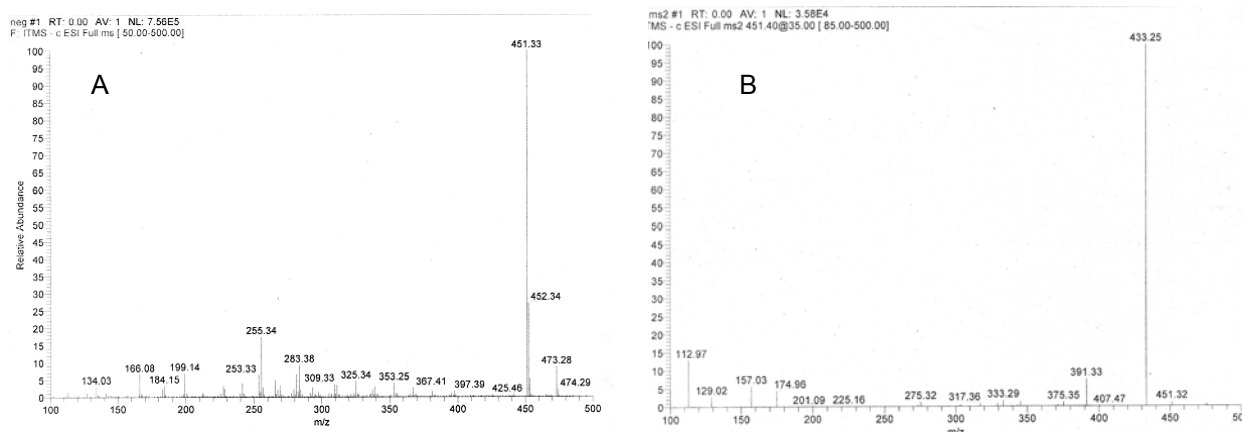


Figure 11 : Analyse par LTQ (A) MS¹ et (B) MS² de NEG avec l'ion précurseur m/z = 451.

Par contre, un autre ion pourrait être identifié à m/z 333 correspondant à une fragmentation au niveau du glucuronide donnant une information spécifique du métabolite (Figure 12).

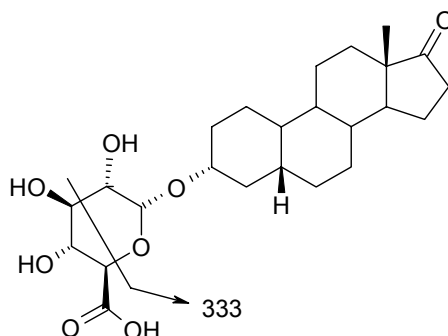


Figure 12 : Fragmentations du NEG pour m/z 333.

Des types de fragments similaires ont été obtenus avec le d₄NAG (m/z = 455). La seule différence est que les m/z correspondants sont augmentés de 4 unités en raison de la présence des quatre deutériums sur la structure.

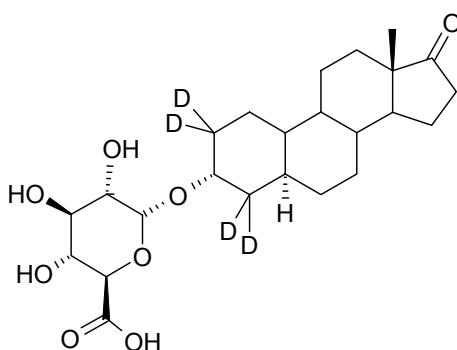


Figure 13 : Structure chimique du d₄NAG.

Les fragments sur la conjugaison glucuronide possèdent des valeurs de m/z identiques à celles obtenues pour le NAG et NEG (Figure 14).

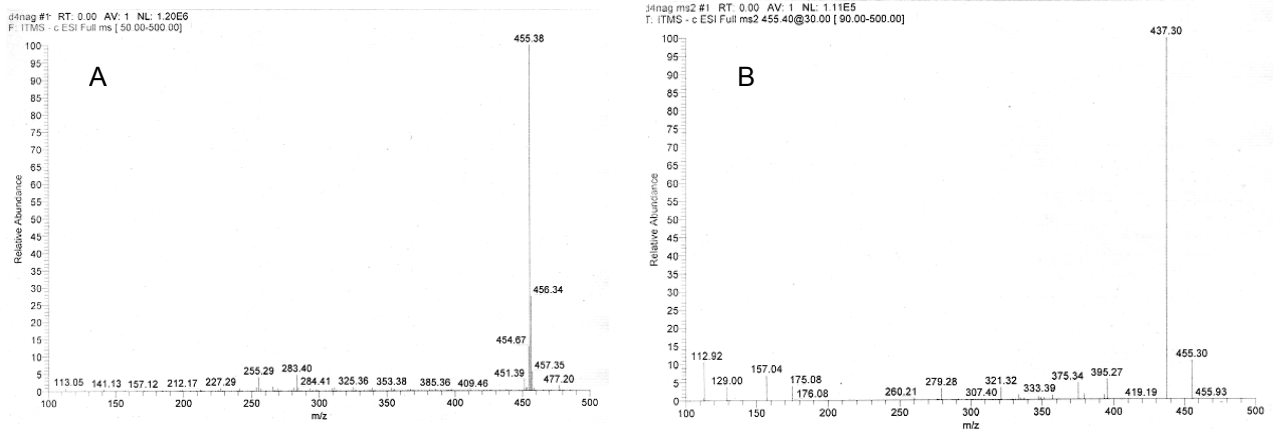


Figure 14 : Analyse par LTQ (A) MS¹ et (B) MS² de d_4NAG avec l'ion précurseur m/z = 455.

Ensuite, le spectre MS² de NAS et NES (m/z = 355) ont été analysés (Figures 15). L'ionisation du métabolite est obtenue par le départ de l'hydrogène sur la fonction sulfate.

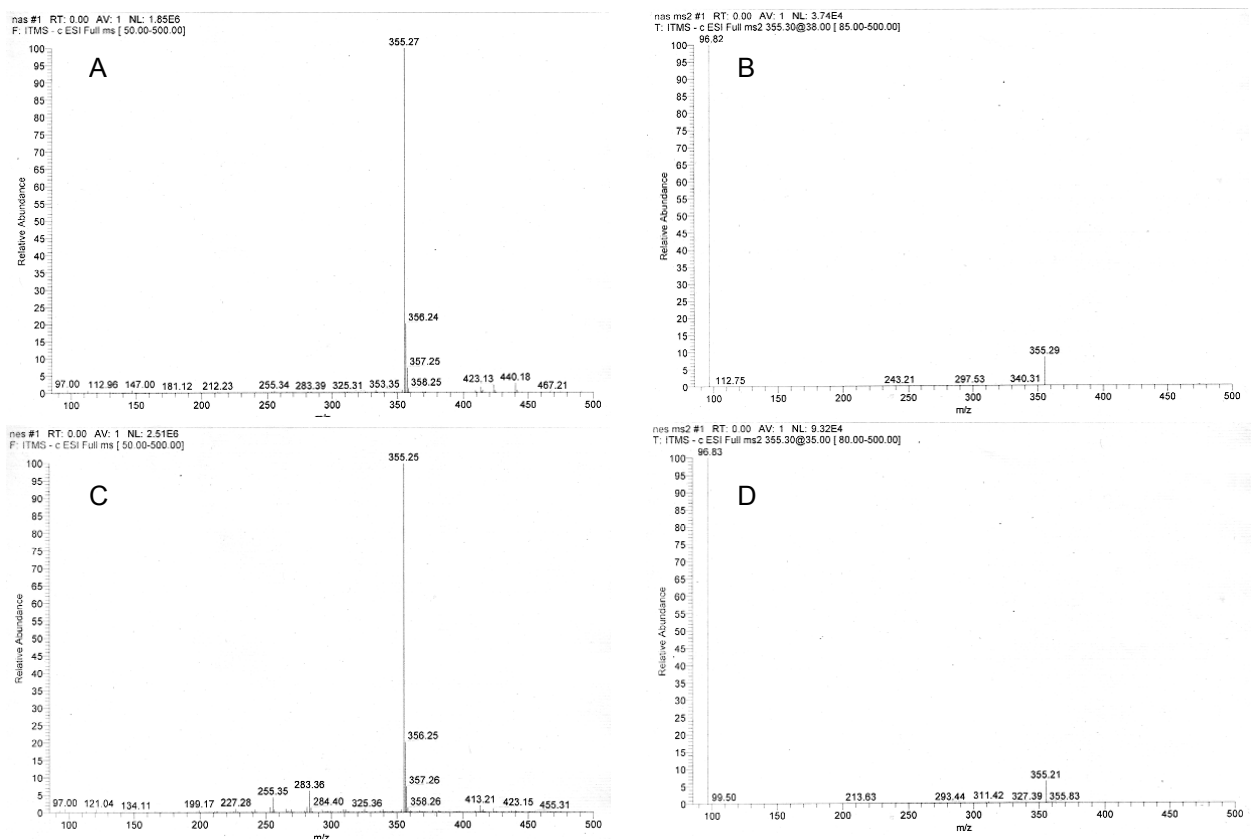


Figure 15 : Analyse par LTQ (A) MS¹ et (B) MS² de NAS et (A) MS¹ et (B) MS² de NES avec l'ion précurseur m/z = 355.

