

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie



ANNEE 1991

THESE N° 241

METABOLISME HEPATIQUE DE LA
19-NORTESTOSTERONE CHEZ
LE BOVIN

THESE

POUR LE

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 18 Décembre 1991

par

CATHERINE GIBIAT

née le 20 Octobre 1967 à Corbeil-Essonnes (Essonne)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur le Professeur HABRIOUX.....- Président
Monsieur le Professeur NICOLAS.....- Juge
Monsieur le Professeur CHASSAIN.....- Juge
Monsieur le Professeur LAFARGE.....- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de thèse,

Monsieur G.HABRIOUX, Professeur des Universités de Biochimie, qui a inspiré et dirigé cette étude .Nous lui savons gré de la gentillesse et la patience dont il a fait preuve, et nous le remercions sincèrement de nous avoir fait profiter de sa haute compétence et de ses précieux conseils durant l'élaboration de ce travail.

Au Membres du jury,

Nous remercions vivement Monsieur J.A. NICOLAS, Professeur des Universités de Parasitologie, Bactériologie et Virologie, d'avoir accepté de juger cette thèse, ainsi que pour son accueil chaleureux au sein du Laboratoire Départemental de la Haute-Vienne .

Nous tenons à remercier Monsieur A. CHASSAIN, Professeur des Universités de Physiologie, Biologiste des Hôpitaux, Chef de service, de l'honneur qu'il nous fait de siéger dans ce jury.

Monsieur J.P. LAFARGE, Directeur du Laboratoire National Antidopage .Nous lui sommes particulièrement reconnaissants de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail .C'est pour nous un grand honneur de le compter parmi nos juges .

A mes parents,

Qui m'ont toujours encouragée et soutenue durant ces années
d' études .

Que ce travail soit le témoignage de ma profonde tendresse .

A Philippe,

pour son soutien moral jusqu'à l'aboutissement de ce travail.

A mon frère,

avec tout mon attachement .

A tout ma famille,

avec toute mon affection .

A mes amis,

avec toute ma fidélité .

Je tiens aussi à exprimer tous mes remerciements à ceux qui
ont contribué à la réalisation de ce travail, notamment le
personnel du Laboratoire Départemental pour sa fructueuse
collaboration technique .

PLAN

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : MATERIEL - METHODES

1. REACTIFS

- 1.1. Tampons
 - 1.1.1. Homogénéisation
 - 1.1.2. Incubation -pH 7,4
 - 1.1.3. Acétate -pH 4,8 (0,2M)
- 1.2. Solutions salines
- 1.3. Mélange silylant
- 1.4. Solvants organiques
- 1.5. Stéroïdes de référence
- 1.6. Traceurs radioactifs
- 1.7. Réactifs d'hydrolyse
- 1.8. Liquide scintillant

2. METHODES

- 2.1. Mesure de la radioactivité
- 2.2. Chromatographie sur gel de SEPHADEX LH20®
 - 2.2.1. Chromatographie des stéroïdes libres
 - 2.2.2. Chromatographie des stéroïdes conjugués
- 2.3. Chromatographie des stéroïdes conjugués sur DEAE SEPHADEX A25® (PHARMACIA)
- 2.4. Chromatographie des stéroïdes cétoniques sur CELITE® (BIO -MERIEUX)
- 2.5. Chromatographie des urines sur SEP PAK C18® (MILLIPORE-Division Waters)
- 2.6. Hydrolyse des stéroïdes conjugués

- 2.6.1. Hydrolyse par la β -glucuronidase d'E. Coli (PASTEUR)
- 2.6.2. Hydrolyse par le suc digestif d'Helix Pomatia ou SHP
- 2.6.3. Solvolyse
- 2.7. Réaction de Girard et Sandulesco (1936)
- 2.8. Extraction des stéroïdes libres
- 2.9. Chromatographie en Phase Gazeuse sur colonne capillaire (CPG)
 - 2.9.1. Dérivation
 - 2.9.2. Matériel
- 2.10. Couplage Chromatographie en phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CG/SM)
 - 2.10.1. Matériel et conditions
 - 2.10.2. Principe de la fragmentation des stéroïdes en spectrométrie de masse
 - 2.10.3. Tableau récapitulatif des temps de rétention et des m/z caractéristiques, obtenus pour chaque stéroïde de référence

DEUXIEME PARTIE : METABOLISME HEPATIQUE DE LA 19-NORTESTOSTERONE CHEZ LE BOVIN

1. INTRODUCTION

2. CONDITIONS D'INCUBATION

- 2.1. Préparation de l'homogénat de foie de bovin
- 2.2. Préparation des solutions de 19-Nortestostérone tritiée et non-tritiée
- 2.3. Incubation A (Inc A)
- 2.4. Incubation B (Inc B)
- 2.5. Contrôle des rendements de la réaction
 - 2.5.1. Principe et protocole de mesure
 - 2.5.2. Rendements-résultats-discussion

3. SEPARATION DES DIFFERENTES FORMES DE METABOLITES

3.1. Métabolites présents en phase aqueuse

3.1.1. Rendements de colonne

3.1.2. Commentaires

3.2. Métabolites présents en phase organique

3.2.1. Rendements de colonne

3.2.2. Commentaires

4. HYDROLYSE DES DIFFERENTES FORMES DE NORSTEROIDES CONJUGUES

4.1. Préparation des échantillons

4.2. Hydrolyses

4.2.1. Incubation A

4.2.2. Incubation B

5. SEPARATION DES NORSTEROIDES SELON LEUR STRUCTURE

5.1. Introduction

5.2. Préparation des solutions à déposer sur la colonne de SEPHADEX LH20®

5.3. Elution

5.4. Rendements de colonne

5.5. Commentaires

5.5.1. Incubation A

5.5.2. Incubation B

6. SEPARATION DES STEROIDES DE NATURE CETONIQUE, MONOALCOOLIQUE-MONOCETONIQUE SUR CELITE®

6.1. Introduction

6.2. Préparation des échantillons

6.3. Elution

6.4. Rendements de colonne

6.4.1. Prise des aliquotes

6.4.2. Résultats

6.4.3. Commentaires

7. ANALYSE PAR COUPLAGE CG/SM

7.1. Introduction

7.2. Incubation A

7.2.1. Traitement des stéroïdes cétoniques

7.2.2. Traitement des stéroïdes élués dans la fraction "diols" de LH20®

7.2.3. Traitement des stéroïdes initialement conjugués

7.3. Incubation B

7.4. Résultats

7.4.1. Nature des stéroïdes obtenus

7.4.1.1. Fraction libre

7.4.1.2. Fraction glucuronoconjuguée

7.4.1.3. Fraction sulfoconjuguée

8. DISCUSSION

8.1. Incubation

8.2. Conjugaison

8.3. Nature des métabolites

TROISIEME PARTIE : RECHERCHE DES METABOLITES DE LA 19-NORTESTOSTERONE DANS LES URINES DE CHEVAUX

1. INTRODUCTION

2. ESSAIS SUR LES URINES D'ETALON

2.1. Préparation des urines

2.2. Protocole 1

- 2.2.1. Schéma
- 2.2.2. Séparation des formes conjuguées par chromatographie sur gel de DEAE SEPHADEX A25® , colonne 0,8x25 cm
- 2.2.3. Hydrolyse
- 2.2.4. Extraction
- 2.2.5. Séparation des formes cétoniques et dihydroxylées sur gel de SEPHADEX LH20® , colonne 0,8x10 cm
- 2.2.6. Séparation des formes cétoniques par chromatographie sur CELITE®
- 2.2.7. Silylation
- 2.2.8. Analyse par couplage CG/SM
 - 2.2.8.1. Conditions opératoires
 - 2.2.8.2. Résultats
- 2.3. Protocole 2
 - 2.3.1. Schéma
 - 2.3.2. Purification des urines par chromatographie sur SEP PAK C18®
 - 2.3.3. Hydrolyse des différentes fractions
 - 2.3.4. Extraction
 - 2.3.5. Séparation des formes cétoniques et dihydroxylées sur gel de SEPHADEX LH20® , colonne 0,8x10 cm
 - 2.3.6. Séparation des formes cétoniques par chromatographie sur CELITE®
 - 2.3.7. Silylation
 - 2.3.8. Analyse par couplage CG/SM
 - 2.3.8.1. Conditions opératoires
 - 2.3.8.2. Résultats
- 2.4. Discussion

