

2 m11.3193.5

Université de Montréal

**Détermination quantitative de la
déhydroépiandrostérone (DHEA) et de ses principaux
métabolites conjugués dans l'urine par *electrospray* et
spectrométrie de masse**

par

Élodie Ramos

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en Pharmacologie (M.Sc.)

Août 2003

© Élodie Ramos, 2003



W

4

U58

2004

V. 108

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Détermination quantitative de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et de ses principaux
métabolites conjugués dans l'urine par *electrospray* et spectrométrie de masse.

présenté par:
Élodie Ramos

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean Guy Besner, président-rapporteur

Dr Ibrahim Yousef, directeur de recherche

Dr Edgard Delvin, co-directeur

Dr Pierre Beaulieu, membre du jury

Résumé

La déhydroépiandrostérone (DHEA) est une hormone synthétisée chez l'homme en majorité par les glandes surrénales et dont la concentration diminue avec l'âge et dans certaines maladies. Il est donc suggéré que la mesure de son excrétion urinaire puisse s'avérer utile dans le diagnostic et le traitement de certaines pathologies, tel le syndrome de Cushing. Nous rapportons la mise au point d'une méthode de quantification rapide et sensible de la DHEA et de ses métabolites, basée sur une technique d'ionisation douce par *electrospray*, couplée à la spectrométrie de masse (ESI/MS). L'acide lithocholique sulfatée (LCAS) et le 17- β -estradiol-17-glucuronide sont utilisés respectivement comme standards internes pour les composés sulfatés et glucuronidés. Les composés d'intérêt seront extraits de l'urine par une extraction liquide-liquide et purifiés après un passage sur cartouche de type C18. L'ionisation est réalisée grâce à la présence d'une interface chauffante, opérant en mode négatif. La détection par spectrométrie de masse est réalisée sous des conditions de sensibilités optimales, préalablement évaluées, dans lesquelles la molécule déprotonée $[M-H]^-$ est générée pour chaque métabolite conjugué. Les ions moléculaires sont analysés en mode SIR (enregistrement des ions moléculaires selon leur masse). La limite de quantification est de 0.2 pmol pour les hormones se trouvant dans une matrice biologique de type urinaire. C'est ainsi qu'après adaptation, cette technique pourrait sans doute être la base d'une nouvelle procédure efficace et facile d'utilisation dans le milieu médical afin d'identifier chez les patients d'éventuels désordres hormonaux.

La méthode ESI/MS pourrait permettre de mesurer divers stéroïdes urinaires, et de diagnostiquer différents syndromes cortico-surréaliens. La mesure des stéroïdes conjugués pourrait aussi permettre de déceler un dysfonctionnement éventuel du foie dans la détoxification des homologues stéroïdiens utilisés en clinique ou pour le dopage dans le sport de haut niveau.

Mots-clés: Déhydroépiandrostérone (DHEA), Sulfate de Déhydroépiandrostérone (DHEAS), *Electrospray* (ESI), Spectrométrie de Masse (MS), Glandes Surrénales.

Abstract

Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement therapy as compensation for age-related decline of DHEA production has many beneficial effects. It has been suggested that the urinary excretion of free cortisol and DHEA might be useful in differential diagnosis of hypercorticoïd states due to adrenal adenoma and Cushing's disease. A specific and sensitive method using electrospray tandem mass spectrometry (ESI/MS) for the quantitation of DHEA and their major metabolites (glucuronides and sulphated of DHEA, androsterone) in human urine is reported. Lithocholic acid sulphated (LCA-S) and 17- β -estradiol-17-glucuronide was used as internal standard for sulphated and glucuronides forms, respectively. The analytes were extracted from urine by liquid-liquid extraction and purified by C18 solid-phase extraction. Ionisation was performed in a heated nebulizer interface operating in the negative ion mode under optimal sensitivity mass spectrometric conditions, where only the deprotonated molecule ion, $[M-H]^-$, was generated for each conjugate metabolite. The molecular ions were monitored in a select-ion-recording (SIR) method developed for detecting the steroids in urine. Using this methodology, DHEA and their metabolites were detected. The limit of quantification of the method was 0.2 pmol for all the hormones in urine. Further development of the technique could form the basis of a protocol for screening for adrenocortical disorders. ESI/MS method will permit us simultaneous assays of steroids in medical specimens and is helpful for diagnosis of, not only adrenogenital syndrome, steroids excreting tumour, but also drug abuse and liver dysfunction for detoxification.

Keywords : Dehydroepiandrosterone (DHEA), Sulphated Dehydroepiandrosterone (DHEAS), Electrospray (ESI), Mass Spectrometry (MS), Adrenal Disorders.

Table des matières

Identification du jury.....	ii
Résumé (français).....	iii
Résumé (anglais).....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xi
Liste des spectres.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii

Chapitre 1 : Introduction

1. TYPES ET FONCTIONS DES STÉROÏDES.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Les hormones sexuelles.....	2
1.2.1 Les androgènes.....	2
1.2.2 Les œstrogènes.....	2
1.2.3 Les progestagènes.....	2
1.2.4 Les stéroïdes anabolisants.....	3
2. LE CORTEX SURRÉNALIEN.....	3
3. LA DÉHYDROÉPIANDROSTÉRONE (DHEA).....	6
3.1 Biosynthèse.....	8
3.2 Métabolisme.....	13
3.3 Mécanisme d'action.....	15
3.4 Rôles physiologiques.....	17

4. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES STÉROÏDES UTILISÉS POUR L'ANALYSE PAR SÉPARATION.....	20
4.1 Structure.....	20
4.2 Leur étude dans différents milieux biologiques.....	21
4.3 Sélection de la matrice pour l'étude envisagée: L'urine.....	21
4.3.1 Forme libre.....	21
4.3.2 Forme conjuguée.....	22
5. LES MÉTHODES ACTUELLES D'ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE	23
5.1 Historique.....	23
5.2 HPLC/UV.....	24
5.3 HPLC/radio-immunologies.....	25
5.4 GC/MS.....	27
5.5 LC/MS.....	31
5.6 Sport et dopage: technique de détection de produits anabolisants	37
6. HYPOTHÈSE ET BUT DE RECHERCHE.....	38
7. LES OBJECTIFS.....	38
7.1 <u>Objectif # 1</u> : Définir un profil caractéristique pour chaque stéroïde.....	38
7.2 <u>Objectif # 2</u> : Rendre détectable la DHEA.....	38
7.3 <u>Objectif # 3</u> : Mise au point de la méthode d'extraction.....	39
7.4 <u>Objectif # 4</u> : Construction des courbes d'étalonnage sans matrice urinaire.....	39
7.5 <u>Objectif # 5</u> : Construction des courbes de calibrage.....	40
7.6 <u>Objectif # 6</u> : Application clinique.....	41

Chapitre 2 : Matériels

1. CHOIX DES STÉROÏDES PERMETTANT D'ÉVALUER LA FONCTION SURRÉNALIENNE.....	42
2. CHOIX DES STANDARDS INTERNES CORRESPONDANTS.....	44
3. COLLECTION DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	45
4. EXTRACTION EN PHASE SOLIDE DES STÉROÏDES À PARTIR DE L'URINE.....	45
4.1 Principe de l'extraction en phase solide.....	45
4.2 Sélectionner la cartouche appropriée.....	50
4.3 Le système d'extraction sous-vide.....	54
5. <i>ELECTROSPRAY</i> COUPLÉ À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM (ESI/MS/MS).....	55
5.1 La phase mobile.....	55
5.2 Techniques d'ionisation.....	55
5.3 Analyseur quadripolaire: Filtre.....	60
5.4 Les détecteurs.....	60
6. ÉVALUATION SOMMAIRE DU PROTOCOLE ANALYTIQUE	61
6.1 Vérification de la conformité de l'ionisation.....	61
6.2 Préparation des échantillons.....	61
6.3 Stabilité et intégrité des échantillons.....	61
6.4 Introduction de l'échantillon.....	62
6.5 Choix du mode d'ionisation: Positif ? Négatif ?.....	62
6.6 Optimisation du système analytique.....	62
6.6.1 Spectromètre de masse 1: Le voltage d'ionisation.....	63
6.6.2 Spectromètre de masse 2: L'énergie de collision.....	63
6.7 Acquisition des résultats.....	63

Chapitre 3 : Méthodes et résultats

1. Profil caractéristique pour chaque stéroïde.....	64
2. Rendre détectable la DHEA.....	84
3. Mise au point de la méthode d'extraction.....	90
4. Construction des courbes d'étalonnage sans matrice urinaire.....	96
5. Construction des courbes de calibrage.....	101
6. Applications cliniques.....	104

Chapitre 4 : Discussion et conclusion

1. Problématique.....	107
2. Expérimentation pilote.....	108
3. Propriété de la DHEA et dérivation.....	109
4. Développement de la méthode d'extraction.....	110
5. Les analyses réalisées.....	111
6. Importance du diagnostique clinique.....	112
7. Projets futurs.....	113
8. Conclusions.....	114

Bibliographie.....	116
---------------------------	------------

Liste des figures

- Figure 1: Synthèse de la DHEAS..... p.5
- Figure 2: Synthèse de la DHEA.....p.7
- Figure 3: Synthèse mitochondriale de la pregnénolone (à gauche) et biosynthèse de la pregnénolone (à droite).....p.10
- Figure 4: Biosynthèse microsomiale des androgènes.....p.11
- Figure 5: Régulation de type *rétrocontrôle* négatif.....p.12
- Figure 6: Synthèse des oestrogènes et des androgènes.....p.14
- Figure 7: La DHEA et le vieillissement.....p.19
- Figure 8: Chromatographie en phase gazeuse, conditions et mode opératoire.....p.29
- Figure 9: Schéma fonctionnel d'un système moderne de chromatographie en phase liquide.....p.32
- Figure 10: Les principaux androgènes et leur métabolisme.....p.43
- Figure 11: Remplissage des colonnes (phases stationnaires) et phases mobiles les plus fréquemment utilisées en H.P.L.C.....p.47
- Figure 12: Interaction moléculaire.....p.49
- Figure 13: Cartouche C18 de type *reverse phase*.....p.51
- Figure 14: Système d'extraction sous-vide de type Baker SPE-12G.....p.51
- Figure 15: Schéma illustrant la différence entre la chromatographie à polarité de phase normale et celle à polarité de phase inversée.....p.53
- Figure 16: L'*Electrospray*.....p.56
- Figure 17: Ionisation moléculaire.....p.58
- Figure 18: Fragmentation moléculaire.....p.59
- Figure 19: Reproductibilité de l'injection en H.P.L.C.....p.106

Liste des spectres

- Spectre 1A: Épitestostérone ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=20$ eV, $P=2.4.10^{-3}$ mbar.....**p.65**
- AUC 1A: Épitestostérone, $EV=40$ eV et $EC=20$ eV.....**p.66**
- Spectre 1B: Épitestostérone ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=30$ eV, $P=2.5.10^{-3}$ mbar.....**p.67**
- AUC 1B: Épitestostérone, $EV=40$ eV et $EC=30$ eV.....**p.68**
- Spectre 1C: Épitestostérone ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=35$ eV, $P=2.4.10^{-3}$ mbar.....**p.69**
- AUC 1C: Épitestostérone, $EV=40$ eV et $EC=35$ eV.....**p.70**
- Spectre 1D: Épitestostérone ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=40$ eV, $P=2.4.10^{-3}$ mbar.....**p.71**
- AUC 1D: Épitestostérone, $EV=40$ eV et $EC=40$ eV.....**p.72**
- Spectre 1E: Épitestostérone ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=45$ eV, $P=2.4.10^{-3}$ mbar.....**p.73**
- AUC 1E: Épitestostérone, $EV=40$ eV et $EC=45$ eV.....**p.74**
- Spectre 1F: Épitestostérone ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=50$ eV, $P=2.5.10^{-3}$ mbar.....**p.75**
- AUC 1F: Épitestostérone, $EV=40$ eV et $EC=50$ eV.....**p.76**
- AUC 2: Surface sous la courbe en mode MS2 de la testostérone ($m/z=97$ et $m/z=109$), $CV=35$ eV.....**p.77**
- Spectre 2: Fragmentation en mode MS2 de la DHEA ($m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=20$ eV.....**p.78**
- Spectre 3: Fragmentation en mode MS2 de l'androstérone ($m/z=290$), $EV=40$ eV et $EC=20$ eV.....**p.79**
- Spectre 4: Fragmentation en mode MS2 de la testostérone sulfatée ($m/z=97$ et $m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=50$ eV.....**p.80**
- Spectre 5: Fragmentation en MS2 de la testostérone glucuronidée ($m/z=175$ et $m/z=289$), $EV=40$ eV et $EC=50$ eV.....**p.81**
- Spectre 6: La molécule de DHEA ($m/z=289$) indétectable en mode MS1 à différentes énergies d'ionisation.....**p.82**

- Spectre 7: La molécule de DHEA ($m/z=289$) libre (non acétylée) et acétylée ($m/z=330$).....**p.86**
- Spectre 8: La molécule de DHEA libre ($m/z=289$) contenue dans l'eau et le méthanol (50:50) et dérivée dans l'ammonium acétate ($m/z=306$).....**p.87**
- Spectre 9: La molécule de DHEA ($m/z=289$) contenue dans l'urine (1/10) et dérivée dans l'ammonium acétate.....**p.88**
- Spectre 10: La molécule de DHEA ($m/z=369$) dérivée par l'emploi de pyridine.....**p.89**
- Spectre 11: Recouvrement après passage sur cartouche C18 de la molécule de DHEA glucuronidée ($m/z=464$) et de l'oestradiol glucuronidé ($m/z=448$), son standard interne.....**p.92**
- AUC 3: Surface sous la courbe correspondant aux poids moléculaires suivants $m/z=464$ (DHEA G) et $m/z=448$ (oestradiol G).....**p.93**
- Spectre 12: Confirmation d'un rendement proche de 100% pour $m/z=464$ et $m/z=448$**p.94**
- AUC 4: Surface sous la courbe correspondant au spectre 14 pour $m/z=464$ et $m/z=448$**p.95**
- Spectre 13: Série 1 représentée par la molécule de DHEA sulfatée.....**p.98**
- Spectre 14: Série 2 représentée par la molécule de DHEA sulfatée.....**p.99**
- Spectre 15 et spectre 16: Présence d'interférences entre les poids moléculaires suivants, $m/z=368$, $m/z=369$ et $m/z=370$ illustrées par le DHEAS et l'androstérone S.....**p.100**
- Spectre 17: Série 3 représentée par la molécule de DHEA sulfatée.....**p.103**
- Spectre 18: Courbe de dosage du DHEAS dans l'urine de patients.....**p.105**

Liste des abréviations

- ACTH: Hormone adrénocorticotrope
ADN: Acide désoxyribonucléique
AMP: Adénosine monophosphate
APCI: Atmospheric pressure chemical ionization
AUC: Surface sous la courbe
CH₃CN: Acétonitrile
CI: Chemical ionization
CIO: Comité international olympique
C18: Carbone 18
DAU: Daughters
DHEA: Déhydroépiandrostérone
DHEAG: Déhydroépiandrostérone glucuronide
DHEAS: Sulfate de déhydroépiandrostérone
EC: Énergie de collision
ESI: Electrospray ionization
ESP: Electrospray
EV: Énergie optimale d'ionisation
GC: Chromatographie en phase gazeuse
HDL: High density protein
HPLC, CLHP: Chromatographie en phase liquide de haute performance
H₂O: Eau
I: Intensité
LC: Chromatographie en phase liquide
LCAS: Acide lithocholique sulfaté

LDL: Low density protein
LH: Luteinizing hormone
MeOH: Méthanol
MRM: Multiple reaction monitoring
MS: Spectrométrie de masse
MS/MS: Spectrométrie de masse en tandem
m/z: Masse/Charge
PAR: Parents
PM: Poids moléculaire
P450 SCC: Protein 450 Side Chain Cleavage
QC: Contrôle qualité
R: Rendement
RIA: Essai radio immunologique
SI: Standard interne
SIR: Selective ion recording
T/E: Testostérone / Épitestostérone
TSP: Thermospray
UV: Ultraviolet

Je dédie l'ensemble de mes efforts à ma mère Marie-Christine et ma grand-mère Yvonne ainsi qu'à la mémoire de ma sœur Mandy.

Remerciements

Je voudrais remercier le Dr Ibrahim Yousef pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir fournie le support matériel nécessaire à la réalisation de mes travaux.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à mon codirecteur, Dr Edgard Delvin, pour son assistance scientifique, ses directives ainsi que pour ses précieux conseils lors de la rédaction de mon mémoire.

Je voudrais remercier Diane Mignault. Avec sa perpétuelle bonne humeur, elle m'a donné sans compter de son temps pour m'expliquer la spectrométrie de masse et pour m'aider jusqu'aux petites heures du matin lors de l'analyse de mes échantillons. La portée de son enseignement dépasse largement le cadre formel de la spectrométrie de masse et est aussi vaste que la reconnaissance que je lui voue. Un clin d'œil également à son époux Richard.

Un gros merci à Jean-Sébastien Walczak, mon ami, pour ses encouragements et son soutien d'une valeur inestimable tout au long de mes travaux.

Un gros merci au Dr Pierre Beaulieu qui est un professeur avec lequel on prend plaisir à discuter de la science et de la vie.

J'aimerais remercier Mesdames Sylvie Caron, Marie-Yolaine Thomas, Francine Legault Diane Dumouchel et Francine Côté pour toutes les bienveillantes attentions à mon égard.

Je voudrais remercier le Dr Chantal Lambert, Dr René Cardinal et le Dr Jean-Guy Besner pour leur soutien, leur appui.

Je voudrai remercier Brice, mon copain, pour la patience dont il a fait preuve à mon égard et pour m'avoir accompagné jusqu'à la fin et encore.

Enfin, j'aimerais remercier mes deux sœurs, Killy et Leslie, ma famille, mes beaux-parents, Ginette et Didier, tous mes ami(e)s et toutes les personnes qui ont su m'accompagner dans les bons et mauvais moments durant ces deux dernières années.

Chapitre 1 : Introduction

1. TYPES ET FONCTIONS DES STÉROÏDES

1.1 Généralités

Chez l'humain de nombreux types de stéroïdes sont synthétisés par différents organes. Ces analogues se retrouvent ainsi dans les diverses préparations pharmaceutiques. De manière générale, les stéroïdes sont actifs à très basses concentrations et ont la capacité de réguler de nombreuses fonctions biologiques. Les hormones stéroïdiennes jouent donc un rôle important dans la plupart des fonctions vitales, que ce soit au niveau de la croissance ou des systèmes immunologiques.

L'étude des stéroïdes donne des informations qui permettent de comprendre l'étiologie de différentes maladies telles, la déficience des enzymes responsable de la genèse de ces hormones. Ainsi, leur identification et leur quantification par l'approche de la chimie analytique, est devenue un champ d'étude important pour le milieu médical et pharmaceutique.

Toutefois, le milieu clinique demande des méthodes qui soient non seulement rapides, mais aussi sensibles, simples d'utilisation, automatisées et sécuritaires. Actuellement, les méthodes employées sont diverses, mais ne répondent pas pour la plupart à tous ces critères.

Avant de décrire l'approche utilisée dans ce travail, une revue brève de la physiologie hormonale précède la description des travaux entrepris dans le contexte de ce mémoire.

1.2 Les hormones sexuelles

1.2.1 Les androgènes

Les androgènes sont excrétés principalement par les gonades et le cortex surrénalien. L'androgène principal chez l'homme est la testostérone. Sa principale fonction est d'exercer un effet de virilisation important et d'accroître le volume et la masse musculaire. Cette hormone est aussi impliquée dans le développement de pathologies telles le cancer de la prostate chez l'homme.

1.2.2 Les œstrogènes

Les œstrogènes sont sécrétés par les ovaires et le plus important quantitativement est l'œstradiol. Les œstrogènes sont actifs surtout pendant la phase ovulatoire du cycle menstruel et assurent le développement des caractéristiques sexuelles et de la masse osseuse chez la femme. Les œstrogènes sont aussi impliqués dans le développement du cancer du sein.

1.2.3 Les progestagènes

La progestérone, tout comme les œstrogènes, provient également des ovaires et semble être la principale hormone représentative de l'expression des caractères sexuels féminins, après l'œstradiol. Elle agit durant la phase de lutéinisation du cycle menstruel et est impliquée principalement dans la maturation de l'endomètre de l'utérus.

1.2.4 Les stéroïdes anabolisants

Les stéroïdes anabolisants comprennent essentiellement la testostérone naturelle et la déhydroépiandrostérone, qui sont donc des androgènes (développement des caractères sexuels mâles), comme indiqué précédemment. Ils ont la capacité de développer le tissu musculaire chez l'être humain et ont, de plus, un effet **anti-catabolique** d'où l'emploi du terme **anabolisant** [1]. Par conséquent, ces agents sont souvent les cibles de détection dans le dopage, où leur fréquence d'utilisation est relativement élevée chez les sportifs [2,3] lors des compétitions, afin d'accroître leurs performances [4,5].

2. LE CORTEX SURRÉNALIEN

Trois groupes de stéroïdes surrénaliens doivent être considérés: les minéralocorticoïdes, principalement l'aldostérone; les glucocorticoïdes, essentiellement le cortisol et les hormones sexuelles, principalement le sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS). La sécrétion des minéralocorticoïdes est sous le contrôle du système rénine-angiotensine, celle des glucocorticoïdes et des stéroïdes sexuels sous l'influence de l'ACTH (hormone adrénocorticotrope).

La production des stéroïdes sexuels (androgènes chez l'homme et œstrogènes et progestérones chez la femme) est principalement exercée par les gonades. Cependant, le cortex surrénalien, en particulier la zone réticulée, contribue à la production de stéroïdes sexuels sous la forme de DHEAS et d'androsténone (figure 1).

Le rôle des stéroïdes sexuels produits par l'activité corticosurrénalienne n'est pas encore bien clarifié; cette synthèse est importante pour le développement de la pilosité corporelle chez la femme. Avant la puberté, chez l'enfant normal, la sécrétion de DHEAS augmente de façon importante. Ceci coïncide avec la maturation de la zone réticulée, phénomène appelé adrénarchie. C'est à cette période que l'on enregistre une accélération de la vitesse de croissance chez l'enfant. Pendant la même période, la pilosité pubienne et axillaire ainsi que les glandes sudoripares se développent, mais ce n'est qu'à l'installation spécifique de la puberté qu'apparaîtra le développement des seins et du volume testiculaire.

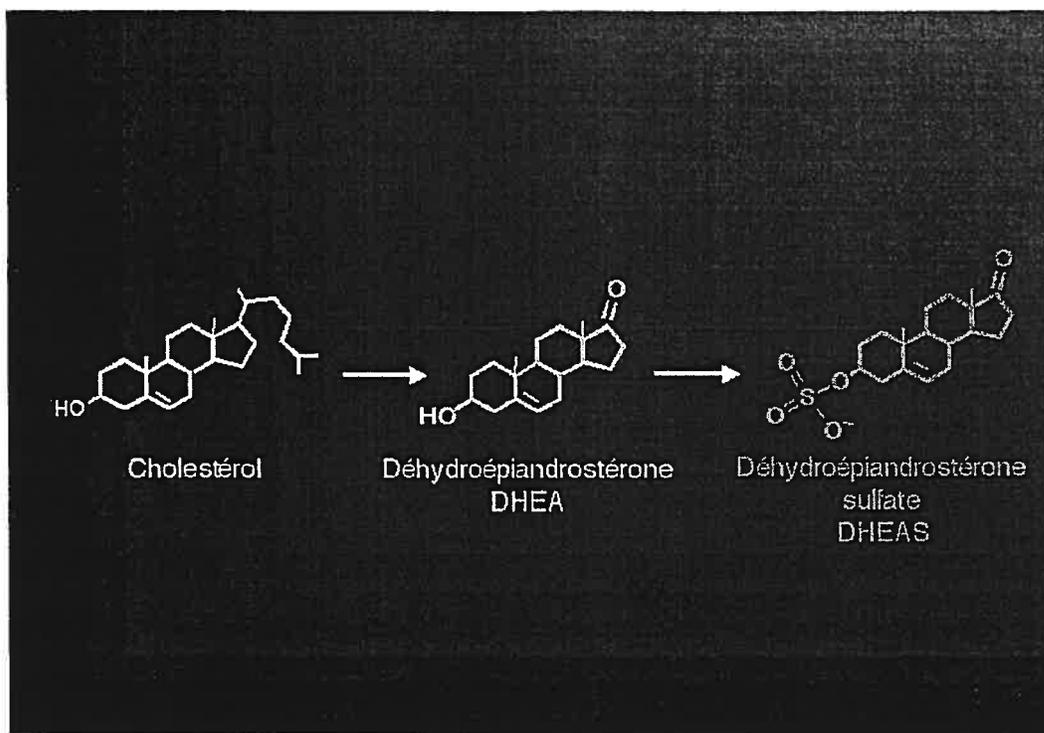


Figure 1 : Synthèse de la DHEAS.

Pour l'essentiel, les cellules stéroïdogènes (qui fabriquent les stéroïdes) importent du cholestérol à partir du sang où celui-ci est présent en quantité importante. Le mécanisme impliqué par cette importation, et les transferts et les réactions chimiques intracellulaires qui aboutissent à la synthèse de DHEA et de son sulfate sont responsables de la chaîne de transformations ci-dessus. Ces cellules appartiennent principalement à des glandes endocrines : corticosurrénales (partie extérieure ou cortex des glandes surrénales), testicules, ovaires, et, très accessoirement sur la plan quantitatif, au système nerveux.

3. LA DÉHYDROÉPIANDROSTÉRONNE (DHEA)

La déhydroépiandrostéronne (DHEA) est une hormone stéroïdienne androgénique synthétisée principalement dans le cortex surrénalien et sécrétée en petite quantité dans les gonades (ovaires et testicules) (figure 2). Il est à noter qu'une faible synthèse prend place également au niveau de la peau et du cerveau.

La DHEA est une hormone à faible action virilisante. Toutefois, elle peut être convertie en testostérone même dans le cortex surrénalien, mais la proportion chez l'homme par rapport à la testostérone d'origine testiculaire reste très faible: 5% de la testostérone provient de la conversion d'androgènes surrénaux, contre 95% produite par les testicules. Bien au contraire, il est à noter que chez la femme, 60% de la testostérone provient de la conversion d'androgènes surrénaux, le reste étant produit par les ovaires [6].

À noter que la DHEA et le cortisol exercent des effets opposés, même si leurs structures chimiques sont semblables. En effet, alors que le cortisol sécrété lors d'un stress peut engendrer des dommages musculaires, la DHEA peut favoriser la synthèse des protéines par sa propriété anti-catabolique.

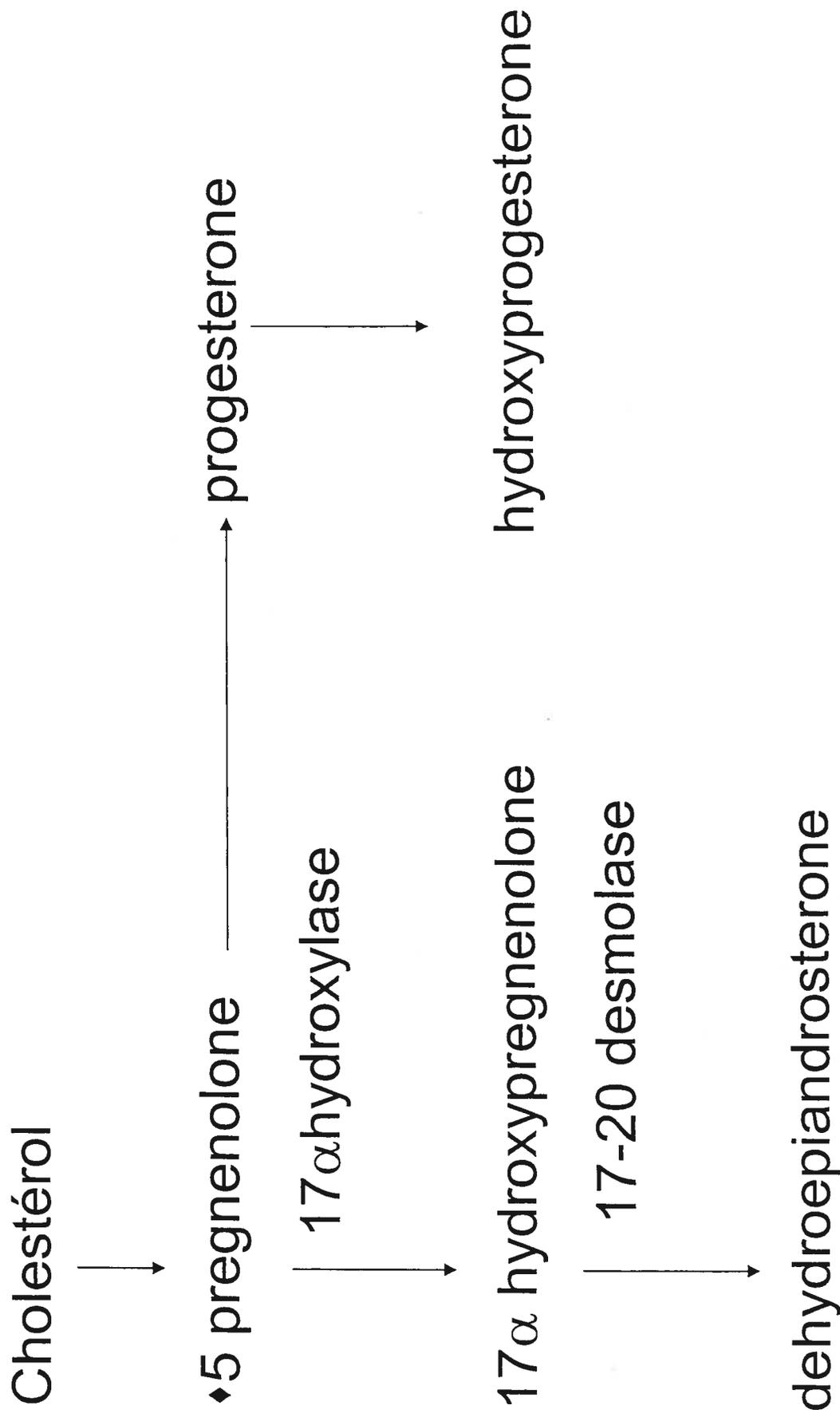


Figure 2 : Synthèse de la DHEA

3.1 Biosynthèse

Le précurseur de la DHEA, comme pour toutes hormones stéroïdiennes, est le cholestérol qui peut-être synthétisé à partir de l'acétate ou bien capté dans la circulation sanguine, où il est transporté par des lipoprotéines (LDL = Low Density Lipoprotein et HDL = High Density Lipoprotein).

Le cholestérol est capté par les cellules de Leydig des testicules; par les cellules de la thèque interne du follicule de l'ovaire; et par les cellules de la zone réticulée du cortex surrénalien.

Le CHOLESTEROL est transformé en PREGNENOLONE par le complexe enzymatique C27 P450 SCC (Protein 450 Side Chain Cleavage) qui contient différentes enzymes situées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (figure 3).

À partir de là, la prégnenolone est prise en charge par le complexe enzymatique C17 P450 qui se trouve au niveau du réticulum endoplasmique et qui possède une 17α hydroxylase qui va hydroxyler la prégnenolone à son carbone 17. La 17α HYDROXY-PREGNELONONE ainsi obtenue est transformée en DHEA par la C17,20 lyase (qui appartient au complexe C17 P450) (figure 4).

La production des stéroïdes, et par conséquent celle de DHEA dans les gonades, est contrôlée par une hormone hypophysaire: la LH (Luteinizing Hormone) qui active la production d'AMP cyclique dans les cellules cibles. Mais la production la plus importante est réalisée par le cortex surrénalien, qui est contrôlée par l'ACTH (hormone hypophysaire), elle-même régulée par le CORTISOL (figure 5).

En effet, l'injection de 25 mg d'ACTH en perfusion intraveineuse pendant 8 heures, double le taux de production de DHEAS qui est la forme d'excrétion urinaire majoritaire urinaire de la DHEA [7].

SYNTHESE MITOCHONDRIALE DE LA PREGNENOLONE

BIOSYNTHESE DE LA PREGNENOLONE

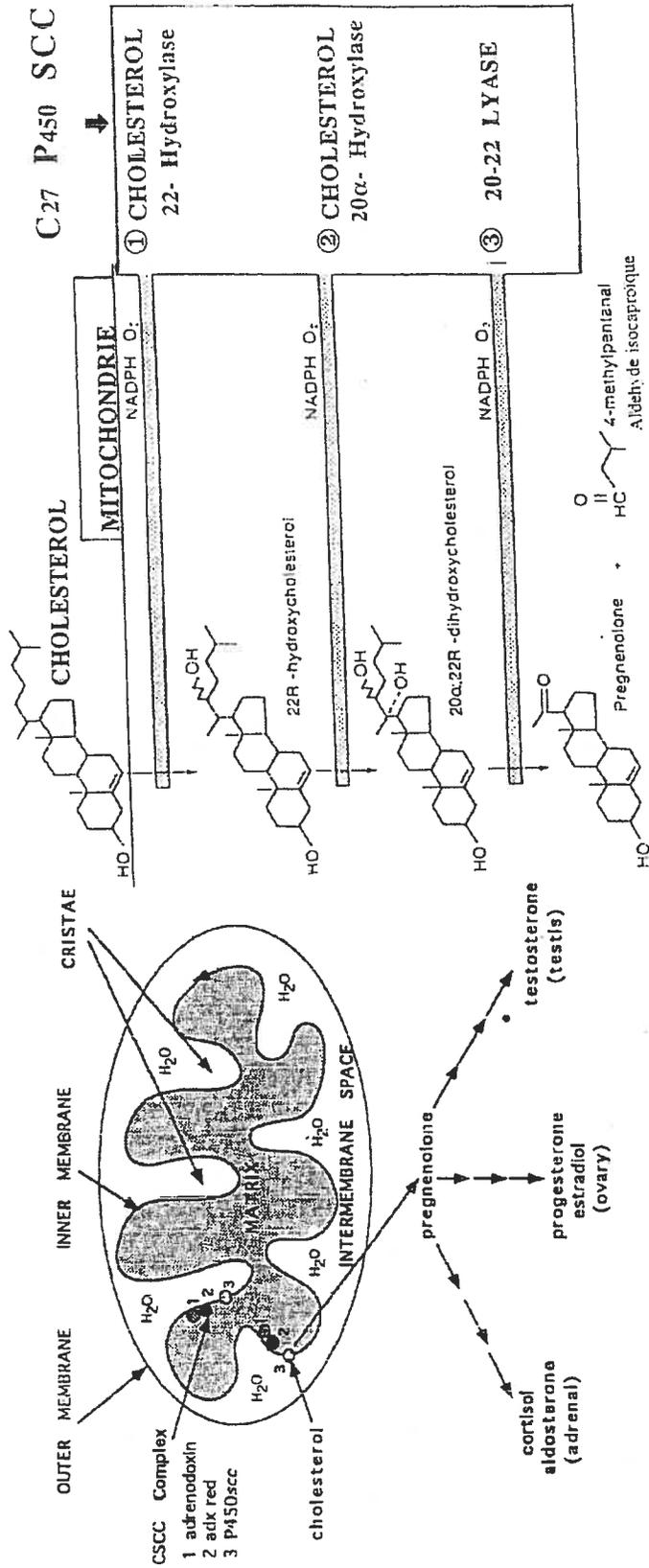


Figure 3 : Synthèse mitochondriale de la pregnénolone (à gauche) et biosynthèse de la pregnénolone (à droite).

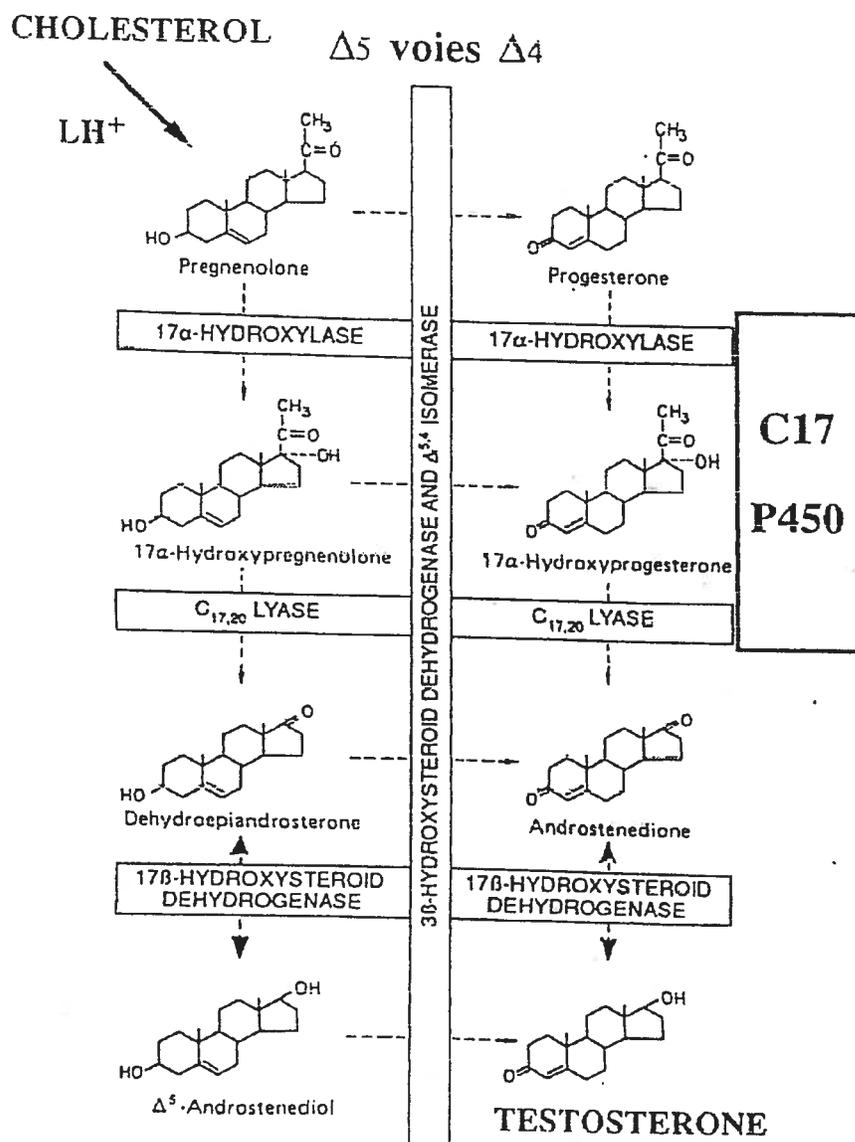


Figure 4 : Biosynthèse microsomale des androgènes.

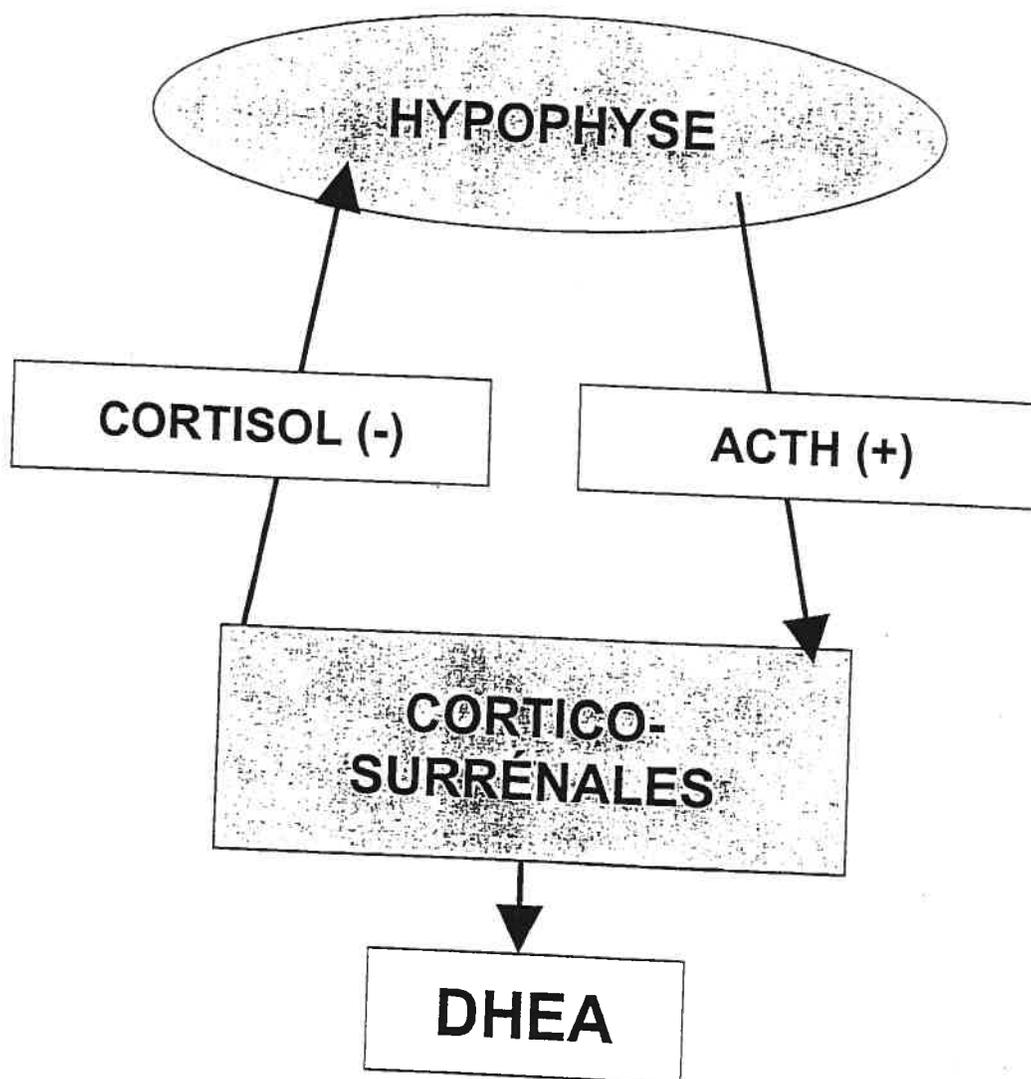


Figure 5 : Régulation de type feed-back négatif.