La liaison de la conjugaison sulfate sur le noyau stérol est rompue par l'énergie de collision appliquée sur l'ion parent (Figure 16). Le signal à m/z 97 observé sur les spectres MS^2 indique que l'ion sulfate est en abondance.

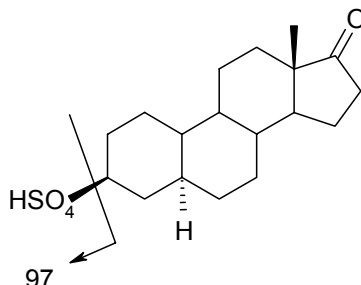


Figure 16 : Fragmentation du sulfate sous forme d'hydrogénosulfate (m/z = 97).

Le signal correspondant à l'ion sulfate n'est pas caractéristique de la molécule NAS et NES. Par contre, aucun pic caractéristique n'a pu être identifié.

Le d_4AS (m/z = 373) produit le fragment sulfate à un m/z 98 ce qui implique que l'hydrogène soit remplacé par l'un des quatre deutériums (Figure 17).

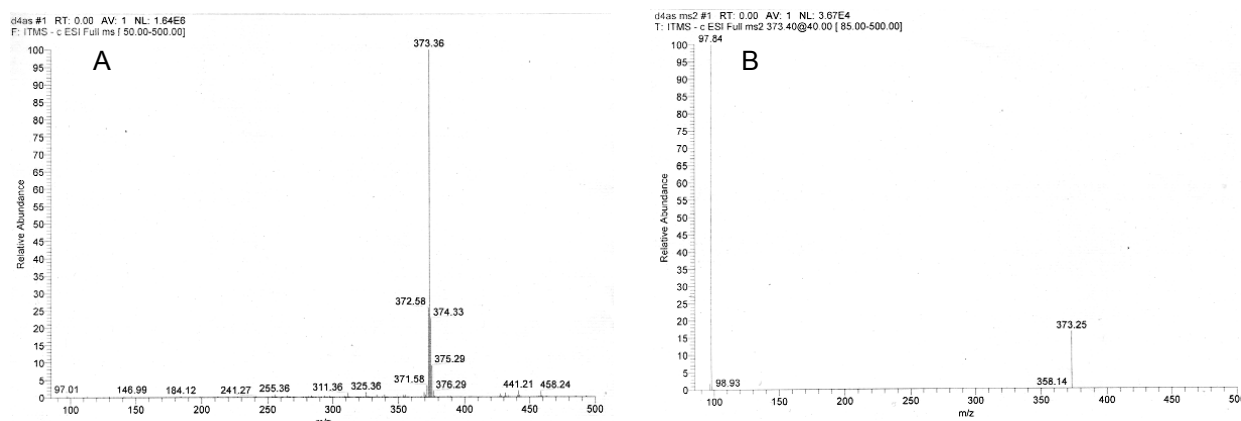


Figure 17 : Analyse par LTQ (A) MS^1 et (B) MS^2 de d_4AS avec l'ion précurseur m/z = 373.

Une hypothèse peut être émise concernant un échange entre un deutérium se trouvant sur les carbones C-2 ou C-4 et l'hydrogène de la fonction sulfate pour expliquer ce signal mais cela n'a pas été vérifié (Figure 18).

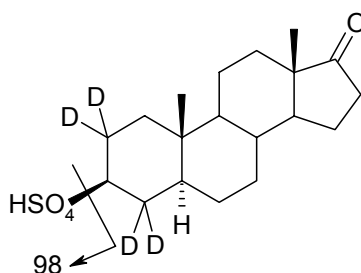


Figure 18 : Structure chimique du d_4AS .

1.2 Analyses MS par TSQ

Les spectres MS² ont été obtenus sur le TSQ en sélectionnant des transitions et des énergies de collision suffisantes pour la fragmentation de l'ion parent (Tableau 4).

Tableau 4 : Transitions et énergies de collision sélectionnées pour l'analyse MS par TSQ.

	Ion parent [m/z]	Energie de collision [V]	Ion fils [m/z]
NAG	451.4	40	433.2
NEG	451.4	38	433.2
d ₄ NAG	455.4	38	437.4
NAS	355.3	40	96.8
NES	355.3	40	96.8
d ₄ AS	373.4	40	97.8

Les spectres MS obtenus pour les énantiomères NAG et NEG sur le TSQ donnent certains fragments non observés par le LTQ (Figures 19).

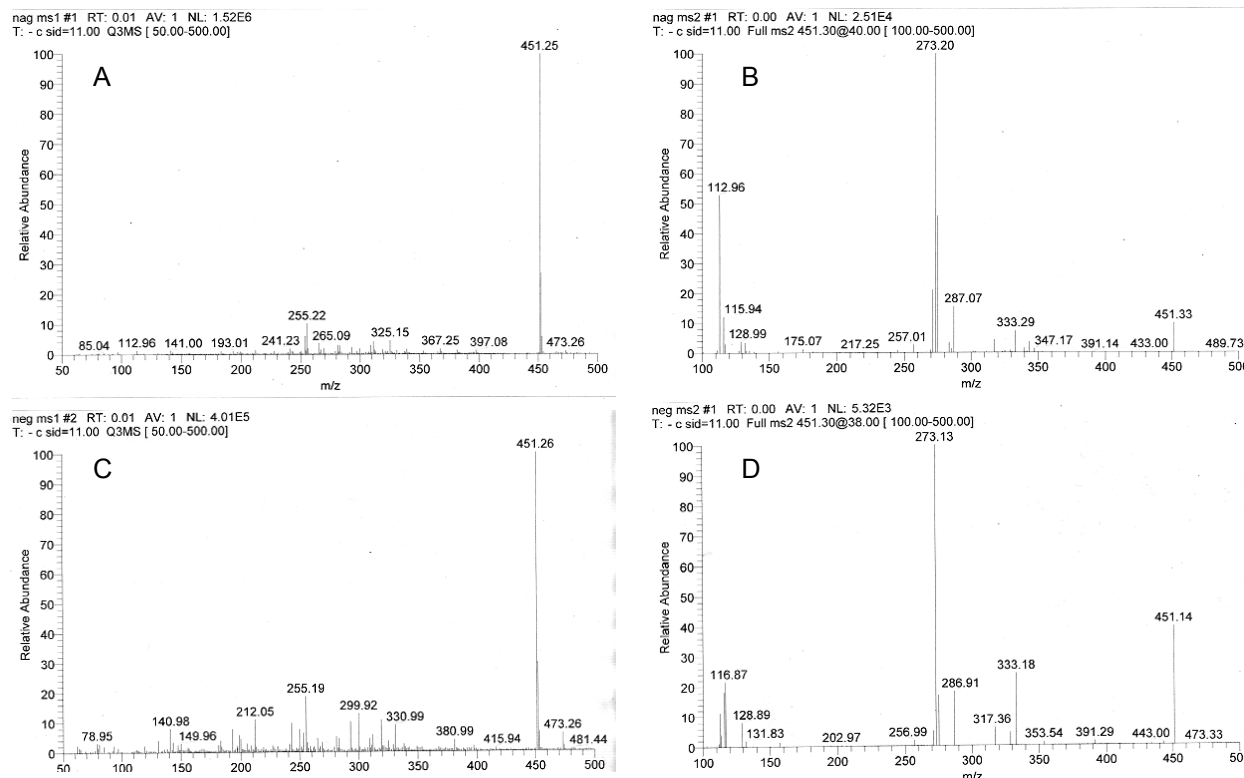


Figure 19 : Analyse par TSQ (A) MS¹ et (B) MS² de NAG et (A) MS¹ et (B) MS² de NEG avec l'ion précurseur m/z = 451.

Les pics à m/z 257, 273 et 287 peuvent être expliqués par les fragments suggérées à la figure 20.