3. ESSAIS SUR LES URINES DE HONGRE ET D'ETALON

- 3.1. Préparation des urines
- 3.2. Protocole expérimental
- 3.3. Extraction directe des stéroïdes libres

- 3.4. Hydrolyse des formes stéroïdiques
conjuguées
- 3.5. Extraction
- 3.6. Séparation des formes cétoniques et
dihydroxylées par la méthode de Girard et
Sandulesco
- 3.7. Dérivation
- 3.8. Analyse par couplage CG/SM
 - 3.8.1. Conditions opératoires
 - 3.8.2. Résultats
- 3.9. Discussion

4. CONCLUSION SUR LES CHEVAUX

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

19-NT: Nortestostérone
 17 β -NT: Nortestostérone
 17 α -NT: Norépitestostérone
 Nor Δ_4 / N Δ_4 : Δ_4 -Norandrostènedione
 17 β -E₂: 17 β -estradiol
 diols: estrane-diols

CH: cyclohexane
 AE: acétate d'éthyle
 Ch / CHCl₃: chloroforme
 M: méthanol
 B: benzène

UDPGA: acide uridyl-diphospho-glucuronique
 SHP: suc d'Helix Pomatia
 β -glu: β -glucuronidase d'E. Coli

Di-O-TMS: diéther de Triméthylsilyle
 CG/SM: couplage chromatographie en phase gazeuse et
 spectrométrie de masse
 Tr: temps de rétention
 v: volume
 t: traces
 F: fraction

H: hongre
 E: étalon

t₅, t₂₀, ... : temps d'incubation de 5 min, 20 min, ...

t₃₀₀ 1: temps d'incubation de 300 min, chromatographie sur
 colonne de SEPHADEX LH20® (§2.2.2. Matériel-Méthodes)

t₃₀₀ 2: temps d'incubation de 300 min, chromatographie sur
 colonne de DEAE SEPHADEX A25® (§2.3. Matériel-Méthodes)

L: libres
 G: glucuronoconjugués
 S: sulfoconjugués
 diS: disulfoconjugués

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Bien que formellement prohibé par la CEE (Directive 88/146/CEE adoptée le 7/04/88, J.O. CEE 16/04/88; Note de service du Ministère de l'agriculture DG-AL/SVHA/N.88/N°8057) l'usage de la **Nandrolone**, ou **19-Nortestostérone**, comme anabolisant protidique, est encore largement répandu dans les élevages .

Actuellement, seule la Nandrolone est recherchée dans les extraits biologiques suspects (urines, point d'injection, reins, fécès). Or, des études ont montré que cette molécule était assez vite éliminée de l'organisme d'un herbivore après une administration (de 40 heures à 6 ou 7 jours), par voie urinaire (1,2,3,4) ; de plus il semblerait qu'il n'existe aucun organe de stockage (1) .

Il était donc judicieux de connaître les principaux métabolites formés, en entreprenant une étude métabolique hépatique de Nandrolone tritiée chez le bovin .

La Nandrolone étant un analogue structural de la Testostérone (la 19-NT ne possède pas de groupement méthyle en C19), l'hypothèse est émise que cette molécule xénobiotique suivrait le même mode de catabolisme, qui est présenté dans la figure 1. Ainsi, il est possible de choisir des composés, supposés être des métabolites cétoniques ou dihydroxylés de la Nortestostérone, qui serviront de références pour l'analyse des résultats . Ceci permettra de déterminer une voie métabolique majeure, et/ou la structure d'un ou des composé(s) éliminé(s) de façon prépondérante, dont la détection montrera d'une manière certaine, l'utilisation frauduleuse de Nandrolone .

Grâce aux résultats obtenus chez les bovins, il est possible de valider les méthodologies employées à la détermination de ces métabolites urinaires chez le cheval, et à les comparer à ceux détectés par des travaux antérieurs (2,3,4,5,6,7,8).

La première partie est consacrée à la description du matériel et des méthodes utilisés. Puis l'analyse expérimentale sera divisée en deux phases :

- en premier lieu, une étude consacrée au métabolisme hépatique de la Nandrolone chez le bovin, et à la mise au point d'un protocole,

- qui en second lieu, sera validé par la recherche de ces métabolites dans les urines de hongre et d'étalon.

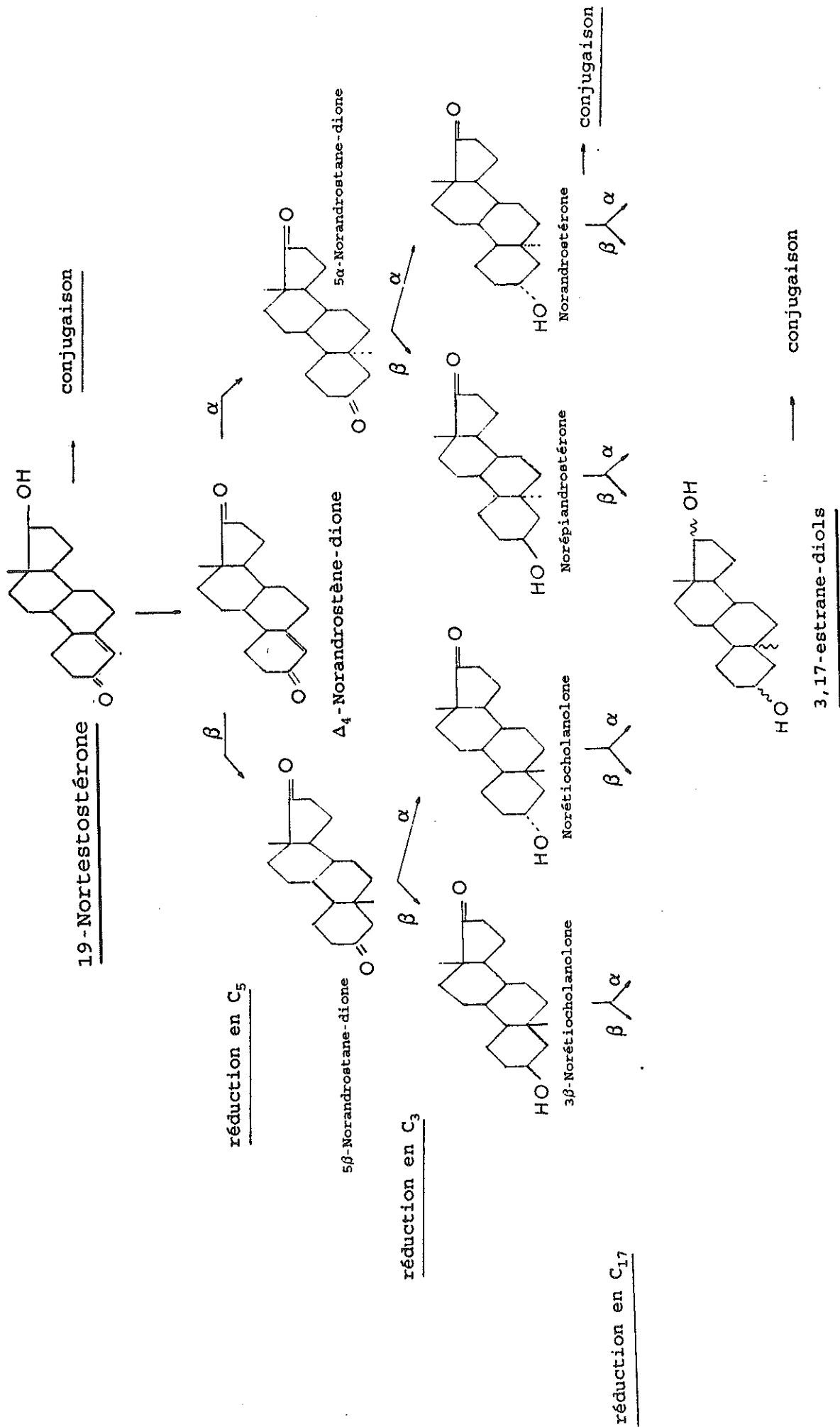


figure 1: Schéma hypothétique du catabolisme de la Nandrolone

PREMIERE PARTIE

MATERIEL-METHODES

1. REACTIFS

1.1. Tampons (9)

1.1.1. Homogénéisation

saccharose	10 g
MgSO ₄	246 mg
eau distillée qsp	100 ml

1.1.2. Incubation-pH 7,4

saccharose	8,550 g
Tris	0,605 g
KCl	0,186 g
MgCl ₂	0,101 g
eau distillée qsp	100 ml

1.1.3. Acétate-pH 4,8 (0,2 M)

NaOH N	60 ml
Acide acétique 2 M	50 ml
eau distillée qsp	500 ml

1.2. Solutions salines

NaCl	0,2 M
NaCl	0,6 M

1.3. Mélange silylant

MSTFA/TMS-iodure (Touzart et Matignon) 1000:2, v/v

1.4.Solvants organiques

Ils proviennent de SDS (PEYPIN-FRANCE).