Cependant, il est à prendre en considération que la DHEA, par elle-même, ne semble pas avoir d'action sur la libération d'ACTH. L'ACTH agit également en activant la production d'AMP cyclique dans les cellules cibles. La production quotidienne de DHEA chez l'homme s'élève à 1.05×10^{-4} mol et la concentration plasmatique a pour valeur approximative environ 1.73×10^{-8} mol/L, et ce, pour les deux sexes.

3.2 Métabolisme

Comme nous l'avons vu précédemment, la DHEA peut être convertie en TESTOSTÉRONE dans le cortex surrénalien et dans les gonades. La déhydroépiandrostérone est alors, de manière irréversible, transformée en $\Delta 4$ -ANDROSTENEDIONE par le 3- β -hydroxystéroïde déshydrogénase et le $\Delta 4,5$ isomérase. Le $\Delta 4$ -androstènedione est ensuite converti en testostérone par l'enzyme 17- β -hydroxystéroïde déshydrogénase ou bien la DHEA est transformée par ce même enzyme en $\Delta 5$ -ANDROSTENEDIOL, qui sera converti ensuite à son tour en testostérone, par le 3- β -hydroxystéroïde déshydrogénase et le $\Delta 4,5$ isomérase à son tour (figure 4).

Dans les ovaires, la source d'œstrogènes (œstradiol et œstrone) est le $\Delta 4$ -ANDROSTENEDIONE provenant essentiellement de la DHEA, et même de la testostérone pouvant, elle aussi, rappelons-le, avoir pour origine la déhydroépiandrostérone (figure 4, 6).

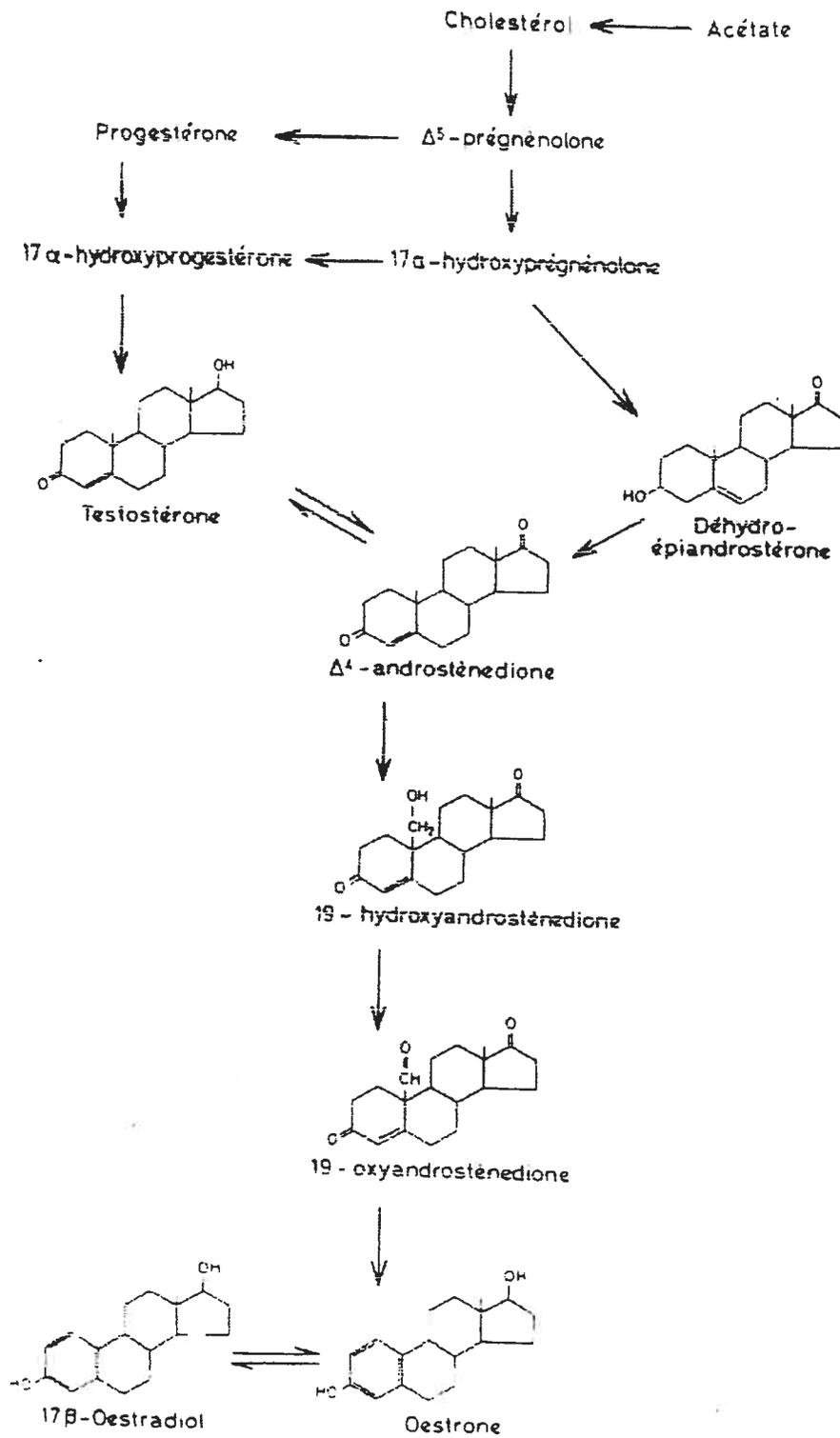


Figure 6 : Synthèse des œstrogènes et des androgènes.

Mais la DHEA n'est pas uniquement un précurseur d'hormones sexuelles, elle peut donc être sécrétée sous forme libre ainsi que sous forme de SULFATE de DHEA. Celui-ci représente 4/5 de la DHEA excrétée.

Pour le transport sanguin, la DHEA, comme tous les androgènes surrénaliens est liée avec une grande affinité à une glycoprotéine, la SSBG (Sex Steroid Binding Globulin). Les androgènes surrénaliens peuvent aussi être liés à l'albumine avec une faible affinité qui est compensée, en revanche, par sa grande quantité dans le sang.

Au niveau du catabolisme, la DHEA libre a une demi-vie de 20 à 30 minutes alors que celle du DHEAS est de 7 heures. Le catabolisme est essentiellement hépatique, mais il peut se produire dans de nombreux tissus où les enzymes nécessaires sont présents. Dans le foie, il se réalise une GLUCURO ou une SULFO-CONJUGAISON, ce qui permet d'obtenir des métabolites hydrosolubles pouvant ensuite être transportés plus facilement dans le plasma ou bien éliminés dans l'urine [6].

3.3 Mécanisme d'action

Le groupe des hormones stéroïdiennes inclut donc les œstrogènes, les androgènes, les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et la forme active de la vitamine D (calcitriol). Ces hormones traversent les membranes des cellules cibles pour atteindre le noyau, où elles se lient à des récepteurs spécifiques. Les hormones stéroïdes sont probablement transportées dans le cytoplasme par ces protéines elles-mêmes récepteurs [8].

La liaison des hormones stéroïdes à leurs récepteurs intracellulaires active ceux-ci qui, à leur tour, exposent des sites de liaison leur permettant de se lier à de courtes séquences d'ADN dans le noyau de la cellule cible. Les récepteurs de ces hormones appartiennent à une super famille de protéines apparentées dont on dénombre actuellement plus de trente membres différents. Elles ont toutes une structure dont le modèle comprend des domaines de liaison de l'hormone, de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription. Elles agissent donc en tant que facteurs de transcription répondant à l'activité hormonale et sont capables de réguler l'expression des gènes. L'homologie des domaines spécifiques de ces récepteurs est telle, que des structures chimériques ou hybrides peuvent être construites en utilisant des domaines appartenant à des récepteurs différents. Selon la construction de telles chimères, des gènes différents peuvent alors être activés par une hormone qui normalement n'était pas capable d'induire leur transcription [8].

La localisation des récepteurs dans leur forme libre et non stimulée, a été difficile à établir de façon définitive. De nombreuses évidences ont montré que les récepteurs aux hormones stéroïdes sont présents à la fois dans le cytosol et le noyau.

Chaque cellule cible contient de nombreux récepteurs. Par exemple, un hépatocyte contiendrait jusqu'à cent mille récepteurs aux glucocorticoïdes et on estime que le récepteur aux œstrogènes de l'utérus est présent, lui, à concentration plus faible, approximativement dix mille par cellule [8].

Pour résumer, la DHEA et la DHEAS vont donc atteindre et agir sur les *cellules cibles* qui reçoivent l'information grâce à un système de *récepteurs approprié* pour chaque hormone, et en conséquence, qui vont donner une **réponse hormonale spécifique**. La réponse hormonale survient quand l'hormone se lie au récepteur dans la cellule cible [9].

3.4 Rôles physiologiques

La DHEA, en tant qu'androgène, a un rôle négligeable chez l'homme adulte, par rapport à la testostérone. En revanche, chez l'enfant et chez la femme, comme mentionné précédemment, il y a un effet virilisant dû à la conversion en testostérone [10] et on a pu ainsi remarquer que lors d'une production excessive d'androgènes, c'est-à-dire lors d'un défaut enzymatique (syndrome adrénogénital) ou lors de tumeurs sécrétrices d'androgènes, qu'en effet ceux-ci avaient directement une action virilisante [7].

La glande surrénale fœtale [10] produit une quantité importante de DHEA (3 à 4 fois plus élevée que chez la mère), puis quelques semaines après la naissance, les valeurs sont plus basses que chez l'adulte. Enfin, peu avant la puberté, la production surrénale d'androgènes augmente [10], ce qui explique le développement de la pilosité axillaire et pubienne chez la fille et chez le garçon [7].

Récemment, on a découvert que les niveaux de DHEA chutaient considérablement chez les personnes âgées ou atteintes de maladies [11]. En effet, si le taux de DHEA atteint son maximum à l'âge de 20-25 ans, il y a une chute de 85-90% de ce taux à l'âge de 70 ans (figure 7).

Or, on s'est aperçu que les personnes qui avaient conservé un taux élevé de DHEA gardaient certaines capacités physiques ou mentales normalement perdues [10,12,13] et des expériences ont su montrer une corrélation appréciable entre les niveaux bas de DHEA et les effets du pro-vieillessement; parallèlement, l'administration de DHEA dans le cadre d'une thérapie aurait des effets anti-vieillessement [14,15].

La molécule de déhydroépiandrostérone semble ainsi posséder des propriétés empêchant l'apparition de certaines maladies liées à l'âge (maladies cardio-vasculaires, cancers, ostéoporose, ...) ou bien encore permettant de restaurer certaines capacités perdues avec le temps (perte de mémoire, perte d'activité physique, ...). Elle posséderait également des propriétés bénéfiques chez l'homme autre que le ralentissement du vieillissement, comme une capacité certaine à agir contre l'obésité ou encore contre la dépression [16,17,18].

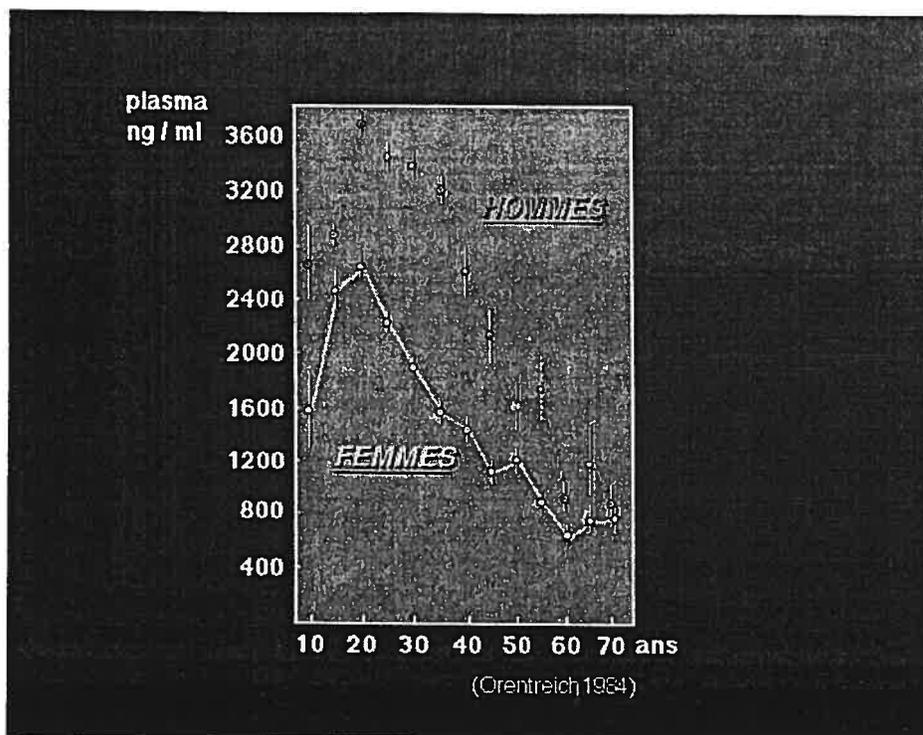


Figure 7 : La DHEA et le vieillissement

4. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES STÉROÏDES UTILISÉS POUR L'ANALYSE PAR SÉPARATION

4.1 Structure

On trouve donc les stéroïdes sous la forme libre ou conjuguée (sulfatée ou glucuronidée) dans les différents compartiments biologiques de l'organisme. C'est la raison pour laquelle la solubilité des stéroïdes dans l'eau va être influencée et le choix de leur mode d'extraction adapté en conséquence.

De plus, le poids moléculaire de ces stéroïdes varie (200-1000 kda) et il s'agit de composés non volatiles. Il est donc à noter que lors de l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse, il faudra obligatoirement faire appel aux méthodes de dérivation déjà disponibles ou procéder à la mise au point de nouvelles techniques selon les espèces étudiées.

Les groupes majeurs fonctionnels des stéroïdes à considérer sont les **hydroxyles** et les **cétones** qui sont très fragiles et sujets à une perte en présence de réaction chimique pouvant prendre place dans un système ouvert ou fermé. Il est à noter que ceci s'avère être le principal désavantage, voire l'unique, pour la détection de haute sensibilité réalisée par la spectrométrie de masse.

4.2 Leur étude dans différents milieux biologiques

En clinique, les matrices utilisées pour l'analyse des stéroïdes sont nombreuses.

En effet, nous avons le sérum, la salive, l'urine dans lesquels les stéroïdes sont toujours présents, mais toujours sous des formes chimiques différentes (conjugués, libres, liés aux protéines...). Il faudra tenir compte de ces différents comportements lors du choix de la méthode d'analyse ainsi qu'évidemment de l'équipement disponible au sein du laboratoire d'analyses.

4.3 Sélection de la matrice pour l'étude envisagée: L'urine

L'urine humaine contient des stéroïdes. Les formes conjuguées constituent la majeure partie (99.7%). Elle est donc représentative des métabolites étudiés et de plus, ce liquide biologique est facilement accessible.

Habituellement, les spécimens d'urine sont collectés sur 24h afin d'éviter l'influence du rythme circadien sur l'excrétion des stéroïdes et de leurs métabolites.

4.3.1 Forme libre

Dans les urines, les formes libres sont, en général, présentes en très faibles concentrations comme nous l'avons vu, mais représentent la forme la plus importante, car il s'agit de la forme **active** dans le sérum. Par conséquent, une pré-purification de l'urine afin de permettre la détection des stéroïdes est capitale et s'effectuera souvent à l'aide de cartouches d'extraction spécifiques.

4.3.2 Forme conjuguée

Comme mentionné précédemment, lors de l'emploi du GC, il est absolument nécessaire d'hydrolyser les stéroïdes avec un acide fort inorganique ou de les traiter avec des enzymes du type glucuronidase ou sulfatase, selon le cas, pour rendre ces derniers volatiles et par conséquent leur quantité plus appréciable. Cette étape limite donc l'emploi de la méthode citée, car elle augmente considérablement la durée de l'analyse des composés.

La sélection d'une autre technique s'impose car on ne peut se passer tout de même de leur étude.

En effet, les formes conjuguées fournissent de multiples informations, dont la capacité de conjugaison de certains enzymes, comme l'hydroxylase, indispensable au bon fonctionnement du foie.

Or, les stéroïdes conjugués peuvent être la cible directe des analyses pratiquées par le HPLC (chromatographie en phase liquide de haute performance) et le gain de temps apporté par cette méthode devient alors non-négligeable.

De plus, cette méthode offre la possibilité de choix entre deux modes d'ionisation chimique, soit le mode négatif ou positif selon les besoins, ce qui élargit les possibilités du champ d'étude envisagé.

5. LES MÉTHODES ACTUELLES D'ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE

5.1 Historique

1903-1906 : Découverte de la chromatographie par le botaniste russe CVET (ce nom est écrit parfois TSWETT dans certains ouvrages). Le principe repose sur la séparation et l'isolement de pigments végétaux dans une colonne remplie de craie pulvérisée où CaCO_3 joue le rôle d'adsorbant), cette dernière éluée à l'éther de pétrole, d'où la naissance du nom de **chromatographie**, signifiant enregistrement graphique de couleurs en Grec.

1930-1931 : Essais de la technique avec les travaux de KUHN et LEDERER en Allemagne, conduisant à de nombreuses découvertes dans les domaines de la biochimie et de la chimie des substances naturelles.

1952 : Découverte de la chromatographie de partage gaz-liquide par MARTIN et JAMES. Les applications furent immédiates pour les corps gras et au niveau de la parfumerie. On débute également la recherche fondamentale sur la théorie de la chromatographie et on commence la standardisation des appareils utilisés en chromatographie phase gazeuse.

1960 : Mise en place de la chromatographie en phase liquide moderne appelée la **chromatographie liquide haute performance (HPLC)**. Elle est toujours en pleine évolution. Elle utilise des colonnes de petit diamètre (2 à 5 mm) remplies de particules très fines (3 à 5 μm).

De manière générale, la phase mobile est toujours introduite sous pression relativement élevée dans la colonne (100 Bars) et le débit est contrôlé par des pompes dites de haute pression (1 à 2 ml/ min en HPLC analytique).

Il existe donc diverses méthodes de tests des stéroïdes [19,20].

5.2 HPLC/UV

Actuellement le HPLC équipé d'une colonne de type C18 (phase inversée) est l'une des techniques les plus performantes sur le marché, et par conséquent, la plus employée pour les diverses substances à **séparer**, dont les stéroïdes.

En revanche, les méthodes utilisées afin de **détecter** les composés sont diverses et toutes plus ou moins efficaces et pourront donc s'illustrer selon d'anciens procédés avec l'emploi des détecteurs Ultra-Violet (UV) ou encore avec des instruments plus récents, comme la spectrométrie de masse.

Sachant que les stéroïdes sont souvent présents en très faible quantité dans les liquides biologiques et afin que l'on puisse être capable de les détecter dans leur totalité, la condition essentielle requise à la réussite de la manipulation, s'avèrera être précisément l'emploi d'un matériel de **haute sensibilité**.

Les méthodes classiques de détection par fluorescence et chemiluminescence [21] furent ainsi développées en ce sens, essentiellement pour la plupart des nombreux essais en laboratoire exigeant de la précision et de l'exactitude.

Mais on ne réussira pas à éviter la dérivation des composés à analyser par le seul fait que les stéroïdes ne fluorescent pas naturellement à l'exception des œstrogènes.

Cependant, la dérivation et la procédure de purification ne sont pas recommandées pour l'utilisation clinique de la méthode, en raison d'un temps d'analyse trop long. On essaya alors de modifier la technique de dérivation employée afin de gagner du temps.

C'est ainsi que l'on passa progressivement de la dérivation classique, relativement difficile et longue à effectuer, vers la dérivation photochimique, à l'aide de marqueurs réactifs [21] ou de substances réactives (éthanol, acide sulfurique).

5.3 HPLC/radio-immunologies

La radio-immunologie est utilisée essentiellement pour calculer le rapport DHEA/DHEAS [22]. Il s'agit d'une méthode sensible, simple mais peu précise, car les résultats obtenus peuvent varier [23]. Il semblerait que les données dans la littérature soient différentes selon les trousse de tests employées. En effet, il peut apparaître un écart relativement important dans la valeur des concentrations mesurées pour un échantillon plasmatique identique [23]. Cependant, il faut noter, et de ce fait prendre en considération, que les troubles hormonaux rencontrés chez les patients sont d'origines multiples, et par conséquent, amènent un degré de variabilité supplémentaire aux mesures trouvées selon les individus sélectionnés [24,25].

En effet, lors d'une expérience visant à valider l'emploi de cette méthode, le Collège Américain des Pathologistes avait soumis quatre échantillons identiques pour une analyse du taux sanguin de DHEAS auprès de deux cent laboratoires différents, et avait noté des résultats pour des concentrations connues, pouvant varier jusqu'à quatre fois entre eux [26] lors des contrôles effectués.

De plus, lorsque ces échantillons furent analysés par LC/MS, les résultats indiquaient des concentrations correspondantes à la moitié des valeurs précédemment trouvées par radio-immunologie [26]. À noter qu'il existe cependant certaines démonstrations indiquant une bonne corrélation des résultats entre la méthode HPLC/MS et la radio-immunologie [27,28]. Les résultats obtenus peuvent donc être très discutables.

La limitation de la technique par RIA (essai radio immunologique) semble provenir principalement des interférences pouvant avoir lieu entre le co-éluant choisi et la fraction de l'échantillon lors de l'analyse, entraînant ainsi une mauvaise séparation des poids moléculaires voisins. On note l'amélioration de la sélectivité et la spécificité de la méthode RIA si on lui associe la technique par chromatographie liquide, ces dernières devenant alors complémentaires [29,30].

La DHEA libre dans l'urine, ainsi que d'autres androgènes libres ou conjugués [31] sont ainsi estimés par HPLC couplée à la RIA [32]. Utilisant cette combinaison la DHEA ainsi que douze autres hormones naturelles peuvent être quantifiées dans des volumes de sérum pouvant être inférieur à 0.1 ml [32].

5.4 GC/MS

La chromatographie est donc une méthode physique de séparation basée sur une partition des substances entre la phase stationnaire et la phase mobile.

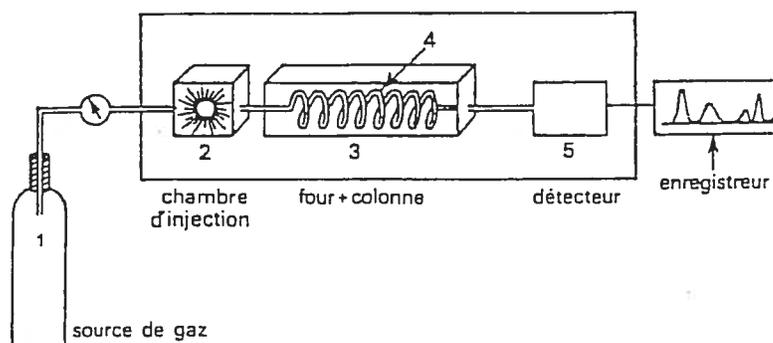
Dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse, la phase mobile est un gaz inerte. La phase stationnaire est un liquide de très haut point d'ébullition greffée à la paroi de la colonne. La séparation est basée sur la différence de coefficients de partage des constituants entre la phase stationnaire et la phase mobile. Ces coefficients reflètent les différences de solubilité des composés à séparer entre phases liquide et gazeuse.

La phase mobile étant un gaz, les composés peu volatils devront être transformés chimiquement (dérivation) pour abaisser la température d'ébullition.

De plus, l'appareillage devra permettre une alimentation en gaz à débit constant, l'introduction et la vaporisation du mélange à analyser, le maintien d'une température appropriée à l'analyse, la détection des composés et leur séparation. Pour répondre à ces exigences, un chromatographe en phase gazeuse comprend: un circuit gazeux, un injecteur, une colonne insérée dans un four à thermostat et un détecteur (figure 8).

On peut donc dire, pour résumer, que la technique de chromatographie en phase gazeuse va nous permettre de séparer des mélanges, en les faisant circuler dans une colonne chromatographique où chaque composé sera élué dans un temps donné de la phase gazeuse. Il s'agit d'un bon moyen de séparation, mais pas d'une méthode permettant d'identifier de façon positive tous les analytes.

L'association du GC à la spectrométrie de masse va permettre ensuite de déduire à partir du spectre de masse, l'identité d'un composé inconnu [33]. En effet, à son arrivée dans la source, chaque composé est ionisé par un faisceau d'électrons de haute énergie, ce qui rend ces derniers détectables lors du contact avec la paroi du spectromètre de masse.



Conditions opératoires :

- Gaz vecteur (= phase mobile) : hélium - 16 kPa
- Température injecteur : 250 °C
- Colonne : 10 m x 0,53 mm - phase stationnaire : polydiméthylsiloxane
- Gradient de température : de 100 à 250 °C à raison de 10 °C/min.
- Détection : FID (détecteur à ionisation de flamme) - Température : 300°C

Figure 8 : Chromatographie en phase gazeuse, conditions et mode opératoire.

- (1) Circuit gazeux
- (2) Injecteur
- (3) (4) Colonne insérée dans un four thermostaté
- (5) Détecteur

Il est alors possible de comparer le spectre de masse obtenu à un standard préparé dans les mêmes conditions que notre échantillon avec une librairie ou encore une banque de données déjà disponibles.

Il est également important de savoir que les techniques pour ioniser les substances inconnues et recherchées sont multiples.

Parmi elles, l'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) est la technique d'ionisation la plus douce [34,35]. Les gouttelettes sont vaporisées vers une région où des ions seront formés à pression atmosphérique par une charge électrique. L'ionisation résulte des réactions chimiques entre l'échantillon et les ions du solvant. Cette méthode est employée notamment pour les composés non volatiles et labiles thermiquement. On peut opérer avec un solvant 100% organique ou un solvant 100% aqueux. La valeur minimale du flot d'écoulement employé est de l'ordre de 2 ml/min.

La technique d'ionisation TSP (thermospray) est en revanche employée pour les composés de nature polaire seulement, dont le poids moléculaire est inférieur à 1,000.

Il existe aussi la méthode CI (chemical ionisation), considérée comme un mode d'ionisation doux. Il s'agit d'un gaz réactif ionisé par électrons qui réagira avec l'échantillon considéré (échantillon ionisé).

L'*electrospray* (ESP) fait partie également des techniques les plus connues et employées et sera revue en détail dans les prochains paragraphes en raison de son application à l'étude envisagée par le laboratoire.

5.5 LC/MS

La chromatographie en phase liquide associée à la spectrométrie de masse (LC/MS) et l'emploi d'une technique d'ionisation douce (*electrospray*), ne tiendra pas compte des groupes fonctionnels caractéristiques de la molécule et permettra ainsi de confirmer rapidement l'identité d'un large éventail de composés organiques, qu'ils soient gros, petits, de nature polaire ou non polaire (figure 9). LC/MS pourra nous informer également sur le poids des molécules, sur la structure résultante dépendant essentiellement de la fragmentation subie, ainsi que sur la sélectivité et la sensibilité demandée ou exigée, liée directement aux caractéristiques propres de l'appareillage, pour la qualification et la quantification rapide des composés présents dans les matrices biologiques [36].

Il est à noter que l'emploi de la spectrométrie de masse permettra donc l'apport d'informations supplémentaires comparativement aux détecteurs habituellement employés en chromatographie et autorisera une analyse directe des métabolites conjugués non-volatiles sans avoir à les dériver ou à les hydrolyser au préalable [37,38] comme pour le GC/MS. De plus, un HPLC ayant pour interface un spectromètre de masse, aura une phase mobile exigeant seulement l'emploi d'un solvant classique. L'acide acétique, l'acide formique, le trifluoro-acide acétique, l'acétate ou le formate d'ammonium seront utilisés sans précaution particulière. Seul l'introduction de colonnes HPLC ne pouvant pas supporter des pH de valeurs élevées (>11) proscrit l'utilisation de phase mobile à caractère basique tels que l'ammonium, le *tert*-éthylamine, etc.

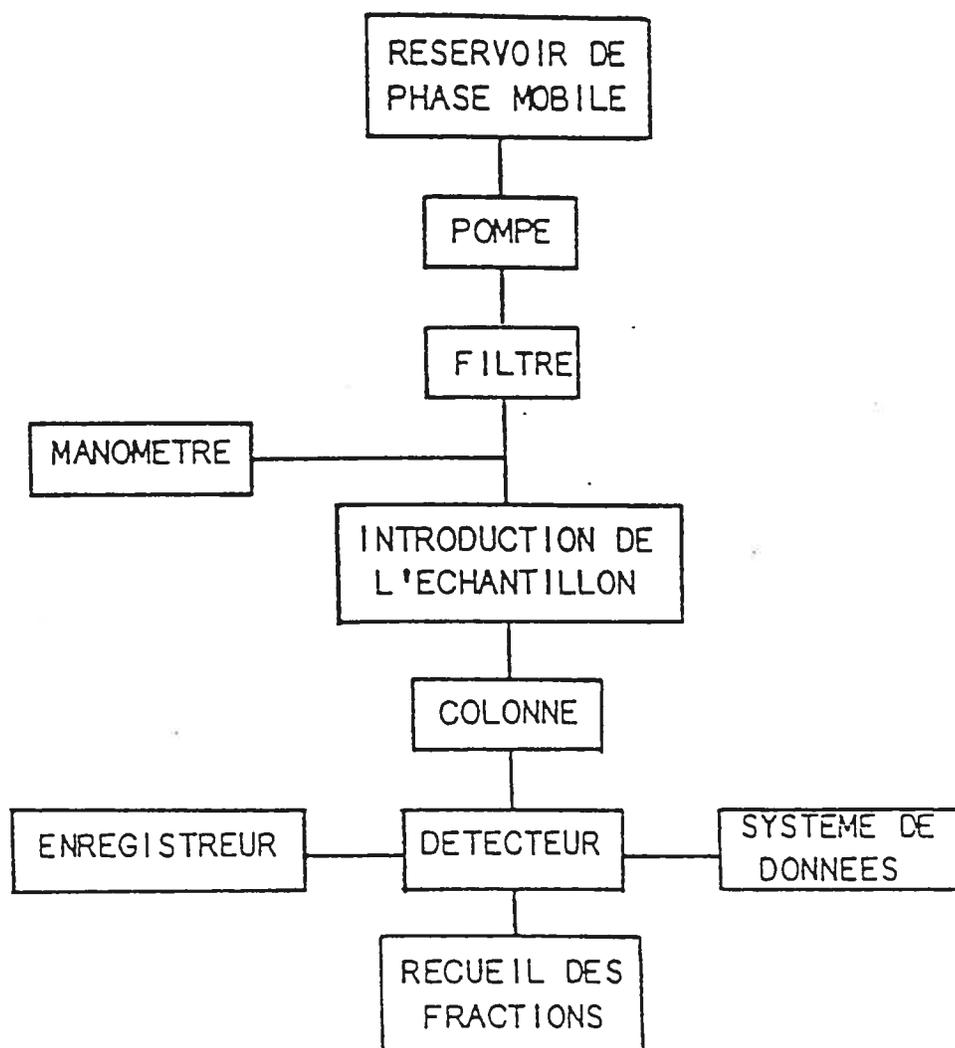


Figure 9 : Schéma fonctionnel d'un système moderne de chromatographie en phase liquide.

L'intérêt pour déterminer la concentration du DHEA, DHEAS circulant et des composés semblables n'est pas nouveau. Les stéroïdes conjugués présents dans le plasma, notamment les sulfates, ont été les premiers analysés par GC/MS, considéré comme l'appareil de référence, et à l'origine de l'apparition et du développement des techniques de chromatographie plus efficaces (degré et pouvoir supérieur de séparation des molécules) et donc spécifiques (LC/MS, modèle Sephadex LH-20) [39,40].

DHEAS a été également la première hormone quantifiée par GC/MS en mode opératoire d'analyse SIM (*Selected Ion Monitoring*) [41,42]. Cependant, pour effectuer ces premières études, le DHEAS et les autres stéroïdes conjugués devaient être hydrolysés en priorité avant les analyses, ainsi que dérivés [26]. Cette technique suggérerait donc de nombreuses limitations. Plus précisément, l'hydrolyse enzymatique de certains stéroïdes conjugués restait incomplète dû à une inhibition compétitive ou non compétitive des enzymes pouvant prendre place dans certaines matrices biologiques. L'incapacité de l'aryl sulfatase à enlever le groupement sulfate en position 17 est bien documenté [43] ainsi que la variabilité du rendement des préparations β -glucuronidase selon les composés [44,45]. De plus, la contamination des préparations enzymatiques destinées à l'hydrolyse [44,45] des stéroïdes restait possible et pouvait entraîner la conversion de ces derniers en d'autres molécules selon les conditions de réaction [46].

L'utilisation des méthodes GC/MS et LC/MS pour l'analyse des stéroïdes peuvent donc être ainsi revues et comparées [47,48].

L'analyse du DHEAS par HPLC/MS/*Thermospray* est également rapportée. Le standard interne utilisé étant le $[7,7\text{-}^2\text{H}_2]\text{DHEAS}$, les stéroïdes sulfatés sont mesurés dans le plasma puis séparés dans une colonne C18 où la phase mobile est composée de méthanol (200 mM) et d'acétate d'ammonium (60:40). Cette technique a surtout été utilisée pour déterminer le taux de DHEAS au niveau sanguin. Les valeurs obtenues ont été de l'ordre de 7.4×10^{-6} mol/L chez l'homme et 5.85×10^{-6} mol/L chez la femme [26].

L'association HPLC/MS/*Electrospray*, quant à elle, a surtout été reconnue pour sa capacité à séparer, puis à identifier chaque stéroïde, dont le DHEAS, présent dans un mélange de 7 stéroïdes sulfatés [49,50]. La détection s'effectuant de préférence, cette fois-ci, dans le mode *FULL SCAN* ou MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) pouvait ainsi être décrite [50]. Pour réaliser une séparation isocratique des stéroïdes sulfatés comme ci-dessus, on utilisera généralement une colonne C18 et une phase mobile se décrivant comme un mélange d'eau et d'acétonitrile (15:85), s'écoulant à une vitesse moyenne de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. On obtiendra ainsi un spectre correspondant aux anions si l'on travaille en mode négatif [50], et aux cations en mode positif, présents dans le mélange.

Une autre étude décrit l'installation d'une colonne C18 ayant un flot d'écoulement de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. On utilise alors un gradient d'élution composé d'acétonitrile ou de méthanol avec de l'ammonium acétate. Un spectromètre de masse (triple quadripôle) équipé d'un vaporisateur pour ioniser les molécules sert de détecteur. Le glucuronide de DHEA forme essentiellement l'ion $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ et le DHEAS, l'ion di-ammonium $[\text{M}+\text{NH}_3.\text{NH}_4]^+$.

En mode négatif, l'ion $[M-H]^-$ est la forme prédominante trouvée pour ces deux composés démontrant une intensité importante [49].

On décrit également l'analyse par LC/MS du 2,4-DNP hydrazones de DHEAS dans la littérature [51]. Seuls quelques paramètres seront ensuite modifiés d'une méthode à l'autre, mais le principe restera toujours le même.

Shimada *et al.*, ont réussi à séparer et à caractériser la DHEA présente au niveau du système nerveux central, chez le rat, par APCI/MS [52]. De même, ils réussirent la caractérisation du stéarate et du palmitate (esters acides gras de DHEA) au niveau cérébral chez ce rongeur.

Le HPLC/APCI/MS peut aussi être utilisé pour estimer le taux de DHEAS dans le sérum, le cœur, les corticosurrénales, etc. [53].

Une nouvelle méthode d'analyse extrêmement sensible, le nanoESI-MS a récemment été mise au point [54,55] pour la détection du DHEA, DHEAS et autres stéroïdes. La limite de détection pour les stéroïdes sulfatés se trouvant dans un milieu biologique, est alors abaissée à 80 fg/ μ l pour un échantillon de volume 1 μ l seulement [53].

La spectrométrie de masse (*triple quadripôle*) permet ainsi d'examiner les stéroïdes conjugués et libres qui sont extraits d'un mélange. Ainsi, le niveau endogène hormonal peut-être connu, c'est-à-dire détecté et quantifié dans des matrices, tels que le sang et l'urine en utilisant pour standard interne $[^2H_2]DHEA$. DHEAS est ainsi reconnu dans le liquide céphalorachidien par LC/MS avec une colonne Zorbax de type C18 et une phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile (30:70) [55].

La sulfonation du DHEA est alors étudiée dans des cultures intactes aussi bien que dans les préparations sub-cellulaires utilisant LC/MS. Des informations additionnelles concernant les structures chimiques peuvent être obtenues si la spectrométrie de masse en tandem est installée [56,57,58] ou encore par l'application d'un voltage élevé. L'analyse du sérum de bébés normaux ou prématurés est ainsi rapportée.

Une publication récente [59] compare les résultats de quantification dans l'urine des 17-kétostéroïdes sulfatés et glucuronidés par LC/Ion *Trap* MS et une ionisation effectuée par vaporisateur sonore. L'ionisation de l'analyte par vaporisation sonore crée des gouttelettes chargées dont la vitesse du gaz est supérieure à la vitesse sonore. Par conséquent, les ions gazeux sont émis des gouttelettes sans l'application de chaleur ou de champ électrique. Il a été démontré que l'injection directe des 17-kétostéroïdes dans une solution tampon de 100 mM, génère un signal 20 fois plus fort que celui obtenu par la technique *electrospray* sans perte de sensibilité. Avec cette méthode, le DHEAS et le DHEAG ont une limite de détection de 10 µl et 3 µl [59], respectivement. Prough et al., ont étudié le métabolisme du DHEA chez le rat et chez l'humain au niveau du foie (fractions microsomales) utilisant LC/APCI/MS. Les métabolites identifiés dans les deux espèces sont le 16α-hydroxy-DHEA, 7α-hydroxy-DHEA et 7-oxo-DHEA [60].

5.6 Sport et dopage : technique de détection de produits anabolisants

Le dépistage du dopage à la testostérone basé sur la détermination du rapport testostérone/épitestostérone (isomère de la testostérone) par **chromatographie en phase gazeuse** pose de nombreux problèmes aux laboratoires accrédités par la commission médicale du Comité International Olympique (CIO). Pour ce rapport T/E une valeur moyenne statistique de 1 a été déterminée ; lors d'un dopage, ce rapport augmente. Le CIO admet qu'un rapport T/E supérieur à 6 est la preuve d'un dopage par la testostérone, or il a été décrit des cas naturels, sans dopage, de rapports T/E compris entre 6 et 9. Depuis 1992, le CIO recommande de pratiquer des contrôles supplémentaires pour les athlètes ayant un rapport T/E compris entre 6 et 10 avant de les déclarer positifs. D'autre part, des valeurs de T/E inférieures à 6 mais voisines de 6 peuvent correspondre à un dopage dans sa phase terminale, c'est-à-dire à un retour vers la normale [*Ressource électronique, CNRS*].

6. HYPOTHÈSE ET BUT DE RECHERCHE

La spectrométrie de masse en tandem permet d'identifier et de mesurer les différents stéroïdes par fragments caractéristiques.

Mettre au point une nouvelle méthode d'analyse rapide et sensible en milieu biologique.

7. LES OBJECTIFS

7.1 Objectif # 1: Définir un profil caractéristique pour chaque stéroïde.

Utilisation de la spectrométrie de masse en tandem pour obtenir tous les ions parents et tous les ions filles de chaque stéroïde étudié. Il s'agit de définir une empreinte propre à l'aide de spectres et de chromatogrammes spécifiques à tous les composés sélectionnés sans utiliser de colonne de séparation, que ce soient des isomères ou des composés de poids moléculaires distincts.

7.2 Objectif # 2: Rendre détectable la DHEA.

La molécule de DHEA est neutre, et est présente en très faible concentration dans l'urine, car il s'agit d'un composé non conjugué, et donc, non sujet à l'élimination rénale. Par dérivation, on peut produire un pic d'intensité important; cependant, il s'agit d'une étape supplémentaire assez longue à réaliser [61], pouvant nuire ainsi à la rapidité de la méthode d'analyse envisagée. On veut donc dériver la DHEA de manière efficace, c'est-à-dire en procédant à une réaction chimique simple et spontanée.