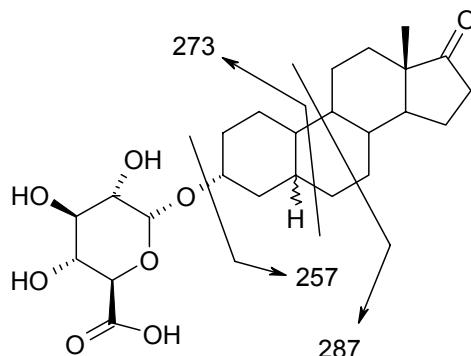


Figure 20 : Fragments du NAG et NEG par TSQ.

Le pic à m/z 257 serait le seul parmi ces trois signaux à ne pas caractériser spécifiquement les métabolites glucuronides car il pourrait être issu d'une molécule sous forme libre.

En ce qui concerne le d_4 NAG, les m/z des pics sont augmentés de 4 unités comme dans le cas du LTQ. Un pic à m/z 277 est présent sur le spectre MS^2 qui correspond à la fragmentation m/z 273 du NAG et NEG (Figure 21). Malgré tout, un pic de base à m/z 279 est observé sans proposition sur la structure du fragment.

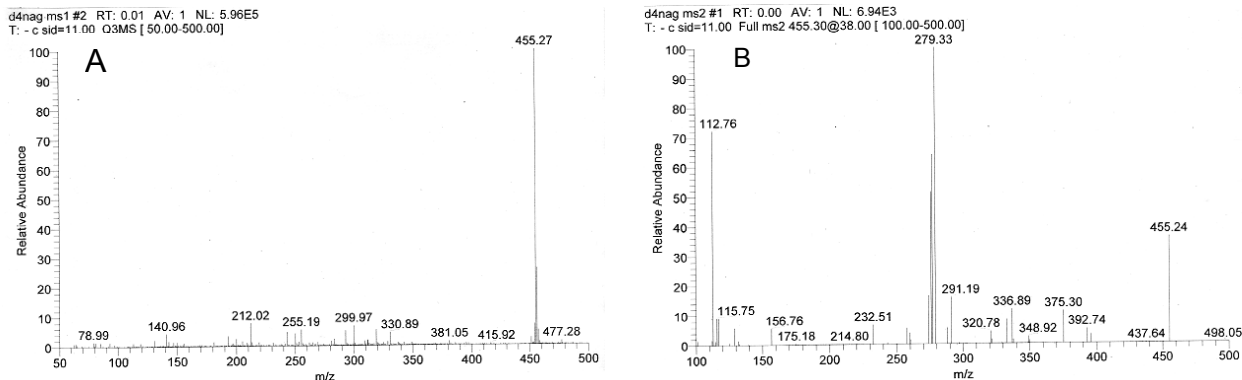


Figure 21 : Analyse par TSQ (A) MS^1 et (B) MS^2 de d_4 NAG avec l'ion précurseur $m/z = 455$.

Les spectres des métabolites sulfates révèlent également des m/z différents par rapport à ceux obtenus par le LTQ. Malgré tout, ces fragmentations n'ont pas pu être expliquées et ne donnent pas d'informations supplémentaires sur leur structure (Figures 22).

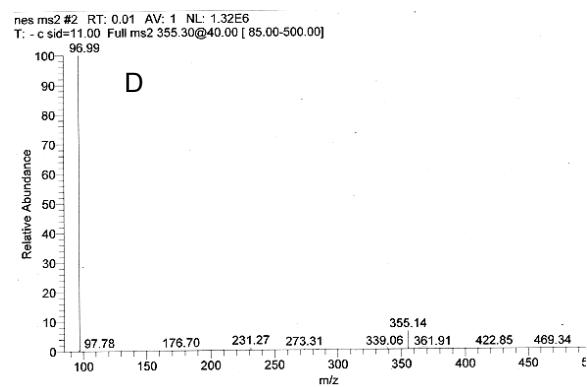
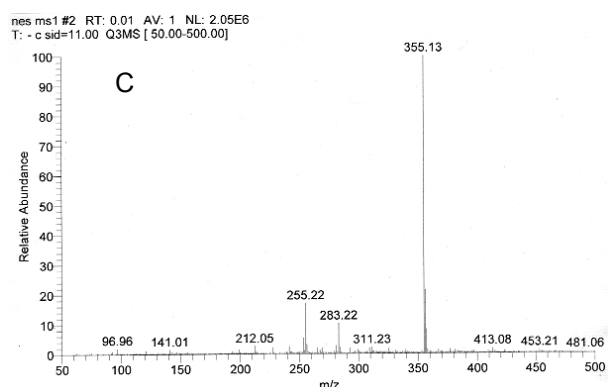
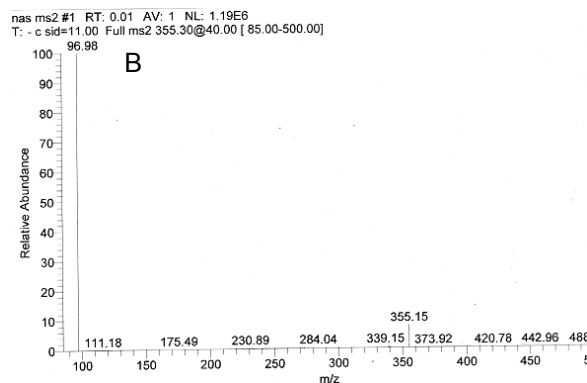
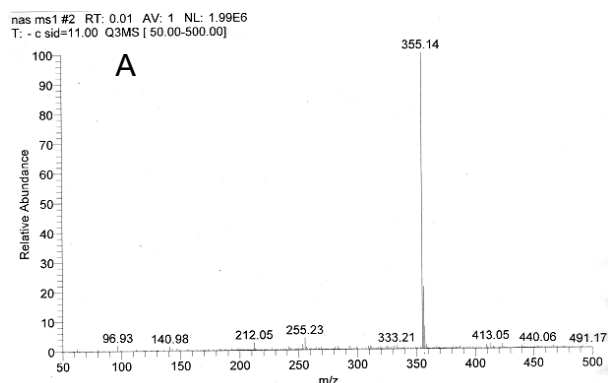


Figure 22 : Analyse par TSQ (A) MS¹ et (B) MS² de NAS et (A) MS¹ et (B) MS² de NES avec l'ion précurseur m/z = 355.

L'analyse MS du d₄AS par TSQ présente plus de signaux que l'analyse par le LTQ, sur le même domaine des rapports m/z (Figure 23). On peut expliquer ceci par le fait que l'intensité des signaux est moins élevée et que les traces données par les ions minoritaires sont plus visibles.

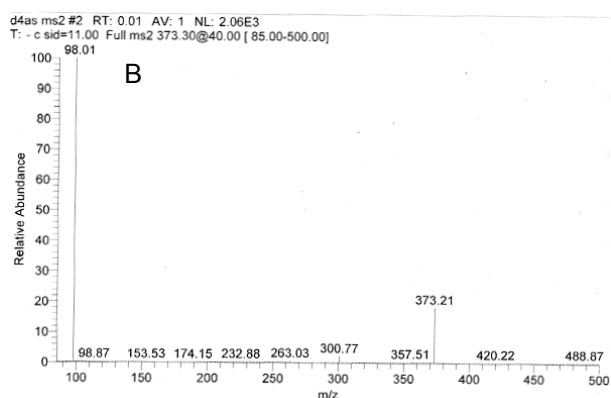
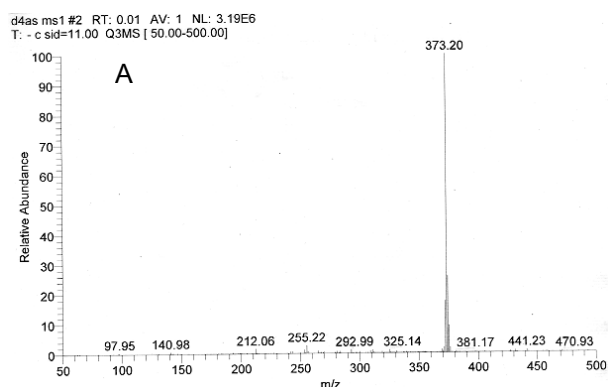


Figure 23 : Analyse par TSQ (A) MS¹ et (B) MS² de d₄AS avec l'ion précurseur m/z = 373.

2. Interprétation des chromatogrammes du LC

Le gradient optimisé permet de séparer tous les métabolites et notamment les couples d'isomères que sont NAG/NEG et NAS/NES. Des tests d'élution par une phase mobile ternaire Acétonitrile/Méthanol/Tampon carbonate (1:1:2) avec acide formique 10 mM et carbonate d'ammonium 5 mM ont été effectués mais aucune amélioration de la résolution ou d'intensité du signal n'a été observée.