1.5.Stéroïdes de référence

Les différents stéroïdes (STERALOIDS INC) utilisés sous forme de solutions éthanoliques à 10%, sont répertoriés dans le tableau II.

1.6.Traceur radioactif

Solution éthanolique de 19-[6,7(H³)]Nortestostérone
 Activité spécifique : 36,9 Ci/mmol soit 1,37 TBq/mmol
 Référence : TRQ.5271
 Origine : AMERSHAM (UK)

1.7.Hydrolyse

β -glucuronidase d'E.Coli
 200 UI/ml
 INSTITUT PASTEUR (FRANCE)

SHP standardisé et stabilisé à 100000 unités Fishman/ml de β -glucuronidase , et 1 million d'unités Roy/ml de sulfatases (IBF) .

1.8.Liquide scintillant

Picofluor15® (PACKARD)

2.METHODES

2.1.Mesure de la radioactivité

Des aliquotes des solutions extractives , ainsi que des éluats , dont on veut mesurer la radioactivité , sont placés dans des fioles de comptage en polyéthylène

(PACKARD) .On évapore à sec les solvants "quenchant" et on ajoute 4 ml de liquide de scintillation .Les mesures sont faites sur une durée de 2 min et, les résultats sont donnés en désintégrations par min (dpm), par un compteur à scintillation TRI-CARB 1900 CA PACKARD, après correction de l'affaiblissement lumineux (phénomène de quenching) .

2.2.Chromatographie sur gel de SEPHADEX LH20[®] (PHARMACIA)

2.2.1.Chromatographie des stéroïdes libres

Des colonnes en verre de 8 mm de diamètre et de 85 mm de haut, surmontées d'un réservoir et munies à leur base d'un coton de verre, sont remplies par gravité avec 0,5 g de SEPHADEX LH20[®] mis à gonfler 24 h dans un mélange de solvants Benzène,Méthanol 95:5, v/v, (10) .

Après élution des stéroïdes libres, le gel est rincé avec 25 ml de mélange solvant (Benzène,Méthanol , 50:50 , v/v) . Il est ensuite rééquilibré avec le mélange solvant initial, pour une nouvelle utilisation .

Un profil d'élution est donné figure 2 .

2.2.2.Chromatographie des stéroïdes conjugués

Une colonne en verre de 240 x 6 mm, est remplie sur une hauteur de 200 mm avec du SEPHADEX LH20[®] mis à gonfler une nuit dans un mélange solvant (Chloroforme/Méthanol, 50:50, v/v, NaCl 0,01M) (11) .

Les stéroïdes glucuronoconjugués sont recueillis dans les 10 premiers ml d'éluat .Les stéroïdes sulfoconjugués sont recueillis entre 10 et 20 ml .Les stéroïdes disulfoconjugués sont élués à partir de 20 ml, par le Méthanol .

Un profil d'élution est représenté figure 3 .

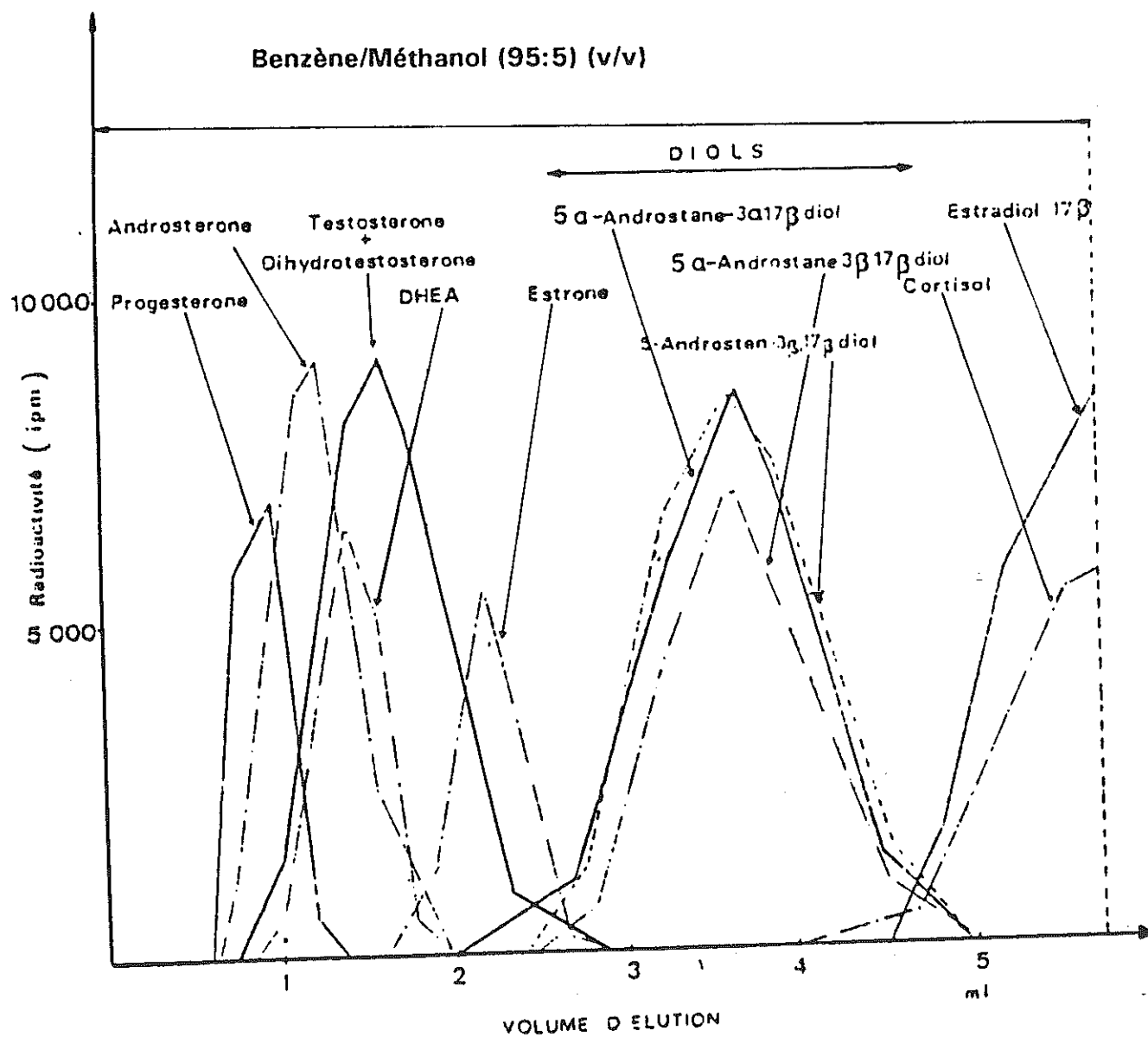


figure 2: Chromatogramme des stéroïdes tritiés libres
sur gel de SEPHADEX LH20®
(cf §2.2.1.)