7.3 Objectif # 3: Mise au point de la méthode d'extraction.

On optimise les réactions entre l'échantillon, les solvants et l'adsorbant afin de retenir ou d'éluer au mieux les composés étudiés. Pour ce faire, l'utilisation de cartouches spécifiques s'impose. En réalité, il s'agit d'un premier processus de purification (ou pré-purification) de la matrice urinaire avant que l'échantillon soit injecté automatiquement dans l'analyseur. Les interférences possibles entre les différentes molécules ionisées présentes sont ainsi diminuées, grâce à certains critères de sélection déjà imposés (moment dipolaire, forces d'attraction, liaisons covalentes...).

7.4 Objectif # 4: Construction des courbes d'étalonnage **sans matrice urinaire**.

Dans un premier temps, il est important de tracer les courbes d'intérêts à partir d'un milieu neutre comme les solvants, afin de mesurer de façon précise les ajouts d'étalons à la solution dont les concentrations sont connues et d'obtenir les équations exactes correspondantes.

Afin de tracer des courbes valides et d'étalonnage aux conditions de l'expérience, le choix du mode d'analyse doit également être déterminé.

Pour le spectromètre de masse 1 (MS1), le choix doit s'effectuer entre le mode **FULL SCAN**, qui est un balayage de tous les ions moléculaires **PAR (parents)** présents à tension continue ou bien, le mode **SIR (Selective Ion Recording)**, où seuls les poids moléculaires sélectionnés sont analysés.

Il est à noter que le mode SIR possède une sensibilité 100 fois supérieure au mode *FULL SCAN*. Pour le spectromètre de masse 2 en tandem, le mode **DAU** (*daughters*) peut-être choisi si le but est d'obtenir les molécules filles de chaque ion parent présent afin d'élucider une structure et de développer éventuellement la méthode appelée **MRM** (*multiple reaction monitoring*), comparable à la méthode SIR utilisée en MS1, et employée notamment pour la recherche rapide des composés connus à partir d'un échantillon (détection de l'usage de stéroïdes anabolisants chez les athlètes).

On peut régler l'appareillage également selon un mode capable de déterminer uniquement la perte d'un fragment neutre ou d'un groupe fonctionnel à partir d'un parent du spectromètre de masse 1 en synchronisation avec le fonctionnement du spectromètre de masse 2.

La détermination de la plage de concentrations dans laquelle il est possible de travailler en fonction du matériel disponible et la capacité de ce dernier, doit être aussi connue. De même une recherche dans la littérature des valeurs physiologiques des stéroïdes étudiés doit être entreprise.

7.5 Objectif # 5: Construction des courbes de calibrage.

Ayant déterminé précédemment le mode d'analyse ainsi que la plage de concentrations pour l'étude visée, l'établissement des courbes de calibrage par ajouts d'étalons à des extraits de matrice biologique est l'étape suivante à réaliser.

On pourra ainsi savoir si un effet de matrice est présent ou non, en fonction des nouvelles courbes d'équations obtenues. En effet, si ce dernier est inexistant, on pourra alors travailler sans avoir à modifier le milieu dans lequel se trouve l'analyte et éventuellement travailler dans l'eau, simplifiant par la même occasion les manipulations décrites.

Des ajustements possibles pourront avoir lieu et seront réalisables lors de l'expérimentation pour miser sur la précision et l'exactitude des résultats, en soit atteindre un des objectifs principaux.

7.6 Objectif # 6: Application clinique.

La prospection des échantillons d'urine de femmes enceintes en période de périnatalité sera alors effectuée.

La construction des courbes de calibrage définitive à l'aide d'échantillons de patients, maintenant réalisable, constituera l'étape finale du protocole expérimental proposé.

Chapitre 2 : Matériels

1. CHOIX DES STÉROÏDES PERMETTANT D'ÉVALUER LA FONCTION SURRÉNALIENNE

- Déhydroépiandrostérone (DHEA), PM: 288.4.
- Sulfate de DHEA (DHEAS), PM: 367.5.
- DHEA glucuronide (DHEAG), PM: 464.5.
- Testostérone, PM: 288.4.
- Sulfate de Testostérone, PM: 367.5.
- Testostérone glucuronide, PM: 464.5.
- Androstérone, PM: 290.4.
- Sulfate d'androstérone, PM: 369.5.
- Androstérone glucuronide, PM: 466.6.
- Épitestostérone, PM: 288.4.
- Sulfate d'épitestostérone, PM: 367.5
- Épitestostérone glucuronide, PM: 464.5

Soit un total de 12 stéroïdes sélectionnés appartenant à la famille des androgènes (figure 10) et ayant tous la particularité d'être anabolisants [62]. Notons que toutes ces substances font également partie de la liste des substances interdites par le Comité International Olympique (C.I.O).

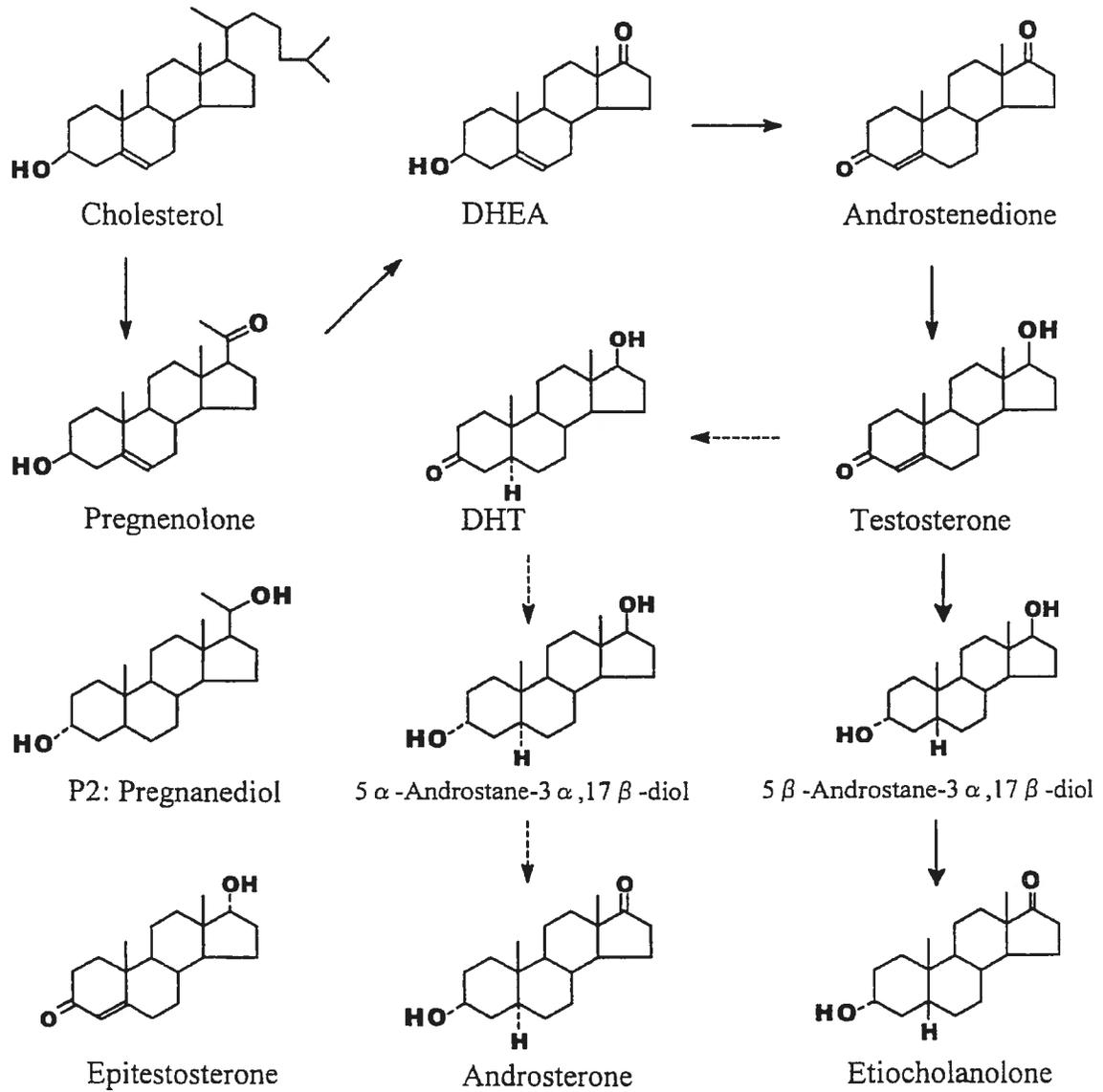


Figure 10 : Les principaux androgènes et leur métabolisme.

2. CHOIX DES STANDARDS INTERNES CORRESPONDANTS

Les standards internes (SI) se sélectionnent selon les conditions imposées suivantes: La structure chimique d'un standard interne doit être similaire à celle que l'on veut quantifier. Il doit avoir une sensibilité voisine de l'analyte et donc des propriétés physico-chimiques proches (point d'ébullition...). Il doit se détecter de manière semblable (technique d'ionisation...) et avoir les mêmes caractéristiques d'extraction. Enfin, les poids moléculaires des SI choisis doivent être absents de la matrice biologique utilisée afin de ne pas fausser les dosages [63].

Il est essentiel de respecter ces critères correctement, car ces substances vont garantir la reproductibilité de la méthode, dont l'extraction est la composante majeure.

Les standards internes ci-dessous sont ainsi sélectionnés, puis testés :

- Acide lithocholique sulfaté (LCAS) pour les composés sulfatés, PM : 456.6.
- 17- β -Estradiol-17-glucuronidé pour les composés glucuronides, PM : 448.5.
- Cholestérol pour les composés libres, PM : 386.
- Nandrolone pour les composés libres, PM : 274.4.

3. COLLECTION DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

Les échantillons urinaires contrôles collectés à partir de volontaires féminines, sont congelés à -80°C et préservés sans agents jusqu'au moment de l'analyse.

Le département de biochimie clinique de l'hôpital Ste-Justine (Montréal, Canada) a fourni les échantillons nécessaires, provenant majoritairement du laboratoire central de l'institut, afin de procéder aux analyses par ESI/MS.

4. EXTRACTION EN PHASE SOLIDE DES STÉROÏDES A PARTIR DE L'URINE

4.1 Principe de l'extraction en phase solide

Les trois principaux objectifs de l'extraction en phase solide se résument à purifier, à concentrer l'échantillon et à favoriser un échange entre les solvants utilisés et l'analyte sélectionné avant le commencement de l'analyse pour éviter toutes réactions non désirées.

La réussite d'une extraction en phase solide se réalise en suivant particulièrement les quatre étapes suivantes:

i. Le conditionnement

Il s'agit, dans un premier temps, de préparer la cartouche choisie en solvant son adsorbant, de manière à créer des interactions entre ce dernier et l'échantillon ajouté ultérieurement (figure 11).

Ceci est réalisé plus précisément en introduisant le solvant approprié, suivi du dépôt d'un petit volume de liquide dont la nature est similaire au milieu dans lequel se trouve la substance à analyser. Un exemple courant pour les composés non polaires (les stéroïdes anabolisants) contenus dans un milieu aqueux, est le conditionnement de cartouche effectué en solvantant l'adsorbant par du méthanol (MeOH), puis en ajoutant un petit volume d'eau, le tout avant le dépôt de l'analyte.

Mode	Phase stationnaire	Fonctions superficielles	Phases mobiles communes	Exemples d'application		
ADSORPTION	Gel de Silice	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ -\text{Si}-\text{O}-\text{Si}- \end{array}$	hexane, chloroforme, isopropanol	47 éthers, esters, porphyrines, mycotoxines, vitamines liposolubles		
	Alumine	Al - O - Al	hexane, chloroforme, isopropanol	amines		
PARTAGE	PHASES GREFFÉES	amine	- NH ₂	hexane, chloroforme, isopropanol	sucres, stéroïdes, composés nitrés	
		cyanure	- CN	hexane, chloroforme, isopropanol	composés nitrés, stéroïdes, acides aminés	
		diol	glycidoxy-éthyl méthoxy silane	eau, Na ₂ HPO ₄ 0,1 M	protéines, peptides, composés tensioactifs aqueux	
		PHASES INVERSEES	RP-2	diméthylsilane	eau, acétonitrile, méthanol	amines, phénols, vitamines hydrosolubles
		RP-8, C-8	octylsilane	eau, acétonitrile, méthanol	cathécolamines, stéroïdes, huiles essentielles	
PHASES NORMALES	RP-18, ODS	octadécylsilane	eau, acétonitrile, méthanol	analgésiques, phtalates, aromatiques polynucléaires		

Mode	Phase stationnaire	Fonctions superficielles	Phases mobiles communes	Exemples d'application
ECHANGE D'IONS	échangeur de cation fort	acide sulfonique	Na ₂ HPO ₄ (0,01 à 0,1 M)	vitamines hydrosolubles, purines, acides aminés, nucléosides
	échangeur d'anion fort	amine quaternaire	Na ₂ HPO ₄ (0,01 à 0,1 M)	nucléotides
	échangeur d'anion faible	-NH ₂	H ₃ PO ₄ (0,01 à 0,05 M)	colorants alimentaires, hydrates de carbone
EXCLUSION STERIQUE	Gel aqueux	divinyl-benzène sulfoné	eau	protéines, peptides, sucres
	Gel organique	divinyl-benzène	chloroforme, tétrahydrofuranne	polymères, caoutchoucs
	Silice à pores de dimensions contrôlées	Gel de silice	tétrahydrofuranne, alcools, eau	polymères, composés biologiques
	Verre à pores de dimensions contrôlées	Verre poreux	tétrahydrofuranne, alcools, eau	composés biologiques

Figure 11 : Remplissage des colonnes (phases stationnaires) et phases mobiles les plus fréquemment utilisées en C.L.H.P.

ii. La rétention

On dépose l'échantillon sur l'absorbant conditionné *spécifiquement* au préalable (se référer à la première étape), créant ainsi essentiellement une retenue des composés d'intérêts grâce aux interactions chimiques caractéristiques présentes comme les forces de Van der Waals ou encore des interactions de type non polaires se produisant entre les chaînes hydrocarbure de l'analyte et celles de la cartouche utilisée (figure 12). On peut remarquer que plus ces interactions s'effectueront de façon spécifique, meilleure sera la pureté de l'échantillon préparé.

C'est ainsi que l'on établira une première sélection face aux composés que l'on veut retenir préférentiellement sur le lit de la cartouche, les autres molécules s'écoulant au travers de ce dernier.

iii. Le rinçage

Après le passage de l'échantillon (étape 2), on procède au rinçage de la cartouche permettant d'éliminer ainsi les contaminations pouvant être encore présentes comme indiqué ci-dessus. Il est à noter que le solvant communément utilisé pour l'extraction des composés polaires est l'eau (composé très polaire), et ne perturbera et ne modifiera aucunement les molécules retenues sur la cartouche.

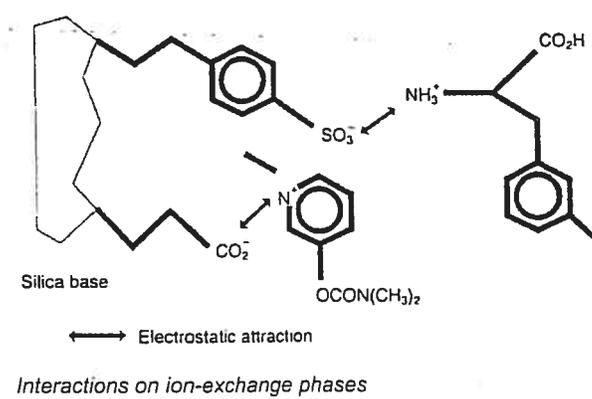
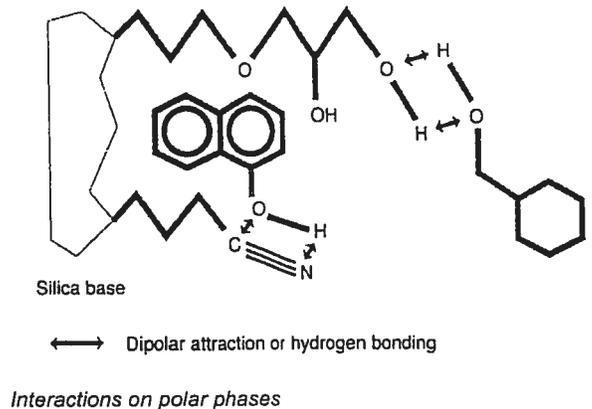


Figure 12 : Interaction moléculaire.

iv. L'élution

La dernière étape consiste à choisir un éluant de nature suffisamment forte pour rompre les liens créés entre l'adsorbant et l'analyte, résultant en la récupération unique des composés retenus auparavant sur la cartouche grâce aux conditions imposées selon l'objectif fixé. Pour illustrer à nouveau ce cas de figure, toujours avec l'extraction de composés non polaires, l'emploi du méthanol comme éluant est commun, car il s'agit d'un solvant dont la force d'élu

tion est assez importante pour extraire la plupart des composés organiques retenus sur une cartouche de type C18. Cependant, le chloroforme, l'acétonitrile, le tétrahydrofurane ou bien le mélange de ces derniers, peut aussi s'avérer efficace.

4.2 Sélectionner la cartouche appropriée

Il faut savoir qu'il existe trois mécanismes majeurs d'interaction entre l'échantillon et l'adsorbant pouvant avoir lieu selon les propriétés des composés à récupérer. En effet ces derniers peuvent être soit de nature polaire, soit de nature non polaire ou encore des ions (composés possédant une ou plusieurs charges). On choisira alors l'adsorbant approprié, quatre types existants actuellement sur le marché.

C'est ainsi que la sélection de la cartouche va se réaliser (figure 13). Elles pourront être alors constituées soit de:

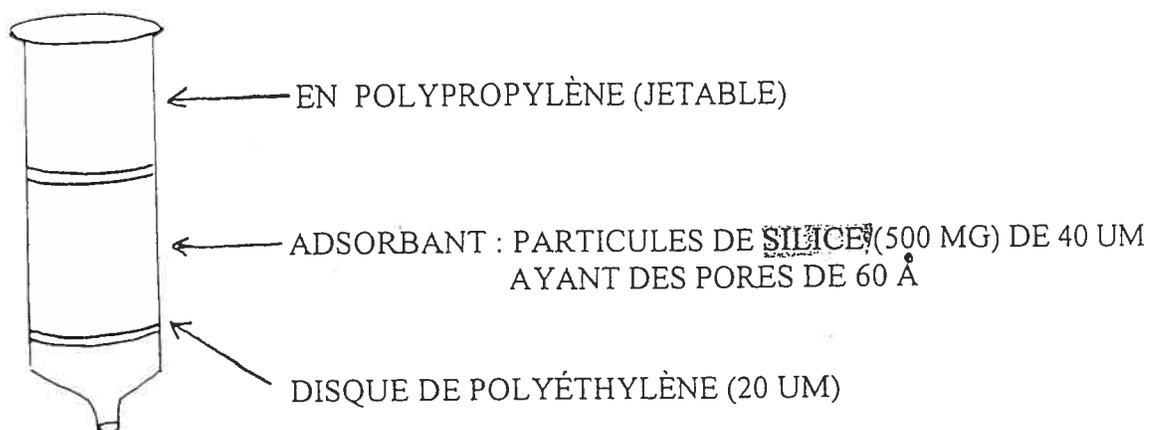


Figure 13 : Cartouche C18 de type reverse phase.

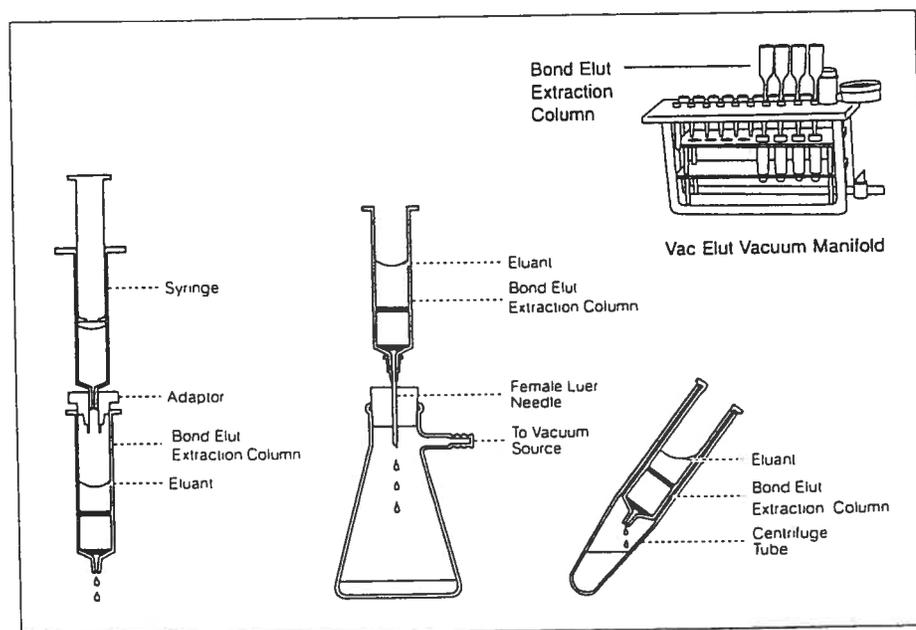


Figure 14 : Système d'extraction sous-vide de type Baker SPE-12G.

L'adsorbant *phase inversée* qui va permettre l'extraction des composés non polaires à modérément polaires à partir d'une solution polaire sur un tamis moléculaire non polaire (figure 15).

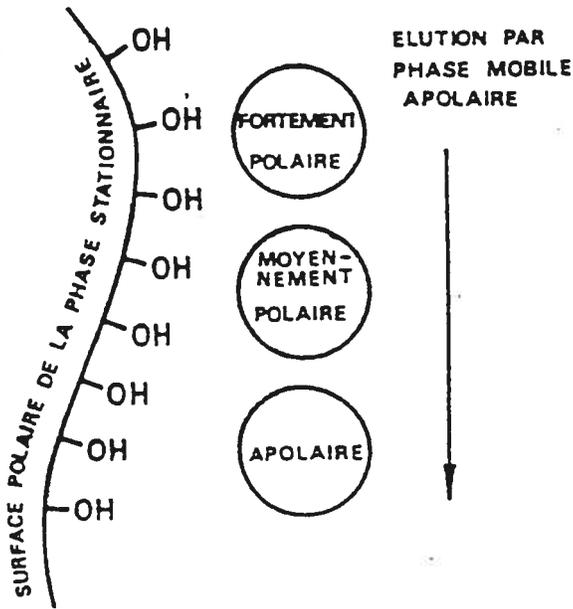
Mais également l'adsorbant *phase normale* servant à extraire des composés modérément polaires à polaires à partir d'une solution non polaire sur un tamis moléculaire polaire (figure 15).

Pour l'adsorbant opérant par *échange d'ions*, le principe est un peu différent. Les composés étudiés devront être évidemment de nature ionique et extrait d'une solution avec un tamis moléculaire de charge opposée.

Et enfin de disponible, l'adsorbant *exclusion selon la taille* ne s'appliquant qu'aux molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 10 000, ou qui vont être retardées par leur entrée dans les pores du polymère d'hydrates de carbone hydraté (Dextran).

En conclusion, la sélection d'un adsorbant va tenir compte de la nature de l'échantillon, mais aussi des caractéristiques et surtout de la composante de la matrice dans laquelle il évolue. En prenant en considération ces deux paramètres et les groupes fonctionnels appartenant à la molécule et au tamis moléculaire sélectionné, on est alors capable d'obtenir le rendement maximal des composés à extraire de la solution en évitant les pertes possibles dues à des réactions croisées ou autres paramètres.

Chromatographie à polarité de phase normale



Chromatographie à polarité de phase inversée

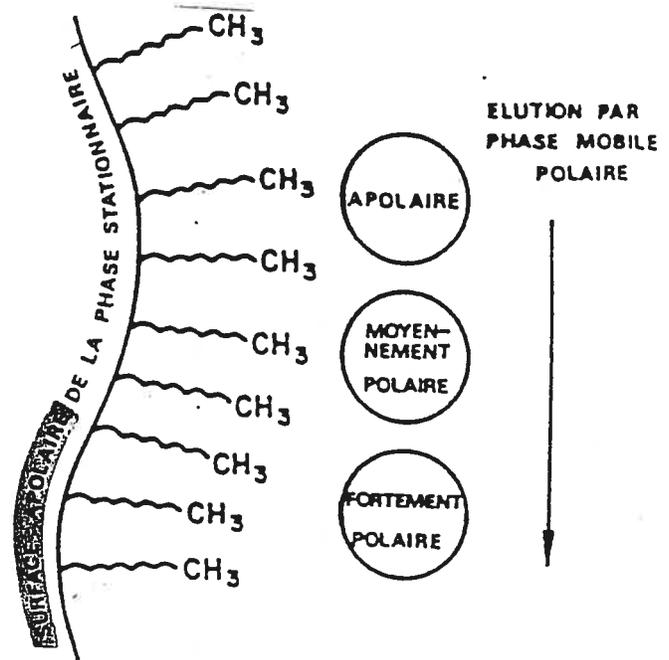


Figure 15 : Schéma illustrant la différence entre la chromatographie à polarité de phase normale et celle à polarité de phase inversée : les types de composants présents dans l'échantillon sont entourés par des cercles et leur position par rapport à la flèche représentant la phase mobile indique leur ordre d'élution.

4.3 Le système d'extraction sous-vide

Différents choix s'offrent à nous pour créer le vide :

- **Baker SPE-12G ou Baker SPE-24G** (flot d'écoulement 2 à 4 ml/min).

Il s'agit d'un système sous-vide contenant au choix, 12 ou 24 places (figure 14).

L'extraction de l'échantillon se trouvant dans le lit adsorbant de la colonne se réalise par la formation d'un vide, lui-même créé par une aspiration de l'air contenu dans un système fermé par l'ouverture d'un robinet d'eau, en utilisant une **pompe** ou encore par un mécanisme de **centrifugation**.

- **Speed Vac SVC100** (Farmingdale, NY, USA).

Il s'agit d'un autre système efficace, mais sensiblement plus onéreux, dont le principe fondamental reste le même.

5. *ELECTROSPRAY* COUPLÉ À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM (ESI/MS/MS)

5.1 La phase mobile

La phase mobile employée est H₂O-CH₃CN (eau-acétonitrile) dans les proportions (1/1). Le choix du solvant n'est pas unique et nombre d'entre eux pour ne citer que l'hexane, le méthanol, l'éthyle acétate ou encore le chlorure de méthylène, peuvent être employés (figure 11). Une importance particulière doit être accordée à la préparation de la phase mobile. En effet, il est indispensable de dégazer et de filtrer les solvants avant leur emploi et de travailler aussi avec des solvants spécialement adaptés aux conditions d'utilisation des CLHP qui démontrent une pureté supérieure aux produits classiques. Il faut être sûr d'employer des solvants miscibles afin d'éviter des précipitations avec les solutions tampons entre autres. Lorsqu'on utilise, comme dans ce cas en particulier, ce que l'on appelle un système d'injection en boucle, on doit également vérifier l'absence de bulle d'air à l'intérieur de ce dernier.

5.2 Technique d'ionisation

Il s'agit de l'*electrospray* (ESP).

Le principe de vaporisation (nébuliseur) électronique (*electrospray*) est d'utiliser un capillaire en acier inoxydable introduisant la substance étudiée dans une chambre où cette dernière est bombardée à l'aide d'un faisceau d'électrons de potentiel élevé [64].

Les produits chargés résultants sont accélérés et déviés sous vide au travers d'un champ magnétique et vont frapper les parois de l'analyseur (figure 16).

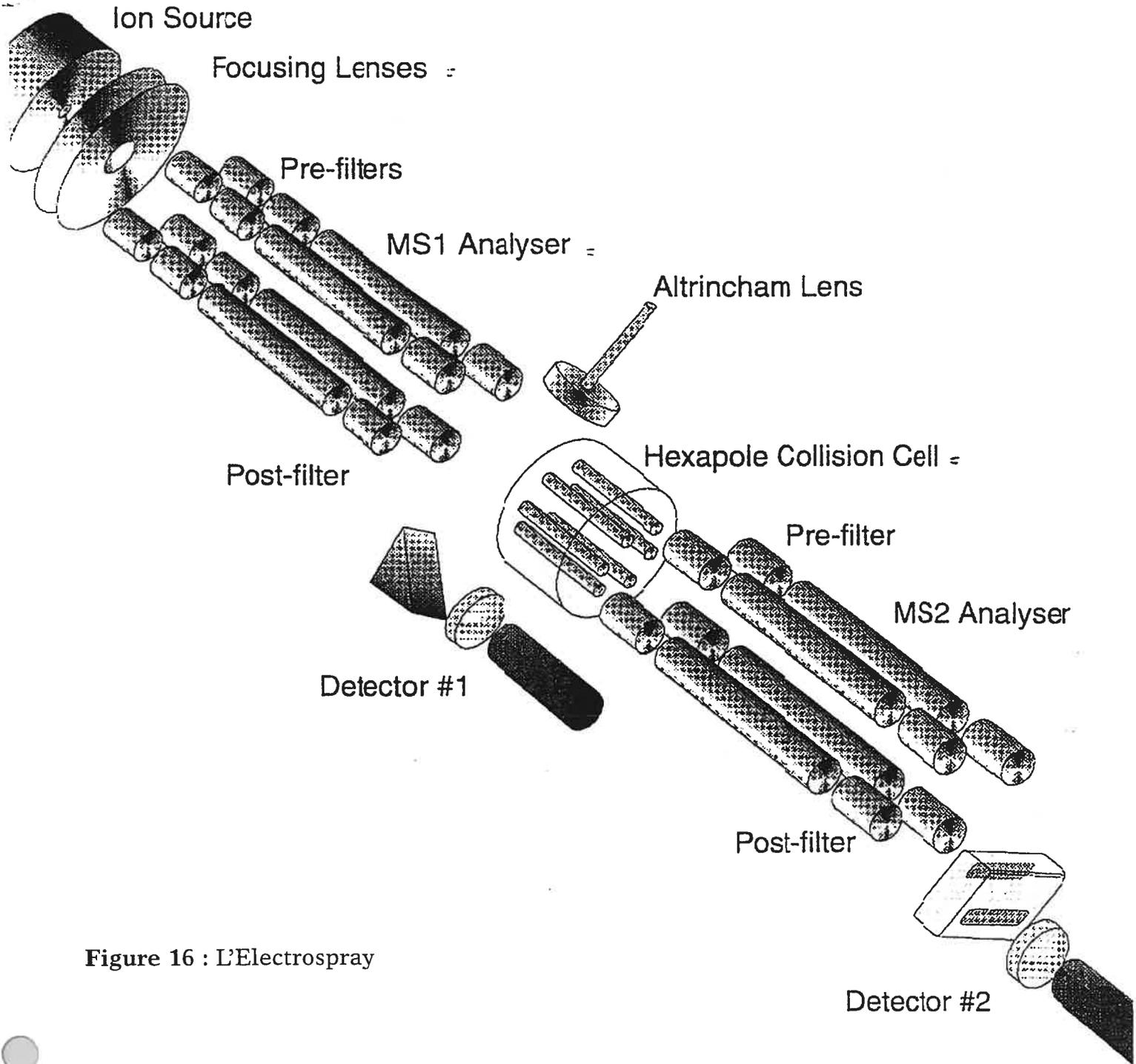


Figure 16 : L'Electrospray

En ESP, la présence d'un champ électrique élevé a tendance à produire des ions ayant des charges multiples (figure 17). Les molécules des poids moléculaires inférieurs à 1,000 portent généralement une seule charge ($z=1$). Le spectromètre de masse analyse le ratio m/z (masse/charge) qui devient alors $m/1=m$ (figure 18).

De son côté, la vaporisation sera facilitée par le passage d'un flux d'azote gazeux chaud, qui permettra aussi le retrait du solvant. Un flux d'azote supplémentaire passera aussi autour du capillaire pour diriger les gouttelettes. En ESP^+ sont analysés essentiellement des composés basiques comme les amines qui donnent une molécule protonée de la forme $[M-H]^+$, ainsi que la plupart des peptides, les pesticides, les drogues (cocaïne, amphétamine) et leurs métabolites et la famille des saccharides.

En ESP^- sont analysés les composés acides comme l'acide sulfonique donnant cette fois-ci une molécule déprotonée de la forme $[M-H]^-$. Quelques protéines, les oligonucléotides, les sels biliaires et les conjugués glucuronides sont également analysés en mode négatif.

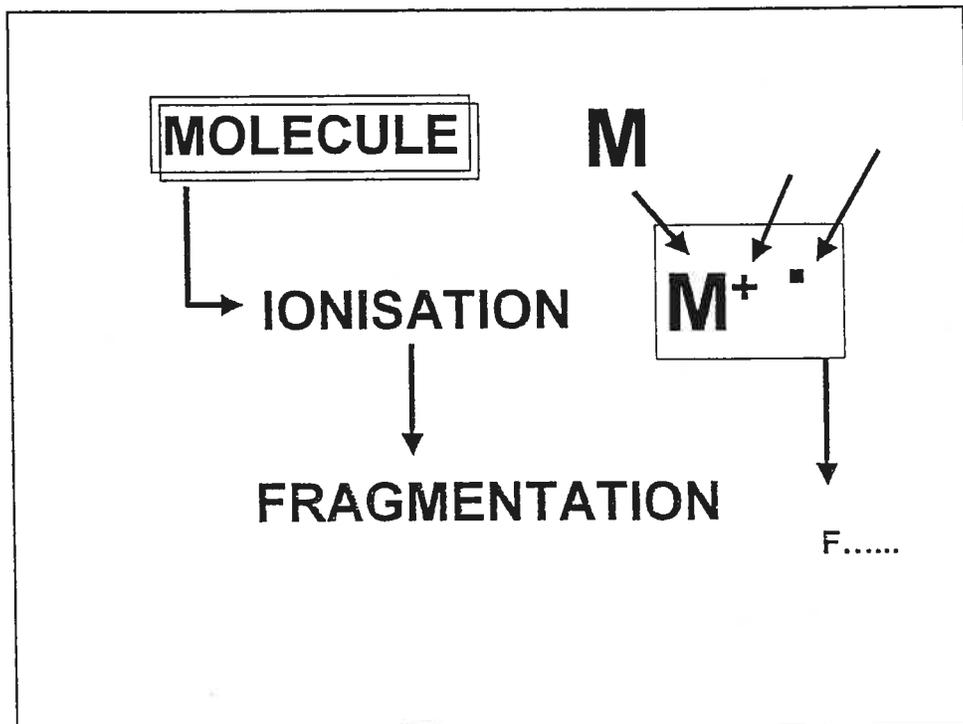
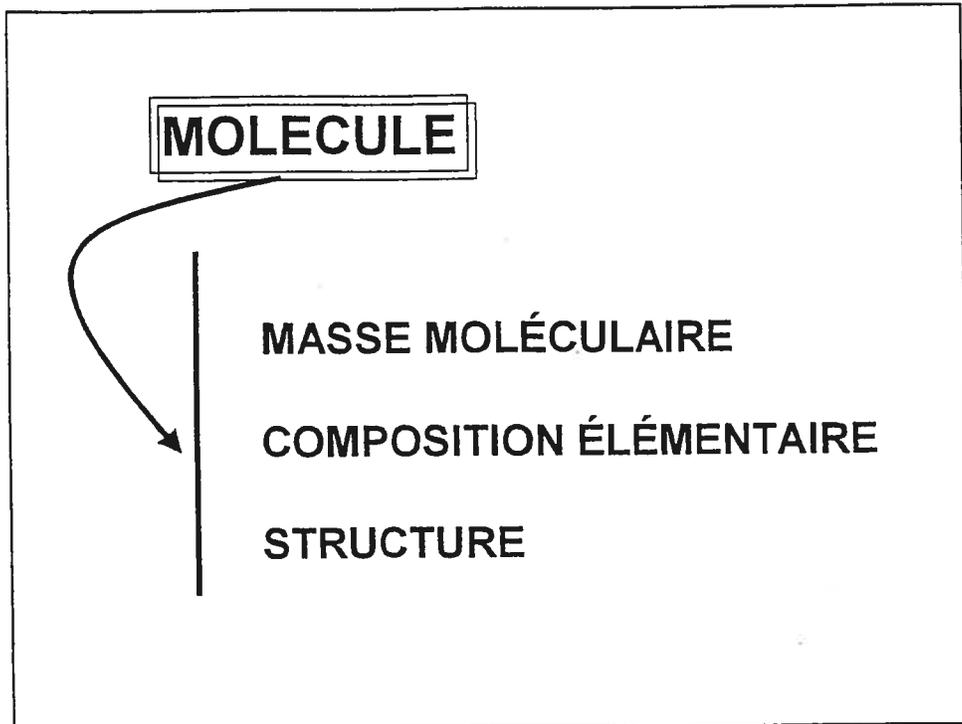


Figure 17 : Ionisation moléculaire.

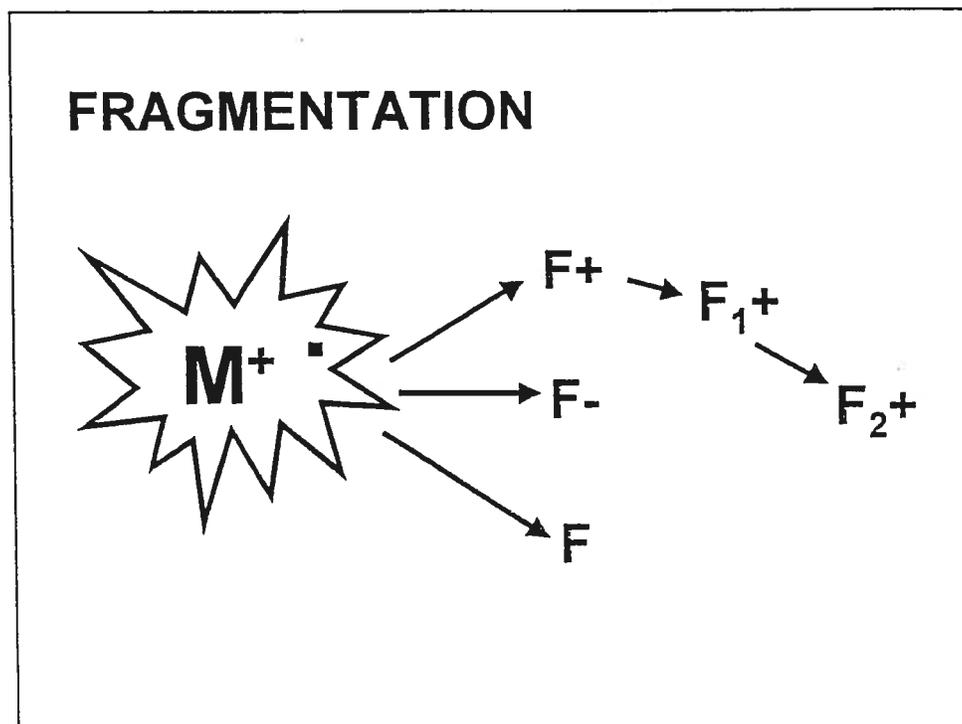
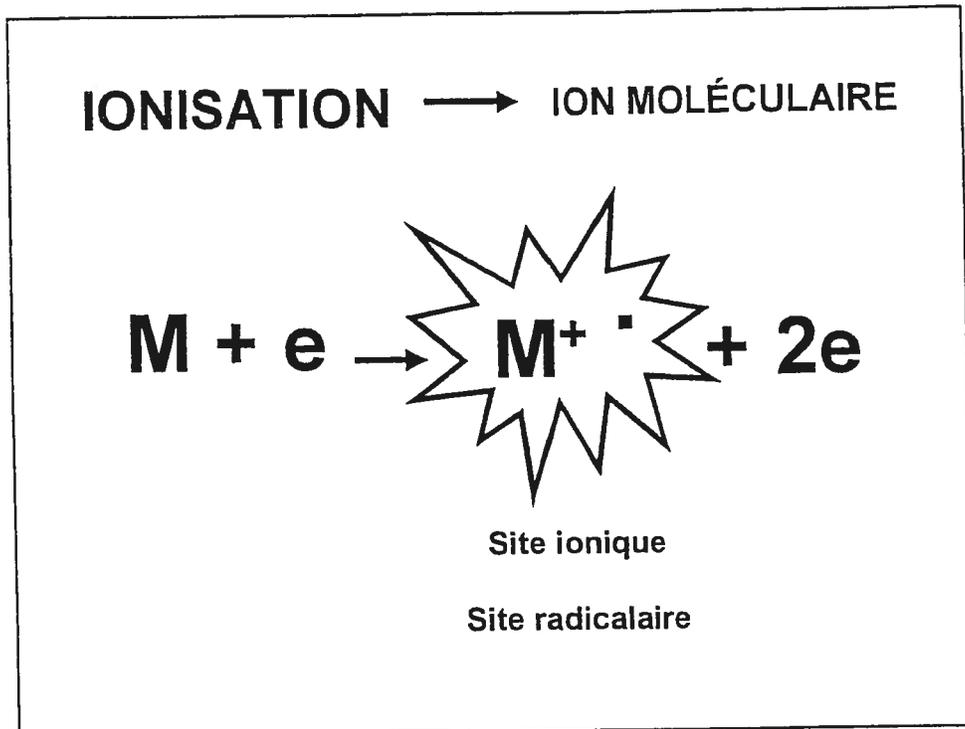


Figure 18 : Fragmentation moléculaire.