Les premiers essais ont été effectués avec un débit de 400 µl/min mais les pics s'étaient sur une minute et leur profil n'était pas régulier. La pression à la sortie de la colonne était d'environ 150 bars. L'augmentation du débit à 700 µl/min a permis l'amélioration de deux paramètres. D'une part, la résolution des pics est améliorée. D'autre part, le temps d'analyse est diminué de 20 à 15 minutes (Figure 24). Ceci pour une pression en début de cycle d'environ 280 bars.

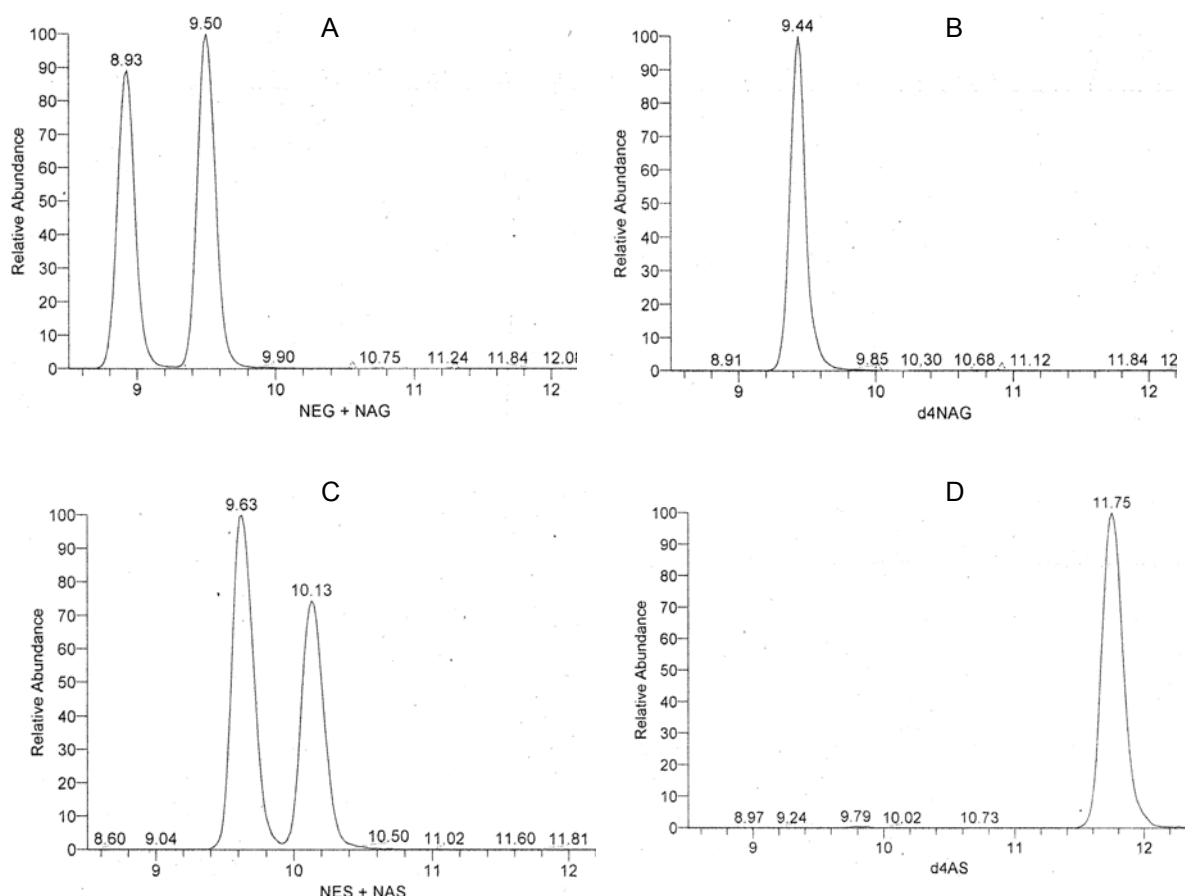


Figure 24 : Chromatogrammes par LTQ (ESI, -) d'une solution des substances d'intérêt à 20 ng/ml sur le avec un débit de la phase mobile de 700 µl/min pour (A) NEG et NAG, (B) d₄NAG, (C) NES et NAS et (D) d₄AS.

La séparation des énantiomères peut être caractérisée par la résolution entre les pics qui est déterminée par la formule :

$$\text{Résolution} = 2 \cdot (t_{R1} - t_{R2}) / w_1 + w_2$$

avec :

- t_R : temps de rétention [min]
- w : largeur du pic [min]

Plus la résolution est grande et meilleure sera la séparation. Pour le couple NAG/NEG, la valeur de la résolution est de 1.96 et la valeur pour le couple de NAS/NES est de 2.22 ce qui implique que la séparation des énantiomères est complète.

La limite de détection (LOD) de NAG, NEG et NAS ont été déterminées sur le LTQ et le TSQ en diminuant graduellement la concentration des métabolites dans un mélange MeOH / Eau 1% (50:50). La LOD est donnée par le rapport du signal du composé sur le bruit de fond qui doit être égal à 3.

Tableau 5 : LOD de NAG, NEG et NAS sur le LTQ et TSQ.

	LOD sur LTQ [ng/ml]	LOD sur TSQ [ng/ml]
NAG	0.01	1.00
NEG	0.10	1.00
NAS	0.01	0.10
d ₄ NAG	0.10	1.00
d ₄ AS	0.01	0.10

Les valeurs du LOD pour le LTQ sont dix fois inférieurs par rapport à celles du TSQ. Cela démontre que le LTQ est le plus sensible des deux appareils (Tableau 5). De nouvelles analyses devraient être effectuées sur d'autres instruments (validation inter-instrumentale) afin de confirmer la sensibilité des deux appareils.

Lors de l'analyse de nombreux échantillons urinaires, une diminution des temps d'élution a pu être observée dans une même séquence. Ceci est probablement causé par l'accumulation des impuretés dans les différentes parties de la LC-MS/MS tels que sur le fritté, dans la colonne chromatographique ou dans la colonne de garde. Les sites de la phase stationnaire sont donc occupés par d'autres composés et les métabolites possèdent moins d'interactions avec la colonne et sont donc plus rapidement élués. Toutefois, les diminutions des temps de rétention restent difficiles à expliquer car les écarts sont plus marquants pour les sulfates que les glucuronides.

Ainsi, des étapes de lavage réguliers par du MeOH tous les 5-6 échantillons ainsi que le remplacement des frittés ont été nécessaires pour l'acquisition de résultats reproductibles par rapport aux temps de rétention et à l'intensité du signal. Comme cette première méthode de lavage ne donnait pas des résultats satisfaisants, une nouvelle méthode de lavage a été développée avec successivement du méthanol, tétrahydrofurane, méthanol et acétonitrile avec acide acétique 1% (70:30). Cette

méthode a permis de révéler des signaux intenses sur le spectre MS du lavage démontrant que des impuretés ont été retenues sur la phase stationnaire de la colonne sans que les étapes de lavage habituelles ne puissent les supprimer. Par contre, cette méthode a permis de stabiliser les temps de rétention des composés analysés comme le montre le tableau 6 où l'ordre d'élution et les temps de rétentions moyens de chaque composé ont été déterminés. Les valeurs de 32 échantillons à une concentration de 100 ng/ml de chaque métabolite dans MeOH ont été utilisées.

Tableau 6 : t_R et coefficient de variation (c.v.) des analytes sur le LTQ (ESI, -) à 700 μ l/min.

n = 32	t_R [min]	c.v. [min]
NAG	8.88	0.06
NES	9.24	0.08
d ₄ NAG	9.41	0.06
NEG	9.47	0.06
NAS	9.73	0.08
d ₄ AS	11.27	0.10

3. Extraction sur phase solide (SPE)

3.1 Généralités

Les pKa des couples NAG/NEG et NAS/NES ont été calculés à l'aide d'un programmes informatiques (ACD, Adme-Boxes et Moka) par le Pr. P.-A. Carrupt du laboratoire de chimie thérapeutique-pharmacochimie de l'Université de Genève. D'après les trois programmes, le pKa de NAG et NEG est d'environ 2.9 tandis qu'il est de 1.9 pour NAS et NES.