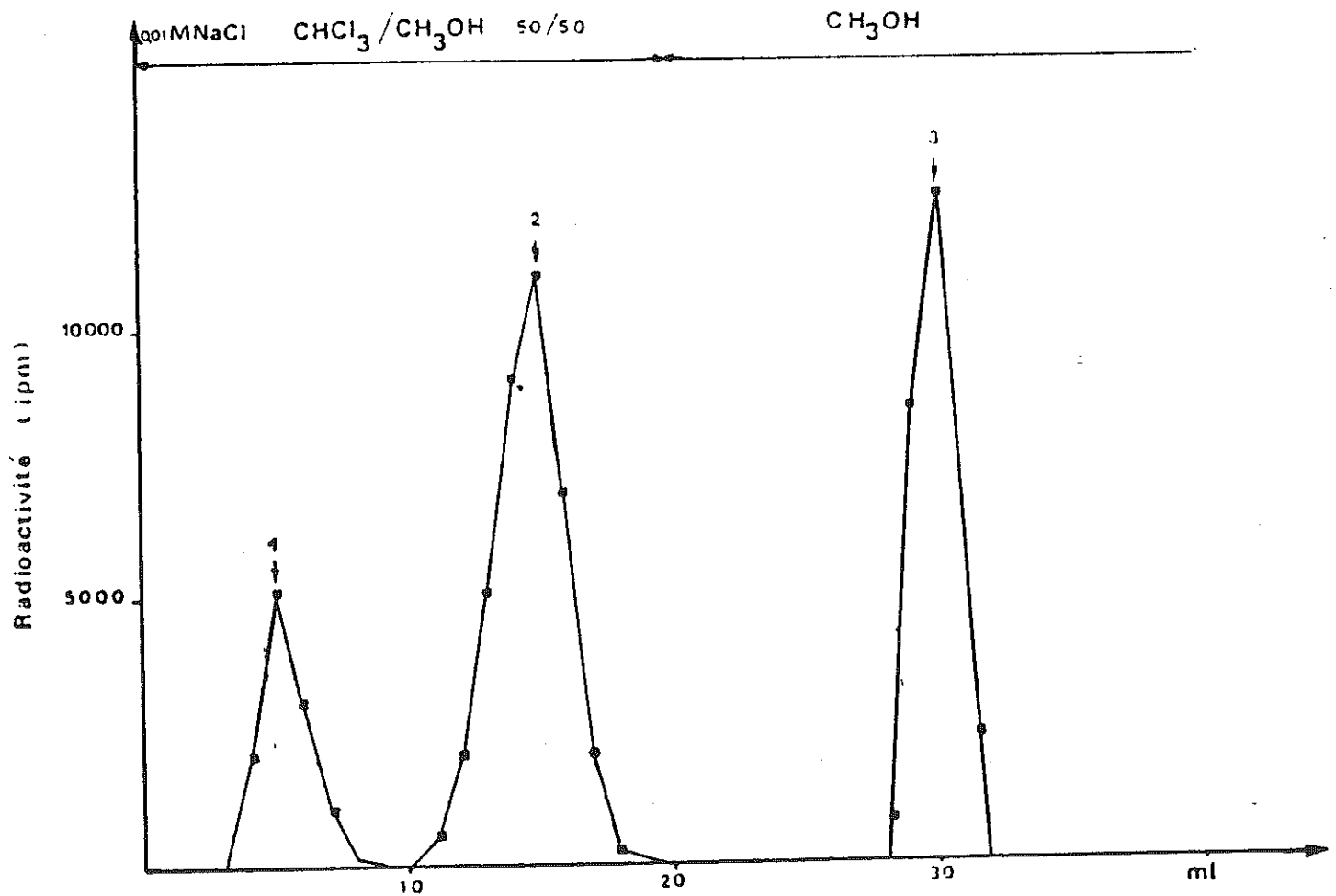


figure 3: Chromatogramme des stéroïdes tritiés
 Glucurono, sulfo et disulfoconjugués
 sur gel de SEPHADEX LH20®
 (cf §2.2.2.)

légende:

- 1-Glucuronoside d'androsterone
- 2-Sulfate de DHA
- 3-Disulfate de 5-androstène-3β-17β-diol

2.3. Chromatographie des stéroïdes conjugués sur DEAE SEPHADEX A25[®] (PHARMACIA)

Deux colonnes en verre de 240 x 8 mm et 240 x 6 mm sont remplies respectivement sur une hauteur de 20 et 10 cm, avec du DEAE SEPHADEX A25[®] mis à gonfler une nuit dans de l'eau distillée. Les extraits sont déposés sur chaque colonne en milieu aqueux et les stéroïdes conjugués sont élués par des solutions salines de concentrations croissantes en NaCl (0,6 M et 2 M) (12). Des profils d'éluion sont représentés figures 4 et 5, selon le type de colonne.

2.4. Chromatographie des stéroïdes cétoniques sur CELITE[®] (BIO-MERIEUX)

Une bille de verre est placée dans une pipette en verre de 5 ml à écoulement libre que l'on remplit ensuite de Chromatolithe A jusqu'à la graduation 3,5. Après l'avoir tassée jusqu'à la graduation 4,0, on rajoute de la phase jusqu'au niveau de 3,0 ml. Cette dernière est de nouveau tassée, en une seule fois jusqu'à la graduation 3,5 et lavée par 3 ml d'Isooctane, en laissant couler par simple gravité.

La Nor- Δ_4 sera éluee par 8 ml d'Isooctane et recueillie; 6 ml de mélange solvant Isooctane, Acétate d'éthyle, 94:6, v/v élueront la Nor-DHT. On ajoutera ensuite 2 ml de ce mélange solvant sans récupérer la fraction éluee. 6 ml de mélange solvant Isooctane, Acétate d'éthyle, 80:20, v/v seront enfin ajoutés pour récupérer la Nortestostérone. L'étalonnage de la colonne est réalisé avec de la 19-NT tritiée qui est éluee dans la fraction 3 avec un rendement de 86 %.

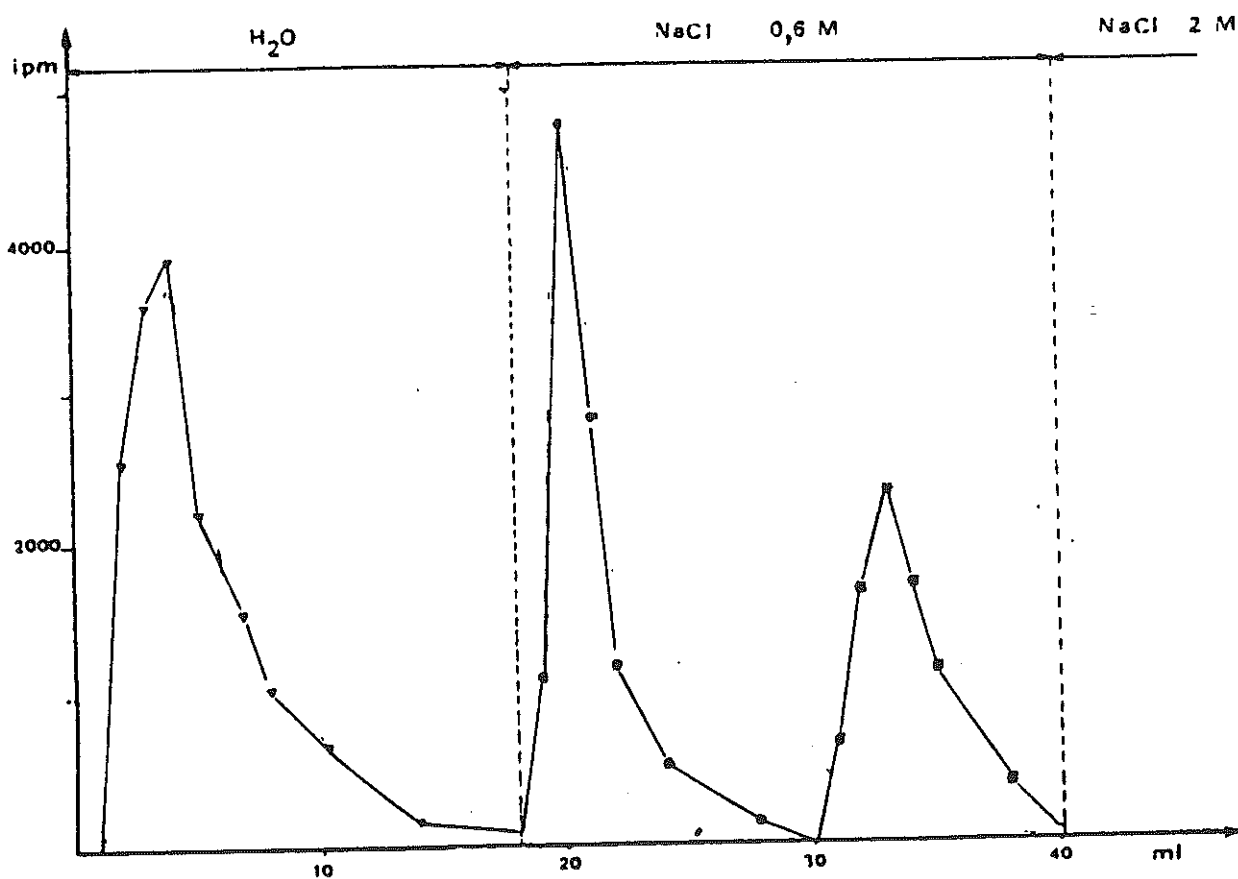


figure 4: Chromatogramme des stéroïdes tritiés
libres et conjugués
sur gel de DEAE SEPHADEX A25®
colonne 10x0,6 cm(cf §2.3.)