5.3 Analyseur quadripolaire: Filtre

Principe: Les ions sortent un par un selon leur masse. Le balayage s'effectue à tension continue.

Il s'agit d'un analyseur de type QUATTRO 2 : triple quad (quadripôle 1, hexapole, quadripôle 2). La cellule de collision hexapolaire est la composante majeure de ce type d'instrument. Elle permet aux ions générés par la source et sélectionnés par le spectromètre de masse 1 (quadripôle 1), d'être activés par collision ce qui cause leur fragmentation sous une pression exercée équivalente à 2.10^{-5} mbar.

5.4 Les détecteurs

L'appareil est équipé de deux spectromètres de masse d'où la nomination "en tandem".

Le spectromètre de masse 1 (MS1) placé en première position comme son nom l'indique, sert à détecter les ions parents. Le spectromètre de masse 2 (MS2) couplé au MS1, servira à détecter les ions filles, c'est-à-dire à analyser les produits de fragmentation issus de la cellule de collision. En faisant varier le voltage des tiges des détecteurs, on peut donc séparer les ions de différents m/z. Ces voltages sont ajustés automatiquement selon le type d'acquisition choisi.

6. ÉVALUATION SOMMAIRE DU PROTOCOLE ANALYTIQUE

6.1 Vérification de la conformité de l'ionisation

L'injecteur délivre le mélange eau et acétonitrile (1/1) qui traverse le système pour se rendre à la source de l'*electrospray* en mode positif. Pour obtenir une sensibilité et une stabilité optimale de l'appareil, on utilise l'acétonitrile protoné comme référence ($m/z=42$; $I = 1.34 \times 10^8$).

6.2 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons s'effectue dans l'acétonitrile pour favoriser la miscibilité avec la phase mobile de l'appareil. On peut cependant remarquer que l'expérience pratiquée avec le méthanol donne sensiblement les mêmes résultats. En effet, d'après la littérature, il s'agit de deux solvants de routine et fournissant des résultats équivalents.

6.3 Vérification de la stabilité et de l'intégrité des échantillons

Cette étape consiste à injecter au sein de l'appareil chaque standard préparé afin de vérifier, dans un premier temps, la livraison des bons produits par la compagnie, ainsi que leur pourcentage de pureté. La stabilité des échantillons pourra alors être évaluée sur plusieurs jours en injectant ces derniers à des intervalles de temps régulier et en analysant l'intensité des pics obtenus.

6.4 Introduction de l'échantillon

L'injection de l'échantillon s'effectuera de façon automatique grâce à un système de prélèvement d'un chromatographe liquide à haute performance (séries 1100) Hewlett Packard (Palo Alto, CA). Ce dernier est relié à un spectromètre de masse en tandem ayant pour interface un *electrospray* (Micromass, Manchester, UK). L'azote liquide joue le rôle de nébuliseur. Le HPLC opère de façon isocratique avec un flot de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ et une phase mobile, rappelons-le, composée d'eau et d'acétonitrile (1/1) à la température de la pièce.

6.5 Choix du mode d'ionisation: Positif ? Négatif ?

Dans un premier temps, on doit déterminer les concentrations à appliquer pour obtenir un bon signal de chaque composé, c'est-à-dire un pic dont la hauteur est égale à trois fois la ligne de base. Une fois, la concentration moyenne optimale définie, chaque composé devra être testé en mode positif puis en mode négatif ou inversement, dans le but d'obtenir un signal maximal de détection.

6.6 Optimisation du système analytique

Le voltage appliqué au capillaire et aux lentilles, est respectivement 3.5 kV et 1kV (standards de référence).

6.6.1 Spectromètre de masse 1: Le voltage d'ionisation

MS1 va opérer en mode statique. Le voltage optimal d'ionisation du cône est évalué à 30 V lorsqu'une sensibilité maximale est demandée et la fragmentation des stéroïdes étudiés, non souhaitée.

6.6.2 Spectromètre de masse 2: L'énergie de collision

Il s'agira de déterminer l'énergie de collision optimale pour tous les stéroïdes en MS2.

6.7 Acquisition des résultats

L'enregistrement des résultats s'effectue par le logiciel Micromass Mass Lynx, Version 3.0. C'est grâce à ce système d'analyse que les standards internes déposés et les échantillons inconnus vont pouvoir être quantifiés.

Chapitre 3 : Méthodes et résultats

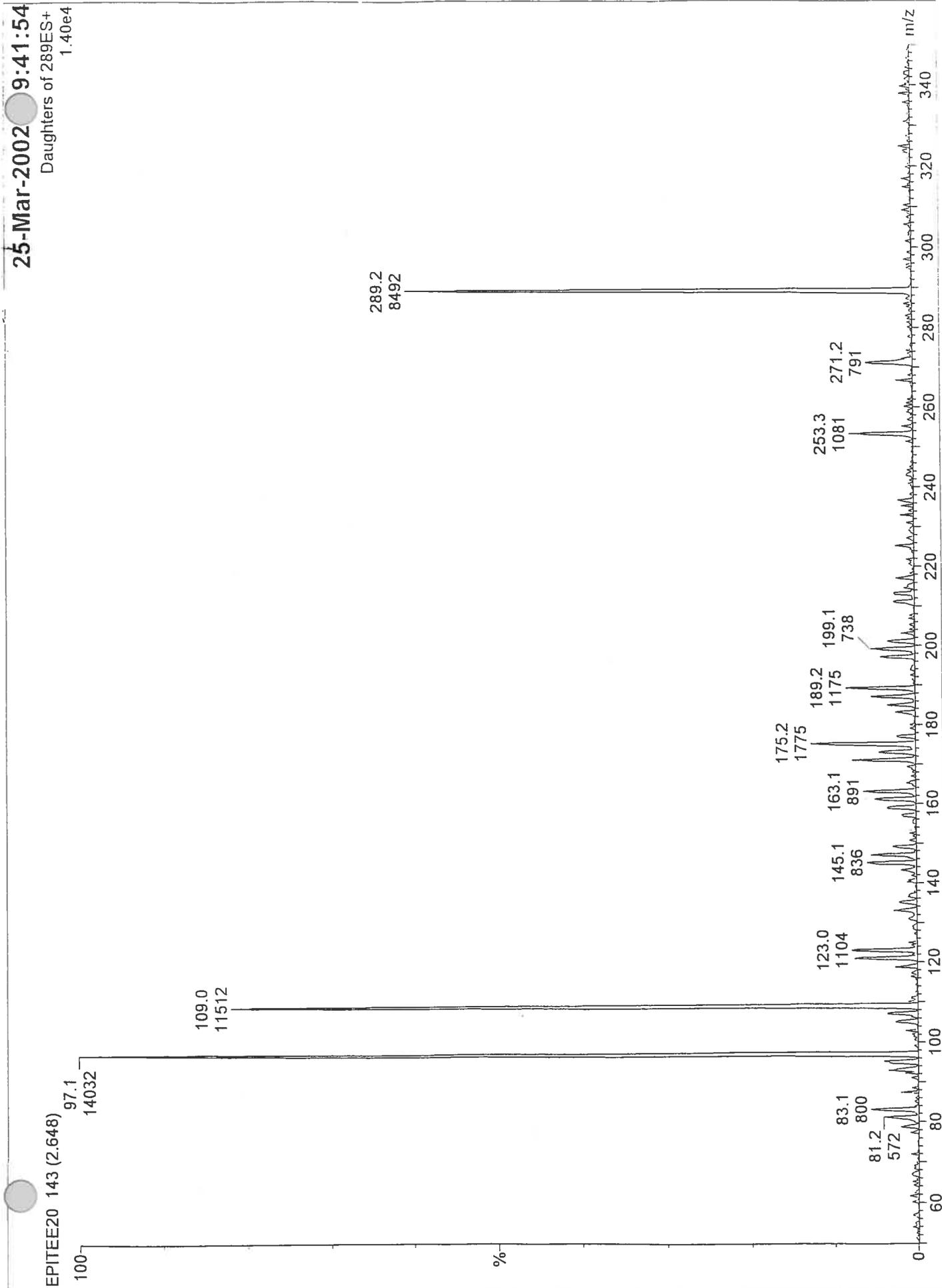
1. PROFIL CARACTÉRISTIQUE POUR CHAQUE STÉROÏDE

La DHEA libre ($m/z=288.4$) et conjuguée ($m/z=367.5$ et 464.5) ainsi que l'androstérone ($m/z=290.4$, 369.5 et 466.6) proviennent de la compagnie Steraloids Inc. (Newport, RI, USA) et ont une pureté voisine de 99%. Tous les autres solvants et réactifs chimiques utilisés pour l'analyse par HPLC ont également une pureté similaire connue et sont fournis par la compagnie Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

➤ Méthodologie :

Utilisation de la spectrométrie de masse en tandem pour obtenir tous les ions parents en mode MS1, les ions filles en mode MS2, des composés étudiés.

Nous recherchons l'énergie optimale d'ionisation (EV) et de collision (EC) illustrée par le composé suivant sélectionné, l'épitestotérone, (spectre 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F et AUC 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F).



Spectre 1A : Epitestostérone (m/z=289), EV=40 eV et EC=20eV, P=2.4.10e-3 mbar.

25-Mar-2002, 09:41:54

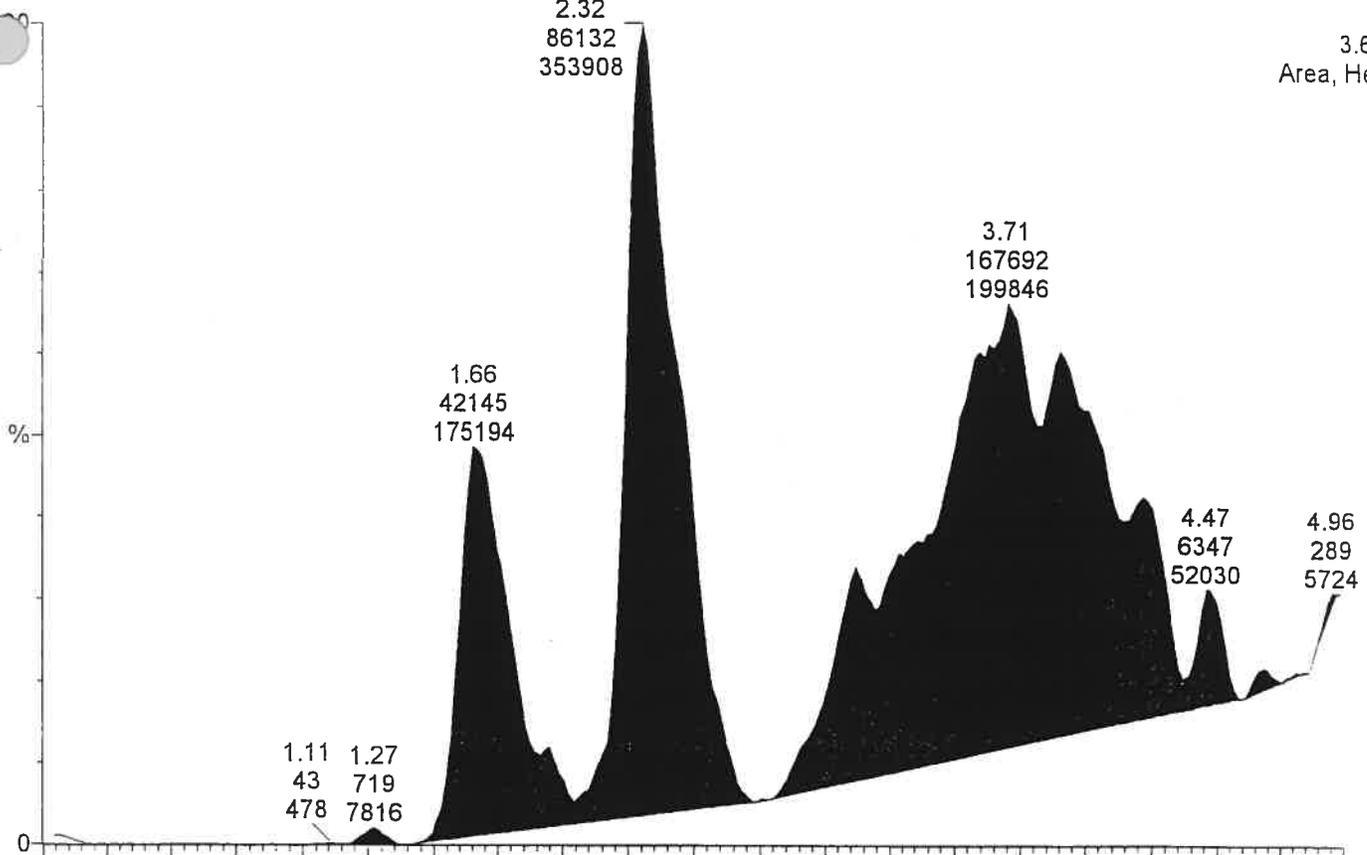
EPITEE20 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+

109

3.67e5

Area, Height



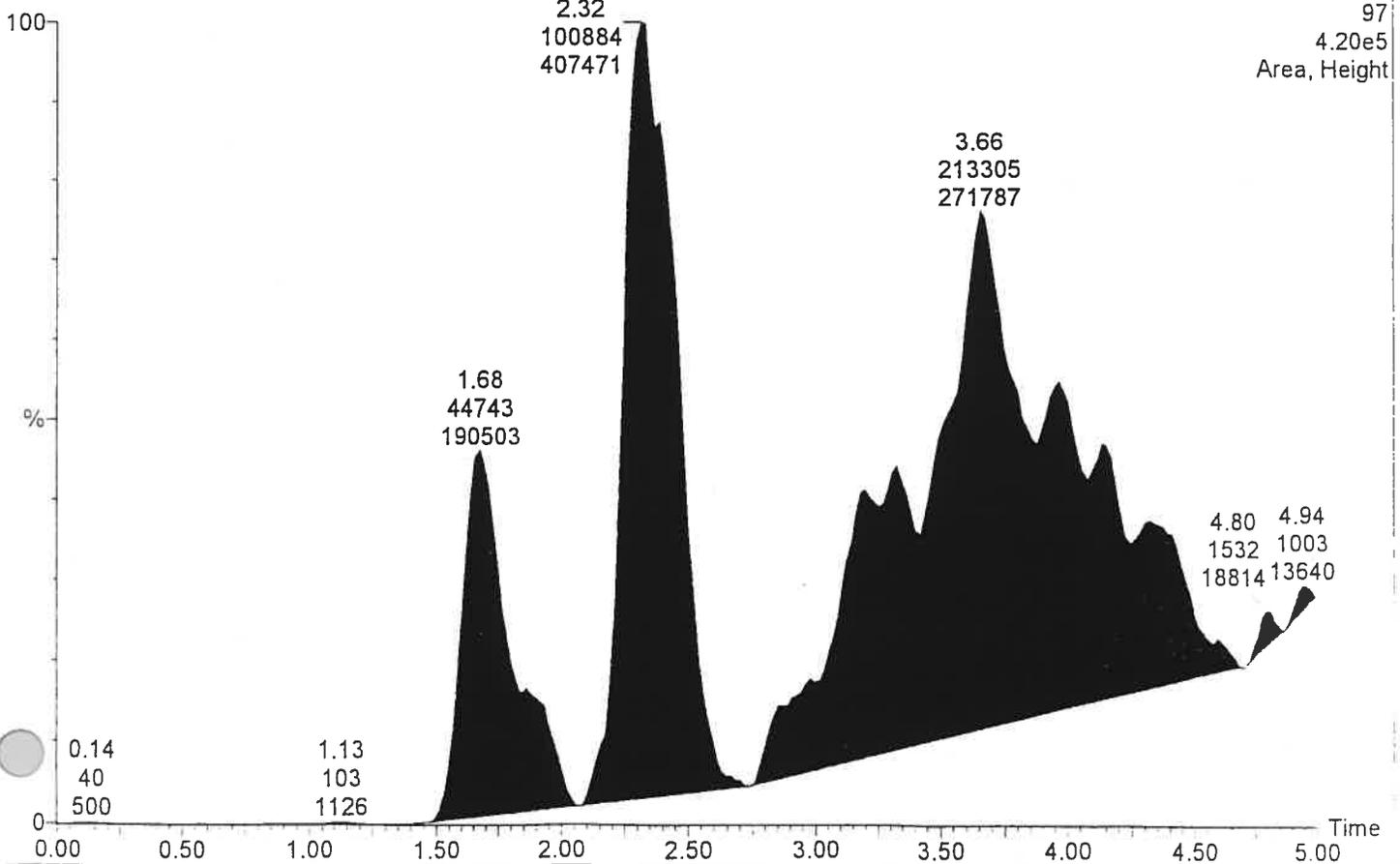
EPITEE20 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+

97

4.20e5

Area, Height

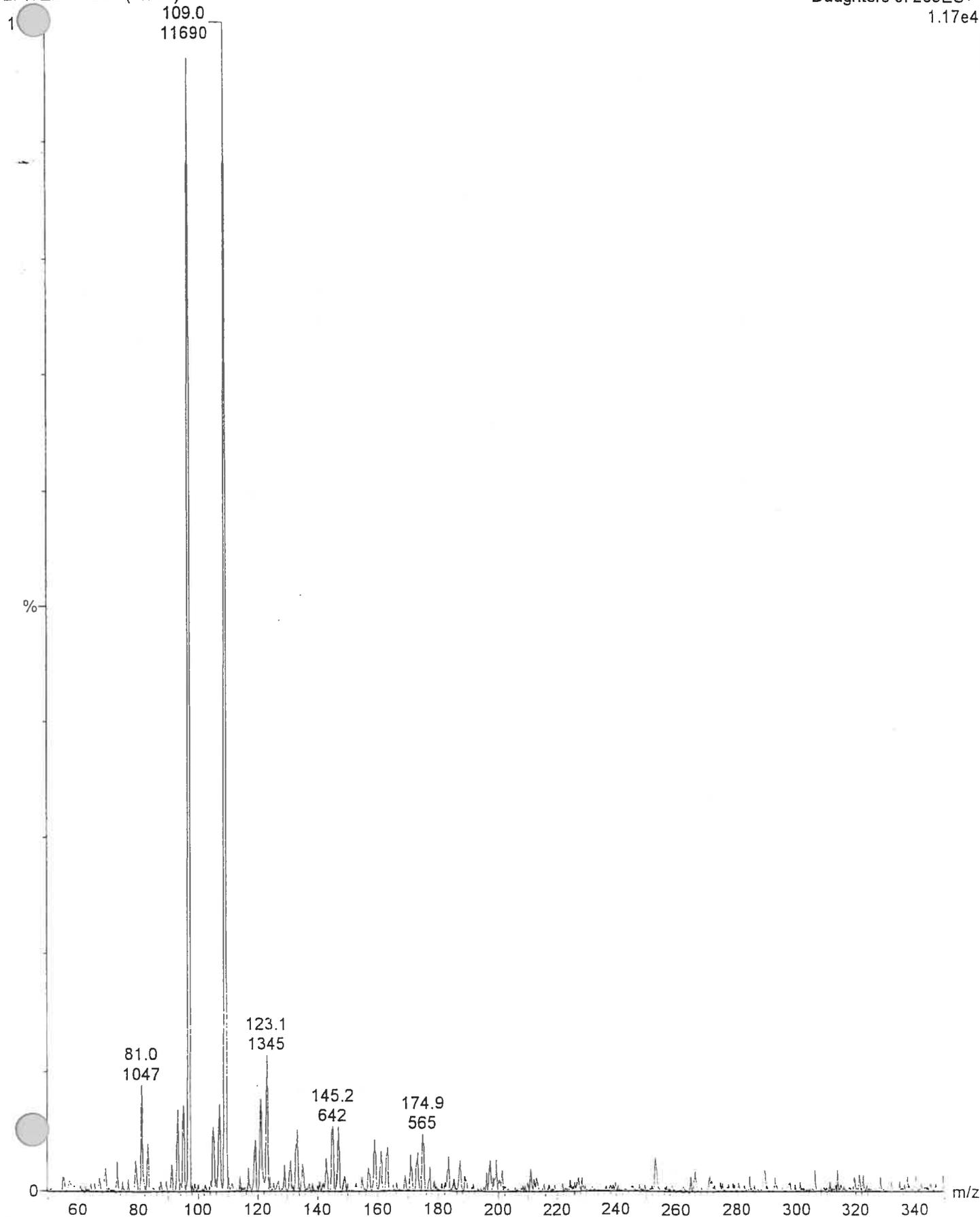


AUC 1A : Epitestostérone, EV=40 eV et EC=20 eV.

25-Mar-2002 , 09:47:50

Daughters of 289ES+
1.17e4

EPITEE30 205 (3.788)

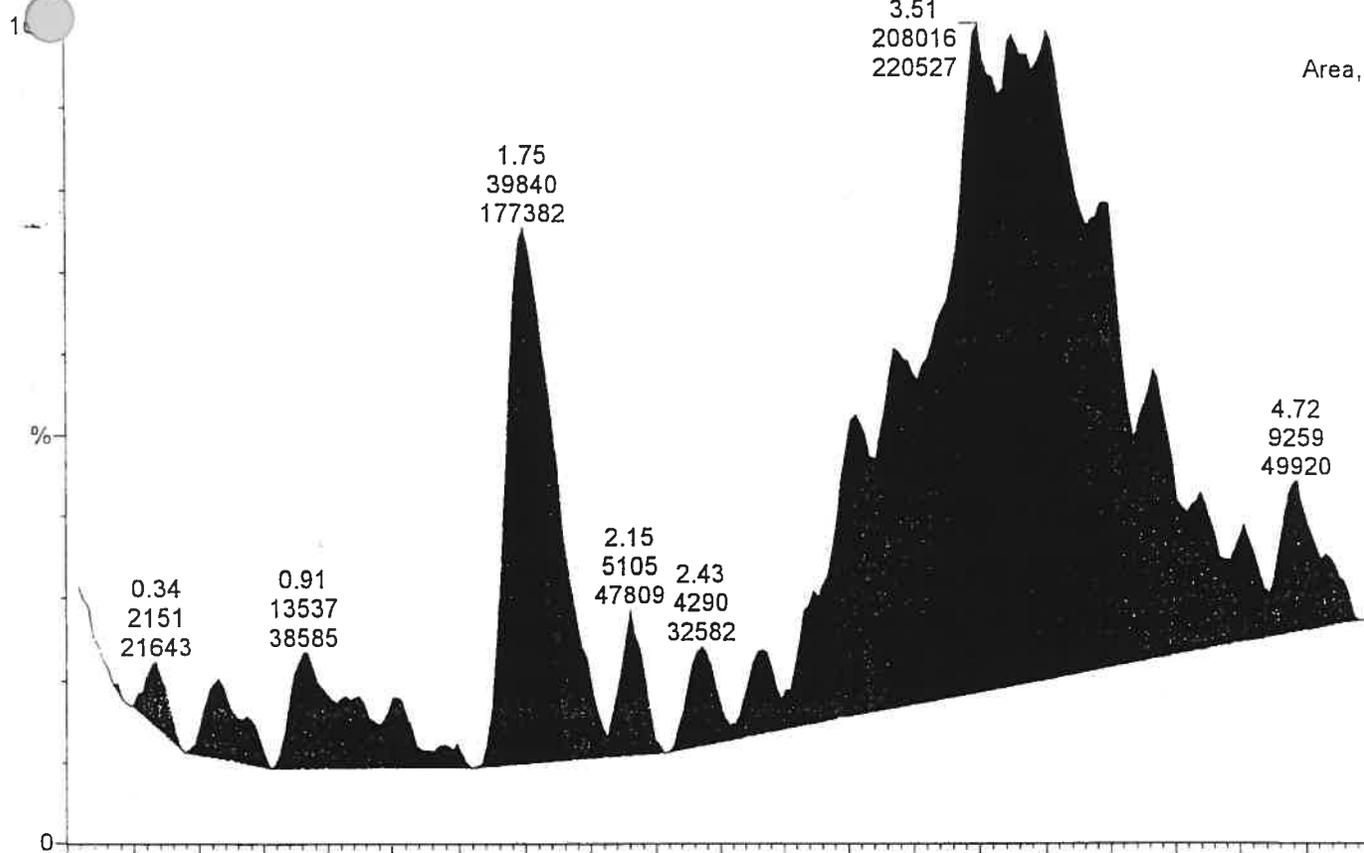


Spectre 1B : Epitestostérone (m/z=289), EV=40 eV et EC=30eV, P=2.5.10e-3 mbar.

25-Mar-2002, 09:47:50

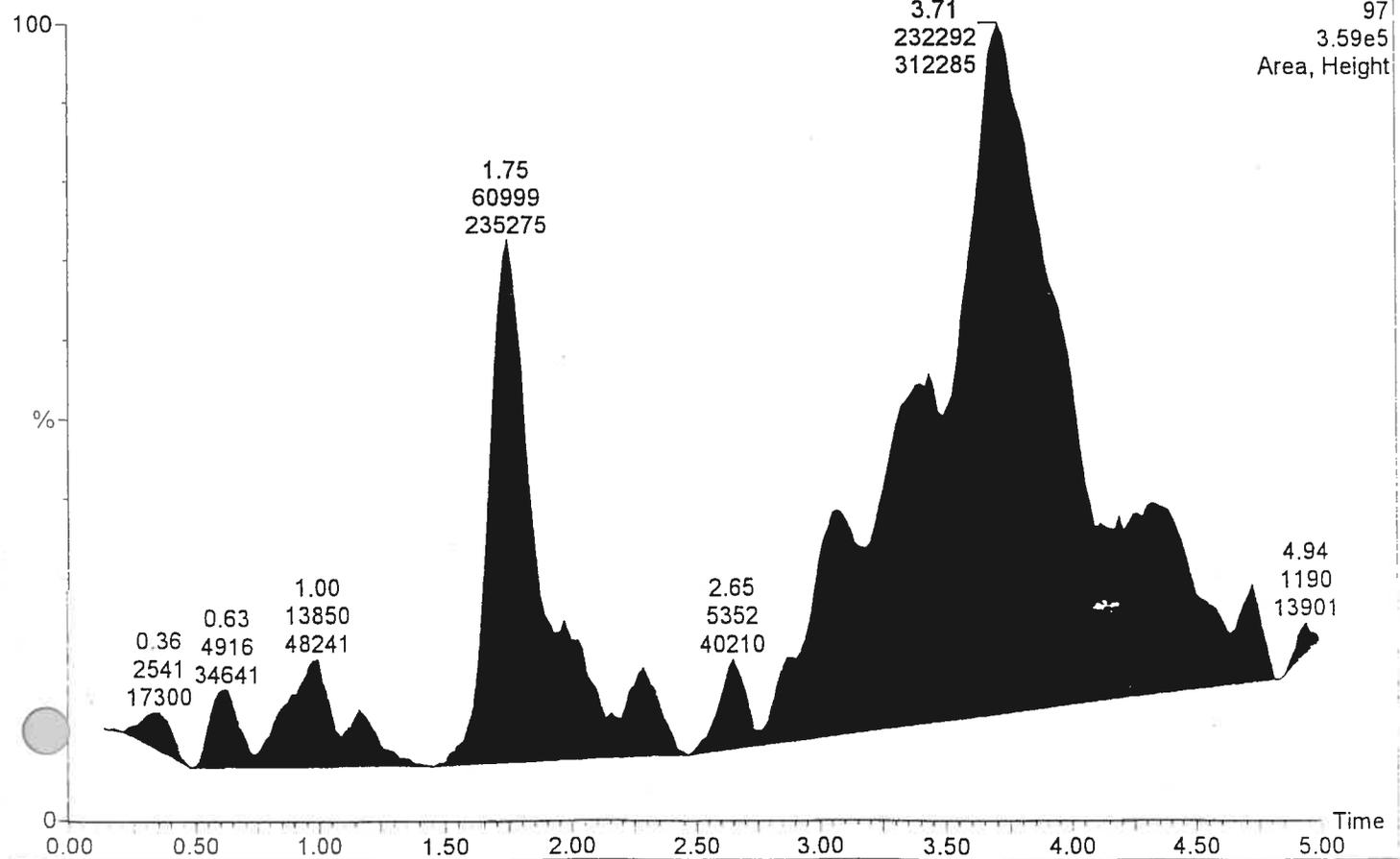
EPITEE30 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+
109
2.71e5
Area, Height



EPITEE30 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+
97
3.59e5
Area, Height

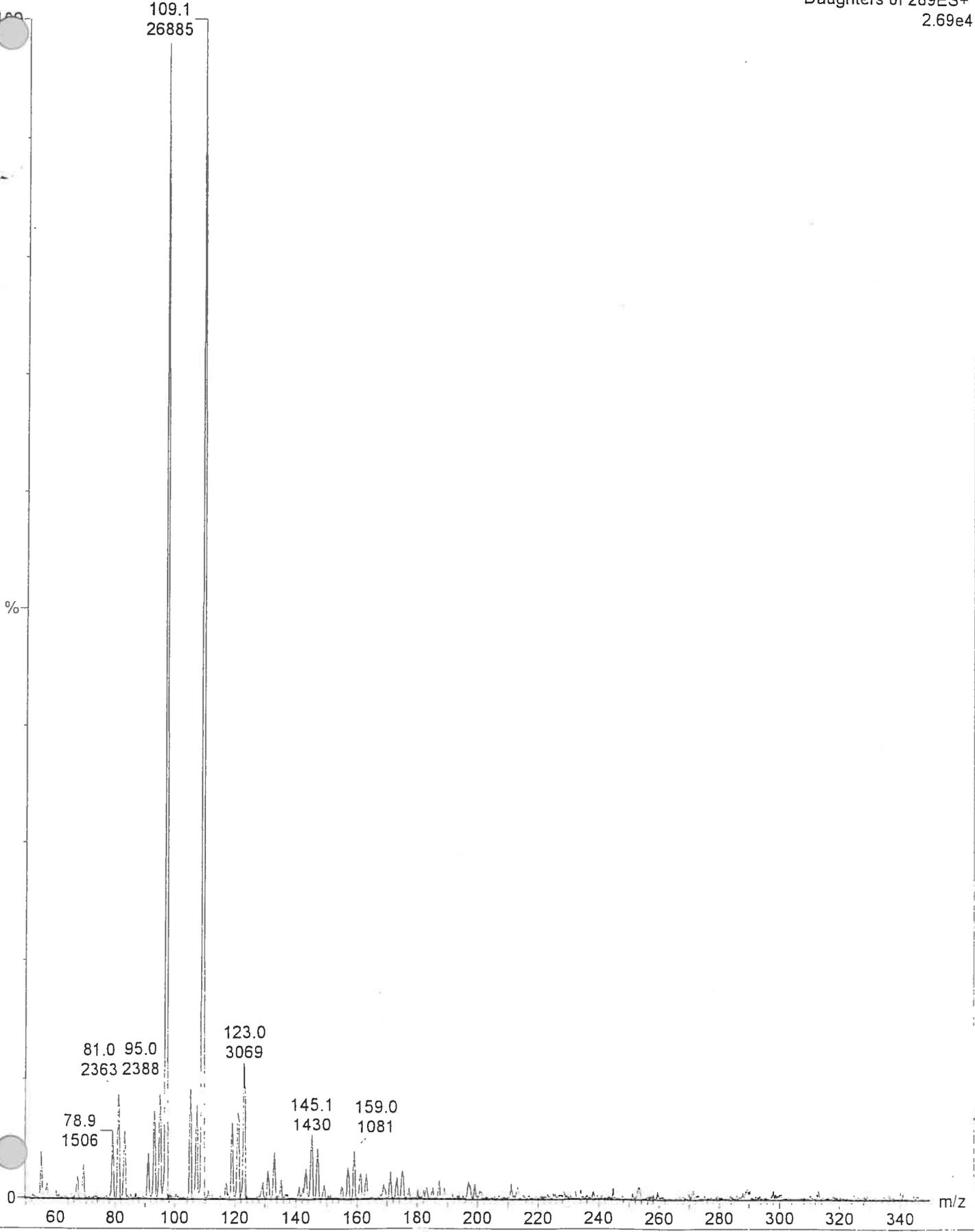


AUC 1B : Epitestostérone, EV=40 eV et EC=30 eV.

25-Mar-2002 , 09:53:47

EPITEE35 139 (2.575)

Daughters of 289ES+
2.69e4



Spectre 1C : Epitestostérone (m/z=289), EV=40 eV et EC=35 eV, P=2.4.10e-3 mbar.

25-Mar-2002, 09:53:47

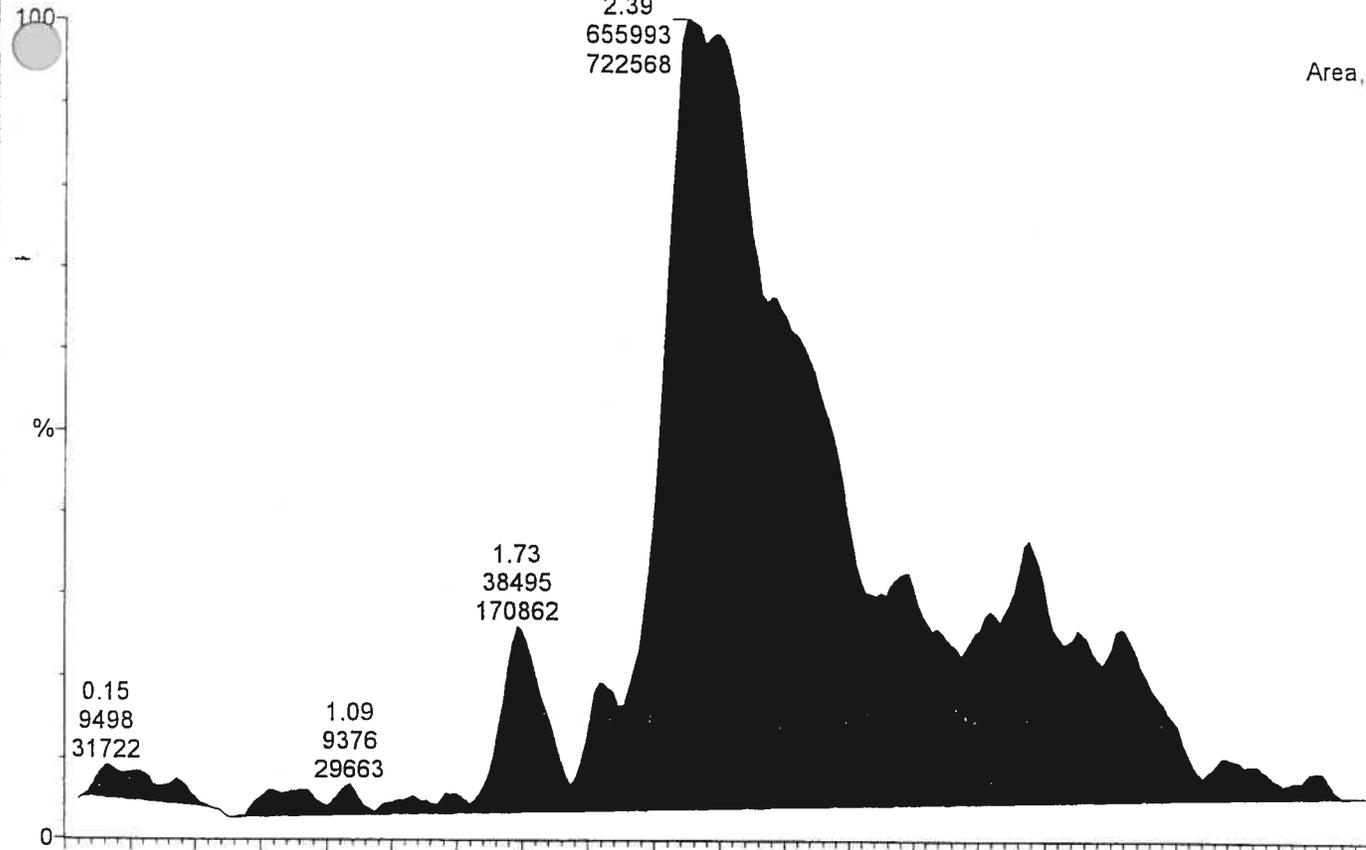
EPITEE35 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+

109

7.52e5

Area, Height



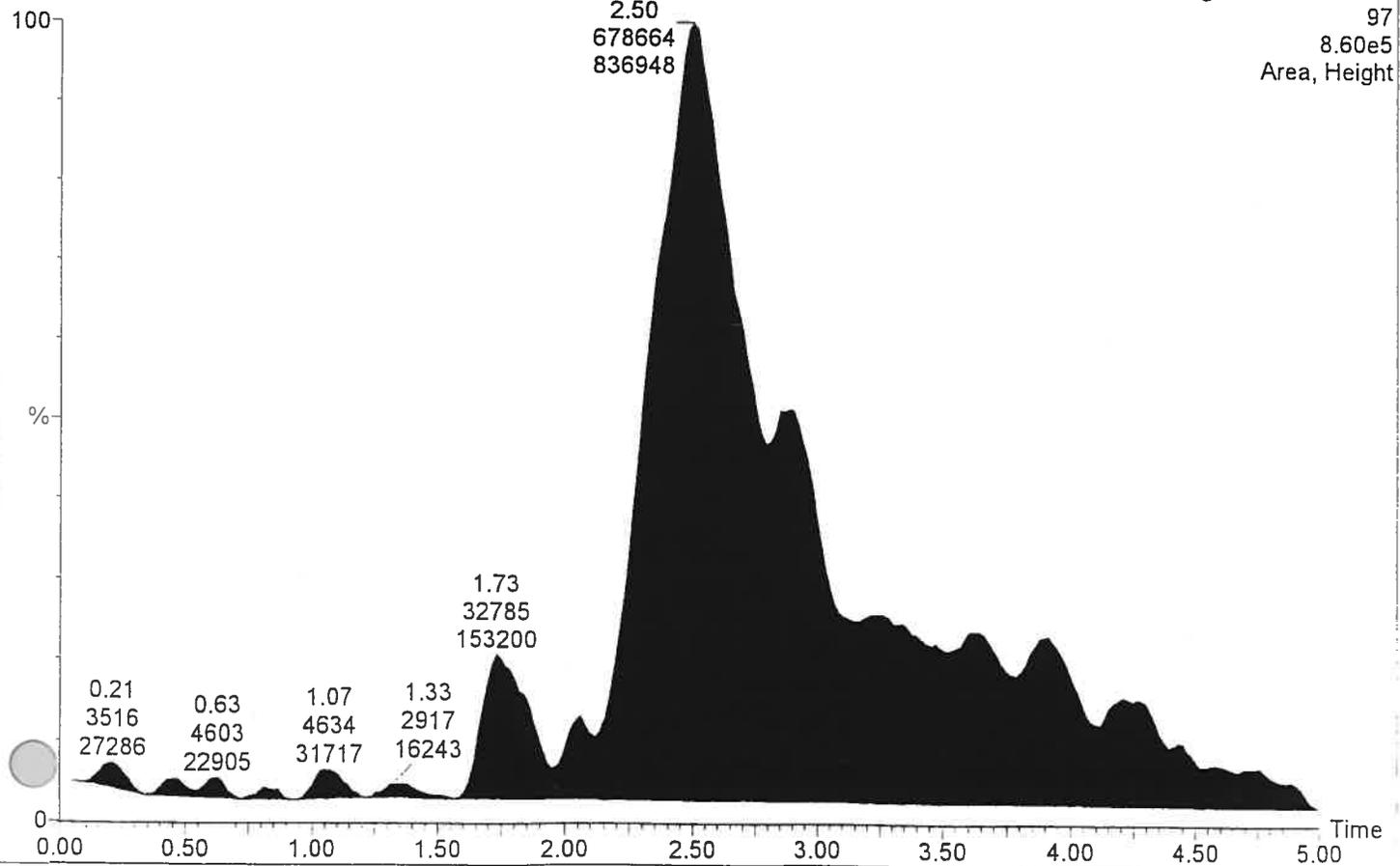
EPITEE35 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+

97

8.60e5

Area, Height



AUC 1C : Epitestostérone, EV=40 eV et EC=35 eV.

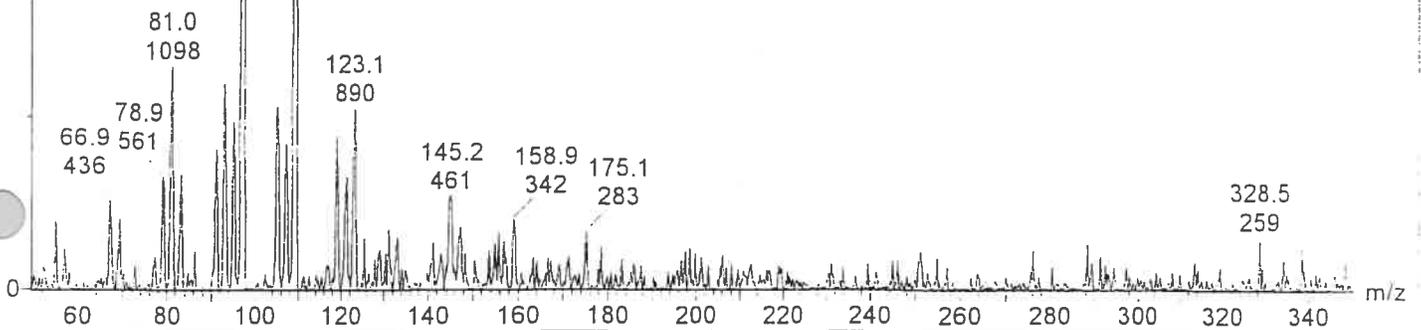
25-Mar-2002 , 09:59:43

EPITEE40 210 (3.879)
97.0
8476

Daughters of 289ES+
8.48e3

109.0
7829

%



Spectre 1D : Epitestostérone (m/z=289), EV=40 eV et EC=40 eV, P=2.4.10e-3 mbar.