L'objectif de l'analyse des métabolites de la nandrolone est d'isoler les conjugués glucuronides et sulfates à partir d'une matrice d'urine. Pour cela, des colonnes d'extraction HLB se basant sur les interactions hydrophobes puis des colonnes échangeuses d'anions MAX et WAX ont été testées. Ces colonnes sont composés de polymères récemment développés à des fins analytiques.^[28]

3.2 Colonne HLB

Les colonnes HLB sont composés de polymères macroporeux et présentent les propriétés d'interaction hydrophobe avec les analytes. La structure du HLB est décrite à la figure 25.

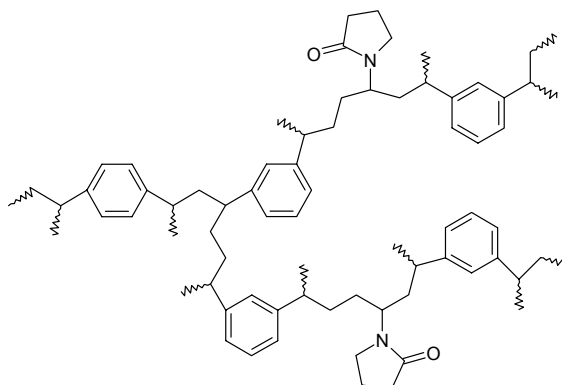


Figure 25 : Structure du polymère de la colonne HLB.

Le polymère de la surface de la colonne permet d'absorber simultanément les composés polaires et non-polaires à partir d'un échantillon aqueux.

3.3 Colonne MAX

Les colonnes MAX offrent les avantages d'avoir plusieurs paramètres d'interaction entre la phase solide et les analytes. D'une part, par le même principe que les colonnes HLB, les polymères composant la surface interne de la colonne (Figure 26) permettent des interactions hydrophobes. D'autre part, des groupes amines quaternaires constamment chargés facilitent l'échange d'anions dans la phase inverse ce qui permet une de jouer sur les interactions ioniques. Cela permet une meilleure sélectivité pour les acides faibles et forts.

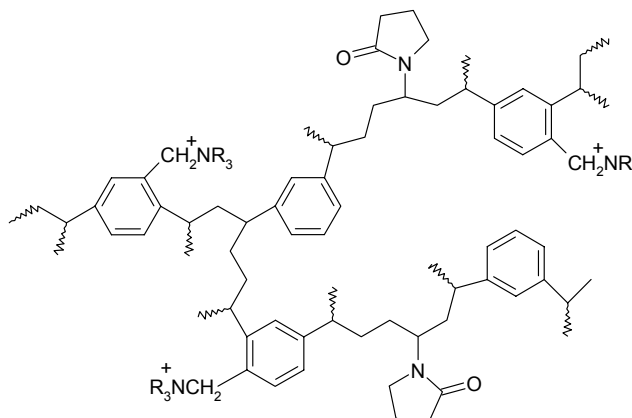


Figure 26 : Structure du polymère de la colonne MAX.

Les deux mécanismes responsables de la rétention sur la colonne peuvent être ainsi ajustés selon le pH de la phase mobile afin d'obtenir la meilleure adsorption (Figure 27). Le maximum de rétention est donc atteint lorsque les acides sont ionisés.

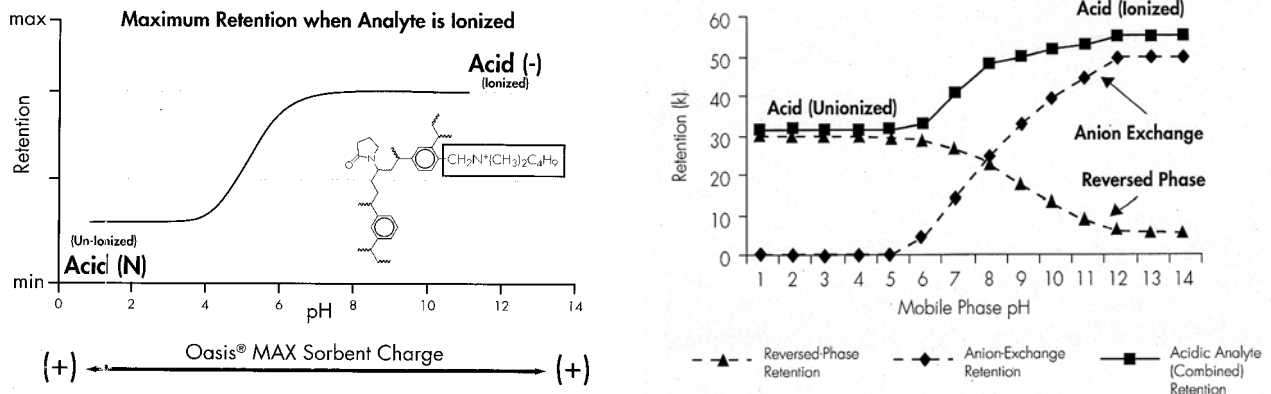


Figure 27 : Profils de rétention des acides selon le pH de la phase mobile.^[28]

3.4 Colonne WAX

Les colonnes WAX possèdent les mêmes propriétés que les colonnes MAX à savoir les interactions hydrophobes et les échanges d'ions avec les analytes. La différence réside dans le fait que la structure de la phase solide permet de neutraliser la charge du polymère (Figure 28).

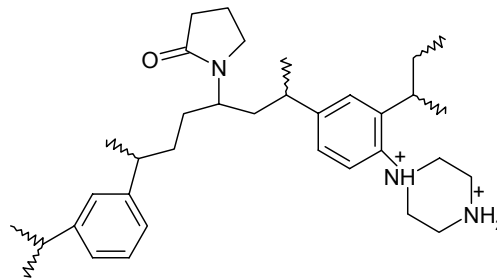


Figure 28 : Structure du polymère de la colonne WAX.

Ainsi le maximum de rétention est obtenu lorsque le polymère de la colonne est sous forme ionisée (Figure 29).

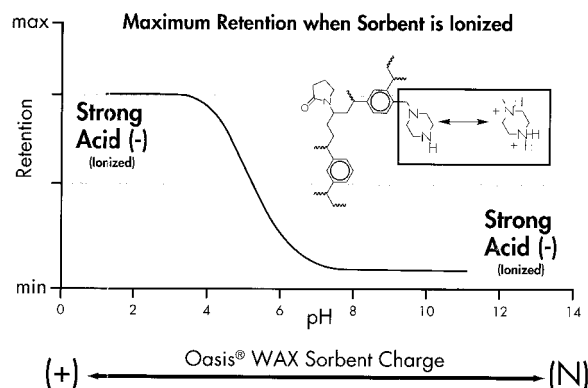


Figure 29 : Profil de rétention des acides selon le pH de la phase mobile.^[28]

3.5 Optimisation de la méthode d'extraction par SPE sur colonne HLB

Les méthodes d'extraction ont été développées à partir d'une méthode générique fournit par le fabricant des colonnes SPE.^[28] Divers modifications ont été apportées suite à des tests de lavage ou d'élution afin d'optimiser le rendement d'extraction des métabolites.

Après le conditionnement des colonnes par du MeOH et de l'eau, les échantillons d'urine sont acidifiés à l'aide de 1 ml d'acide formique 0.1% et déposés sur la colonne HLB. Le dépôt de l'échantillon a été effectué en continu pour ne pas laisser sécher les polymères afin d'optimiser les interactions entre la phase solide et les métabolites. Le débit de sortie de la colonne peut être grande car les interactions dues aux échanges d'ions n'ont pas lieu avec ce genre de phase solide.

Une étude sur la composition des solutions de lavage et d'élution a été effectuée. Dix solutions de 2% NH_4OH à dix concentrations comprises entre 0 et 90% en MeOH ont été utilisées pour extraire les métabolites. Des solutions avec 2% CH_3COOH ont également été testées (Annexe 1).

L'optimisation des étapes de lavages est illustrée par une représentation en deux dimensions (Figure 30).

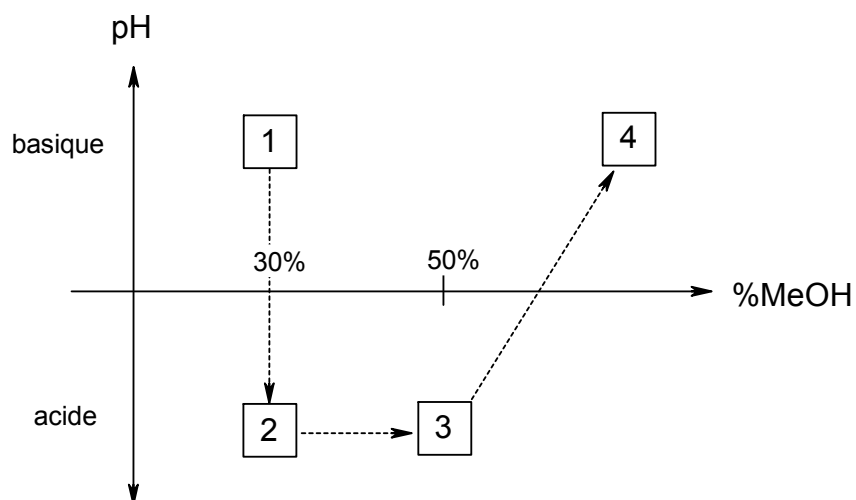


Figure 30 : Schéma des étapes de lavage avec HLB selon le pH et la concentration en MeOH.