légende:

- Glucuronoside d'androstérone
- ▼ Androstérone
- Sulfate de DHA

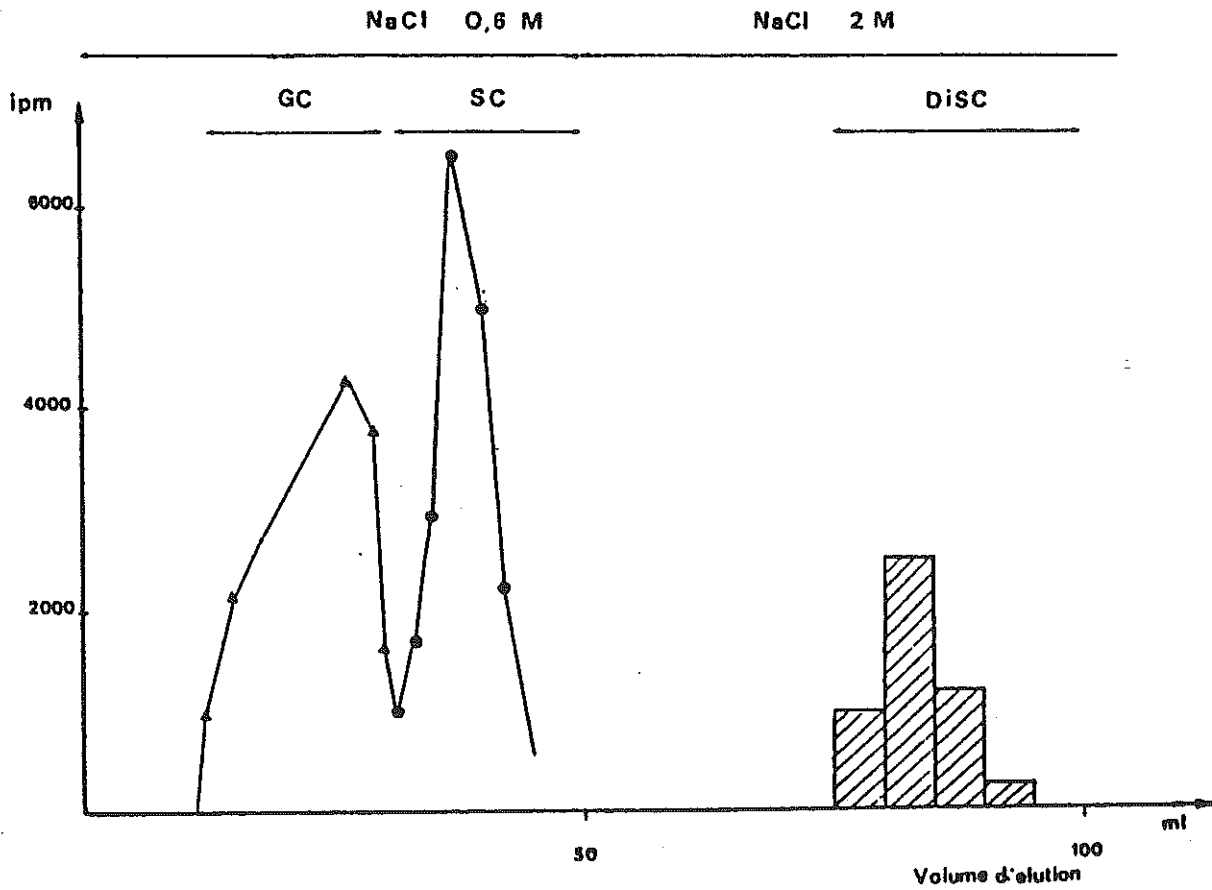


figure 5: Chromatogramme des stéroïdes conjugués tritiés
sur gel de DEAE SEPHADEX A25®
colonne 20x0,8 cm (cf §2.3.)

légende: GC=Glucuronoconjugués
SC=Sulfoconjugués
DISC=Disulfoconjugués

2.5. Chromatographie des urines sur SEP PAK-C18[®] (MILLIPORE, division Waters)

10 ml d'urines sont élués au travers d'une cartouche SEP PAK-C18[®] (débit: 1 goutte.s⁻¹) . 10 ml d'eau distillée sont ensuite injectés, suivis de 10 ml de Méthanol . Les fractions urinaire et méthanolique sont gardées .

2.6. Hydrolyse des stéroïdes conjugués

2.6.1. Hydrolyse par la β -glucuronidase d'E. Coli

Elle est réalisée à l'aide d'une préparation de β -glucuronidase d'E. Coli (200 UI/ml). La réaction a lieu par incubation du milieu biologique ou des éluats (ajustement du pH entre 6 et 7), pendant 1/2 heure à 50°C, en présence d'une goutte de préparation pour 5 ml .

2.6.2. Hydrolyse par le suc digestif d'Helix Pomatia (SHP)

Les stéroïdes glucurono ou sulfoconjugués contenus dans l'éluat ou l'extrait biologique (V ml), amené à pH 4,8, tamponné avec V/10 ml de tampon acétate pH 4,8 (cf §1.1.3.), sont hydrolysés 1 heure à 50°C, par V/100 ml de SHP .

2.6.3. Solvolyse

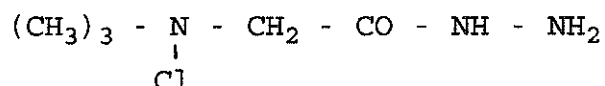
Les phases aqueuses contenant des stéroïdes sulfoconjugués amenées à pH 1 avec de l'acide sulfurique concentré, après addition de NaCl (20% p/v) sont extraites par 2 fois 1,5V d'Acétate d'éthyle . Les phases organiques contenant les stéroïdes conjugués sont réunies et placées ensuite à 65°C pendant 3 heures et lavées 2 fois par 10 ml de NaHCO₃ 1 M, puis 2 fois par 10 ml d'eau distillée .

On traitera de la même façon les stéroïdes contenus dans les éluats organiques, après avoir évaporé à sec le solvant et repris le résidu par du tampon .

2.7.Réaction de Girard et Sandulesco (1936)

20 mg de réactif T de Girard sont ajoutés à l'extrait biologique dissous dans 0,5 ml d'éthanol .Le milieu est acidifié par 1 ml d'acide Acétique concentré, porté 20 min à ébullition, refroidi dans la glace et alcalinisé par 2 ml de NaOH 6 N .

Reactif T: chlorure de triméthylacéthydrazide d'ammonium



Les composés non cétoniques (comprenant les stéroïdes non cétoniques et les pigments) sont extraits 2 fois par 20 ml d'Acétate d'éthyle .Les composés cétoniques contenus dans la phase aqueuse, issue de l'étape précédente, sont extraits 2 fois par 50 ml d'Acétate d'éthyle, après hydrolyse des complexes par 3 ml d'HCl concentré, pendant 3 heures .

2.8.Extraction des stéroïdes libres

Les stéroïdes libres présents dans une phase aqueuse sont extraits par un mélange solvant Cyclohexane, Acétate d'éthyle, 50:50, v/v, (13) dans les proportions suivantes: 7 ml de solvant pour 2 ml de phase aqueuse .

2.9. Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (CPG)

2.9.1. Dérivation

Les stéroïdes cétoniques ou hydroxylés des séries estrane ou androstane sont séparés par CPG sous forme de leur éther de Triméthylsilyle (TMS). Leur réalisation est la suivante: les différentes solutions organiques de stéroïdes libres sont introduites dans un tube en verre et évaporées à sec après avoir ajouté 100 μ l de mélange silylant (cf § 1.3. du chapitre MATERIEL-METHODES). Les tubes sont ensuite placés à 80°C pendant 45 min, dans un bloc chauffant métallique.