25-Mar-2002, 09:59:43

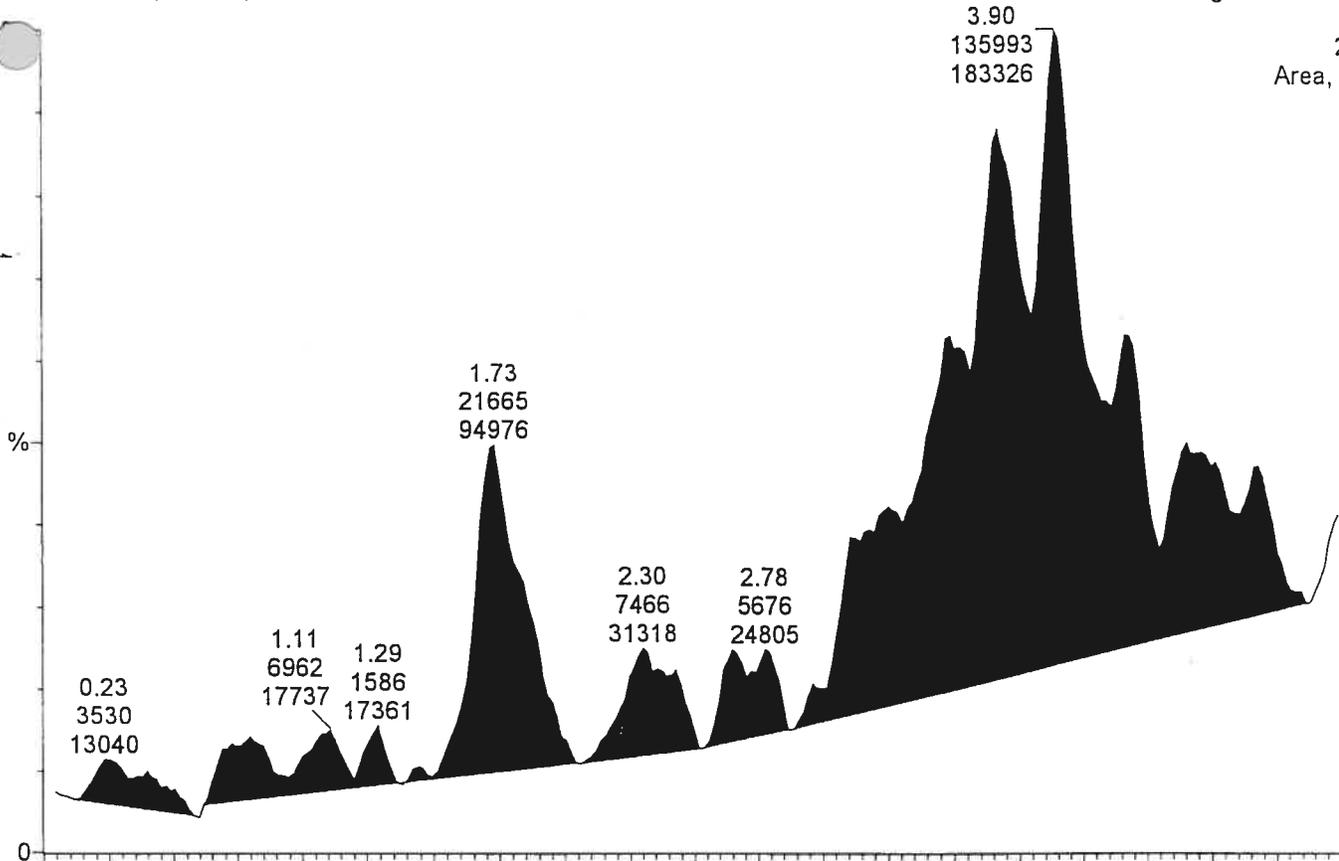
EPITEE40 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+

109

2.38e5

Area, Height



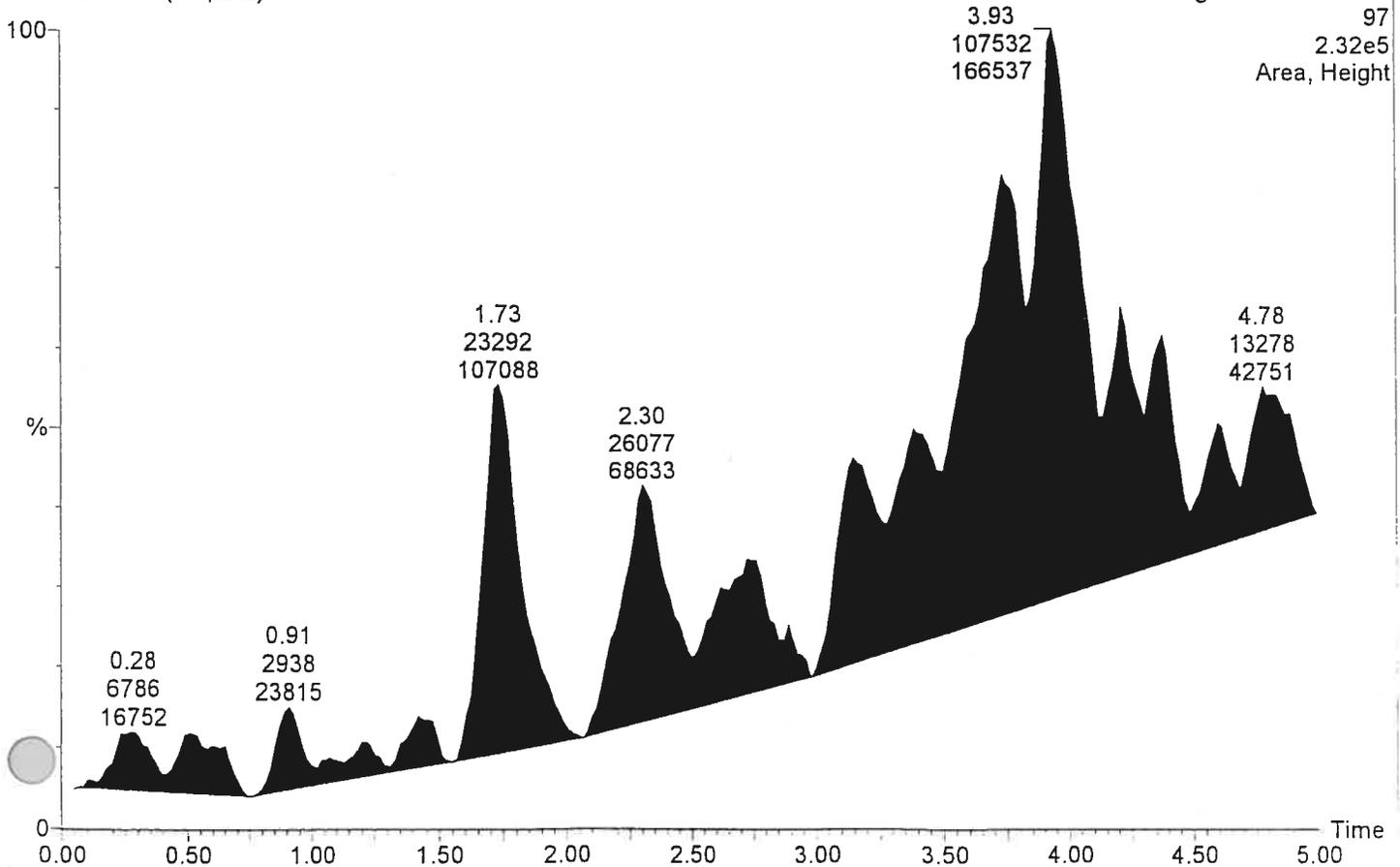
EPITEE40 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+

97

2.32e5

Area, Height



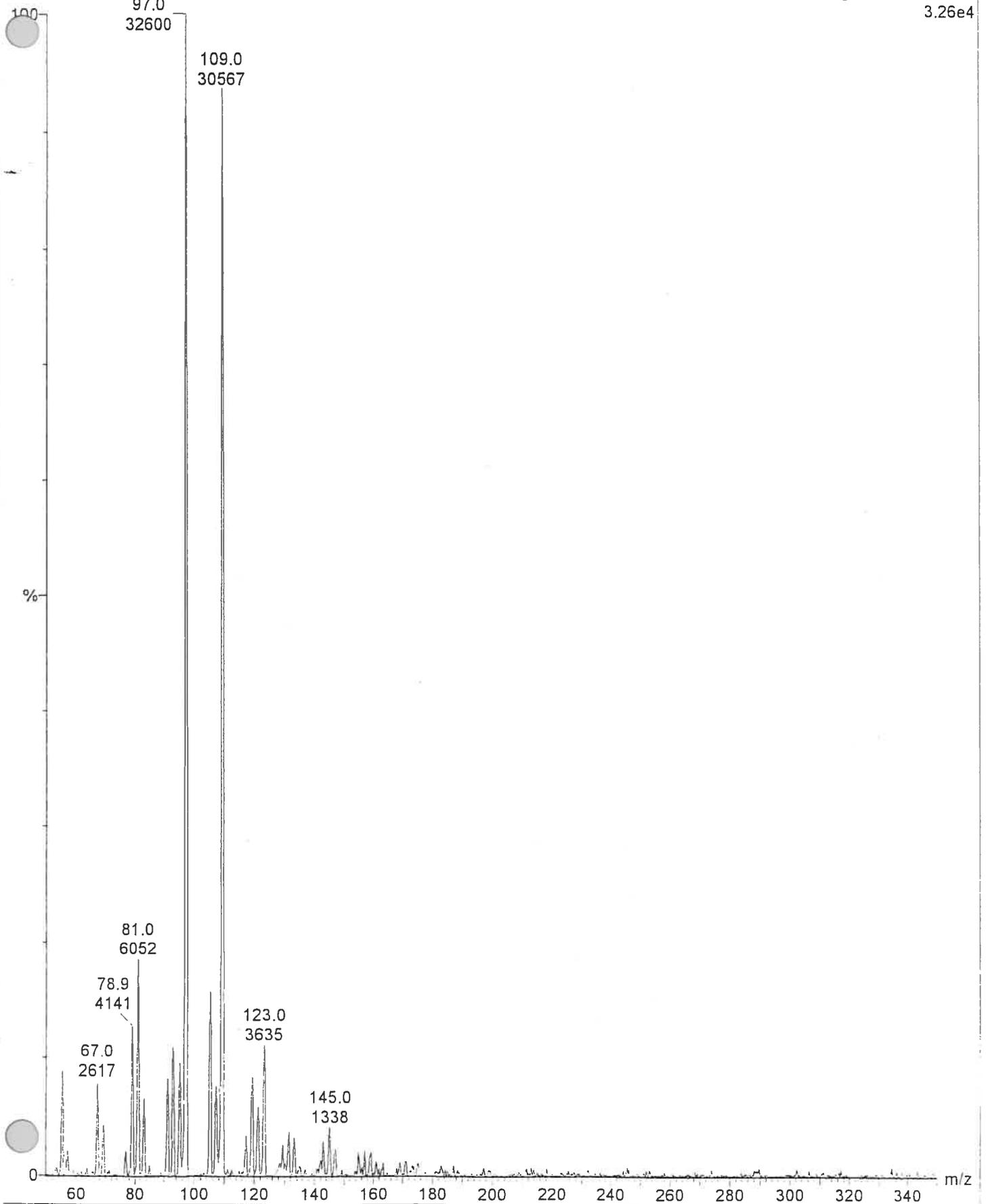
AUC 1D : Epitestostérone, EV=40 eV et EC=40 eV.

25-Mar-2002 , 10:05:42

EPITEE45 114 (2.116)

Daughters of 289ES+

3.26e4

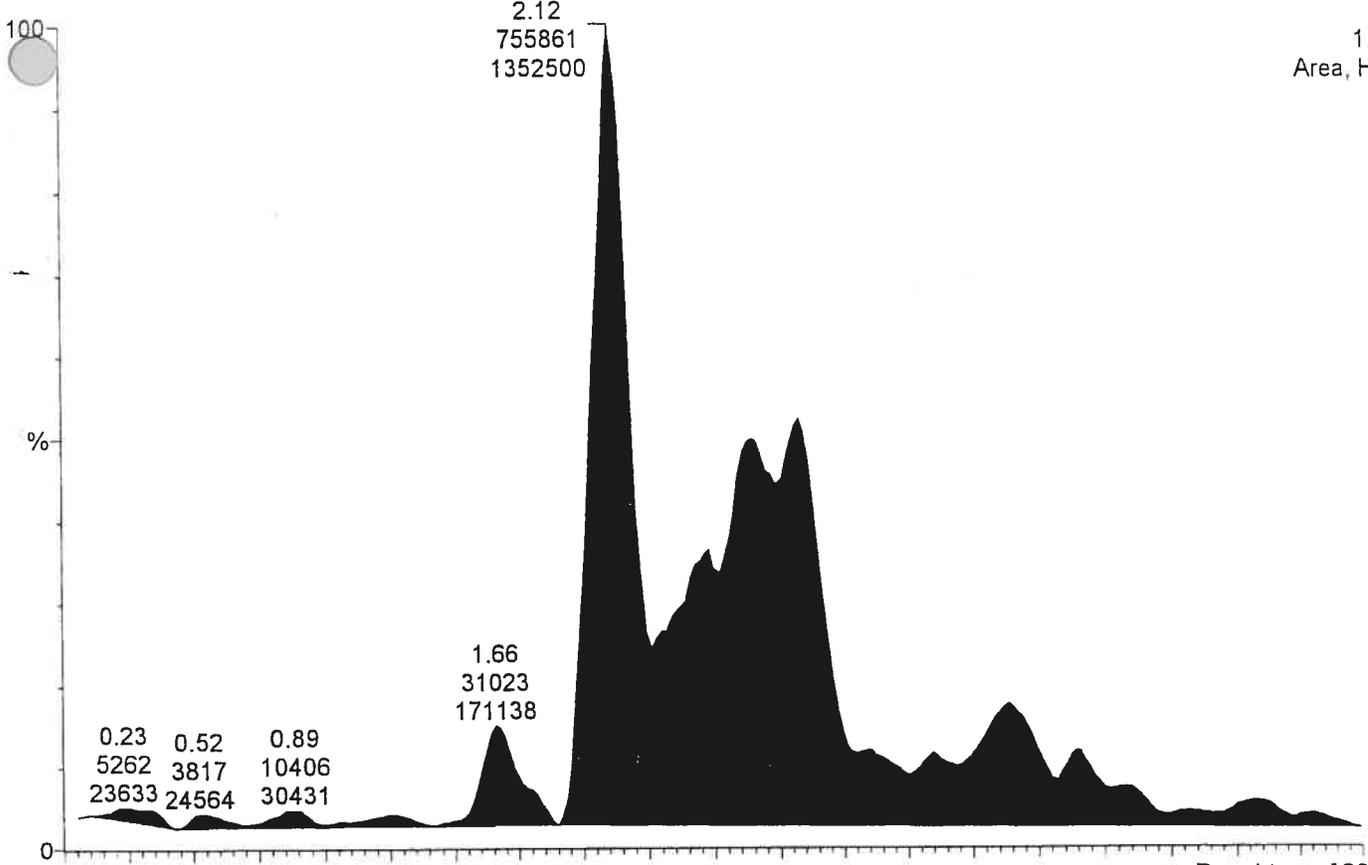


Spectre 1E : Epitestostérone (m/z=289), EV=40 eV et EC=45 eV, P=2.4.10e-3 mbar.

25-Mar-2002, 10:05:42

EPITEE45 Sm (Mn, 2x2)

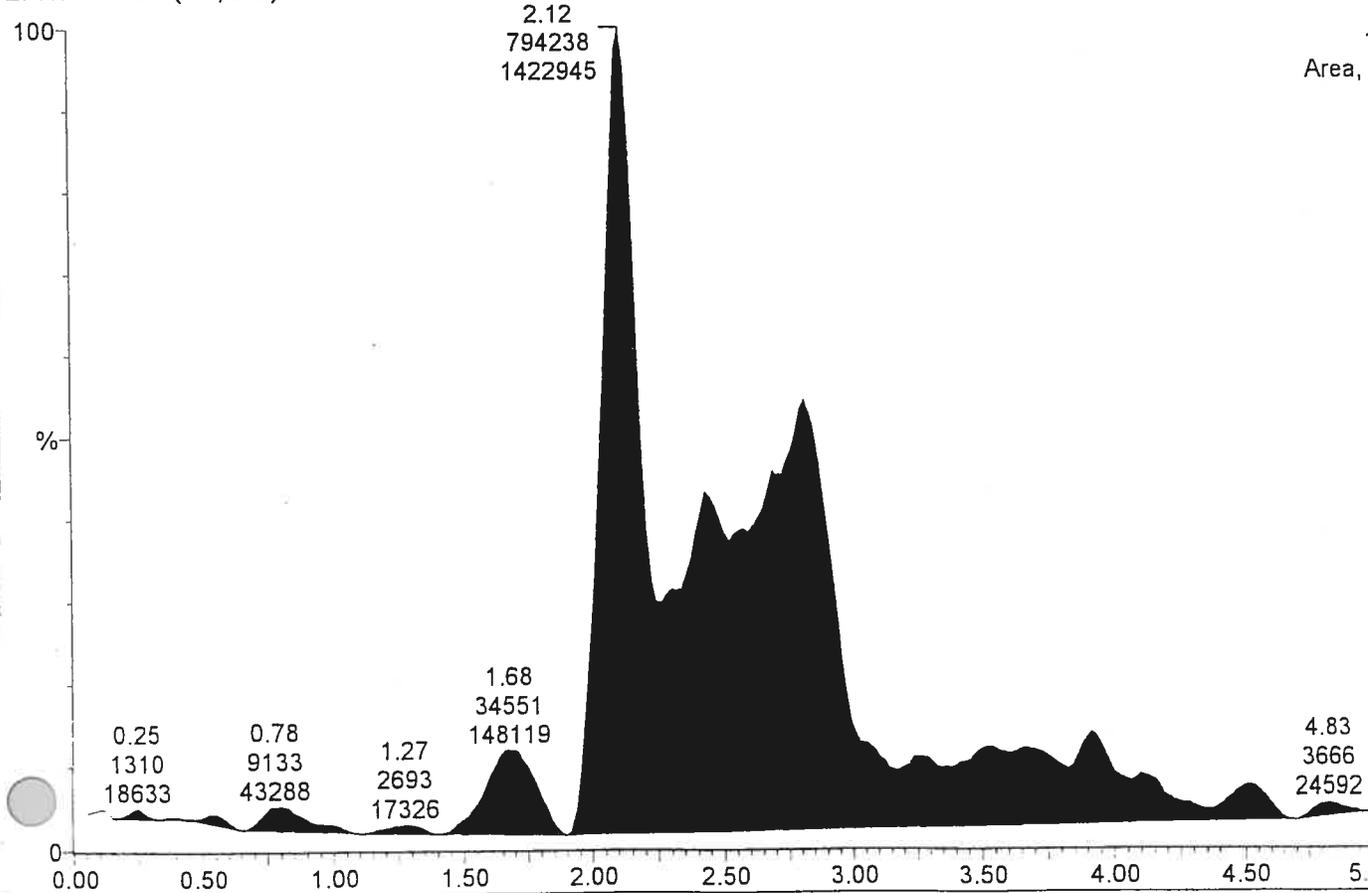
Daughters of 289ES+



109
1.39e6
Area, Height

EPITEE45 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+



97
1.45e6
Area, Height

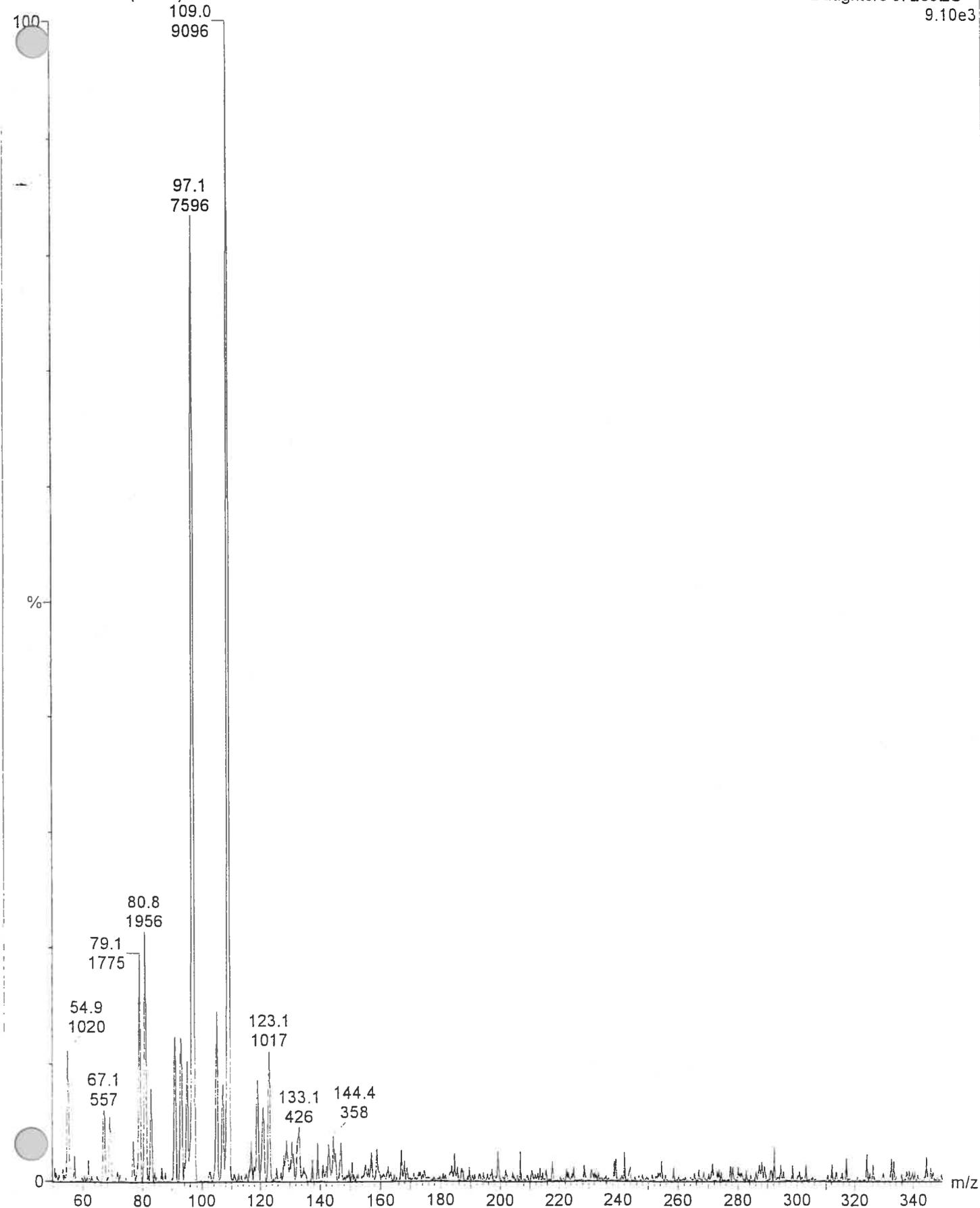
AUC 1E : Epitestostérone, EV=40 eV et EC=45 eV.

25-Mar-2002 , 10:11:40

EPITEE50 183 (3.383)

Daughters of 289ES+

9.10e3

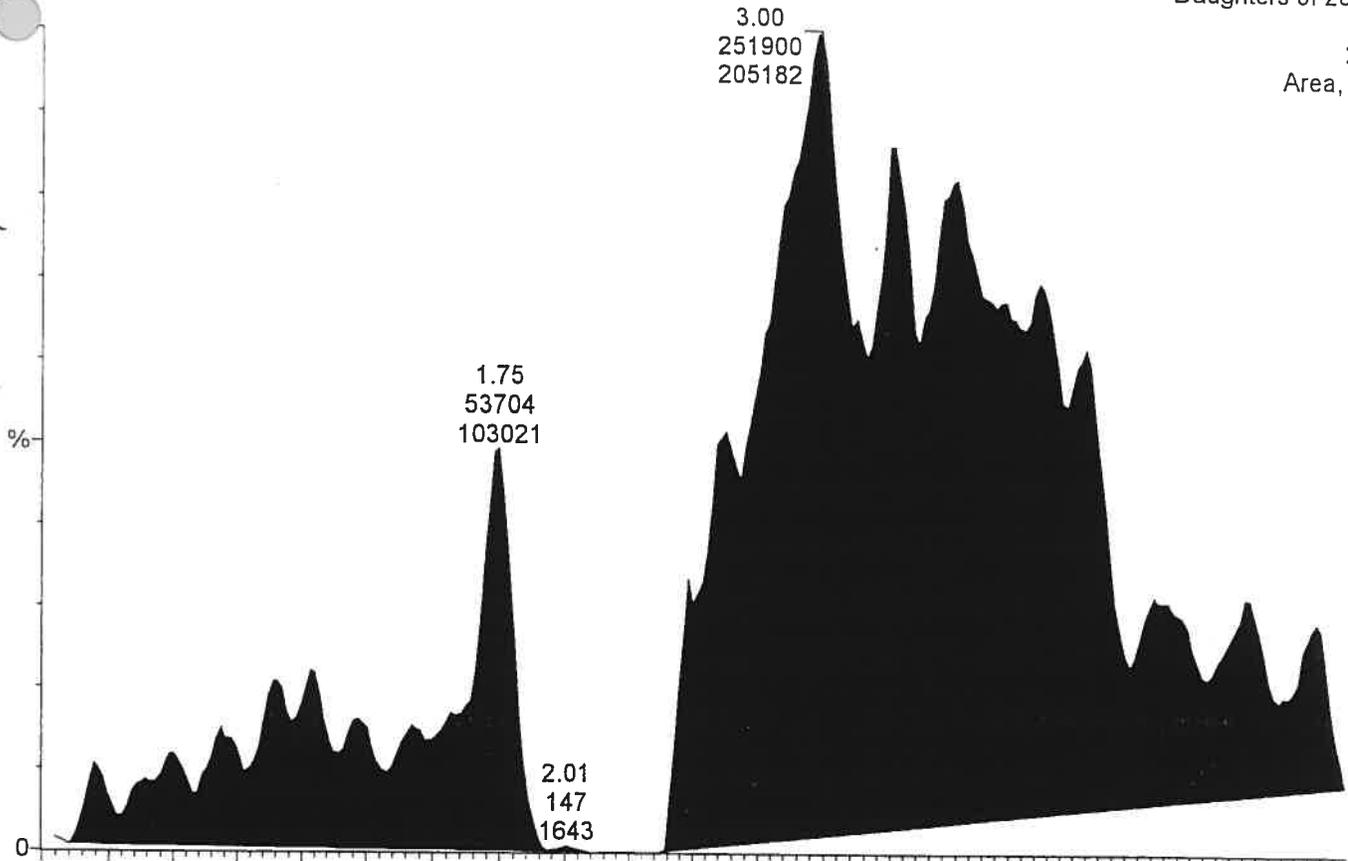


Spectre 1F : Epitestostérone (m/z=289), EV=40 eV et EC=50 eV, P=2.5.10e-3 mbar.

25-Mar-2002, 10:11:40

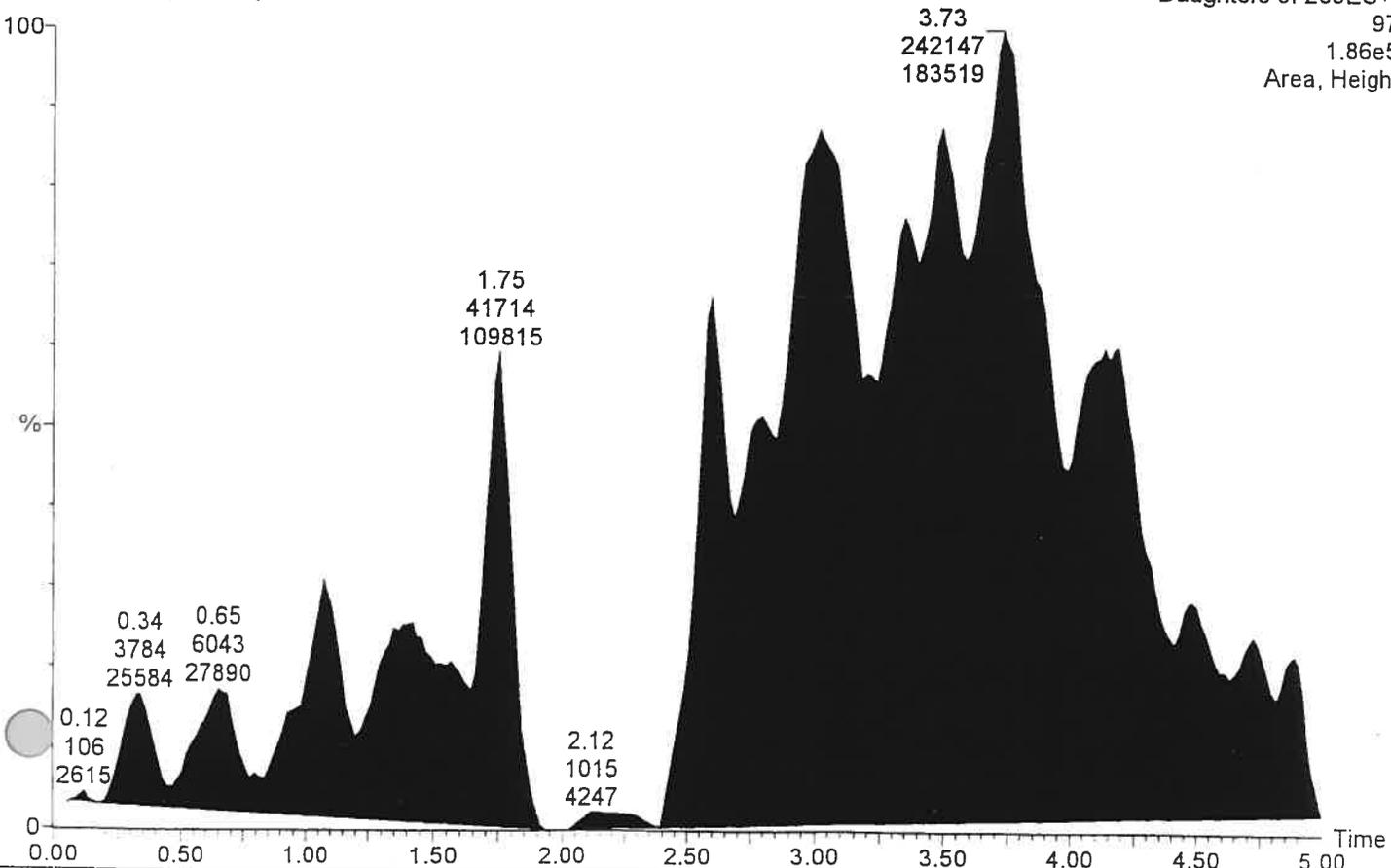
EPITEE50 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+
109
2.09e5
Area, Height

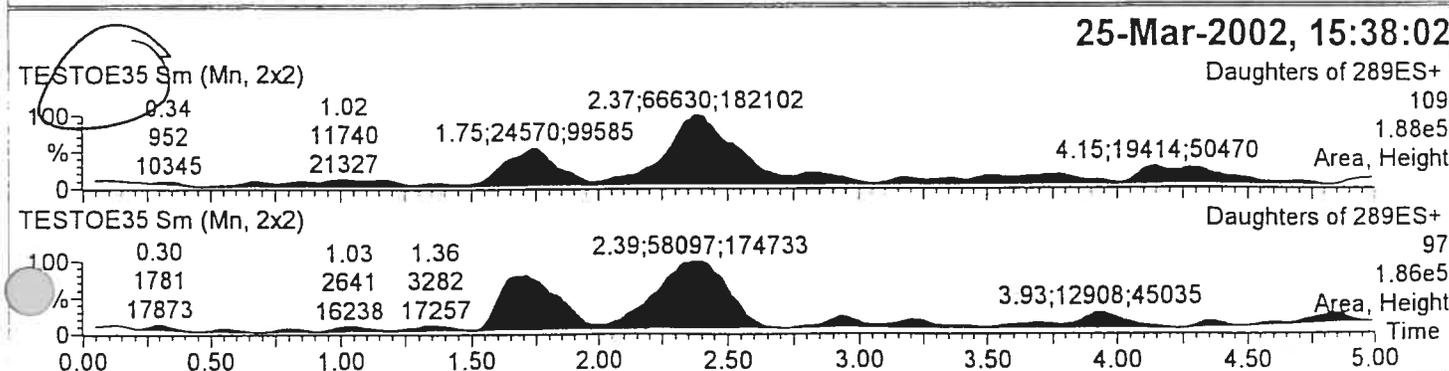
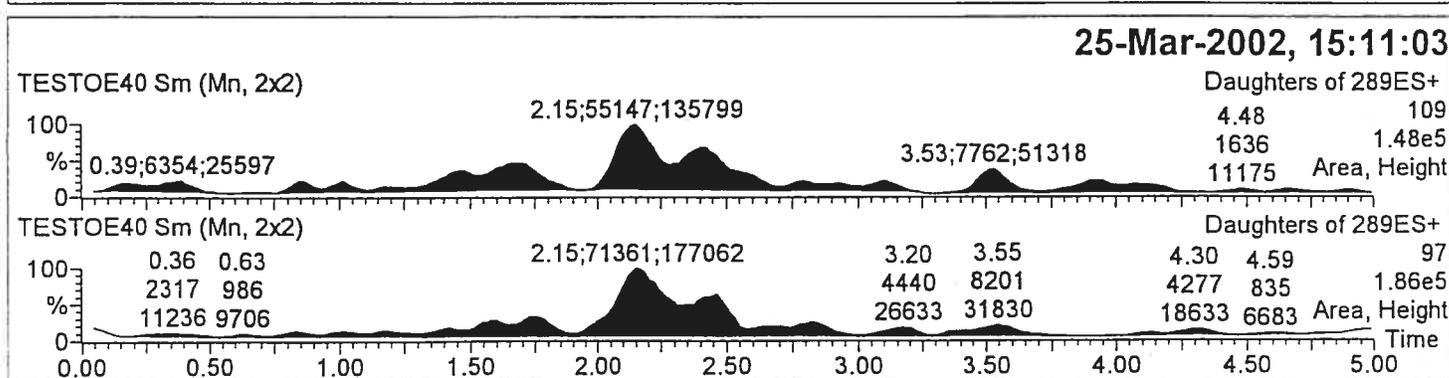
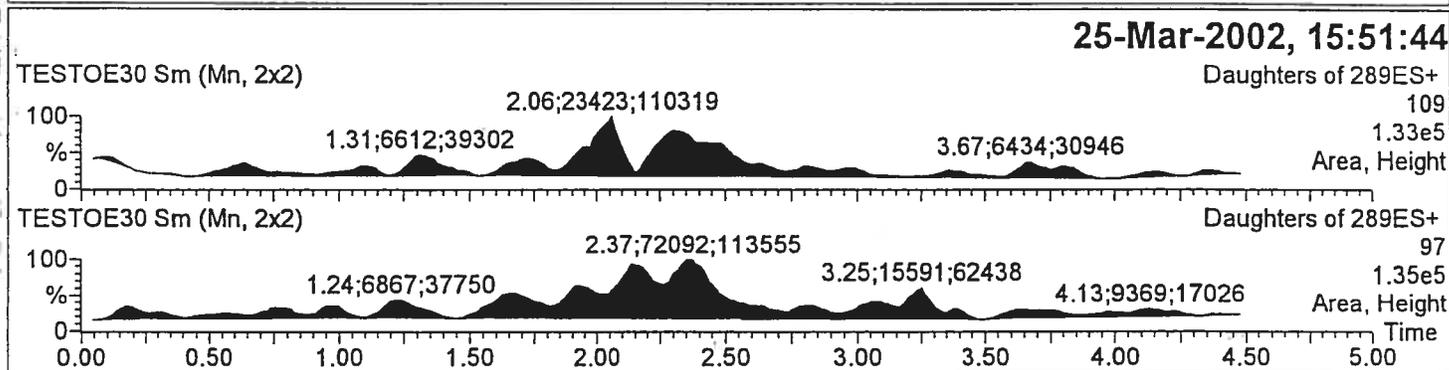
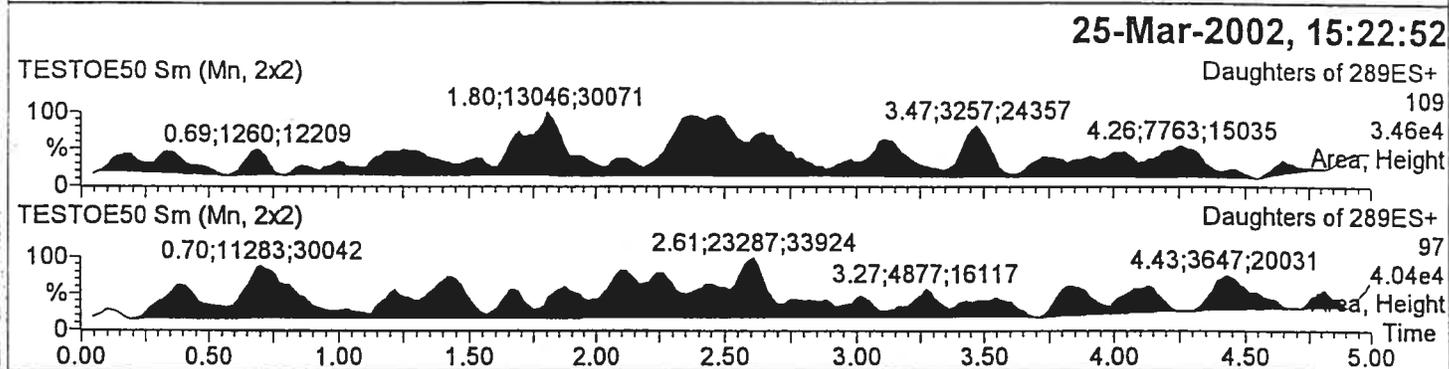
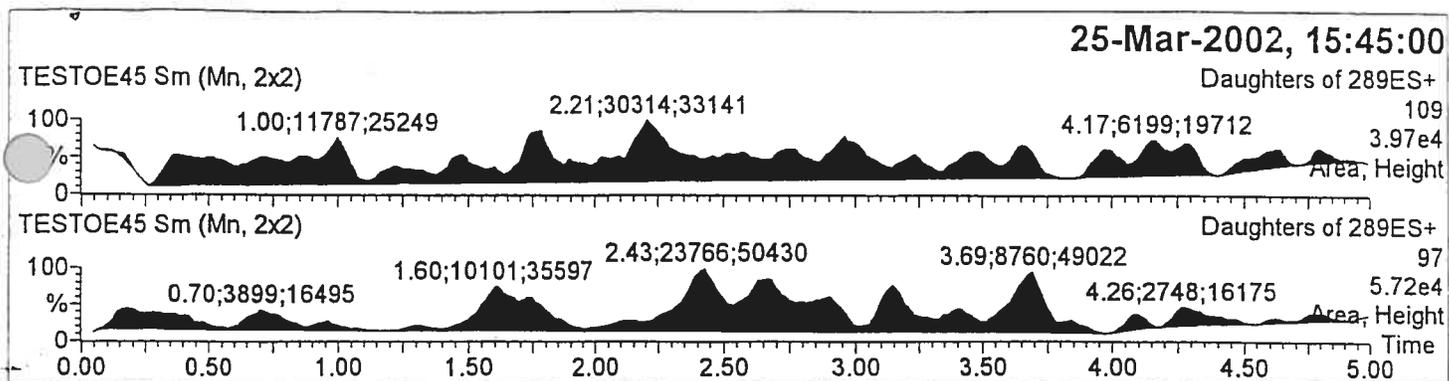


EPITEE50 Sm (Mn, 2x2)

Daughters of 289ES+
97
1.86e5
Area, Height



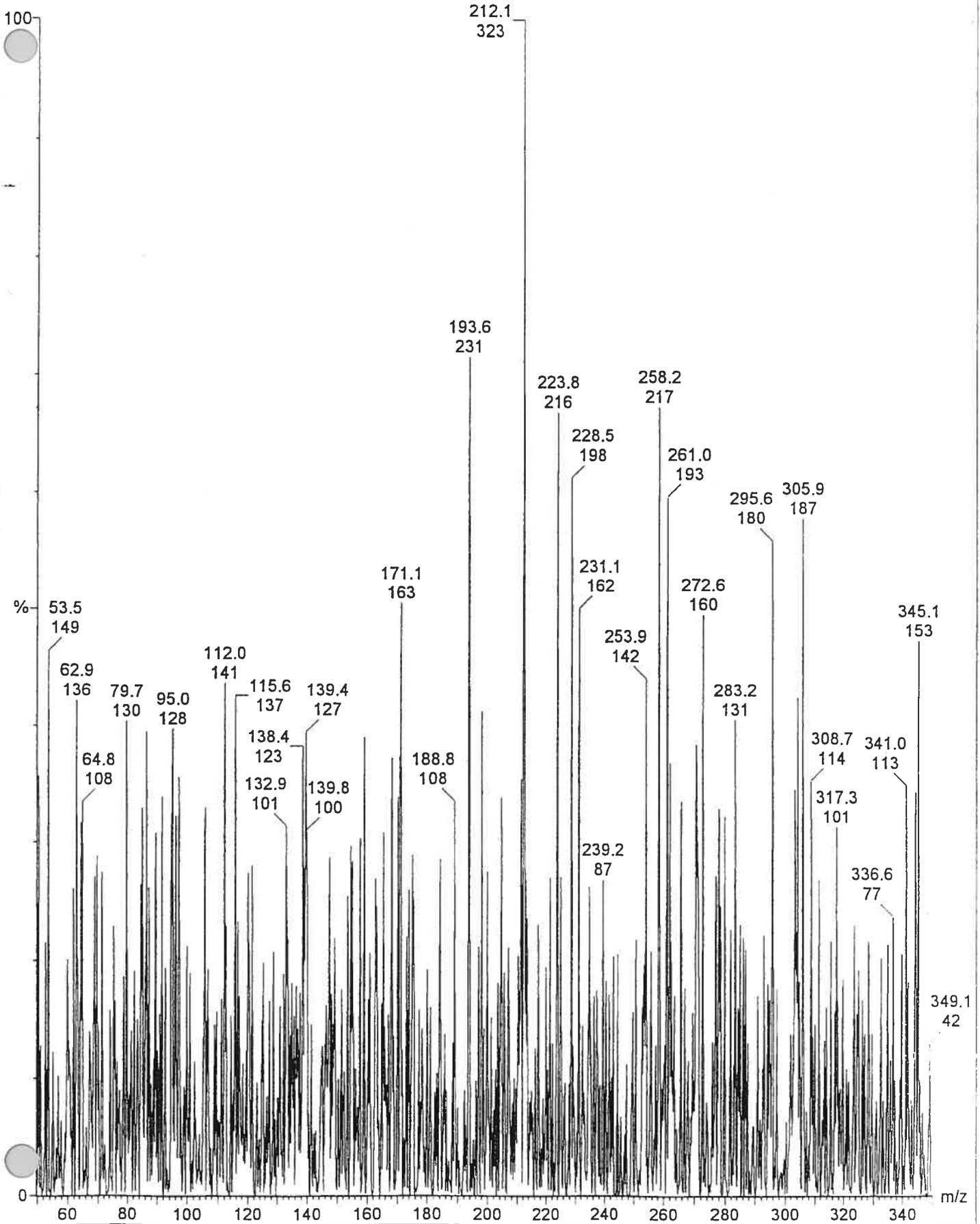
AUC 1F : Epitestostérone, EV=40 eV et EC=50 eV.