L'étape 1 se passe en milieu basique à une concentration en MeOH de 30%. Ce lavage permet de supprimer les composés neutres polaires ainsi que les interférents acides polaires sans que les métabolites de la nandrolone ne soient élués. Le lavage 2 se déroule en milieu acide à la même concentration en solvant organique et permet d'enlever les molécules basiques polaires. Ensuite, lors du lavage 3, la concentration en MeOH est augmentée à 50% en gardant le même pH basique. Les composés neutres non-polaires ainsi que les molécules acides hydrophobes peuvent être éliminés. Enfin, l'étape 4 permet d'éluer les analytes recherchés en passant à un pH basique dans du MeOH.

Cette méthode permettrait d'éliminer de nombreux interférents présents dans la matrice urinaire par la simple variation du pH et de la concentration du solvant organique.

Après avoir déterminé la composition des solutions de lavage et d'élution, un test sur le volume minimum nécessaire à l'élution des métabolites a été effectué (Annexes 2). Ainsi, un volume de 3 ml de NH_4OH 5% dans MeOH a été choisi dans le protocole d'extraction.

3.6 Optimisation de la méthode d'extraction par SPE sur colonne MAX

Après le dépôt des méthodes sur la colonne MAX, un premier lavage est effectué avec une solution de 1 ml NaOAc 50mM / MeOH (95:5). Cette solution permet de supprimer les différentes protéines contenues dans l'urine et de renforcer les liaisons des acides sur la surface du polymère. Un deuxième lavage est effectué avec du MeOH afin d'éliminer les molécules apolaires et supprimer les traces d'acétate de sodium résiduelles du lavage précédent ainsi que les composés interférents qui seraient encore retenus par les interactions hydrophobes.

L'élution des conjugués glucuronides se fait ensuite à l'aide d'une solution de MeOH avec 10% d'acide acétique. Les composés se trouvant dans la phase mobile sont sous la forme non chargée et peuvent être élués par le solvant apolaire car les forces d'interactions hydrophobes sont supprimées.

Ainsi, des tests ont été développés à différentes concentrations d'acide acétique avec MeOH à 80% afin de déterminer les concentrations nécessaires pour un lavage ou une élution des analytes.

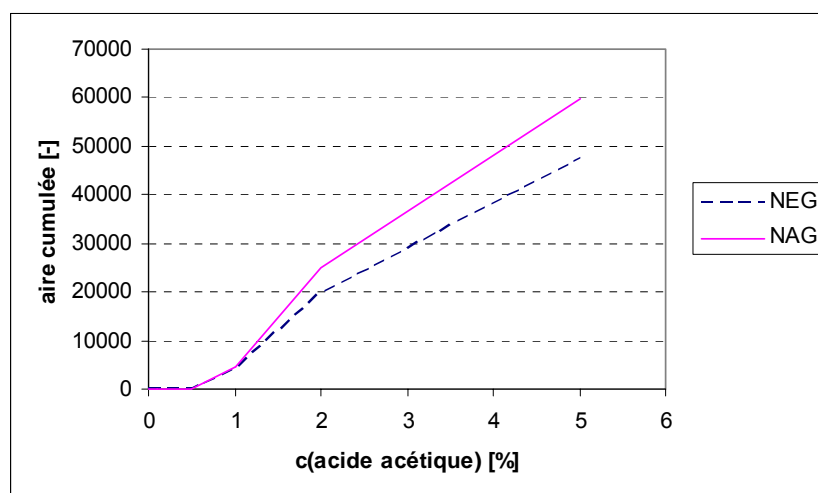


Figure 31 : Profil des aires cumulées des signaux pour chaque métabolite selon la concentration d'acide acétique dans l'éluant MeOH/H₂O (80:20).

L'aire cumulée représente la somme des aires obtenues par les essais aux concentrations inférieures. Cela évite ainsi d'utiliser une colonne d'extraction pour chaque concentration.

Plus la concentration en acide acétique dans la phase éluante augmente et plus les conjugués glucuronides sont récupérés. D'après les courbes de la figure 31, il est à supposer que tous les métabolites glucuronides ne sont pas totalement extraits avec les concentrations choisies. Un second test avec des concentrations d'acide acétique supérieures a été effectué avec un éluant avec 85% de MeOH.

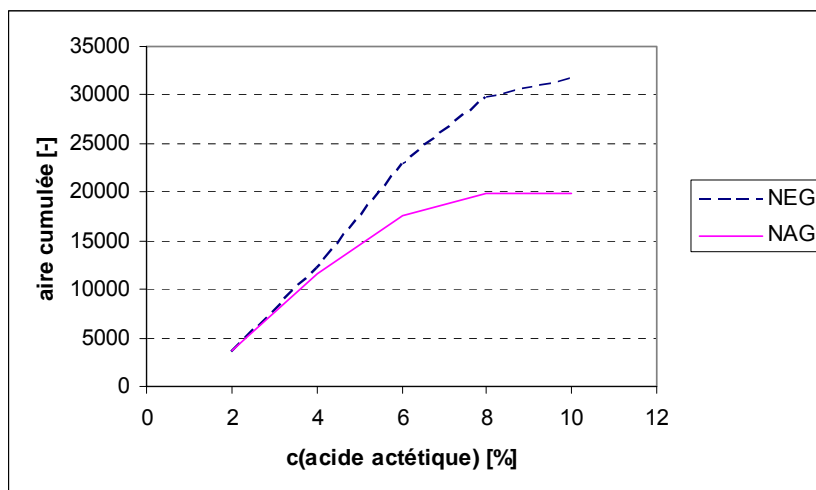


Figure 32 : Profil des aires des signaux pour chaque métabolite selon la concentration d'acide acétique dans l'éluant MeOH/H₂O (85:15).

D'après la figure 32, un plateau est observé après une concentration en acide acétique de 10%. La majorité des métabolites glucuronides est ainsi élue à cette concentration.

Un autre test sur la concentration de l'éluant en MeOH a été effectué afin de déterminer les valeurs limites pour un lavage ou une élution (Figure 33).

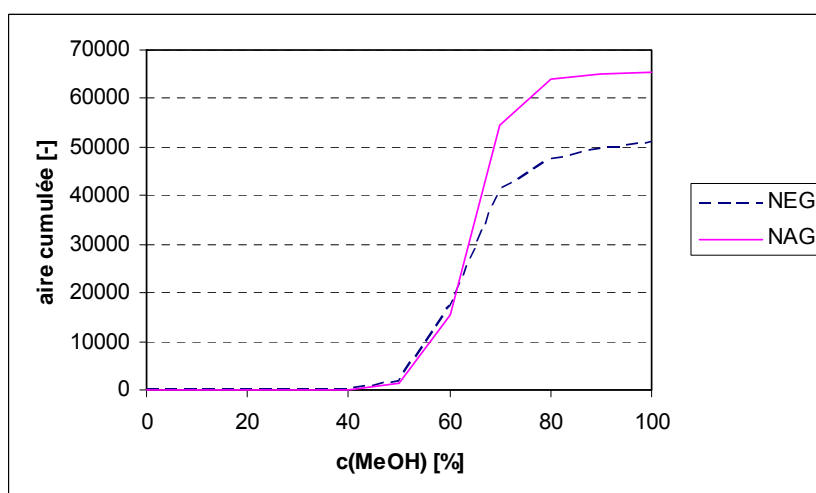


Figure 33 : Profil des aires des signaux pour chaque métabolite selon la concentration de MeOH dans l'éluant acide acétique 5%.

Les NAG et NEG commencent à éluer à une concentration de MeOH de 40% et le maximum d'élution est obtenu à 80%. Ainsi, les concentrations optimales de MeOH pour une solution de lavage seraient de 35% et 85% pour une solution d'élution.