On procèdera à l'analyse chromatographique en injectant manuellement ou automatiquement 1 ou 2 μ l de la solution précédemment obtenue.

2.9.2. Matériel

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée à l'aide d'un " GAS-CHROMATOGRAPH Shimadzu GC9A ". Les colonnes capillaires utilisées au cours de ce travail sont de type OV-5 et SE-54 (Interchemical).

Les conditions de chromatographie sont données dans le tableau I.

2.10. Couplage Chromatographie en phase gazeuse / Spectrométrie de masse

2.10.1. Matériel et conditions

Les analyses des échantillons par CG-SM sont faites à l'aide d'un SHIMADZU QP-1000. Le spectromètre de masse est couplé au chromatographe en phase gazeuse décrit dans le paragraphe précédent.

TABLEAU I: Conditions de chromatographie

Type de colonne	SE-54	OV-5
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Pression en tête de colonne (Bar)	3	3
Longueur (m)	25	30
Diamètre intérieur (mm)	0,25	0,25
Epaisseur du film (μm)	0,20	0,25
Débit (ml/min)	1	1
Température de l'injecteur °C	280	280
Température initiale °C	180	180
Température finale °C	300	300
Mode d'injection	splitless	splitless
Programmation (°C/min)	5 ou 15	5 ou 15

Les conditions d'analyse sont les suivantes:

- Energie d'ionisation : 70 eV
- Potentiel d'accélération des électrons : 3 KV

2.10.2.Principe de la fragmentation des stéroïdes en spectrométrie de masse

En transposant aux diéthers de Triméthylsilyle des dérivés "Nor", le mode de fragmentation (cf fig 6) du diéther de TMS de testostérone, on détermine les masses des principaux fragments ioniques pouvant caractériser une molécule (14) .

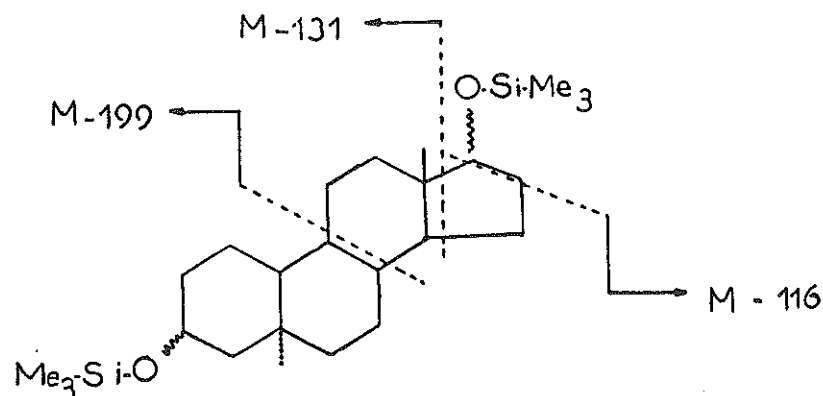


figure 6:Schéma du principe de fragmentation d'un diéther de Triméthylsilyle de stéroïde

Exemple:

Nortestostérone

Masse moléculaire du diéther de Triméthylsilyle de

19-NT= 418

M-15=403

M-[(CH₃)₃-Si-OH]=328

M-CH₃-(CH₃)₃-Si-OH=313

M-131=287

M-(2x90)=238

M-15-(2x90)=223

M-199=219

M-90-116=212

M-90-131=197

M-90-199=129

(CH₃)₂-Si=O-H=75

(CH₃)₃-Si=73

2.10.3. Tableau récapitulatif des temps de rétention et des m/z caractéristiques, obtenus pour chaque stéroïde de référence

Cf tableau II, page suivante .

TABLEAU II: Récapitulation de la nomenclature, des temps de rétention, et des m/z caractéristiques des stéroïdes standards di-O-TMS (Conditions de chromatographie sur SE54, cf Tableau I)

STEROIDES	TEMPS DE RETENTION (min)	M/Z
17 β -Nortestostérone (19-NT, Nandrolone)	19,2	420-418
17 α -Nortestostérone	18,5	420-418
Norandrostènedione (Nor Δ_4)	18,9	418-416
5 β -Estrane-3 α ,17 α -diol	15,4	422-407-242
5 α -Estrane-3 β ,17 α -diol	16,8	422-407-242
5 β -Estrane-3 α ,17 β -diol	17,2	422-407-242
17 α -Estradiol	19,1	416-285
17 β -Estradiol	19,9	416-285
Norandrostérone	16,2	405-315-225
Etiocholanolone	17,5	434-329-239
Androstérone	17,5	434-329-239
5 α -androstane-3 α ,17 β -diol	non déterminé	438-332
5 α -androstane-3 β ,17 β -diol	non déterminé	438-332
5 β -androstane-3 α ,17 β -diol	non déterminé	438-332
5 β -androstane-3 β ,17 β -diol	non déterminé	438-332

DEUXIEME PARTIE

METABOLISME HEPATIQUE DE LA 19-NORTESTOSTERONE CHEZ LE BOVIN

1. INTRODUCTION

Le but de ce travail est de suivre in-vitro la transformation de la 19-Nortestostérone par une préparation enzymatique de parenchyme hépatique de bovin, afin de mettre en évidence des métabolites particuliers, dont la recherche systématique permettrait de détecter l'usage de la 19-Nortestostérone dans un élevage .

Le protocole d'analyse utilisé au cours de ce travail est schématisé figure 7 .

2. CONDITIONS D'INCUBATION

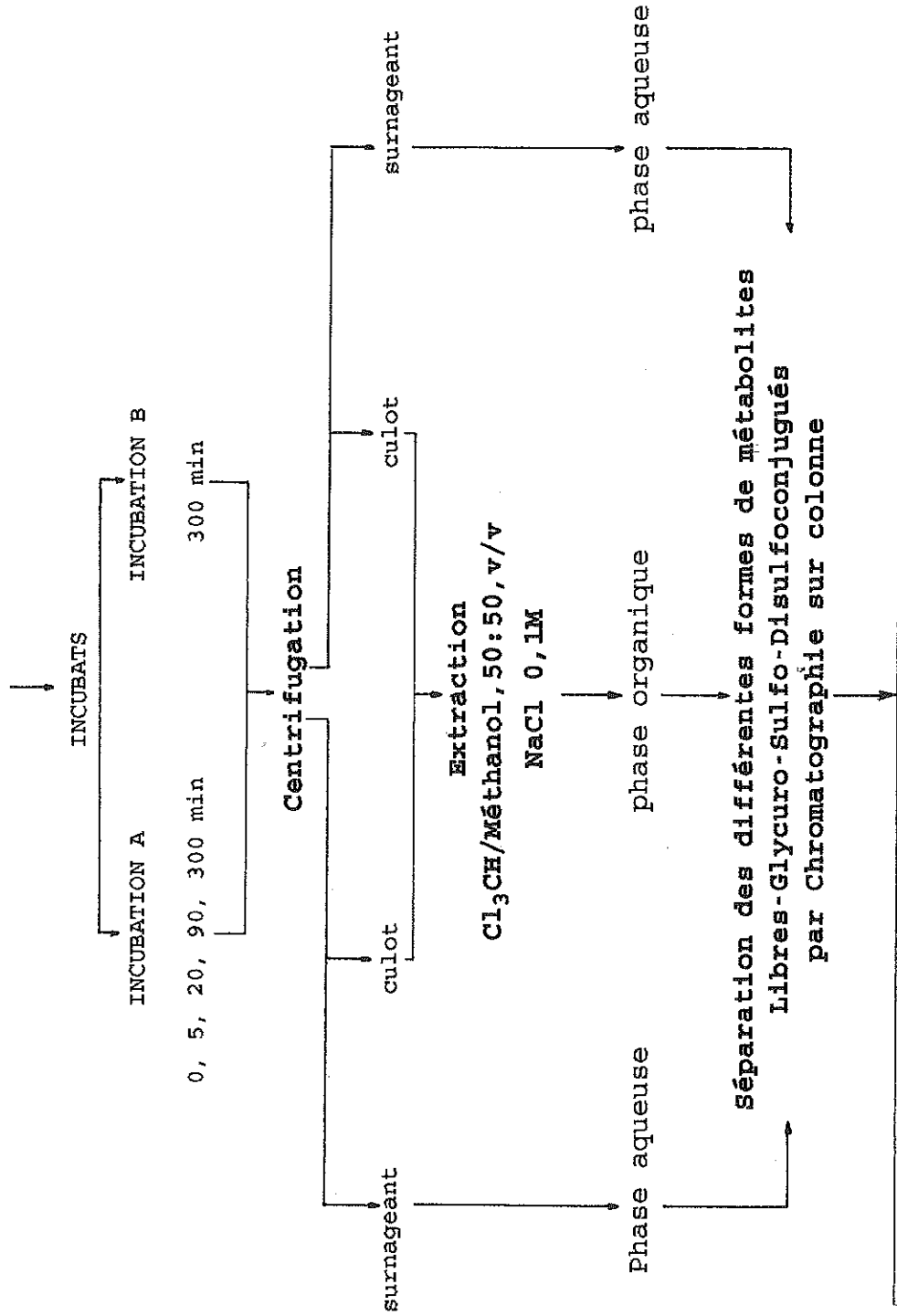
2.1. Préparation de l'homogénat de foie de bovin