AUC 2 : Surface sous la courbe en mode MS2 de la testostérone (m/z=97 et m/z=109),
CV=35 eV.

15-Apr-2002 , 16:09:16

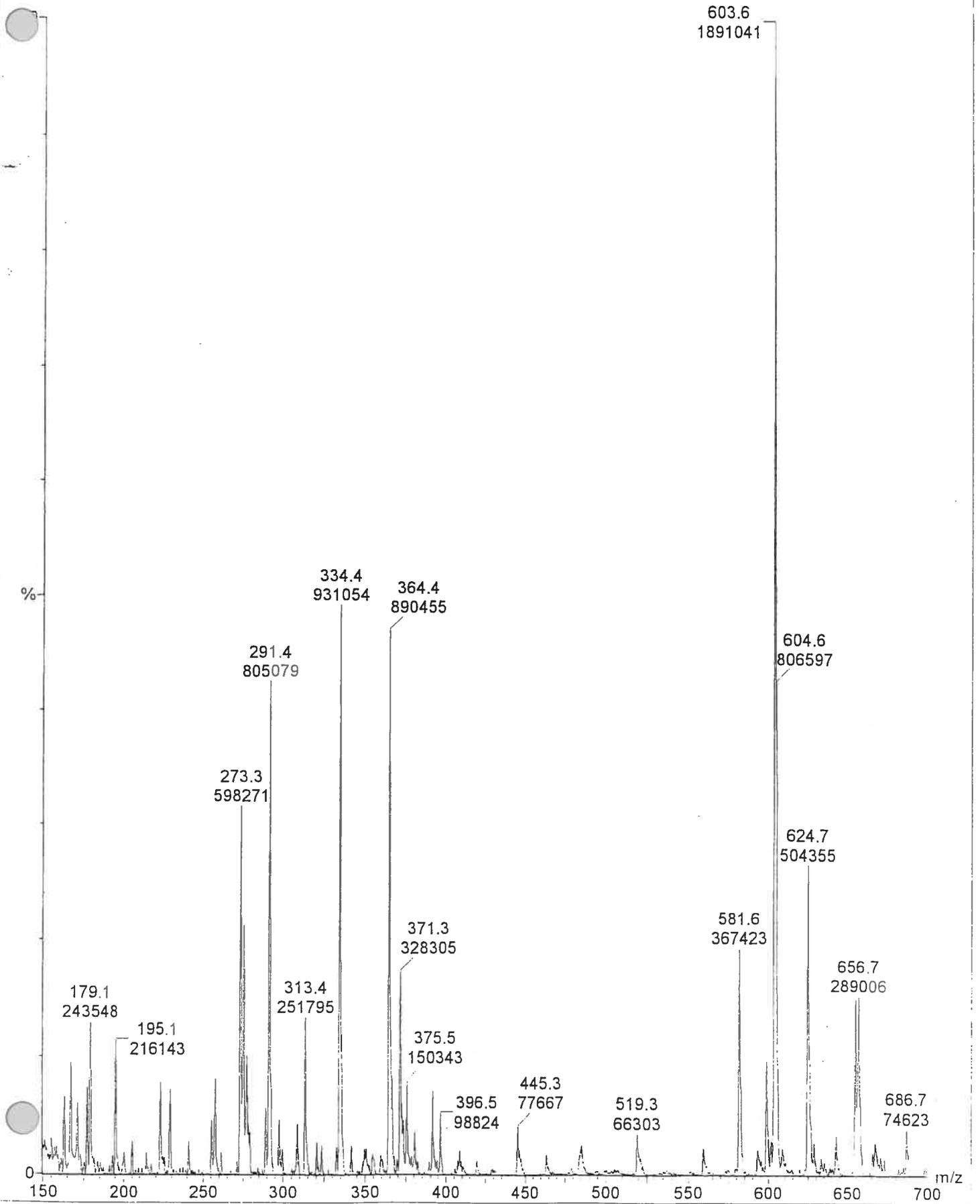
DHE20 152 (2.813)



Spectre 2 : Fragmentation en mode MS2 de la DHEA (m/z=289), EV=40 eV et EC=20 eV.

AN20 122 (2.263)

08-Apr-2002 , 15:07:50



Spectre 3 : Fragmentation en mode MS2 de l'androstérone (m/z=290), EV=40 eV et EC=20 eV.

30-Apr-2002 , 15:08:46

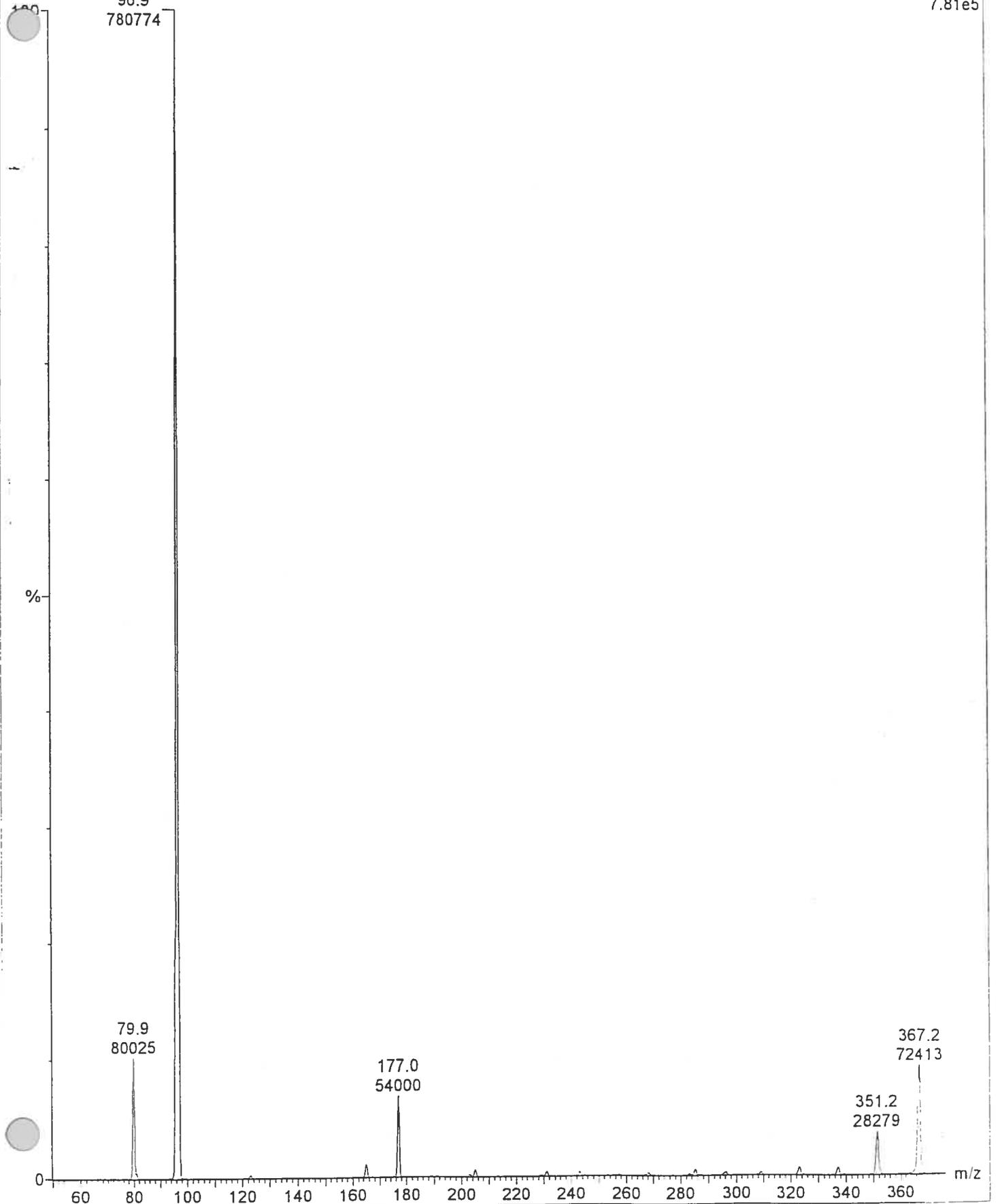
TESTSU13 112 (2.080)

Daughters of 367ES-

96.9

7.81e5

780774

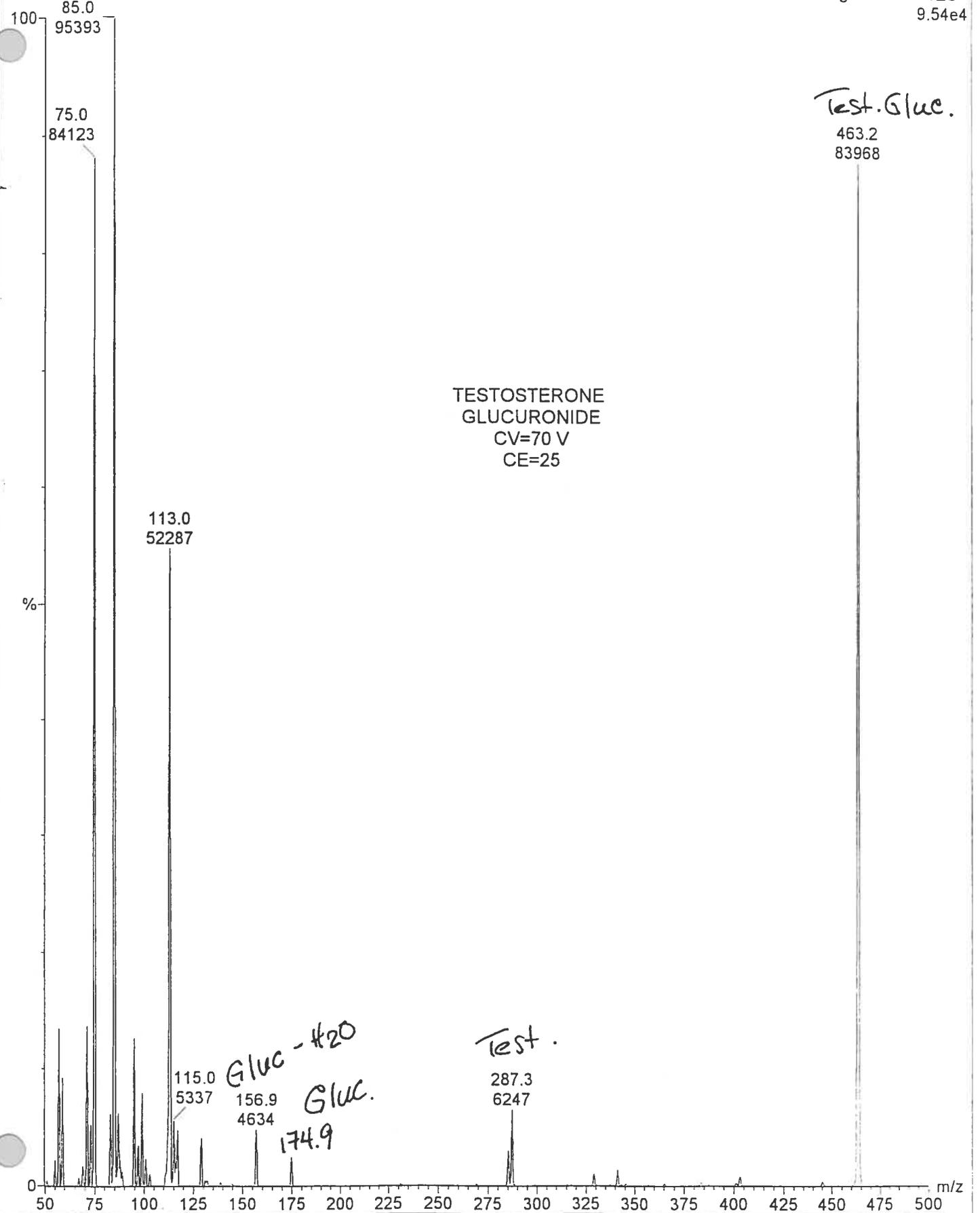


Spectre 4 : Fragmentation en MS2 de la testostérone sulfatée (m/z=97 et m/z=289), EV=40 eV et EC=50 eV.

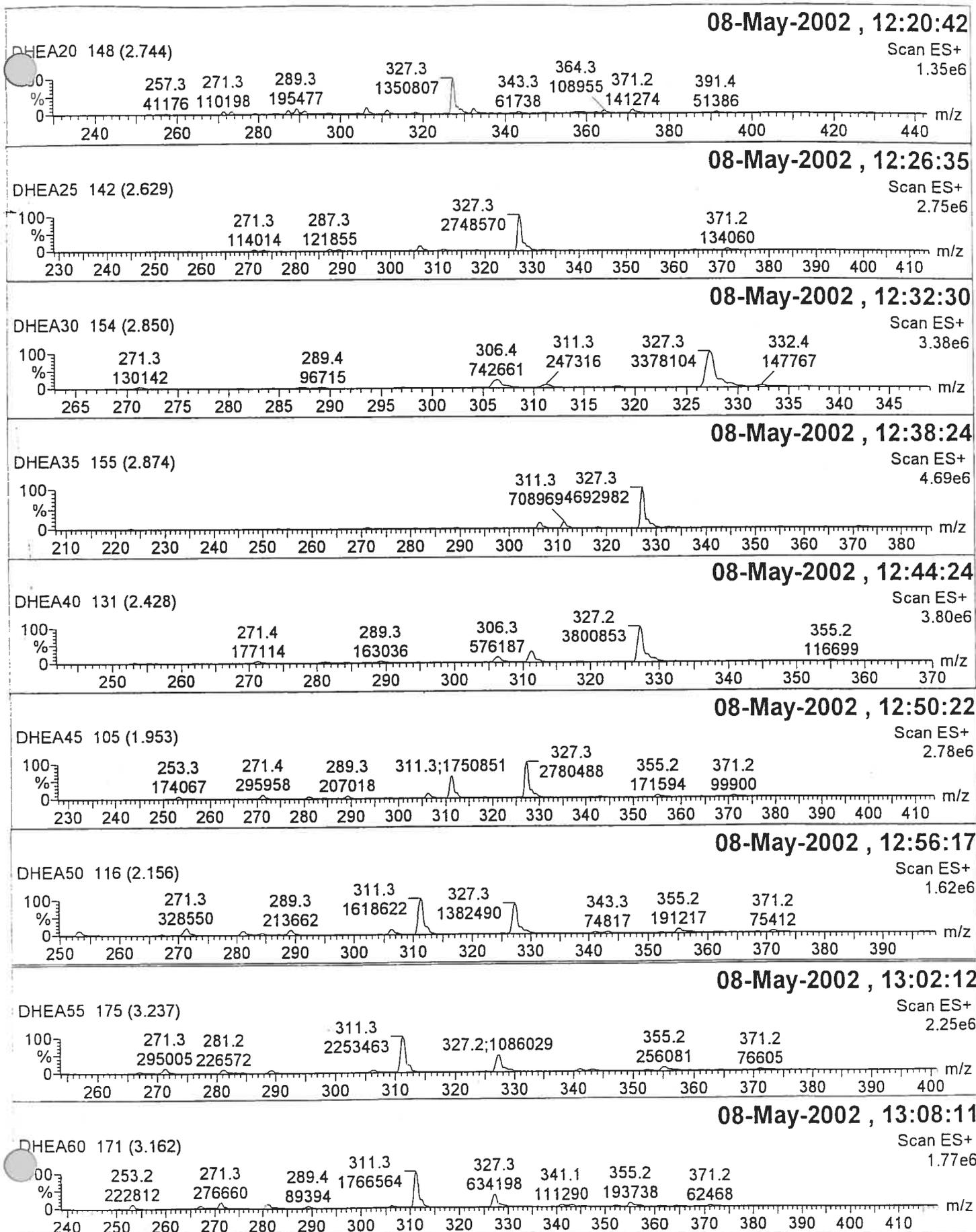
11-Mar-2002 , 13:41:39

Daughters of 464ES-
9.54e4

TESTGL03 60 (2.126)



Spectre 5 : Fragmentation en MS2 de la testostérone glucuronidée (m/z=175 et m/z=289),
EV=40 eV et EC=50 eV.



Spectre 6 : La molécule de DHEA (m/z=289) indétectable en mode MS1 à différentes énergies d'ionisation.

➤ Résultats :

- Nous obtenons une énergie optimale d'ionisation, $EV= 40$ eV et une énergie de collision optimale, $EC=50$ eV.
- La même fragmentation s'observe pour la testostérone et l'épitestostérone, (AUC2).
- Certaines molécules sont trop fragiles pour donner un spectre caractéristique et l'on observe une multitude de fragments non interprétable : La DHEA et l'androstérone (spectre 2 et 3 respectivement).
- Les composés conjugués donnent à l'unanimité le schéma suivant :

Le groupement sulfate ($PM=97$) + l'ion parent de la molécule considérée et le groupement glucuronide ($PM=175$) + l'ion parent de la molécule considérée.

La testostérone sulfatée et la testostérone glucuronidée sont illustrées, (spectre 4 et 5 respectivement).

➤ Conclusions :

- La spectrométrie de masse en tandem est non utilisable pour caractériser spécifiquement chaque composé de **même poids moléculaire**.
- Un autre problème apparaît : La molécule de DHEA ($PM=289$) n'est pas détectable, (spectre 6).

2. RENDRE DÉTECTABLE LA DHEA

Afin d'augmenter le signal de détection et la sensibilité de la molécule de DHEA, la méthode de dérivation chimique va être appliquée [36].

En effet, sachant que cette dernière est neutre et qu'elle se trouve être en trop faible concentration dans les urines, l'ajout d'un groupement fonctionnel chargé va faciliter la lecture du spectre de masse ainsi obtenu. L'acétate d'ammonium va être le réactif sélectionné, car il permettra de former une nouvelle molécule protonée de type $[M+NH_4^+]$. La DHEA aura ainsi un pic de forte intensité pour le nouveau poids moléculaire obtenu.

➤ Méthodologie :

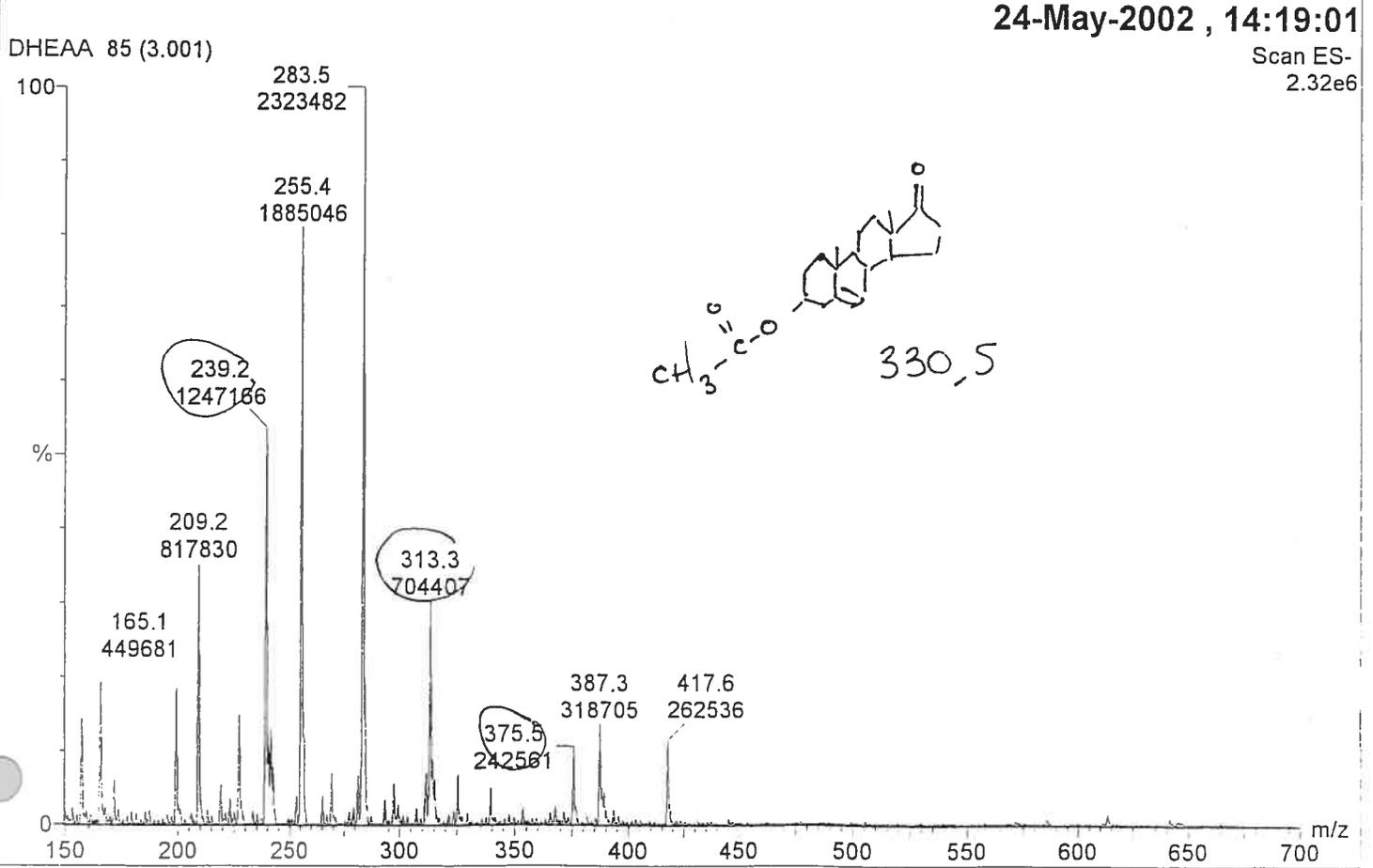
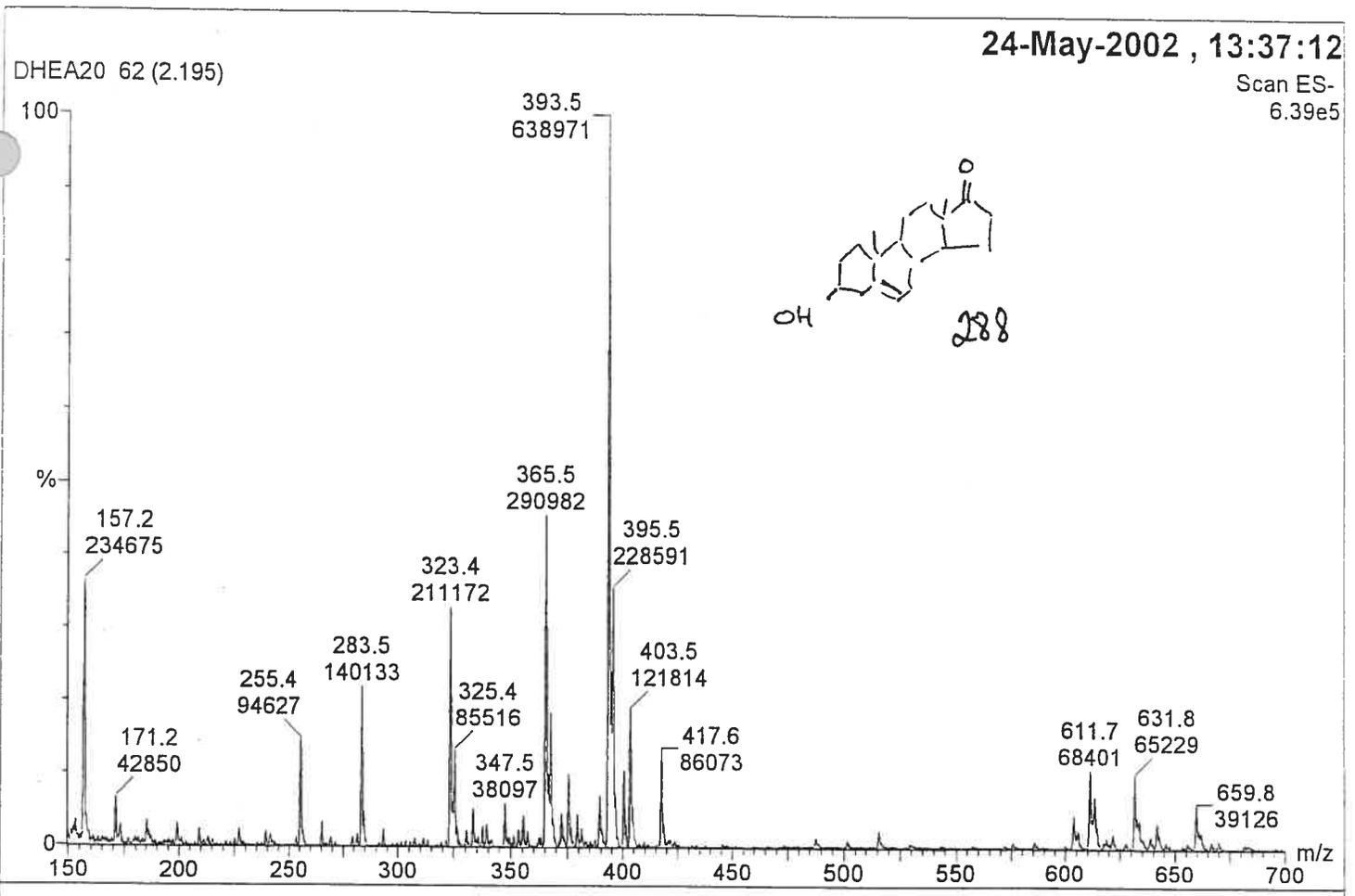
- La méthode d'acétylation habituellement utilisée pour les sels biliaires au sein de notre laboratoire est réalisée.
- La dérivation des molécules avec deux nouveaux produits, l'acétate d'ammonium et la pyridine, est essayée.

➤ Résultats :

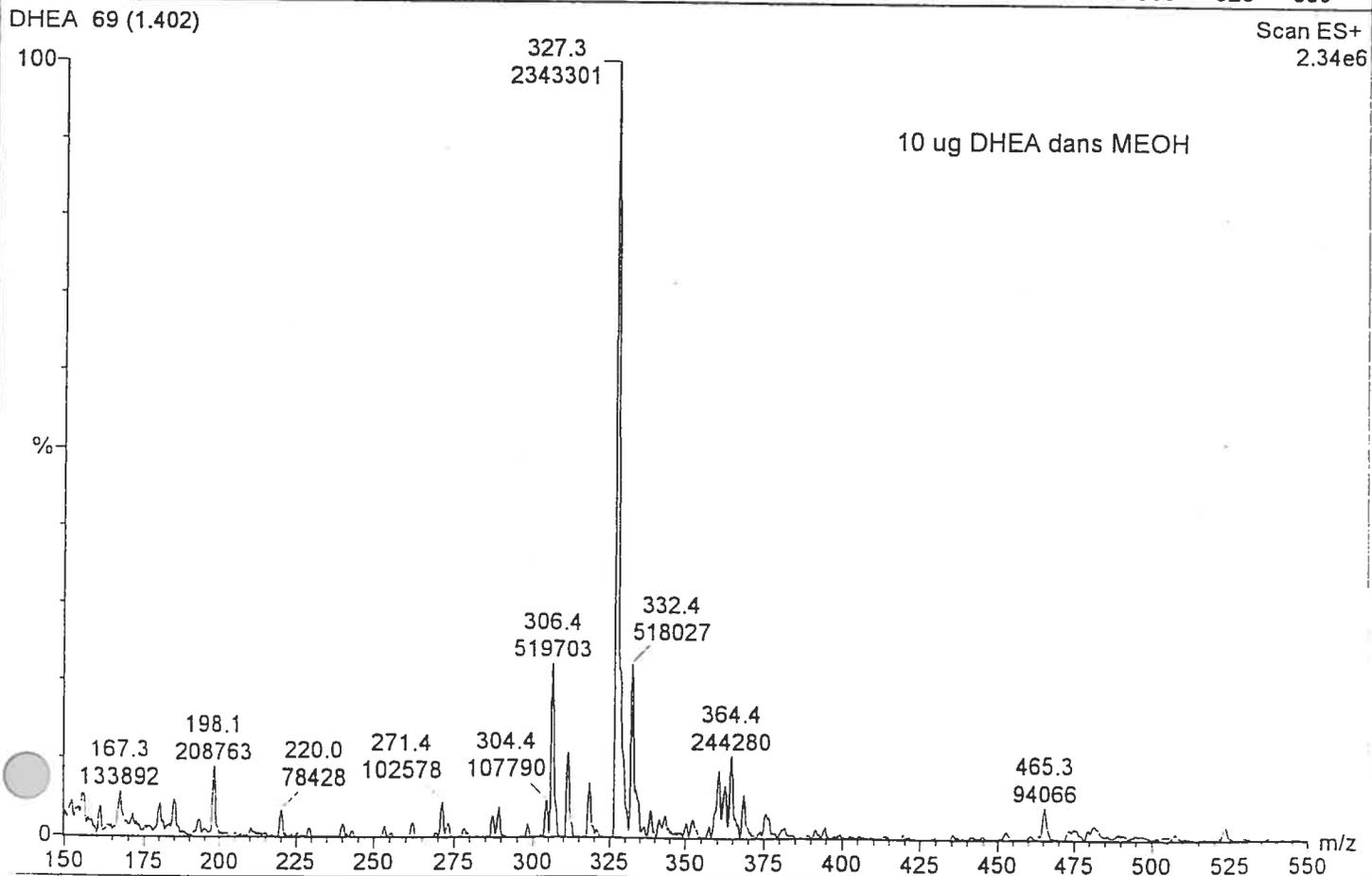
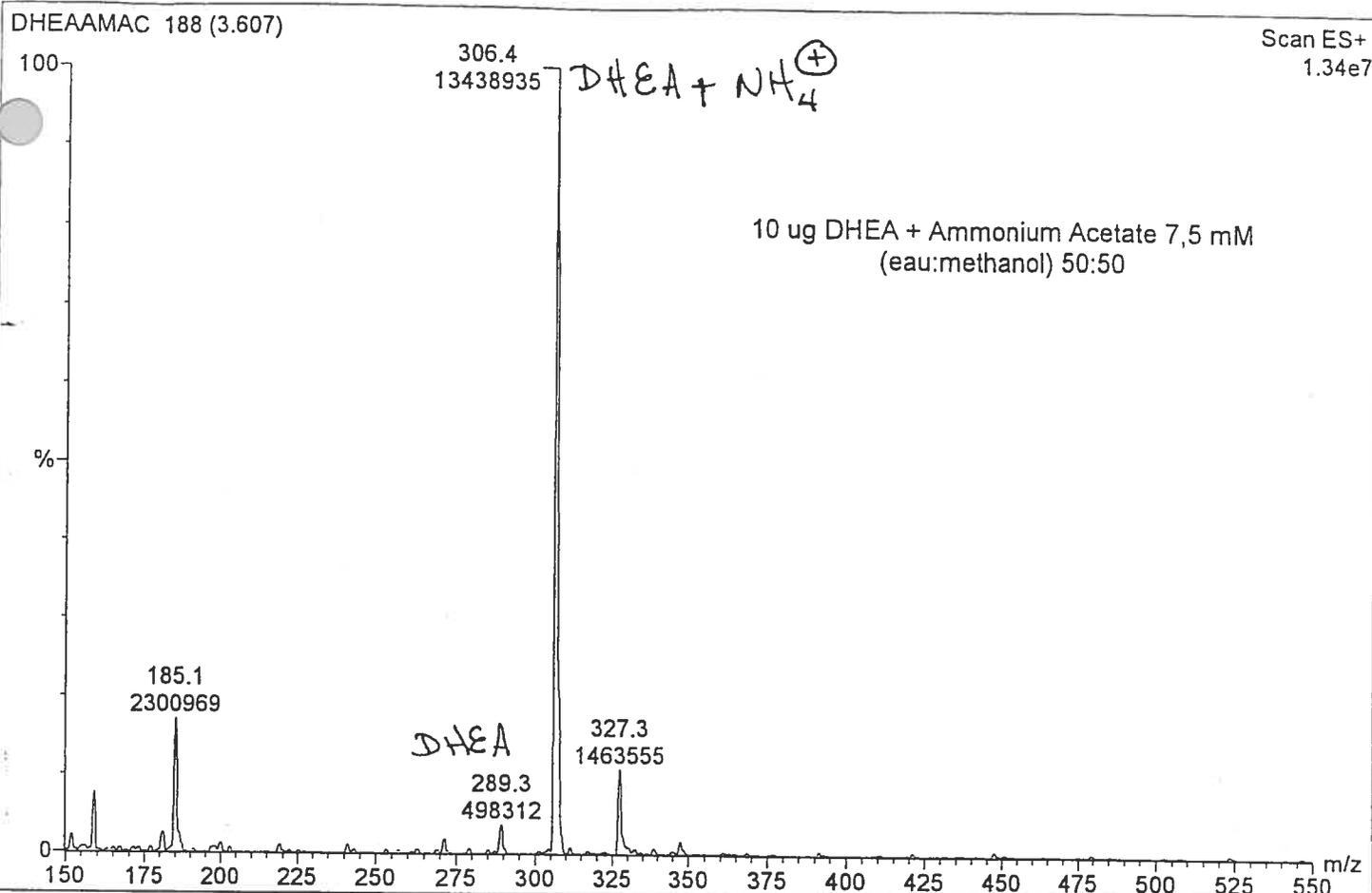
- L'acétylation est impossible à réaliser sur les stéroïdes anabolisants malgré la variation de multiples paramètres tels, la température de la source et de l'échantillon, la durée de l'expérience, le volume d'acide acétique...), (spectre 7).

- En revanche, de très bons résultats sont obtenus avec les deux autres produits testés, (spectre 8, 9 et 10). Nous avons ajouté une charge positive à chaque molécule, les rendant ainsi détectables.

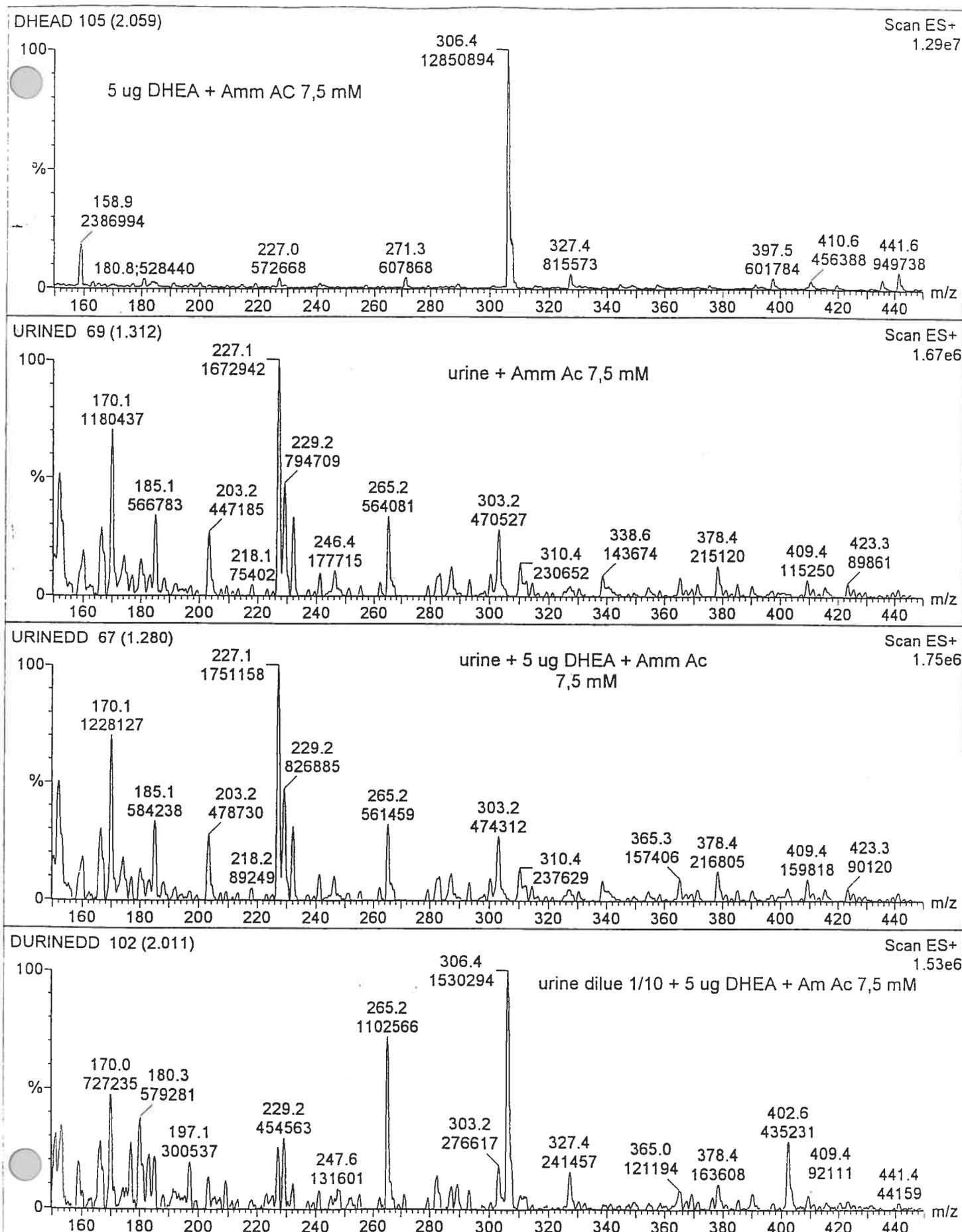
À noter, la protonation va s'effectuer au niveau du groupe hydroxyle des stéroïdes.



Spectre 7 : La molécule de DHEA (m/z=289) libre (non acétylée) et acétylée (m/z=330).



Spectre 8 : La molécule de DHEA libre ($m/z=289$) contenue dans l'eau et le méthanol (50:50) et dérivée dans l'ammonium acétate ($m/z=306$).



Spectre 9 : La molécule de DHEA ($m/z=289$) contenue dans l'urine diluée (1/10) et dérivée dans l'ammonium acétate.