Les métabolites sulfates sont pour leur part retenus aux longues chaînes alkyles du polymère par des interactions hydrophobes et de Van der Waals. Leur élution s'effectue à l'aide d'une solution HCl 2M dans MeOH/H₂O (85:15). L'acide chlorhydrique ne permet pas de neutraliser les conjugués sulfates car les NAS et NES ont un pKa de 1.9. Les ions chlorures vont pouvoir entrer en compétition avec les sulfates de la colonne. Ainsi la rétention sur la phase solide est rompue et les analytes peuvent être élués. La fraction récoltée est ensuite diluée avec 7 ml de H₂O avant d'être introduite dans une colonne SPE C₁₈. Cette dilution est nécessaire pour que la fraction soit moins concentrée en MeOH risquant une élution prématurée des sulfates lors du passage sur SPE C₁₈.

Les métabolites peuvent ensuite être décrochés de la surface de la colonne par du MeOH qui va rompre les interactions hydrophobes et être analysés par LC-MS/MS. La colonne C₁₈ est donc dans ce cas indispensable pour éviter d'avoir des concentrations trop hautes en HCl pouvant induire un clivage du groupe sulfate. L'extraction par les colonnes MAX requiert donc une extraction supplémentaire avec les colonnes C₁₈ ce qui rend la méthode assez laborieuse.

Pour cette raison, le développement d'une méthode de séparation par les colonnes MAX a été abandonné et une nouvelle méthode d'extraction a été mise au point afin de récolter les deux métabolites dans une même fraction avec un protocole le plus simple possible en terme de temps et de nombre de colonnes utilisées par échantillon.

3.7 Optimisation de la méthode d'extraction par SPE sur colonne WAX

Le conditionnement de la colonne WAX est différent par rapport à celui du MAX. Après avoir lavé avec du MeOH, du tampon acétate, identique à celui ajouté dans l'échantillon d'urine, a été utilisé afin d'effectuer un deuxième lavage de la colonne avant le passage de l'échantillon. Cela permet à la surface de la colonne d'être dans les mêmes conditions que lors du passage des métabolites. De plus, l'introduction de l'échantillon a été effectuée en continu afin de ne pas laisser sécher les polymères. Ces mesures ont été prises afin d'optimiser les interactions entre la phase solide et les métabolites.

Après le dépôt de l'échantillon, des lavages ont été effectués avec de l'acide formique 2% et de l'eau. Un test d'élution par une solution de 5% NH₄OH à différentes concentrations de MeOH a été développé (Annexes 3). La concentration maximale en MeOH pour le lavage est de 10%, alors que l'élution est optimale pour une concentration proche de 100%.

Après avoir déterminé la composition des solutions de lavage et d'élution, un test sur le volume minimum nécessaire à l'élution des métabolites a également été effectué (Annexes 4). Ainsi, un volume de 3 ml de NH_4OH 5% dans MeOH a été choisi dans le protocole d'extraction.

4. Rendements d'extraction

Les rendements (η) des extractions par HLB de 20 ng/ml de métabolites dans l'eau ont pu être déterminés et donnent des rendements proches de 100% (Tableau 7). Ces valeurs ont été obtenues par rapport aux aires mesurées en injectant un mélange de standards de même concentration repris dans 50 μl de la phase éluante. Les rendements ont été obtenus en calculant les rapports des aires de chaque métabolite avec leur standard interne respectif (Annexe 2).

Tableau 7 : Rendements d'extraction sur colonne HLB pour $n = 6$.

	η [%]	C.V. [%]
NAG	100.8	1.4
NES	102.7	2.7
NEG	94.3	4.4
NAS	99.6	2.4

Les rendements pour les extractions avec les colonnes WAX (Annexe 4) ont également été déterminés (Tableau 8).

Tableau 8 : Rendements d'extraction sur colonne WAX pour $n = 6$.

	η [%]	C.V. [%]
NAG	105.1	8.3
NES	100.4	4.1
NEG	97.5	4.6
NAS	99.1	2.3

Les deux colonnes SPE HLB et WAX donnent des résultats reproductibles, quantitatifs et peuvent être considérées comme fiables avant une application sur une matrice urinaire.

A noter que les rendements d'extraction par colonne MAX n'ont pas été calculés car le développement de l'optimisation de la méthode d'extraction a été abandonné pour les raisons données précédemment (partie 3.6).

5. Effet de matrice

Les métabolites de la nandrolone étudiés se trouvent dans l'urine qui est une matrice complexe. De nombreux composés de la famille des stéroïdes pourraient entrer en compétition avec les molécules à analyser. Cela peut provoquer une perte de sensibilité car l'ionisation en serait diminuée dans la source du spectromètre.

L'effet de la matrice est ainsi révélé lors de l'extraction d'échantillons d'urine par les deux méthodes par HLB et WAX. Il est nécessaire de pouvoir quantifier les pertes de produits lors des étapes d'isolation des métabolites ainsi que la diminution de leur détection lors de l'analyse par LC-MS/MS.

Pour cela, 6 urines de sujets masculins ont été extraites à partir des méthodes développées pour les 2 colonnes. L'introduction des métabolites a été effectuée de deux manières. Dans un premier cas, 20 ng/ml de métabolites sont additionnés à l'urine avant les étapes d'extractions et dans un second cas, les 20 ng/ml de métabolites sont introduits seulement après l'extraction avant la reprise dans 50 µl de MeOH / CH₃COOH 1% (50:50). Un exemple de chromatogramme est illustré à la figure 34.

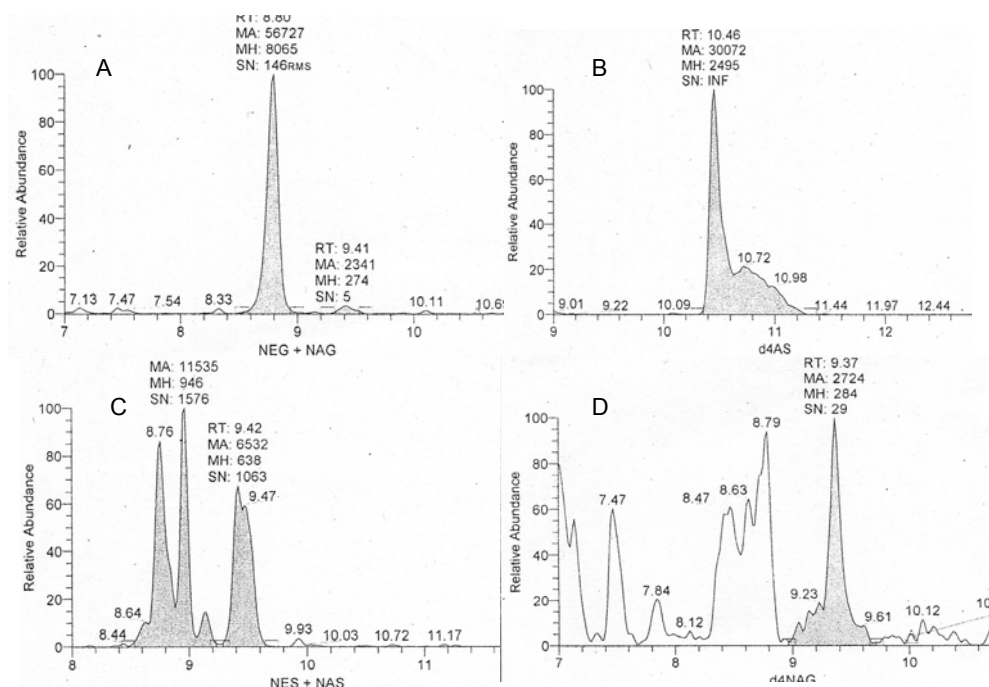


Figure 34 : Chromatogrammes par LTQ (ESI, -) d'une solution des substances d'intérêt à 20 ng/ml sur le avec un débit de la phase mobile de 700 µl/min pour (A) NEG et NAG, (B) d₄NAG, (C) NES et NAS et (D) d₄AS.

Les rendements pour les extractions par HLB ont pu être calculés par rapports aux aires des pics (Annexe 5). Une distribution aléatoire des valeurs a été observée entre les séries des six échantillons ce qui met bien en évidence l'influence de la matrice

urinaire sur la détection (Tableau 9). Cette effet peut être expliqué par la composition des urines qui sont différents selon les sujets (pH, viscosité, etc...).

Tableau 9 : Rendements d'extraction et effet de matrice après extraction par HLB.

		η NAG [%]	η NEG [%]	η NAS [%]	η NES [%]
20 ng/ml avant extraction	Urine 1	49	208	74	64
	Urine 2	118	1772	34	39
	Urine 3	78	642	51	10
	Urine 4	98	158	31	17
	Urine 5	-	1980	23	43
	Urine 6	131	1787	19	22
20 ng/ml après extraction	Urine 1	47	548	39	55
	Urine 2	-	-	17	16
	Urine 3	95	621	15	6
	Urine 4	101	391	25	8
	Urine 5	72	1954	9	12
	Urine 6	71	708	12	6

(-) : l'intégration des signaux n'a pas permis la détermination du rendements.