Un foie prélevé chez un bovin adulte aux Abattoirs Municipaux de Limoges, est placé à 4°C (glace + coffret isotherme) dans du tampon d'homogénéisation . Plusieurs échantillons du tissu (5 g) sont découpés en petits dés, et placés dans un homogénéisateur verre-teflon de Potter, en présence de 15 ml de tampon d'incubation, par fraction de 5 g de foie .

L'homogénéisation est réalisée à 4 °C par plusieurs allers et retours lents , pendant 5 min . On laisse décanter les homogénats obtenus . Le surnageant, conservé au congélateur, servira de préparation enzymatique .

Préparation:

- Homogénat de foie de bovin
- Solutions de 19-NT* et 19-NT non tritiée



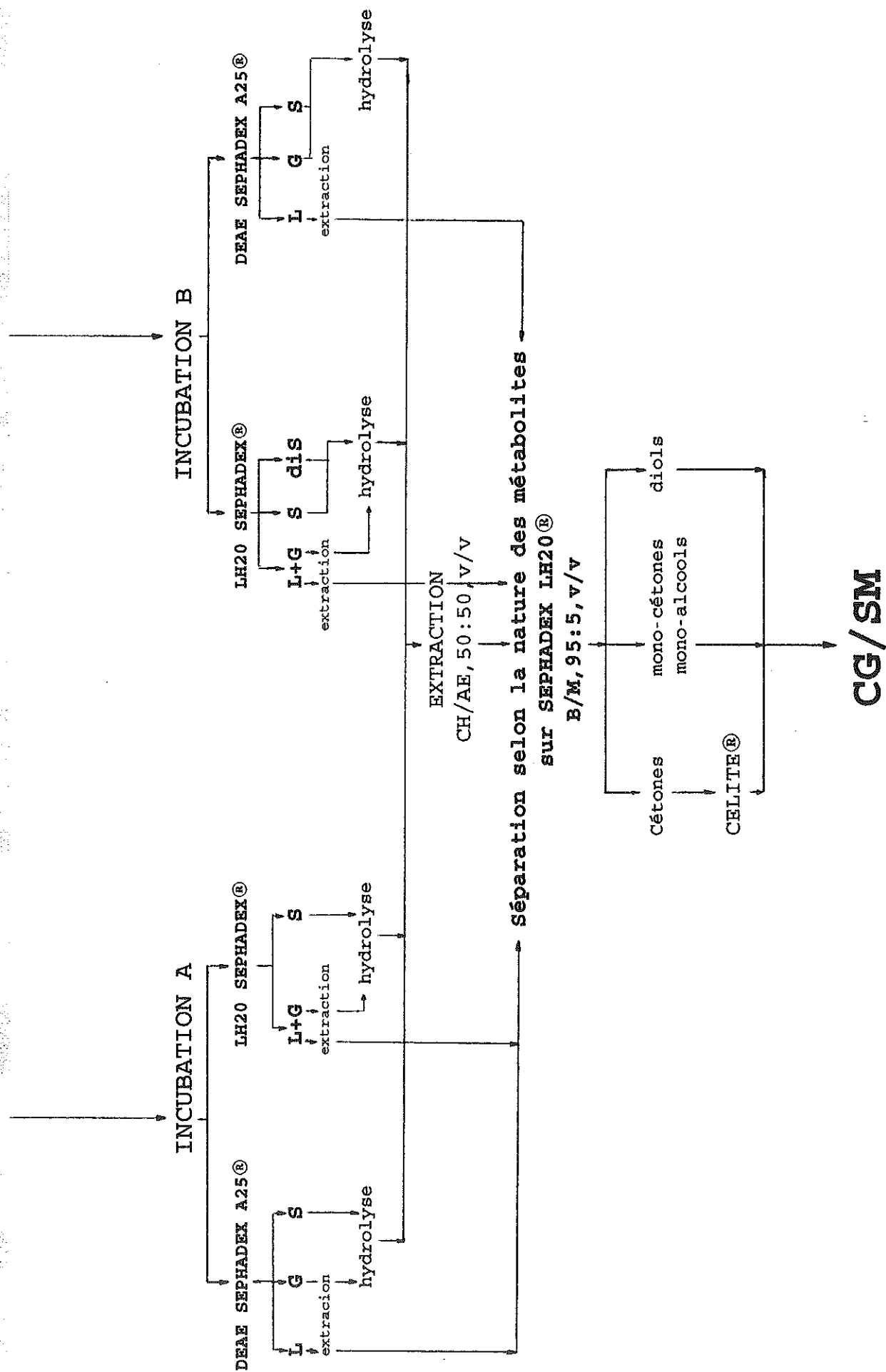


figure 7: Protocole expérimental d'obtention et d'analyse des métabolites de la 19-Nortestostérone

2.2. Préparation des solutions de 19-Nortestostérone tritiée et non-tritiée

Les quantités de 19-NT (tritiée ou non tritiée) à mettre en jeu, dépendent des différents rendements d'incubation, d'extraction, de chromatographie et d'hydrolyse . En effet, la quantité finale des différents produits obtenus doit permettre une détection suffisante par le spectromètre de masse, lors de l'analyse qualitative .

2.3. Incubation A (Inc A)

5 temps d'incubation ont été choisis: 0 (témoin), 5 min, 20 min, 90 min et 300 min (15) pour construire une cinétique. La préparation des échantillons est résumée dans le tableau suivant :

Temps d'incubation (min)	préparation enzymatique (ml)	solution éthanolique de 19-NT tritiée (μ l) 17 μ Ci/850 μ l de tampon	19-NT froide (μ g)
0	1	35	-
5	1	180	500
20	1	180	500
90	1	180	500
300	1	180	500

Ces 5 tubes sont placés dans un bain marie à 37°C, sous des flux d'oxygène et de CO₂ (95/5), pour favoriser le métabolisme oxydatif .Les réactions enzymatiques sont arrêtées par ébullition (2 min) .Le coagulum est séparé de la phase liquide par centrifugation à 800g pendant 10 min, dans une centrifugeuse réfrigérée à 5°C .

La totalité du surnageant est récupérée pour chaque échantillon, et mise au congélateur, en attente de la prochaine analyse .Il en est de même pour le coagulum .

2.4. Incubation B (Inc B)

Cette incubation est caractérisée par une addition au milieu initial de 1 ml d'une solution contenant 1 mg d'UDPG, 3,5 mg de NADH, et de vitamine C (9). La préparation de cet échantillon diffère légèrement de celle de la précédente incubation :

3 g de foie de bovin sont broyés dans 5 ml de tampon d'incubation, dans l'appareil de Potter durant 5 min. Après centrifugation de ce tube, on ajoute à 5 ml de surnageant (préparation enzymatique) 1 ml de la solution réductrice contenant 5 μ Ci de 19-NT et 450 μ g de Nandrolone non tritiée. Cette solution est placée dans un bain-marie à 37 °C, sous oxygène et CO₂ (95/5), pendant 300 min. Les réactions enzymatiques sont arrêtées par ébullition (2 min). L'opération suivante consiste à centrifuger le tube à 800g durant 10 min à 5 °C. De la même façon qu'au paragraphe 2.3., on prélève la totalité du surnageant que l'on conserve au congélateur, ainsi que le coagulum.