20-Jun-2002, 10:36:01

Scan ES+
2.31e7

DHEAPYR2 75 (2.650)

DHEA + pyridine

369.4
23092510

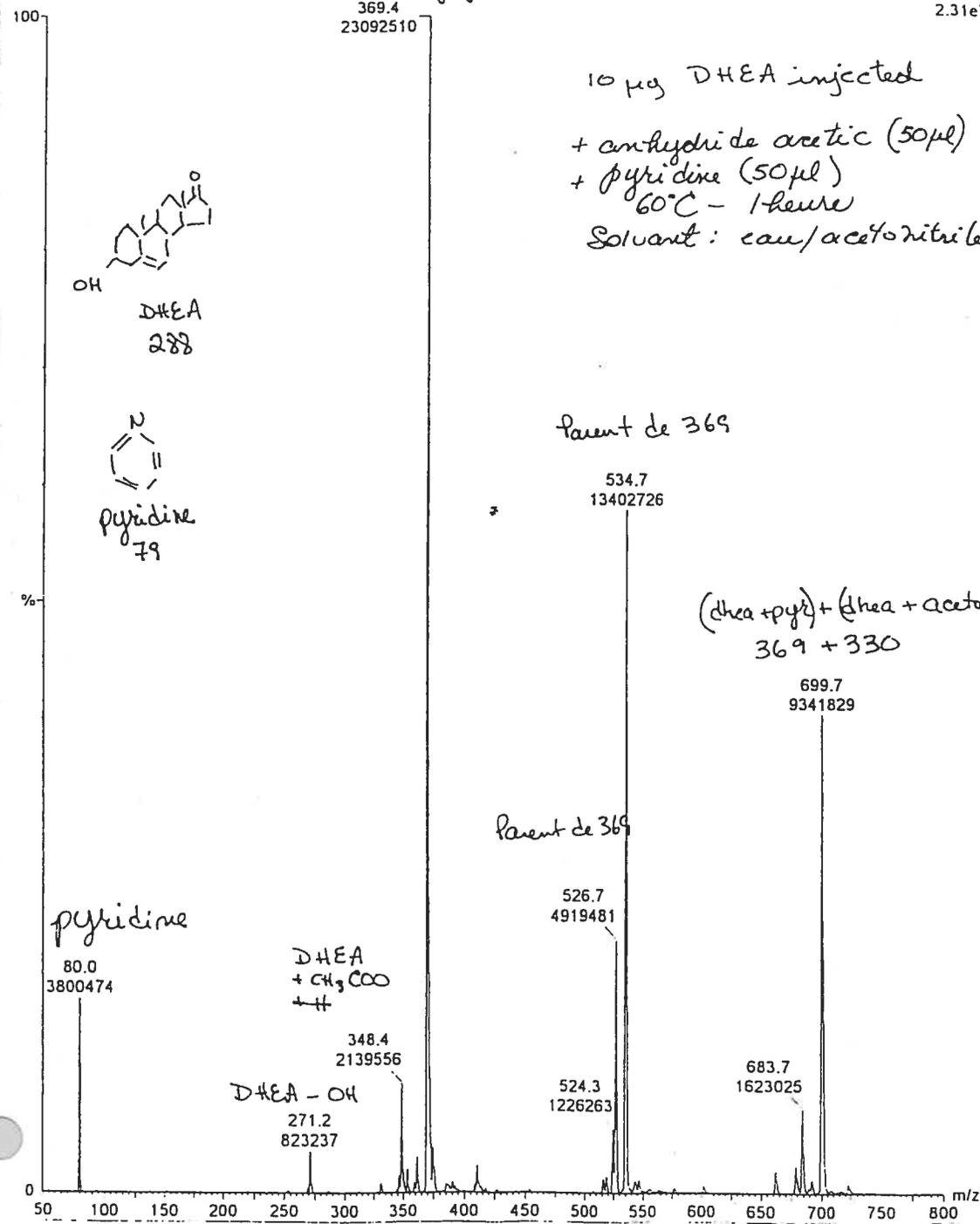
10 µg DHEA injected

+ anhydride acetic (50 µl)

+ pyridine (50 µl)

60°C - 1 heure

Solvant : eau/acetonitrile



Spectre 10 : la molécule de DHEA (m/z=369) dérivée par l'emploi de la pyridine.

➤ Conclusions :

- La DHEA devient détectable, mais en mode positif seulement.
- La méthode de dérivation mise au point est très simple comparativement à la littérature et nous permet d'utiliser la spectrométrie de masse aisément.

3. MISE AU POINT DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION

➤ Méthodologie :

- Le protocole d'extraction de notre laboratoire pour les sels biliaires [65] est adapté aux composés stéroïdiens en ajoutant ou supprimant des étapes, en changeant les solvants.

Les cartouches d'extraction Octadecyl (C18) BAKERBOND® utilisées [66], sont obtenues chez J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Le pré-conditionnement se réalise avec des éluions successives de 2 ml de méthanol et de 2ml d'eau à partir de solvants conçus spécialement pour le HPLC.

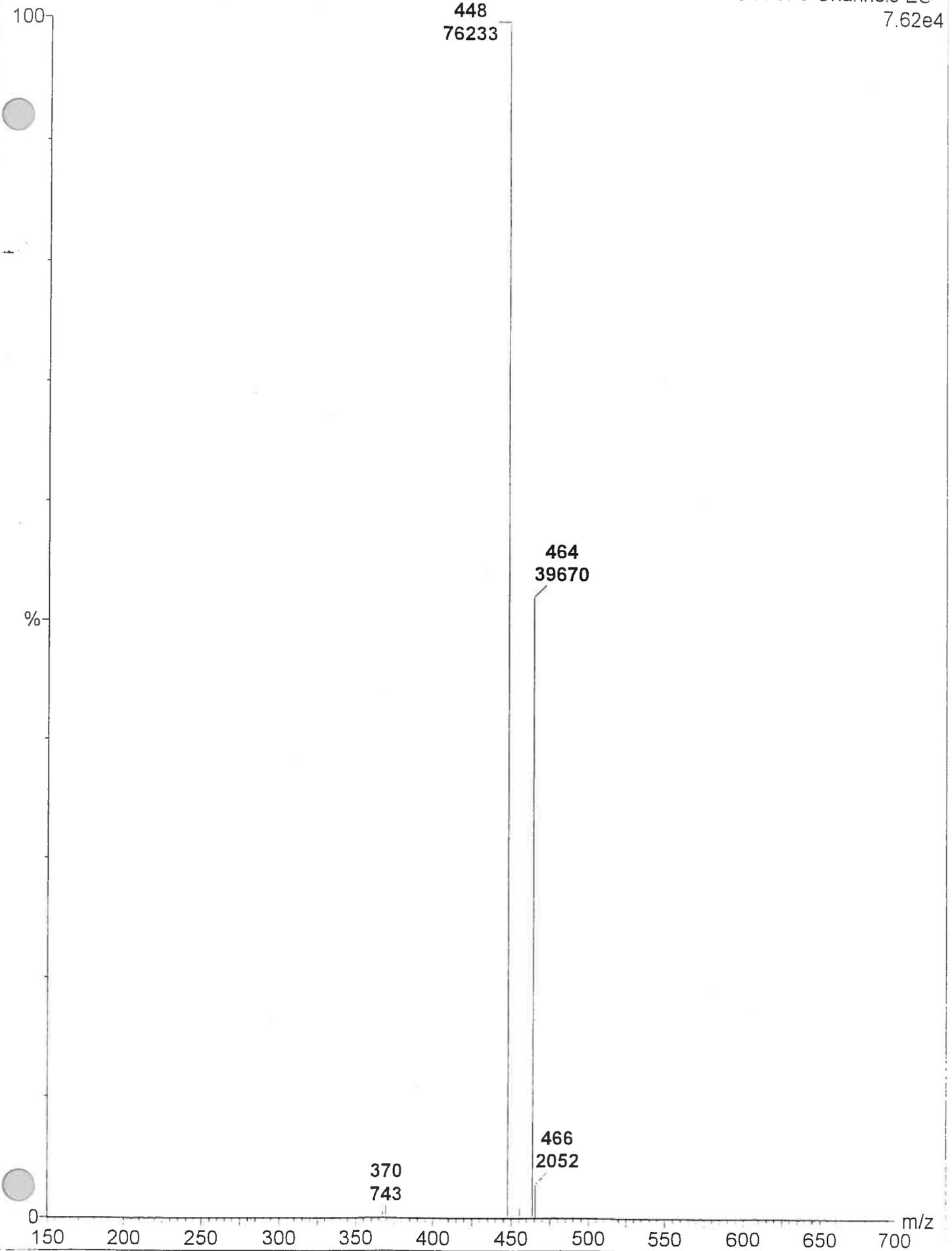
Parallèlement, les échantillons d'urine prélevés, d'un volume équivalent à 200 µl, sont complétés avec un volume d'eau correspondant à 800 µl dans un tube à essai. Ils sont alors chargés sur les cartouches C18 auxquelles sont également ajoutés 10 µl de standard interne correspondant. Selon le cas, il s'agira de LCAS (acide lithocholique sulfaté), de 17-β-estradiol glucuronide ou encore de nandrolone choisis lors d'essais et donnant des résultats consistants et reproductibles.

Après le passage sur cartouche de ces solutions à analyser, un premier rinçage avec 2 ml d'eau purifiée est effectué afin d'éliminer la majorité des composés polaires.

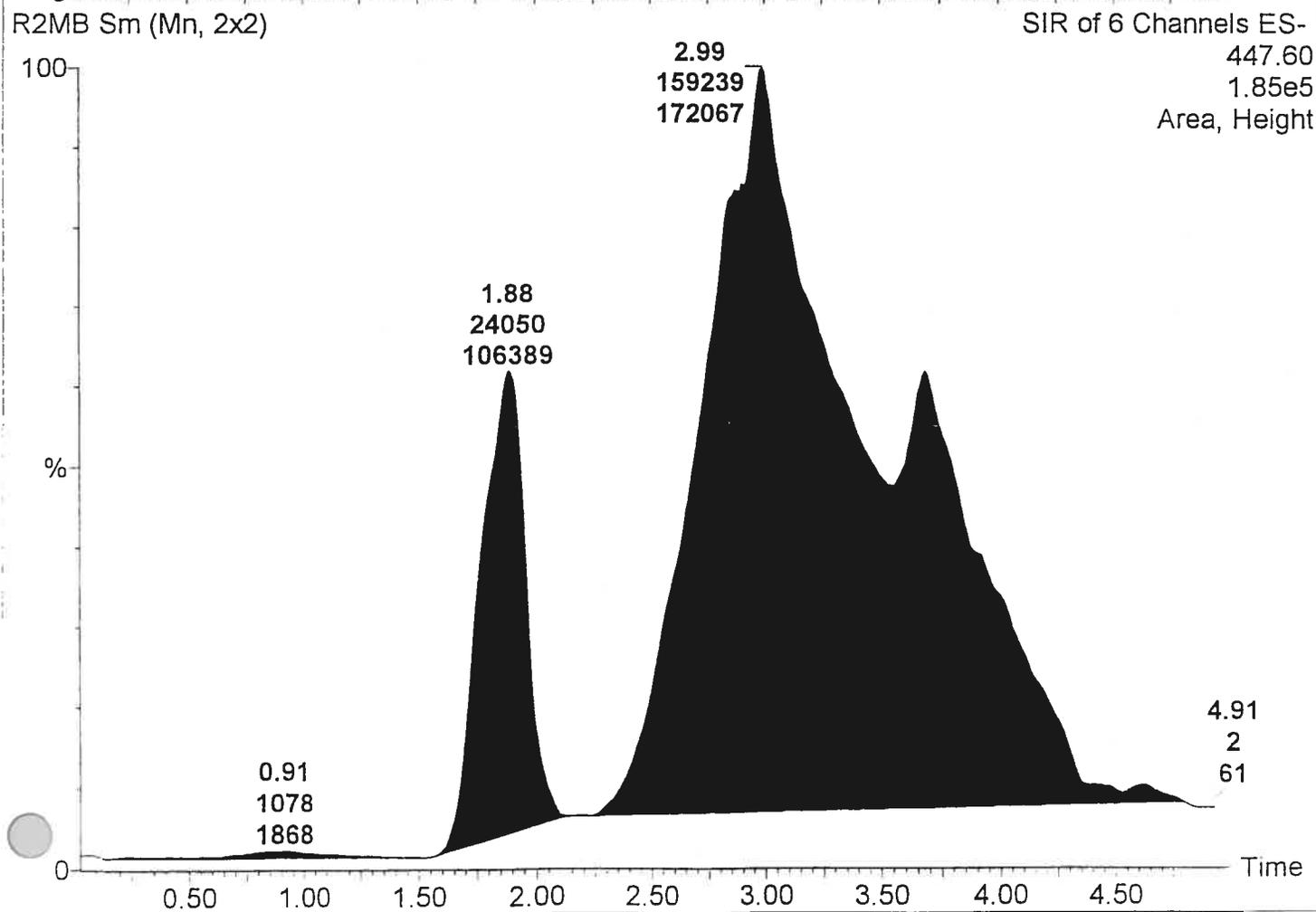
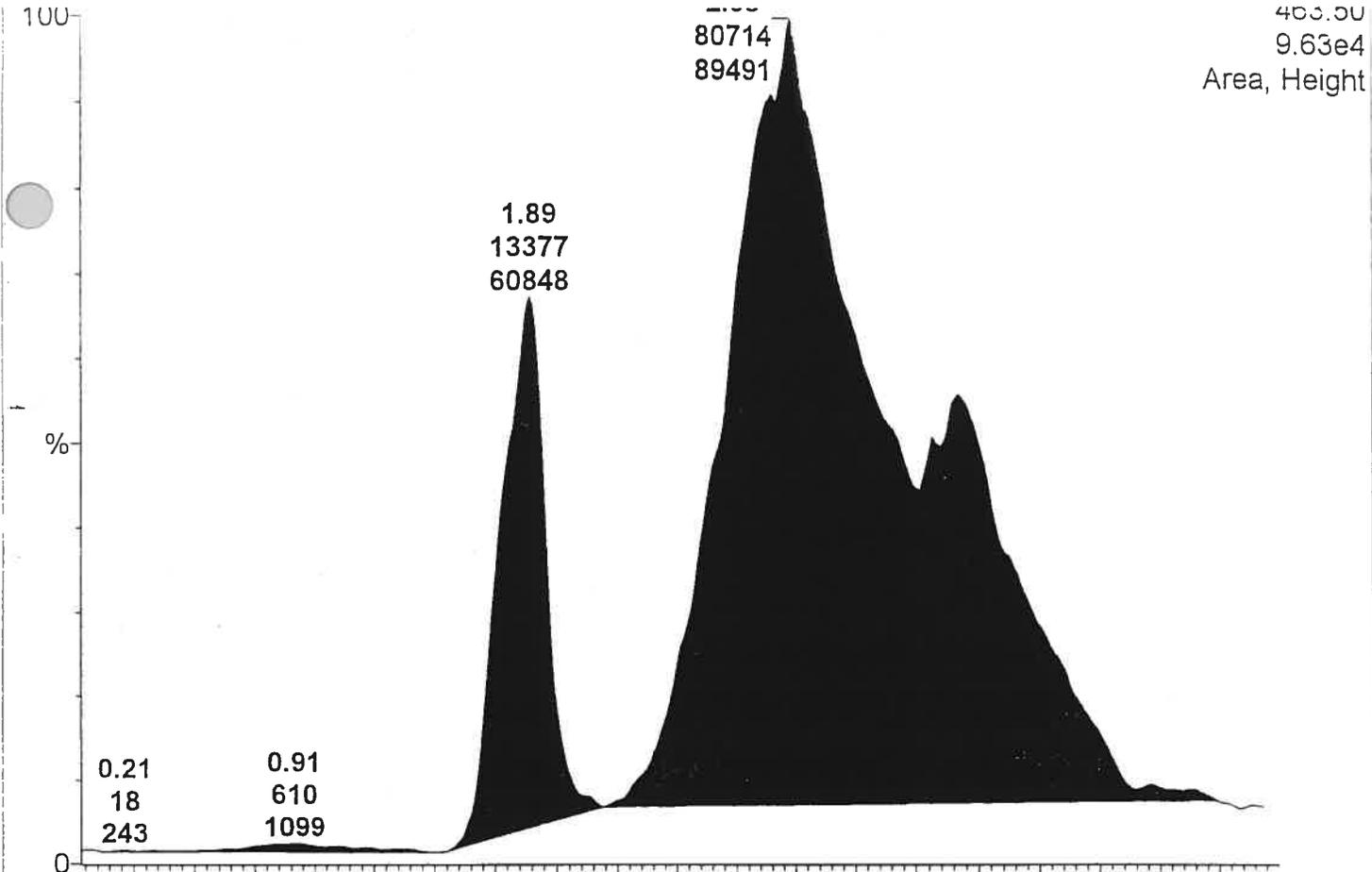
Nous laissons alors sécher la cartouche pendant une dizaine de minutes [65] par l'utilisation d'un système sous vide. Les stéroïdes sont ensuite récupérés dans un nouveau tube à essai grâce à l'emploi répété de méthanol (4 ml). L'évaporation de l'éluant (MeOH) est réalisée sous azote pendant 30 min et le résidu ainsi obtenu est re-dissous dans 400 μ l d'acétonitrile. Chaque préparation est alors transférée dans un flacon spécifique au CLHP et est prête à être injectée.

- Tests effectués et Résultats : Nous effectuons un duplicata avec le standard interne estradiol glucuronide et le DHEA glucuronide, notre analyte, pour vérifier la récupération totale de nos composés après passage sur la cartouche. On obtient 100% de recouvrement, (spectre 11 et AUC3, spectre 12 et AUC4).

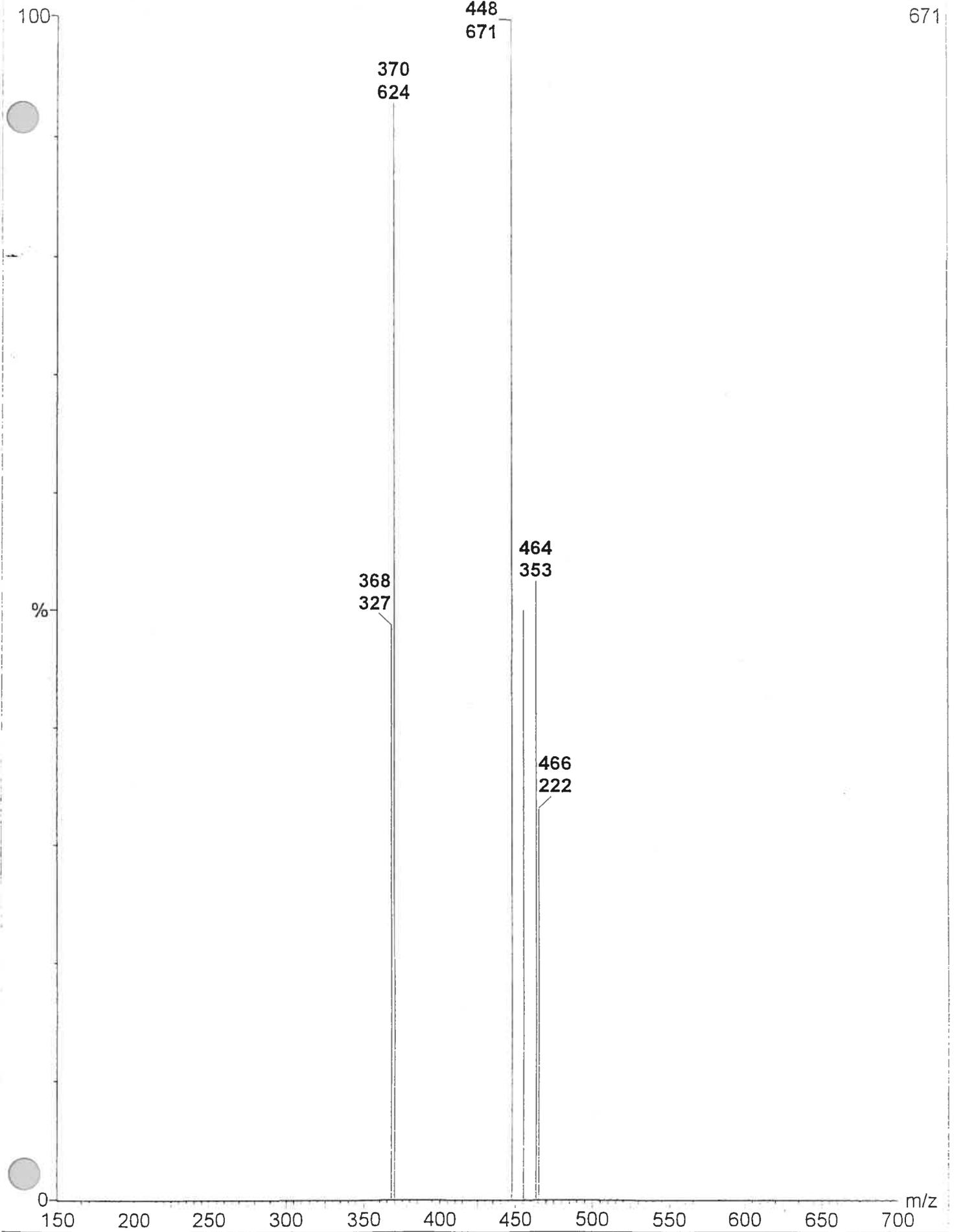
- Conclusions : Mise au point d'une nouvelle procédure d'extraction rapide.



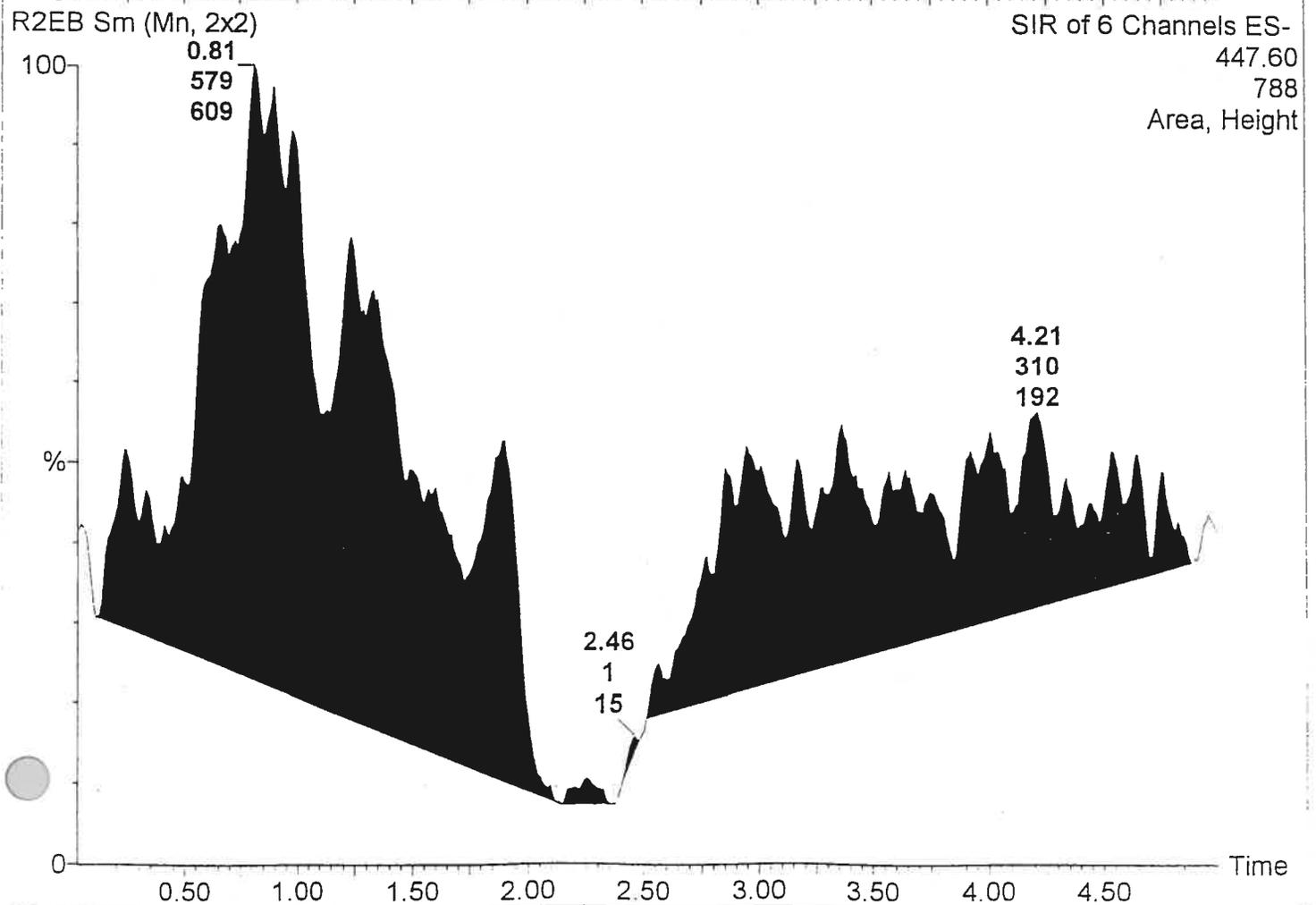
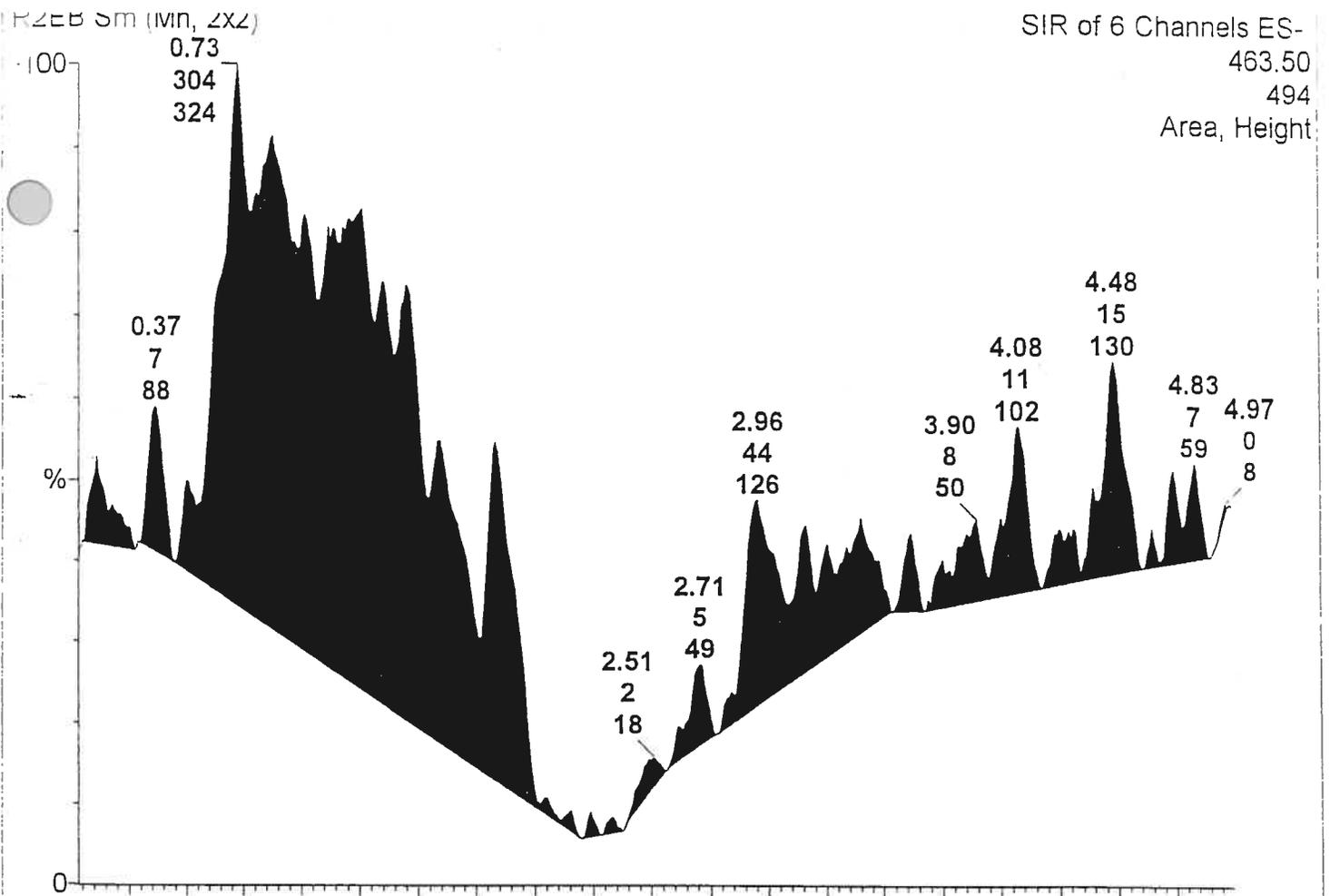
Spectre 11 : Recouvrement après passage sur cartouche C18 de la molécule de DHEA glucuronidée (m/z=464) et de l'oestradiol glucuronidé (m/z=448), son standard interne.



AUC 3 : Surface sur la courbe correspondant aux poids moléculaires suivants $m/z=464$ (DHEA G) et $m/z=448$ (oestradiol G).



Spectre 12 : Confirmation d'un rendement proche de 100% pour m/z=464 et m/z=448.



AUC 4 : Surface sous la courbe correspondant au spectre 14 pour $m/z=464$ et $m/z=448$.

4. CONSTRUCTION DES COURBES D'ÉTALONNAGE SANS MATRICE URINAIRE

- Les courbes standard de calibrage sont préparées pour chaque stéroïde de façon individuelle pour éviter toutes les interférences pouvant fausser les résultats.
- Chaque standard reçoit le standard interne sélectionné et après passage sur cartouche C18 [2], est injecté directement dans le HPLC.
- On détermine notre mode d'analyse préférentiel : *Full Scan* (qualitative) versus SIR (quantitative).
- On détermine la plage de concentrations dans laquelle nous allons devoir travailler pour se rapprocher au mieux de la réalité. Dans la littérature, on trouve les valeurs suivantes qui nous serviront de référence : testostérone sulfatée : 0.4 µg/24h; soit 1.08 nmol (la plus petite valeur trouvée dans la littérature) et androstérone sulfatée : 191 µg/24h ; soit 516 n mol (la plus grande valeur trouvée dans la littérature). On déduit une plage de concentration comprise entre 0-600 nmol pour les travaux envisagés.
- La SERIE 1 correspond aux courbes dans le méthanol, sans passage sur cartouche C18, pour chacun des analytes et le standard interne correspondant.
- La SERIE 2 correspond aux courbes dans l'eau, après passage sur cartouche C18, pour chacun des analytes et le standard interne correspondant.
- La SERIE 2 BIS correspond aux courbes dans l'eau, avec passage sur cartouche C18, de la DHEA et de l'androstérone conjuguée et des standards internes correspondants.

➤ Méthodologie :

- Utilisation du mode SIR
- Dosage utilisant les surfaces sous les pics (drogue/standard interne).

➤ Résultats :

- SERIE 1 et SERIE 2 : obtention de courbes linéaires, (spectre 13 et 14).
- SERIE 2 BIS : interférences observées, courbes non linéaires, (spectre 15 et 16).
- La limite de détection trouvée est de 0.2 pmol.
- Nous pouvons travailler dans une plage de concentrations comprise entre 0.2 pmol-20 nmol.
- La déviation des points est inférieure à 15%.

➤ Conclusions :

- Nous avons défini une courbe standard pour chacun des analytes étudiés (même de poids moléculaires différents).
- La méthode SIR nous permet de choisir les ions caractéristiques d'une molécule, enregistre leur passage en fonction du temps, ce qui augmente la sensibilité de détection.

08 Jan-2003, 15:22:09

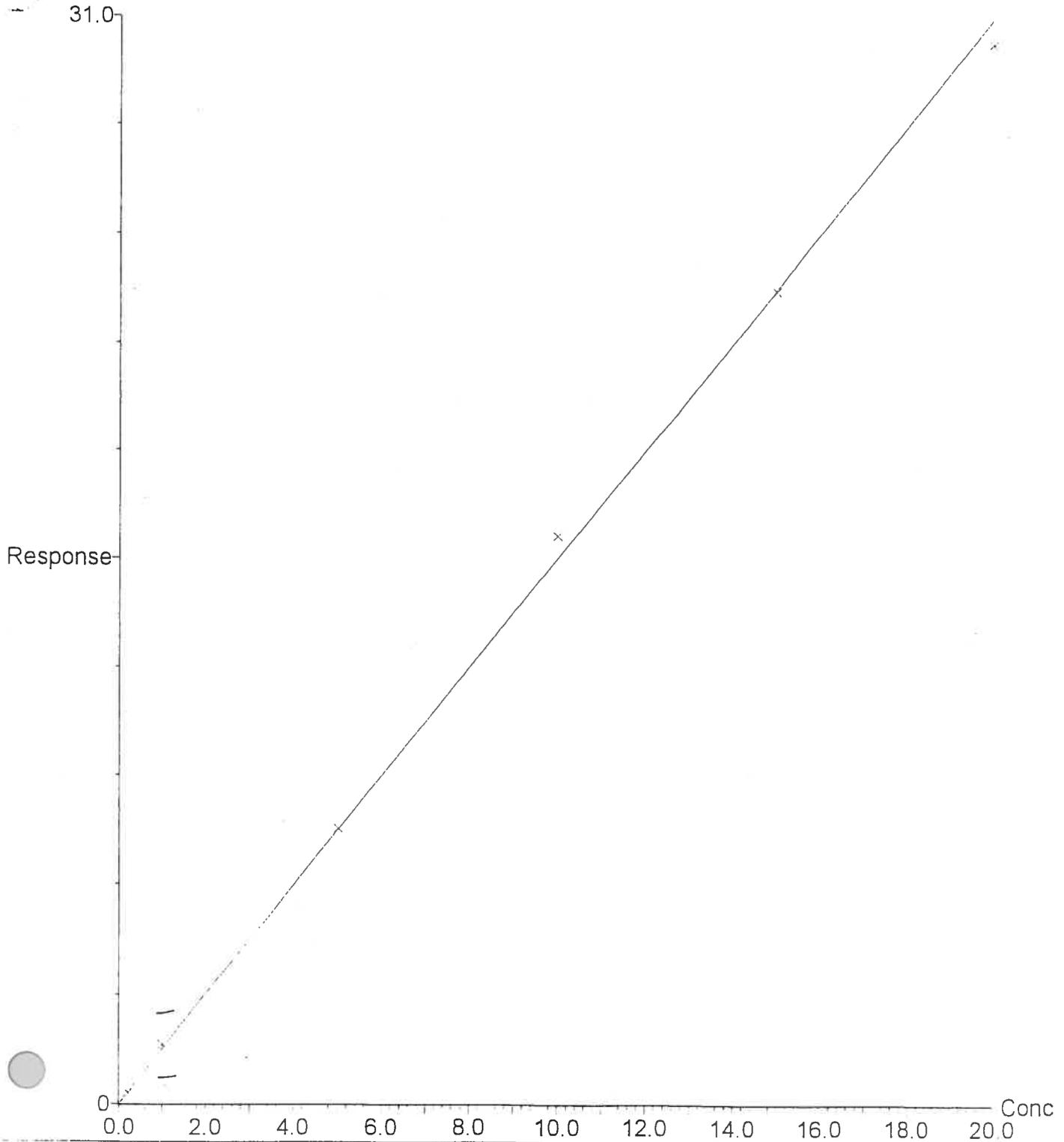
Compound 2 name: dheas/testos

Coefficient of Determination: 0.998982

Calibration curve: $1.548261 * x + 0.028885$

Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Spectre 13 : Série 1 représentée par la molécule de DHEA sulfatée.

15 Jan-2003, 15:43:34

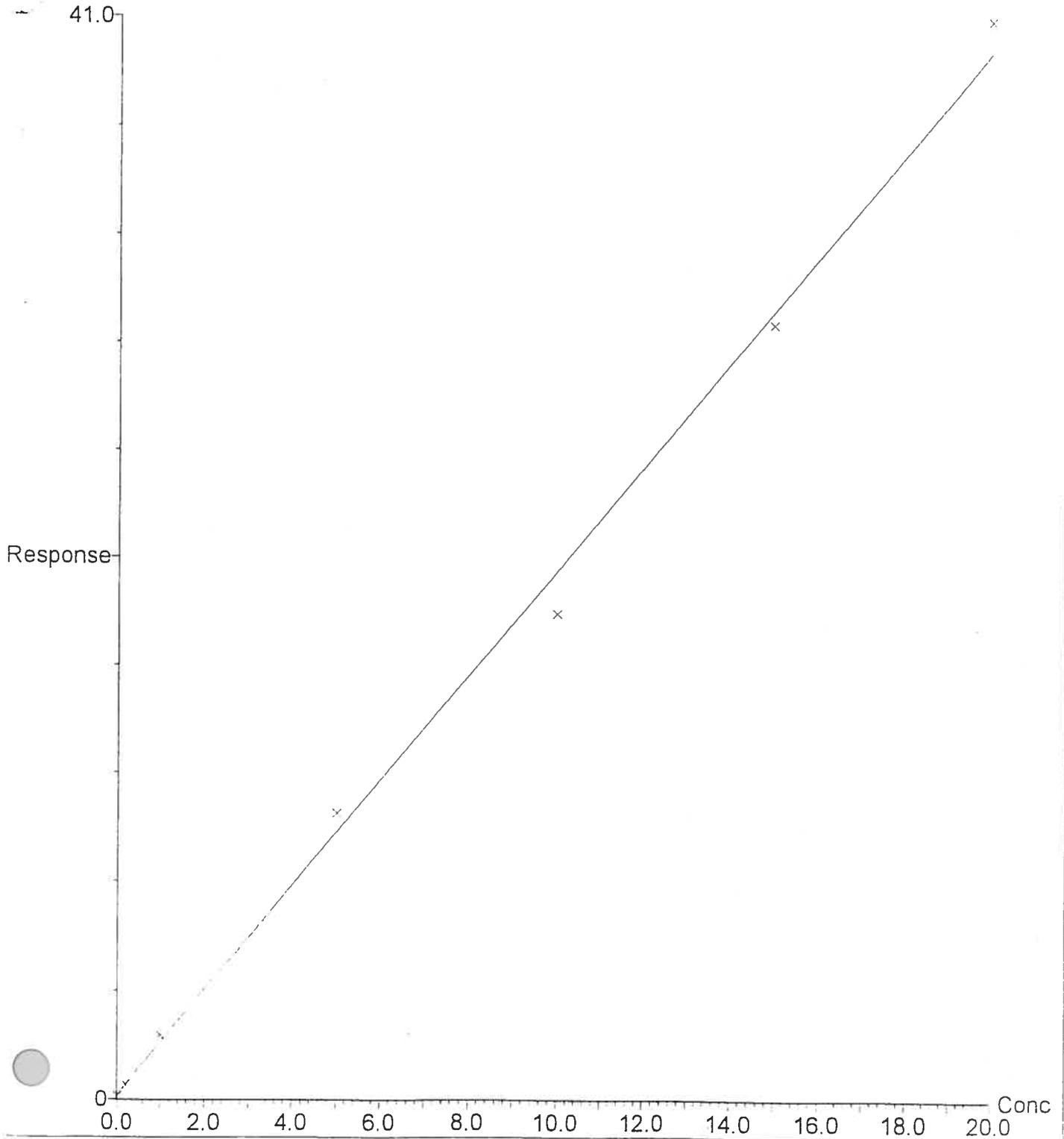
Compound 2 name: dheas/testos

Coefficient of Determination: 0.996839

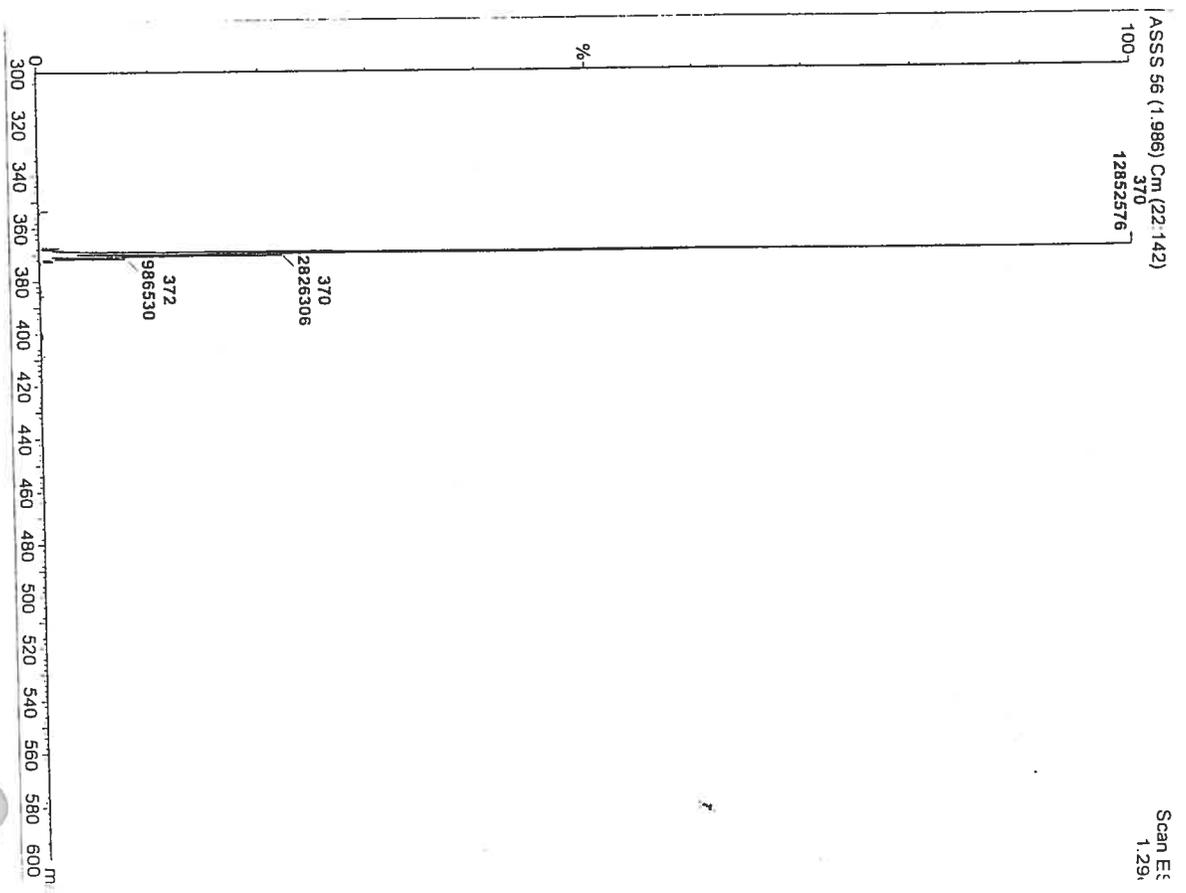
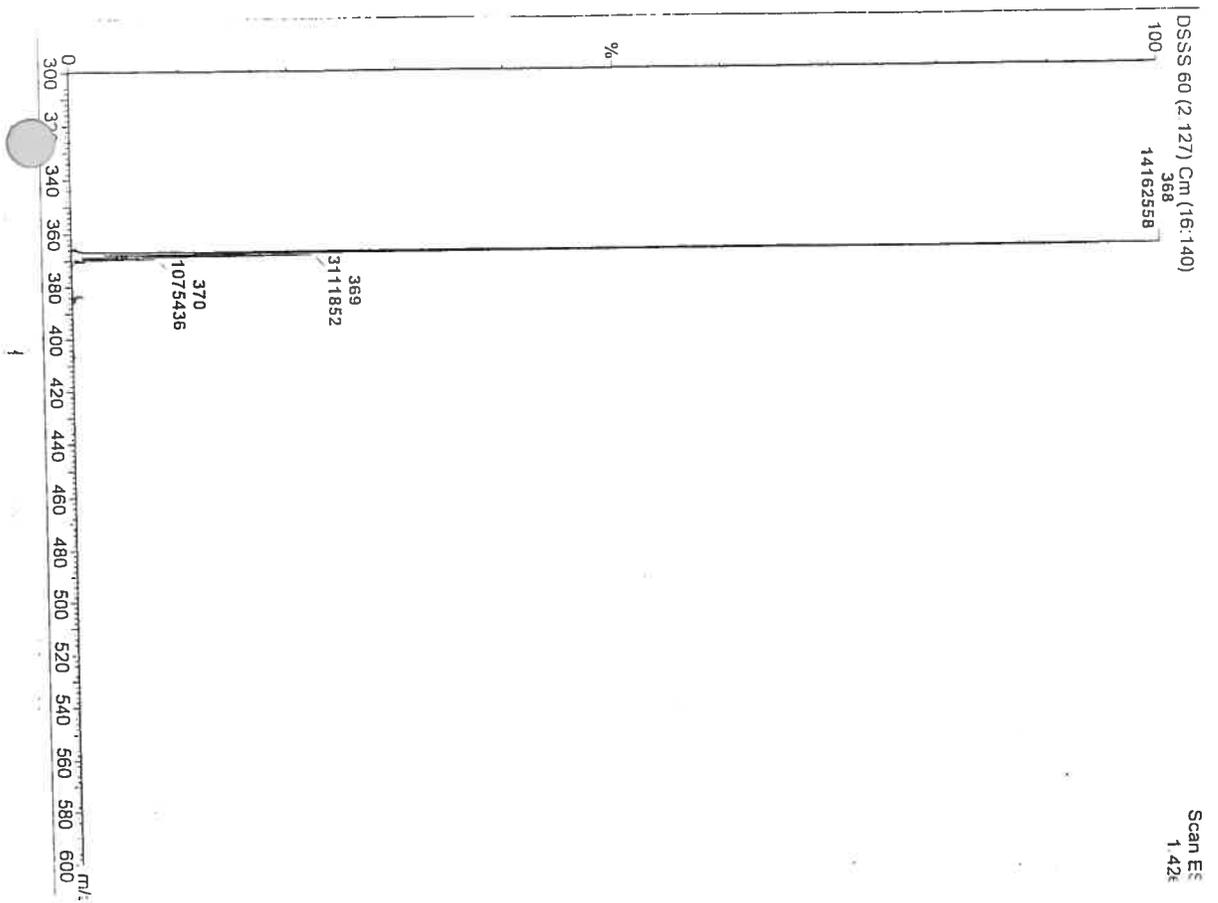
Calibration curve: $1.983097 * x + 0.179439$

Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Spectre 14 : Série 2 représentée par la molécule de DHEA sulfatée.