Les rendements ont également été déterminés pour les extractions avec les colonnes WAX (Tableau 10) (Annexe 6).

Tableau 10 : Rendements d'extraction et effet de matrice après extraction par WAX.

		η NAG [%]	η NEG [%]	η NAS [%]	η NES [%]
20 ng/ml avant extraction	Urine 1	51	245	23	51
	Urine 2	74	1214	18	14
	Urine 3	104	1213	17	27
	Urine 4	115	2193	9	12
	Urine 5	82	278	27	96
	Urine 6	121	1912	11	66
20 ng/ml après extraction	Urine 1	83	418	37	76
	Urine 2	133	960	26	50
	Urine 3	62	619	26	12
	Urine 4	69	290	40	14
	Urine 5	95	917	17	43
	Urine 6	65	861	16	11

D'après les tableaux 9 et 10, certains rendements ont des valeurs absurdes au dessus de 1000% notamment pour le NEG. Ces erreurs peut être expliquées par la suppression d'ions causé par l'effet de matrice.^[29] Cet effet est causé par des composés moins volatils éluant à des mêmes temps de rétention que les métabolites de la nandrolone faisant ainsi diminuer l'efficacité de la vaporisation de l'échantillon. Cela provoque une diminution des ions chargés dans la phase gazeuse qui est détectée par le spectromètre de masse.^[30]

L'utilisation des standards deutérés pour le calculs des rendements devrait permettre de corriger la suppression d'ions si l'influence de l'effet de matrice est similaire entre les composés deutérés et non-deutérés. Or, l'effet de matrice est également important pour d₄AS et d₄NAG ce qui contribue à obtenir des rendements erronés.

Les résultats indiquent que les métabolites sont détectés à une concentration de 20 ng/ml dans l'urine mais ne permettent pas d'établir une quantification précise et robuste. Les deux phases polymériques utilisées ne permettent pas une extraction spécifique des métabolites de la nandrolone et un développement d'une nouvelle méthode de purification par une différente colonne SPE doit être mise au point.

V. CONCLUSIONS

Effectué dans le cadre du Laboratoire suisse d'Analyse du Dopage, ce travail avait pour but de développer une méthode d'analyse des métabolites conjugués de la nandrolone par LC-MS/MS. L'extraction des métabolites dans l'eau par les colonnes HLB et WAX a montré des rendements similaires proches de 100%. Par contre, ces deux phases polymériques ne s'avèrent pas applicables pour une matrice complexe comme l'urine. Une variation dans la quantification des analytes a été observée provoquée par l'important effet de matrice.

Une amélioration dans la méthode serait de tester une nouvelle phase de colonne SPE ou de combiner plusieurs extractions successives afin d'isoler les métabolites de manière plus spécifique.

Une étude peut également être entreprise pour l'analyse et la quantification des métabolites sous forme libre après clivage des conjugaisons. Cette méthode permettrait un rendement d'ionisation supérieur et une sensibilité 100 fois plus élevée. Dans ce cas, il serait intéressant de reprendre les tests effectués avec les colonnes MAX car elles permettent de séparer les conjugués glucuronides des sulfates qui peuvent ensuite être hydrolysés avant l'analyse par LC-MS/MS.

VI. BIBLIOGRAPHIE

-
- [1] de Mondenard J.-P., Dopage : l'imposture des performances, Editions Chiron, 2000.
 - [2] Code mondial antidopage, Agence Mondiale Antidopage, Montréal, 2006.
 - [3] Yesalis C. E., Anabolic steroid in sport and exercices, 2nd edition, Human kinetics, 1993.
 - [4] Baume N., Production endogène de nortestotérone chez l'homme et influence de l'activité physique et du régime alimentaire, UNIL, Lausanne, 2006.
 - [5] Milgrom E., Steroid hormones, Hermann, publishers in arts and science, 1990.

-
- [6] Hemmersbach P., Hagensen A. H. Lund H. S., Determination of urinary norandrosterone excretion in females during one menstrual cycle by gas chromatography/mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 2005.
 - [7] Bricout V., Wright F., Update on nandrolone and norsteroids: how endogenous or xenobiotic are these substances?, *Eur J Appl Physiol*, 2004, 92:1-12.
 - [8] Morant J., Compendium Suisse des médicaments, 22ème édition, 2001, p.641, 1355.
 - [9] Kao YC, Higashiyama T., Sun X., Okubo T., Yarborough C., Choi I., Osawa Y., Simmen F. A., Chen S., Catalytic differences between porcine blastocyst and placental aromatase isozymes, *Eur J Biochem*, 2000, 267:6134-6139.
 - [10] Schänzer W., Metabolism of anabolic androgenic steroids, *Clinical Chemistry*, 1996, 42 :7, 1001-1020
 - [11] N. Baume, L. Avois, C. Schweizer, C. Cardis, J. Dvorak, M. Cauderay, P. Mangin, M. Saugy, [13C]Nandrolone excretion in trained athletes : Intervidual variability in metabolism, *Clinical Chemistry*, 2004, 50 :2, 355-364.
 - [12] Hartgens F, Marken Lichtenbelt W. D., Ebbing S., Vollaard N., Rietjens G., Kuipers H., Body composition and anthropometry in bodybuilders: regional changes due to nandrolone decanoate administration, *Int J Sport Med*, 2001, 22:235-241.
 - [13] Bhasin S, M.D., Storer T. W., Berman N., Callegari C., Clevenger B., Phillips J., Bunnell T. J., Tricker R., Shirazi A., Casaburi R., The Effects of Supraphysiologic Doses of Testosterone on Muscle Size and Strength in Normal Men, *The new England journal of medicine*, Volume 335:1-7, 1996.
 - [14] Hickson R.C., Czerwinski S.M., Falduto M.T., Young A.P., Glucocorticoid antagonism by exercise and androgenic-anabolic steroids, *Med Sci Sports Exerc.*, 1990, 22:331-340.
 - [15] Dickerman R. D., McConathy W. J., Schaller F., Zachariah N. Y., Cardiovascular complications and anabolic steroids, *European Heart Journal*, 1996, 17:1912.
 - [16] Saudan C., Entenza J. M., Baume N., Mangin P., Saugy M., Short-term stability of testosterone and epitestosterone conjugates in urine samples :

-
- Quantification by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry, Elsevier, Journal of Chromatography B, 2006, 168-174.
- [17] Thevis M., Geyer H., Mareck U., Schänzer W., Screening for unknown synthetic steroids in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of mass spectrometry, 2005, 40 : 955-962.
- [18] Skoog, West et Holler, Chimie analytique, De Boeck Université, Paris, 1997.
- [19] Rouessac F., Rouessac A., Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, Cours et exercices corrigés, 6ème édition, Dunod, 2004, p.315-351.
- [20] Constantin E., Spectrométrie de masse, principes et applications, 2ème édition, Tec et Doc, Paris, 1996.
- [21] Niessen W.M.A., Progress in liquid chromatography-mass spectrometry I instrumentation and its impact on high-throughput screening, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2003.
- [22] Thermo Electron Corporation, Finnigan LTQ : Hardware Manual, Technical Publications, San Jose, 2003, p.1-5, 1-7.
- [23] Cech N. B., Enke C. G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, Mass Spectrometry Reviews, 20, 362 – 387, Greensboro, 2001.
- [24] Rouessac F., Rouessac A., Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, 2ème édition, Masson, 1994, p.259-265.
- [25] Korfmacher W. A., Principles and applications of LC-MS in new drug discovery, Foundation review, Kenilworth, 2005, p.1358.
- [26] Kuuranne T., Rapport de thèse : Enzyme-Assisted Synthesis and Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis, Departement of Pharmacy – University of Helsinki, Finland, 2003.
- [27] Antignac J.-P., Brosseaud A., Gaudin-Hirret I., André F., Le Bizec B., Analytical strategies for the direct mass spectrometric analysis of steroid and corticosteroid phase II metabolites, Elsevier, 2005, p.205-216.
- [28] Oasis Applications Notebook, Waters Corporation, Milford, 2003, p.10-17.

-
- [29] Maurer H. H., Hyphenated mass spectrometric techniques – indispensable tools in clinical and forensic toxicology and doping control, *Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 41 : 1399-1413.
- [30] Annesley T. M., Ion suppression in Mass Spectrometry, *Clinical Chemistry*, 2003, 49 :7, 1041-1044.

VII. ANNEXES