Spectre 15 et spectre 16 : Présence d'interférences entre les poids moléculaires suivants, m/z=368, m/z=369 et m/z=370 illustrées par le DHEA S et l'androstérone S.

5. CONSTRUCTION DES COURBES DE CALIBRAGE

- La SERIE 3 correspond aux courbes dans l'urine, après passage sur cartouche C18, pour chacun des analytes et le standard interne correspondant, (spectre 17).

- Méthodologie :
 - Ajout d'étalons à l'urine contrôle aux concentrations suivantes :
0.2 pmol/ml, 1 nmol/ml, 5 nmol/ml, 10 nmol/ml, 15 nmol/ml et 20 nmol/ml,
(DHEAS illustré, série 3).
 - Nous devons évaluer notre besoin de diluer l'urine (1/5, 1/10, 1/20) pour éviter l'effet de matrice lorsque cette dernière se révèle être concentrée.

- Résultats :
 - Nous comparons les équations obtenues dans l'eau, le méthanol et l'urine et nous observons des équations différentes.
 - Les courbes sont linéaires entre 0.2 pmol et 20 nmol.
 - La déviation des points est inférieure à 15%.

- Conclusions :
 - Un effet de matrice est toujours présent et nous donne, par conséquent, des équations différentes dans l'eau et dans l'urine.

Nous devons donc travailler dans l'urine si l'on veut reproduire la réalité au mieux. De plus, la dilution de l'urine au moins 10 fois va s'imposer pour être capable de détecter correctement nos composés d'intérêt.

15-Jan-2003, 14:32:08

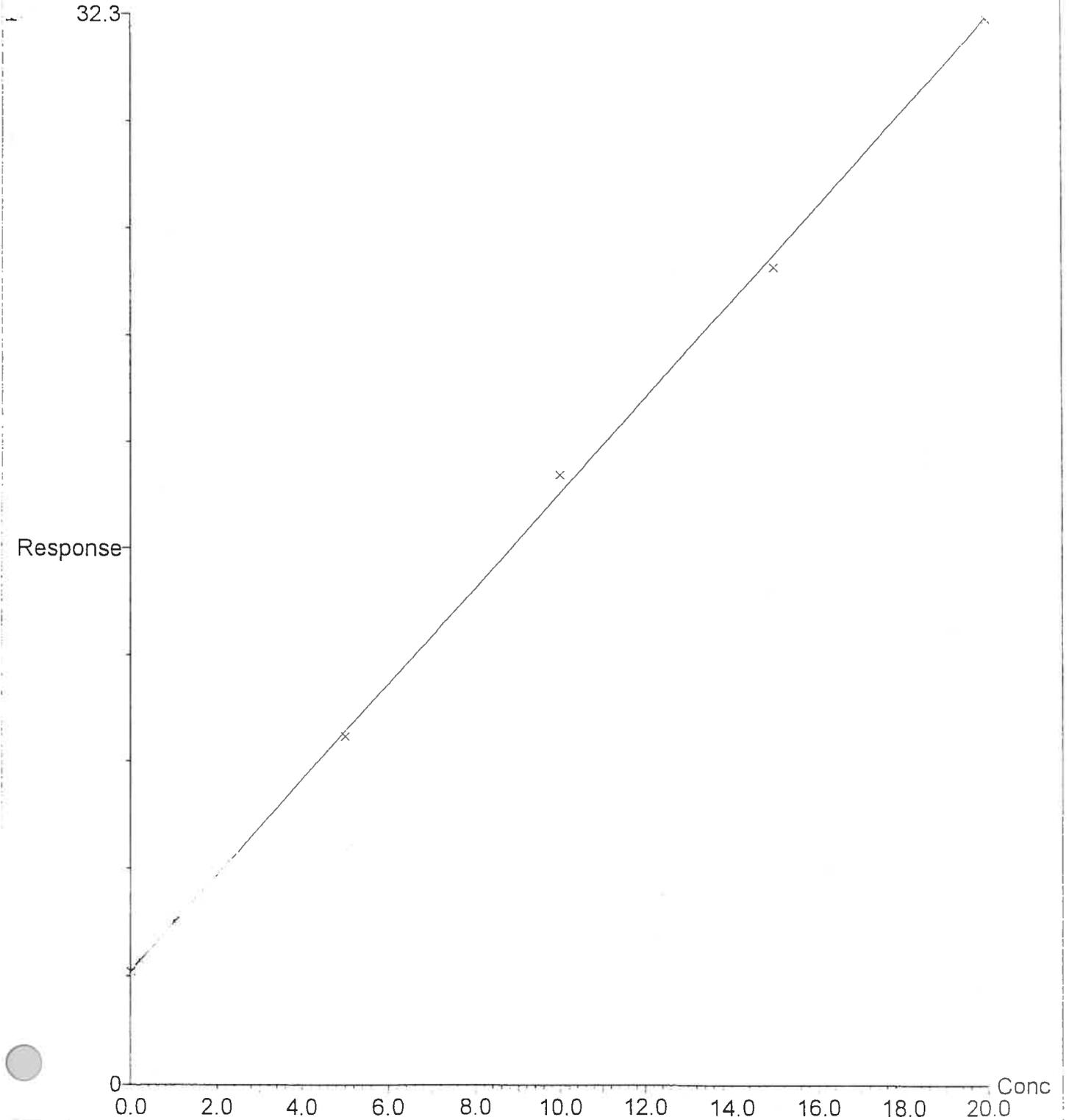
Compound 2 name: dheas/testos

Coefficient of Determination: 0.999383

Calibration curve: $1.444672 * x + 3.387677$

Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Spectre 17 : Série 3 représentée par la molécule de DHEA sulfatée.

6. APPLICATION CLINIQUE

A. Méthodologie :

- Analyse réalisée en mode SIR.
- Intégration des surfaces des poids moléculaires sélectionnés.
- Résultats : Nous observons des différences de sensibilité selon les composés.

B. Préparation de batch analytique:

- Courbes standard.
- Contrôles de qualité (QC) en duplicata.
- Échantillons de patients de 24h afin d'éviter le rythme circadien.
- Résultats:
 - La méthode est très sensible pour les composés étudiés entre 0.2 pmol-20 nmol à l'exception de l'androstérone sulfatée (trop concentrée, mais la limite de détection est intéressante).
 - Toutes les courbes obtenues sont linéaires avec des coefficients directeurs proches de $R=0.999$, (spectre 18).
 - La déviation pour tous les points de courbes standard, des courbes de calibrage et des contrôles qualités (QC), est inférieure à 15%.
 - Reproductibilité des résultats avec l'appareil, HPLC/MS/MS, (figure 19).

28-Jan-2003, 16:56:58

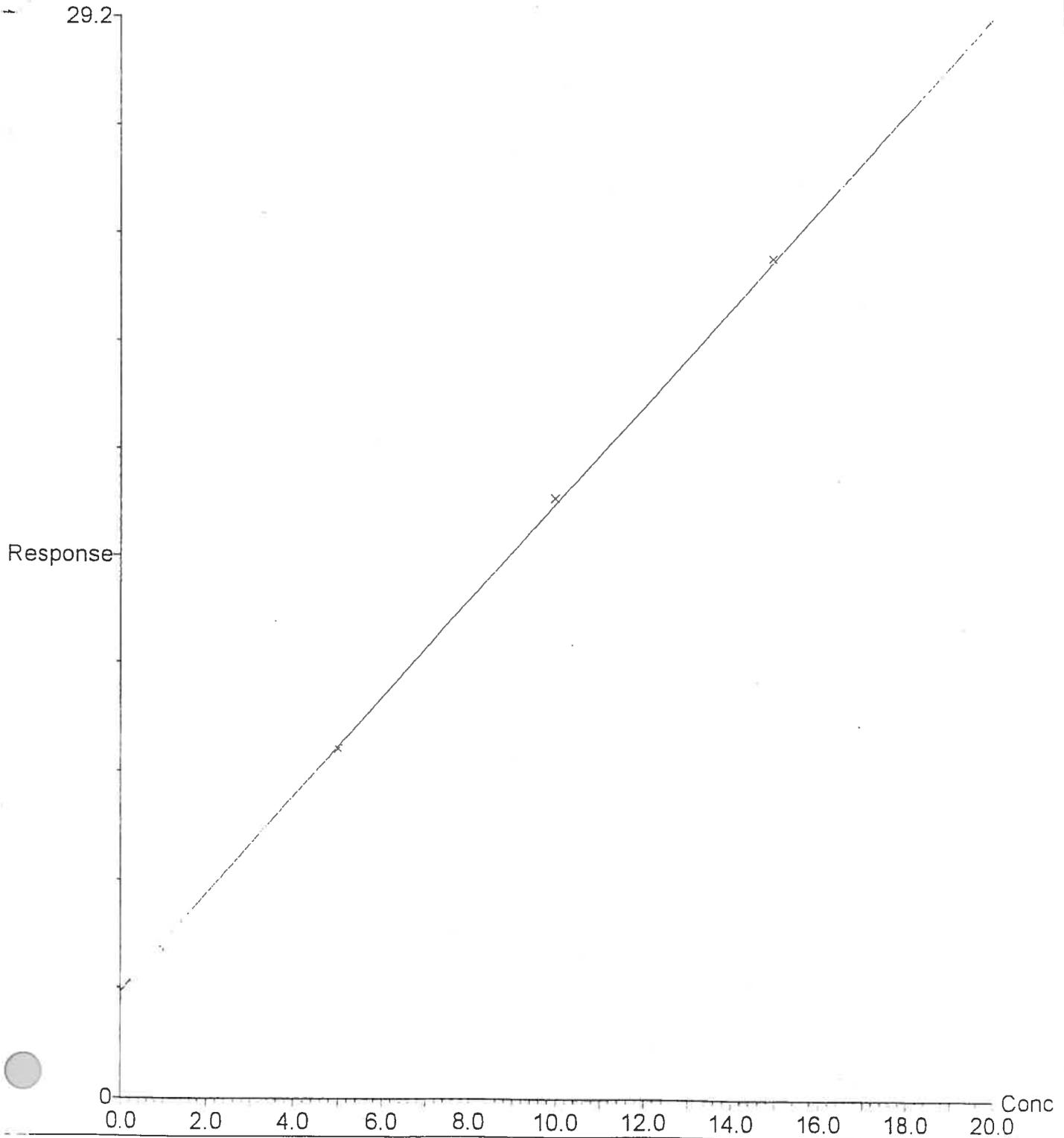
Compound 2 name: ds

Coefficient of Determination: 0.999869

Calibration curve: $1.319665 * x + 2.830777$

Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Spectre 18 : Courbe de dosage du DHEA S dans l'urine de patients.

	LCA-S (MeOH)	LCA-S (Ur)	DHEA-S/LCA-S (MeOH)	DHEA-S/LCA-S (Ur)
	surface	surface	surface (ratio)	surface (ratio)
	215454	197650	1,845115221	2,012849476
	276508	198119	1,864459175	1,935588054
	235351	190452	1,99392436	1,956685401
	258690	228908	1,953193437	1,910904342
	266541	220761	1,953751349	2,000538496
	238859	201435	2,020266951	2,0212088
	228738	212912	1,905971999	1,822106912
	229213	180087	1,803177219	1,906949338
	275888	270273	1,893205198	1,91811707
	250583	218688	2,036209582	1,9018284
moyenne	247582,5	211928,5	1,926927449	1,938677629
ecart-type	21292,1	25379,0549	0,077487507	0,06111994
cv	8,60000202	11,9752652	4,021298624	3,152661334

Figure 19 : Reproductibilité de l'injection en H.P.L.C.

Chapitre 4 : Discussion et Conclusions

1. PROBLÉMATIQUE

Les hormones sexuelles se détectent difficilement dans le milieu urinaire à cause de leur faible présence du point de vue quantitatif, dans leur état libre. Actuellement, la mesure des concentrations se pratique plus aisément au niveau du plasma, là où les stéroïdes sont présents en plus grande quantité, mais permet seulement de connaître les concentrations hormonales actives qui ont parfois, notons-le, un temps de vie trop court pour pouvoir être analysées. Or, l'élimination rénale reste la principale voie de détoxication de l'organisme humain, et par conséquent, celle qui contient majoritairement les métabolites conjugués. Cette dernière pourra donc amener des informations importantes concernant le métabolisme subis par les stéroïdes surrénaliens étudiés [67] et ainsi nous renseigner sur le parcours suivi de ces derniers. En effet, lors d'un traitement hormonal, l'absorption, le temps de demi-vie ou encore le volume de distribution devra être connu. Mais, il ne s'agit pas du seul cas où ces données s'avèreront utiles. Afin d'établir un diagnostic clinique valide, d'identifier la présence de certaines hormones lors des contrôles anti-dopage, la quantification et la qualification de ce type d'hormone ainsi que l'établissement d'un profil urinaire caractéristique correspondant à celui de la DHEA et majoritairement de ses conjugués [68], sera également fortement recommandée.

Mais comment parvenir à obtenir toutes les caractéristiques précédemment énoncées de chaque substance soumise à notre étude de manière concise, rapide, efficace et non coûteuse? Quels protocoles ou démarches vont devoir être mis à jour?

Quelles nouvelles techniques ou procédures vont être envisageables? Tant de questions auxquelles on va devoir répondre afin de développer une méthode applicable en milieu hospitalier. Actuellement, quelques techniques sont disponibles mais laissent encore présager de nombreux inconvénients quant à leur utilisation.

On essaiera alors d'adapter à un matériel de haute performance mis à notre disposition, une procédure d'analyse simple.

2. EXPÉRIMENTATION PILOTE

Le but était donc d'établir une empreinte caractéristique de chaque stéroïde appartenant au mélange de la solution d'intérêt, afin d'être capable de créer un profil spécifique permettant d'identifier ces derniers, dans n'importe quel milieu biologique, et de les classer définitivement dans une banque de données ou une librairie accessible à tous.

Pour ce faire, la technique d'ionisation douce par *electrospray* et la spectrométrie de masse en tandem (ESI/MS/MS) ont été associées.

En effet, par ce moyen, nous allons être capables d'obtenir les informations recherchées par une simple lecture des spectres, c'est-à-dire en relevant simplement les poids moléculaires correspondants aux principaux fragments obtenus de chaque molécule, permettant ainsi de les identifier et de les nommer une à une.

C'est en optimisant les conditions de manipulation, ainsi que celles de l'appareillage et du système d'analyse que l'on obtiendra des résultats valides, et par conséquent, reproductibles.

Trouver les paramètres adéquats à ce genre de composés selon les conditions imposées, constituera donc la première étape capitale à effectuer par le biais du ESI/MS/MS.

3. PROPRIÉTÉ DE LA DHEA ET DÉRIVATION

Les spectres et les chromatogrammes des 12 stéroïdes sélectionnés furent ainsi obtenus. Cependant, concernant la détection de la DHEA libre, molécule neutre, une difficulté majeure s'interposa. En effet, cette dernière présente en très faible quantité dans les urines comme ses analogues, s'est avérée non ionisable par la technique d'*electrospray*, sans doute trop douce, et ne générerait donc aucun signal d'intensité. Le spectre ne présente pas le pic dont le poids moléculaire a pour valeur $PM=289.4$.

Pour pallier ce problème, le voltage du cône fut progressivement augmenté afin de favoriser l'ionisation.

On obtint alors un spectre présentant, non plus l'absence de pics, mais une multitude de fragments non caractéristiques indiquant sans doute une fragilité notable et non négligeable de la molécule de DHEA non conjuguée.

On décida donc de modifier chimiquement cette dernière en basant la réaction sur un processus chimique simple. Une nouvelle méthode de dérivation mise au point et réalisée par notre laboratoire, consista en l'ajout d'un ion ammonium sur la molécule, permettant alors de fixer une charge suffisamment stable sur un carbone pour la rendre détectable en mode positif dans le cas présenté.

C'est ainsi que la présence de DHEA libre fut confirmée dans les urines prélevées et se révéla être intéressant pour connaître et évaluer des rapports utiles dans le domaine de la biochimie clinique comme celui du DHEA/DHEAS. En effet, ceci permet de comparer à présent, les taux plasmatiques et les taux urinaires, et donc apprécier le phénomène de conversion entre DHEA \leftrightarrow DHEAS par un enzyme spécifique qui est présent chez tous les individus de sexe masculin ou féminin.

4. DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION

Après avoir rendu toutes les substances détectables par *electrospray*, la méthode d'extraction classique aux sels biliaires fut modifiée, puis développée selon les propriétés communes des hormones sexuelles étudiées. C'est ainsi qu'une extraction de composés non polaires sur adsorbant de type phase inversée à partir de cartouches C18 fut conçue.

Le principal objectif étant un rendement proche de 100%, tout notre intérêt reposa sur le meilleur moyen de rendre la solution pure sans perdre de l'échantillon. Nous avons donc mis en place une technique de pré-purification sous hotte avant l'entrée définitive de la solution dans l'injecteur automatique relié pour sa part à l'*electrospray* et le système de spectroscopie de masse. De cette manière, le rendement obtenu fut quasiment parfait.

La méthode se révéla donc être performante, simple à réaliser et rapide grâce à des systèmes sous-vide pouvant contenir jusqu'à 24 échantillons pouvant être préparés simultanément.

5. LES ANALYSES RÉALISÉES

Les données mémorisées temporairement grâce à l'installation d'un logiciel placé immédiatement après le spectromètre de masse 2 (MS2), c'est-à-dire à la sortie du système complet, furent enregistrées, puis analysées. Les résultats obtenus furent de diverses sortes selon les molécules considérées, pourtant très proches dans leur structure chimique et leurs propriétés physico-chimiques, ayant même parfois jusqu'à un poids moléculaire identique dans le cas des isotopes. En effet, comme nous avons pu le constater, certains produits pour ne citer que la testostérone ou son isotope l'épitéstostérone, ont subi la même fragmentation lors de leur passage au travers de MS2. Ainsi, différencier les deux molécules se révéla être impossible. Un autre cas se présenta également, celui de la DHEA ou encore de l'androstérone, se fragmentant la majorité du temps au hasard à cause principalement de la fragilité de leurs liaisons, qu'elles soient covalentes ou non.

De plus, on remarqua également que les spectres acquis étaient différents à chaque injection et n'avaient donc pas de représentation significative. Les chromatogrammes, quant à eux, ne présentaient qu'une faible intensité pour les poids moléculaires respectifs attendus, trop insignifiante pour se distinguer du bruit de fond.

La spectrométrie de masse en tandem, sans l'utilisation de colonne de séparation au préalable, est donc insuffisante pour déterminer un profil caractéristique de chaque stéroïde. Cependant, la méthode est extrêmement sensible à la détection de ce type de composés et l'ajout d'une colonne permettait d'obtenir les différents temps de rétention de chaque substance lors de leur passage un à un dans l'appareillage et ainsi d'atteindre l'objectif d'identification formelle des molécules présentes dans le mélange étudié.

6. IMPORTANCE DU DIAGNOSTIQUE CLINIQUE

L'intérêt du développement d'une telle méthode réside dans la multiplicité de ses usages. L'application clinique restant notre priorité, elle pourrait servir à établir de nouveaux profils urinaires, et ainsi à déceler d'éventuelles anomalies à partir de profils d'individus sains. Nous pourrions aussi surveiller étroitement l'emploi de plus en plus fréquent des hormones dans les nouveaux traitements médicaux attribués, notamment en ce qui concerne la déhydroépiandrostérone, actuellement sujet de controverse au sein du milieu scientifique. En effet, l'utilisation de ce stéroïde reste à double tranchant, avec, d'une part ses propriétés thérapeutiques, et de l'autre, les effets secondaires qu'il peut engendrer.

7. PROJETS FUTURS

Il s'agira, comme nous l'avons vu précédemment, d'installer une colonne de séparation appropriée sur l'appareillage disponible afin de rendre définitive l'identification des substances présentes dans le milieu biologique étudié et de confirmer ainsi tous les résultats obtenus lors de nos expériences.

Pour ce faire, nous devons commencer par effectuer un choix judicieux lors de l'achat de la colonne, puis veiller à nouveau à optimiser les conditions de travail en tenant compte du nouvel outil installé.

En ce qui concerne le choix de la colonne de chromatographie, une brève revue de la littérature a été effectuée. Tous les critères de sélection reposent majoritairement, une fois de plus, sur la nature des composés et des analyses à opérer. Nous pourrions choisir une base en silice pour les analytes contenant des groupes hydrophobes avec des cycles aromatiques et des chaînes alkyls (C18-octadecyl *silica-based*) ou encore une base en polymère (PPL *polymer-based*, ENV *polymer-based*, LMS *polymer-based*). Il est à souligner que la différence majeure entre les deux repose sur le fait que les polymères ont une meilleure tolérance au pH élevé.

De disponible également dans le commerce, ce que l'on appelle des spécialités de phases avec un copolymère universel essentiellement employé pour les analytes présents sous forme neutre (*Nexus Universal Copolymer*) ou encore les spécialités de phases avec des applications spécifiques (*EnvirElut 1664 Application specific*) et avec lesquelles on doit déterminer la phase mobile adéquate pour ne pas altérer la colonne.

8. CONCLUSIONS

L'*electrospray* couplé à la spectrométrie de masse se révèle être une méthode sensible pour la détection et la quantification des poids moléculaires sélectionnés, se situant dans une fourchette comprise entre 150 et 700 kda.. La récente disponibilité de cette association capable, de plus, d'incorporer différentes techniques d'ionisation douce, en font une méthode également très précise [36].

En installant au niveau de l'injecteur automatique une colonne de séparation appropriée, l'identification de chaque molécule isotopique présente, devient également faisable.

Il est possible alors, non seulement de quantifier, mais aussi d'identifier les stéroïdes de façon quasi simultanée.

La méthode développée est sans doute applicable à l'identification de la DHEA et ses métabolites, et par conséquent à l'étude de la fonction surrénalienne, puisque notre limite de détection peut s'abaisser à une valeur proche de 0.2 pmol, très inférieure aux concentrations physiologiques habituelles, ceci essentiellement en optimisant les paramètres de l'appareil pour les poids moléculaires étudiés.

Rappelons-le, dans la littérature, la plus petite valeur de détection se trouvant être de l'ordre de 1 nmol, soit une sensibilité établie 1,000 fois supérieure aux expériences antérieures.

L'analyse des échantillons par cette méthode, en plus d'être sensible, est également rapide, puisque la seule étape limitante, la dérivation, s'avère n'être plus qu'une réaction chimique simple à reproduire lorsque nécessaire. De plus, les produits chimiques employés lors des manipulations sont communs et non coûteux.

La mise au point d'une telle méthode nous permet donc d'évaluer, non seulement la fonction surrénalienne, mais aussi la capacité de détoxification du foie, et probablement d'établir de nouveaux profils urinaires. Elle nous donne donc la possibilité d'accès à un suivi plus adéquat des patients recevant une thérapie hormonale, selon les pathologies impliquées ou encore dans un tout autre domaine, de détecter l'abus de certains stéroïdes anabolisants dans les compétitions sportives [69] pour leurs propriétés bénéfiques.

Cette méthode aurait donc de nombreux usages et possibilités d'applications.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permettrait ainsi d'augmenter nos connaissances sur les fonctions de la DHEA [36].

À noter, que de nouvelles technologies capables d'insérer et d'analyser au sein du matériel des volumes d'échantillons encore plus petits sont attendues en milieu clinique, dans un futur proche, afin d'améliorer encore le diagnostic médical [21].

Bibliographie

1. Blue JG, Lombardo JA. 1999. Steroids and steroids like compounds. *Clinics in sport medicine*, **18**: 1-25.
2. Bowers LD. 1997. Analytical advances in detection of performance-enhancing compounds. *Clinical Chemistry*, **43**: 1299-1304.
3. Catlin DH, Hatton CK, Starcevic SH. 1997. Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analyses of athlete's urine. *Clinical Chemistry*, **43**: 1280-1288.
4. Wu FC. 1997. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clinical Chemistry*, **43**: 1289-1292.
5. Mottram DR and George AJ. 2000. Anabolic steroids. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, **14**: 55-69.
6. Meyer P (Auth. & Ed.). 1977. *PHYSIOLOGIE HUMAINE*; Édition numéro 2 ; Pages: 383-385; 392-394; 402-406; 412-421.
7. Baillière JB (Auth. & Ed.). 1980. *PHYSIOLOGIE*; Édition numéro 1 ; tome 1; Pages:51-56; 81-88; 89-94.
8. Brook CG, and Marshall NJ. 1998. *ENDOCRINOLOGIE*; Édition numéro 3.
9. Baulieu E. 2002. Biologie et biochimie de la DHEA. Ressource électronique; *DHEA en images*, 1-8.
10. Parker CR Jr. 1999. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids*, **64**: 640-647.

11. Christeff N, Gharakian S, Thobie N, Rosenbaum W, and Numez EA. 1992. Evidence for changes in adrenal and testicular steroid during HIV infection. *Journal of acquired immune deficiency syndrome*, **5**: 841-846.
12. Fahy GM. 1995. DHEA comes to the mainstream. *Annual New-York Academy Sciences Reporting*.
13. Skerret PJ. 1996. La DHEA: Ignorez toute la publicité. Reproduction d'un article du *New England Journal of Medicine*.
14. Fahy GM. 1995. DHEA in the spotlights. *Annual New-York Academy Science Reporting*.
15. Yen SS, Morales AJ, and Khorram O. 1995. Replacement of DHEA in ageing men and women. Potential remedial effects. *Annual New-York Academy Science Reporting*.
16. Strous RD, Maayan R, Lapidus R, Stryjer R, Lustig M, Kotler M, and Weizman A. 2003. Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, **60**: 133-141.
17. Cabut S, and Souccar T. 2000. Les véritables effets de la DHEA. *Sciences et avenir*, **369**: 36-37.
18. DHEA, la molécule de l'espoir. 1999. *Sciences et avenir*.
19. Saugy M, Cardis C, Robinson N, and Schweizer C. 2000. Test methods: anabolic. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, **14**: 111-133.

20. Ruth A. 2001. Clinical measurement of steroid metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and metabolism*, **15**: 1-16.
21. Nozaki O. 2001. Steroid analysis for medical diagnosis. *Journal of chromatography A*, **935**: 267-278.
22. Granger DA, Schwartz EB, Booth A, Curran M, and Zakaria D. 1999. Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults. *Psychoneuroendocrinology*, **24**: 567-579.
23. Hill M, Lapcik O, Havlikova H, Morfin R, and Hampl R. 2001. 7-Hydroxydehydroepiandrosterone epimers in human serum and saliva. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and radioimmunoassay. *Journal of Chromatography A*, **935**: 297-307.
24. Chasalow FI, Blethen SL, Duckett D, Zeitlin S, and Greenfield J. 1989. Serum levels of dehydroepiandrosterone sulfate as determined by commercial kits and reagents. *Steroids*, **54**: 373-383.
25. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, and Vogellman JH. 1984. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **59**: 551-555.
26. Schackleton CHL, Kletke C, Wudy S, and Pratt JH. 1990. Dehydroepiandrosterone sulfate quantification in serum using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and a deuterated internal standard: a technique suitable for routine use or as a reference method. *Steroids*, **55**: 472-478.

27. Shimada K, Tanaka M, and Nambara T. 1984. Studies on steroids. CC. Determination of 17-ketosteroid sulphates in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*, **307**: 23-28.
28. Holtzclaw WD, and Gordon GB. 1989. Measurement of serum levels of dehydroepiandrosterone sulfate: a comparison of radioimmunoassay and enzymatic analysis. *Steroids*, **54**: 355-371.
29. Murakami K, Nakagawa T, Yamashiro G, Araki K, and Akasofu K. 1993. Levels of androgens and danazol metabolites in serum during danazol therapy. *Fertility and Sterility*, **60**: 179-181.
30. Lahoud H, in: Sampson DC (Ed.), High Perform. Liq. Chromatogr. Clin. Lab., Austr. Assoc. Clin. Biochem., Sydney, 1986, p.102.
31. Boschi S, De Iasio R, Mesini P, Bolelli GF, Sciajno R, Pasquali R, and Capelli M. 1994. Measurement of steroid hormones in plasma by isocratic high performance liquid chromatography coupled to radioimmunoassay. *Clinical Chimical Acta*, **231**: 107-113.
32. Ueshiba H, Segawa M, Hayashi T, Miyachi Y, and Irie M. 1991. Serum profiles of steroid hormones in patients with Cushing's syndrome determined by a new HPLC/RIA method. *Clinical Chemistry*, **37**: 1329-1333.
33. Desgres J, Begue RJ, and Padieu P. 1974. Analyse qualitative et quantitative des 17-oxosteroides et des 20-hydroxy-21-desoxysteroides urinaires par chromatographie gaz liquide et par spectrométrie de masse. *Clinical Chimical Acta*, **52**: 381-405.

34. Kuuranne T, Vahermo M, Leinonen A, and Kostianen R. 2000. Electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometric behaviour of eight anabolic steroid glucuronides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **11**: 722-730.
35. Nakajima M, Yamato S, and Shimada K. 1998. Determination of dehydroepiandrosterone sulfate in biological samples by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry using [7,7,16-³H₄]-dehydroepiandrosterone sulphate as an internal standard. *Biomedical chromatography*, **12**: 211-216.
36. Marwah A, Marwah P, and Lardy H. 2001. High-performance liquid chromatographic analysis of dehydroepiandrosterone. *Journal of chromatography A*, **935**: 279-296.
37. Bowers LD, and Sanaullah. 1996. Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, **687**: 61-68.
38. Barron D, Barbosa J, Pascual JA, and Segura J. 1996. Direct determination of anabolic steroids in human urine by on-line solid-phase extraction/liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, **31**: 309-319.
39. Sjovall J, and Vihko R. 1968. Analysis of solvolyzable steroids in human plasma by combined gas chromatography - mass spectrometry. *Acta Endocrinology*, **57**: 247-260.
40. Sjovall J, and Vihko R. 1966. Identification of 3-beta, 17-beta-dihydroxyandrost-5-ene, 3-beta, 20-alpha-dihydroxypregn-5-ene and epiandrosterone in human peripheral blood. *Steroids*, **7**: 447-458.

41. Choi MH, Kim KR, and Chung BC. 1999. Simultaneous determination of urinary androgen glucuronides by high temperature gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *Steroids*, **65**: 54-59.
42. Sweeley CC, Elliott WH, Fries I, and Hage RY. 1966. Mass spectrometric determination of unresolved components in gas chromatographic effluents. *Analytical Chemistry*, **38**: 1549-1553.
43. Weidolf LO, and Henion JD. 1987. Liquid-solid extraction conditions predicted by liquid chromatography for selective isolation of sulfoconjugated steroids from equine urine. *Analytical Chemistry*, **59**: 1980-1984.
44. Graef V, Furuya E, and Nishikase O. 1977. Hydrolysis of steroid glucuronides with beta-glucuronidase preparations from bovine liver, *Helix pomatia*, and *E. coli*. *Clinical Chemistry*, **23**: 532-535.
45. Combie J, Blake JW, Nugent TE, and Tobin T. 1982. Morphine glucuronide hydrolysis: superiority of beta-glucuronidase from *Patella vulgata*. *Clinical Chemistry*, **28**: 83-86.
46. Messeri G, Cugnetto G, Moneti G, and Serio M. 1984. *Helix pomatia* induced conversion of some 3 beta-hydroxysteroids. *Journal of Steroid Biochemistry*, **20**: 793-796.
47. Shackelton CH, in: Gorog S, and Heftmann E (Ed.). *Advances in Steroid Analysis '90: Symposium on the analysis of steroids*, Pecs, Hungary, April 24-26, 1990, Akademiai, Budapest, 1991 p. 177.
48. Ma YC, and Kim HY. 1995. Development of the on-line high-performance liquid chromatography/thermospray mass spectrometry method for the analysis of phospholipid molecular species in rat brain. *Analytical biochemistry*, **226**: 293-301.

49. Bowers LD, and Sanaullah. 1996. Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **687**: 61-68.
50. Taylor GW, Donnelly LE, Murray S, and Rendell B. 1996. Excursions in biomedical mass spectrometry. *British Journal of Clinical pharmacology*, **42**: 119-126.
51. Hisatomi T, Nakasano T, Takehico H, Hayashiba Y, and Fukushima S. 1998. *Nippon Iyo Masu Supekutoru Gakkai Koenshu*, **23**: 145.
52. Skimada K, and Mukai Y. 1998. Studies on neurosteroids. VII. Determination of pregnenolone and its 3-stearate in rat brains using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences Applications*, **714**: 153-160.
53. Nakajima M, Yamato S, and Shimada K. 1998. Determination of dehydroepiandrosterone sulphate in biological samples by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry using [7,7,16,16-2H₄]-dehydroepiandrosterone sulphate as an internal standard. *Biomedical Chromatography*, **12**: 211-216.
54. Liu S, Sjövall J, and Griffiths WJ. 2000. Analysis of oxosteroids by nano-electrospray of their oximes. *Rapid communications in mass spectrometry*, **14**: 390-400.
55. Chatman K, Hollenbeck T, Hagey L, Vallee M, Purdy R, Weiss F, and Suizdak G. 1999. Nanoelectrospray mass spectrometry and precursor ion monitoring for quantitative steroid analysis and attomole sensitivity. *Analytical Chemistry*, **71**: 2358-2363.

56. Borst DJ, and Bowers LD. 2000. Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, **35**: 50-61.
57. Joos PE, and Van Ryckeghem M. 1999. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of some anabolic steroids. *Analytical Chemistry*, **71**: 4701-4710.
58. Bean KA, and Henion JD. 1997. Direct determination of anabolic steroid conjugates in human urine by combined high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, **690**: 65-75.
59. Jia Q, Hong M, Pan Z, and Orndorff S. 2001. Quantification of urine 17-ketosteroid sulfates and glucuronides by high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectroscopy. *Journal of Chromatography B*, **750**: 81-91.
60. Fitzpatrick JL, Ripp SL, Smith NB, Pierce WM Jr., and Prough RA. 2001. Metabolism of DHEA by cytochromes P450 in rat and human liver microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **389**: 278-287.
61. Appelblad P, Pontén E, Jaegfeldt H, Bäckström T, and Irgum K. 1997. Derivatization of steroids with dansylhydrazine using trifluoromethanesulfonic acid as catalyst. *Analytical Chemistry*, **69**: 4905-4911.
62. Kuhn CM. 2002. The endocrine Society 2002 Awards: Anabolic Steroids. *Endocrine reviews*, **23**: 580-581

63. Le Bizec B, Bryand F, Gaudin I, Monteau F, Poulain F, and Andre F. 2001. Endogenous nandrolone metabolites in human urine: preliminary results to discriminate between endogenous and exogenous origin. *Steroids*, **67**: 105-110.
64. Siudzak G, Hollenbeck T, and Bothner B. 1999. Preparative mass spectrometry with electrospray ionisation. *Journal of Mass Spectrometry*, **34**: 1087-1088.
65. Perwaiz S, Tuchweber B, Mignault D, Gilat T, and Yousef I. 2001. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of lipid research*, **42**: 1-6.
66. Shackleton CH, and Whitney JO. 1980. Use of Sep-pack® cartridges for urinary steroid extraction: Evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Clinica Chimica Acta*, **107**: 231-243.
67. Schöneshöfer M, and Weber B. 1983. Estimation of urinary unconjugated androstenedione, dehydroepiandrosterone, testosterone, cortisol, aldosterone, and 18-hydroxycorticosterone as a potential tool for assessing adrenal status. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **21**: 231-236.
68. Callies F, Arlt W, Siekmann L, Hübler D, Bidlingmaier F, and Allolio B. 2000. Influence of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on urinary steroid metabolites in males and females. *Steroids*, **65**: 98-102.
69. Corrigan AB. 1999. Dehydroepiandrosterone and sport. *The Medical journal of Australia*, **171**: 206-208.

RESSOURCES ÉLECTRONIQUES

<http://www.dheage.com>

<http://www.dotpharmacy.com>

<http://www.nida.nih.gov>

<http://www.asda.org.au>

<http://www.wada-ama.org>

<http://www.sciencesetavenir.com>

<http://www.cnrs.fr>