2.5. Contrôle des rendements de la réaction

2.5.1. Principe et protocole de mesure

Les rendements des incubations A et B sont réalisés en mesurant la radioactivité d'aliqotes selon la méthode décrite au § 2.1. (cf MATERIEL-METHODES). La figure 8 présentée ci-après est divisée en 4 sous-parties : 1, 2, 3, 4.

n°1: la mesure faite sur la solution initiale pure de 19-NT tritiée nous permet de vérifier la quantité de radioactivité attendue.

n°2: les aliqotes prises juste avant l'incubation, nous permettront d'utiliser la radioactivité mesurée comme témoin,

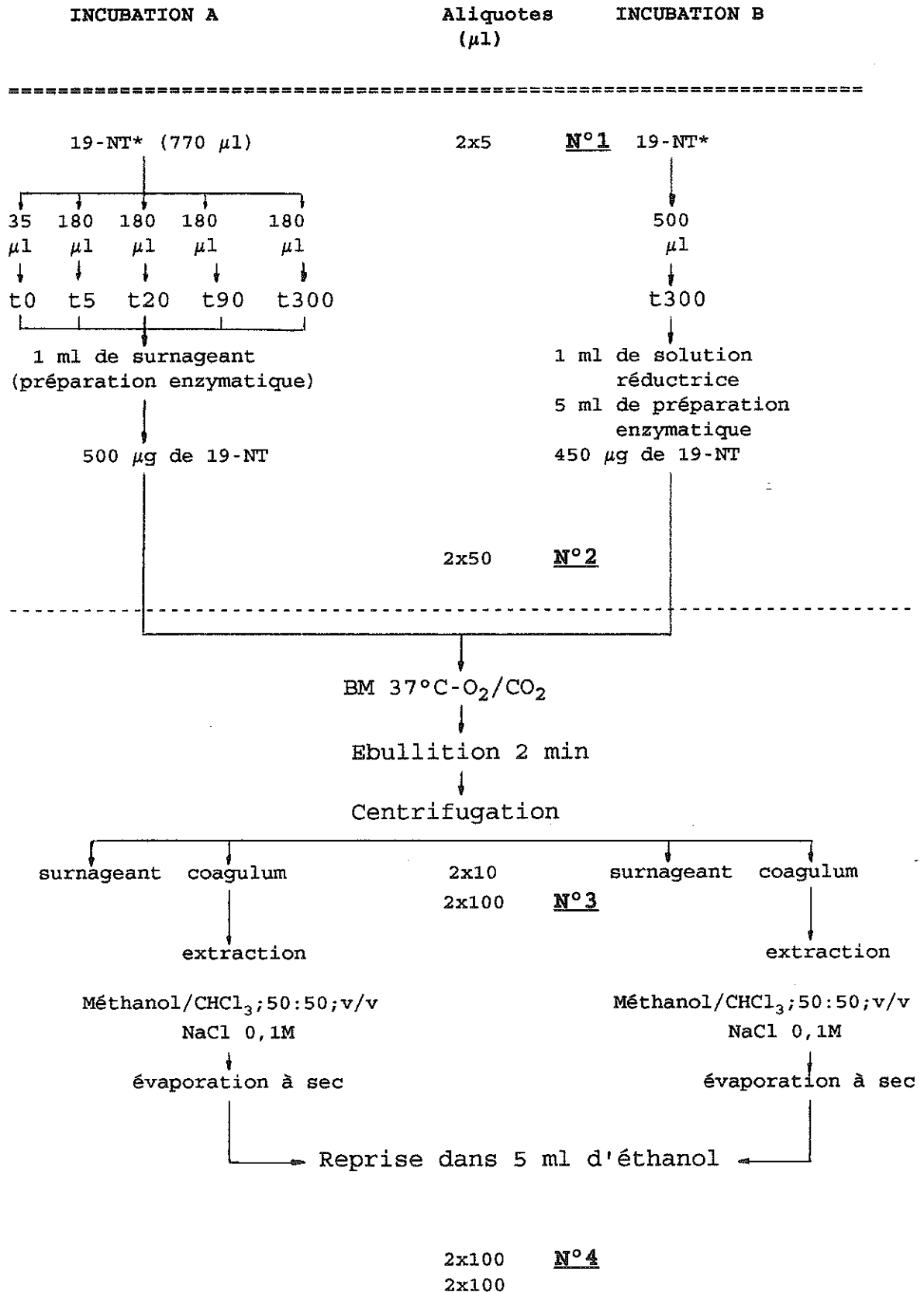


figure 8: Protocole de mesure de la radioactivité dans les échantillons biologiques, après l'incubation

Légende: * = traceur radioactif

lors du calcul du rendement d'incubation .

n°3: la mesure de la radioactivité dans le surnageant (ici, la phase aqueuse), nous a montré une faible récupération , à tous les temps .Ceci indique une forte adsorption sur le matériel biologique, nécessitant une extraction des composés restés dans le culot hépatique .

n°4: la radioactivité émise est mesurée sur une aliquote de solution éthanolique obtenue consécutivement à l'extraction .

2.5.2. Rendements-Résultats-Discussion

En additionnant les résultats obtenus pour le surnageant et ceux de la solution éthanolique du coagulum, nous pouvons comparer cette somme à la radioactivité mesurée avant l'incubation et établir le rendement de récupération pour chaque temps qui est résumé dans le tableau III .Celui-ci nous montre les participations en pourcentage des phases organique et aqueuse dans le rendement final des incubations.

L'analyse des tableaux III et IV indique, qu'il était nécessaire d'extraire le culot de centrifugation par un solvant organique, et de pratiquer un comptage, pour retrouver un niveau acceptable de radioactivité après l'incubation .

Les rendements totaux des différents temps d'incubation ont été satisfaisants sauf à 5, 90 et 300 min, où des pertes ont été occasionnées par une mauvaise oxygénation au cours de l'incubation.

La majorité des composés radioactifs se trouve en phase organique (formes libres) , alors que les formes conjuguées hydrosolubles n'y représentent qu'une faible proportion .Ceci s'expliquerait par la relative brièveté des temps d'incubation qui ne permet pas d'obtenir des quantités importantes de glucurono ou sulfoconjugués .

TABLEAU III: Radioactivité mesurée après l'incubation

Temps (min)	Volume de solution (μ l) radioactive	Radioactivité déposée (dpm)	Phase aqueuse			Phase organique		
			Volume de reprise (ml)	Radioactivité dans 10 μ l (dpm)	Radioactivité totale (dpm)	Volume de reprise (ml)	Radioactivité dans 100 μ l (dpm)	Radioactivité totale (dpm)
I	35	793759	1,13	2567	290000	4,5	7859	353000
N	180	4082191	1,20	8210	975000	4	35821	1430000
C	180	4082191	1,15	11000	1650000	5	25485	1274000
A	180	4082191	1,15	10184	1170000	4	36615	1467000
	180	4082191	1,07	9378	1000000	6 (2+4)	62871	1390000
I				R* dans				
N				100 μ l (dpm)				
C				902900	1206000	4,5	158750	7144000
B	500	11000000	2,00					

TABLEAU IV: % de radioactivité mesuré
après incubation

INCUBATION	TEMPS (min)	Phase aqueuse (%)	Phase organique (%)	Rendement Global (%)
A	0	41	44	85
	5	24	35	59
	20	40	31	71
	90	28	35,9	63,9
	300	24,5	34	58,5
B	300	65	8	73

3. SEPARATION DES DIFFERENTES FORMES DE METABOLITES

3.1. Métabolites présents en phase aqueuse

Les métabolites sont séparés par une chromatographie échangeuse d'ions de DEAE SEPHADEX A25® (cf §2.3., MATERIEL-METHODES).

Les dépôts en tête de colonne sont effectués sous un volume constant de 1 ml, selon la méthode décrite dans le tableau suivant :

	Temps (min)	volume de phase aqueuse (μ l)	volume d'eau distillée (μ l)	Total (μ l)
i	0	800	200	1000
n	5	800	200	1000
c	20	900	100	1000
	90	900	100	1000
A	300	750	250	1000

incB	300	1000	0	1000
-------------	-----	------	---	------

Les éluats sont récupérés tous les ml. Les profils d'éluion expérimentaux sont reproduits dans les figures 9 et 9 bis.

SEPHADEX DEAE A25

SEPHADEX LH20

(cf §2.3./MATERIEL-METHODES)

(cf §2.2.2./MATERIEL-METHODES)

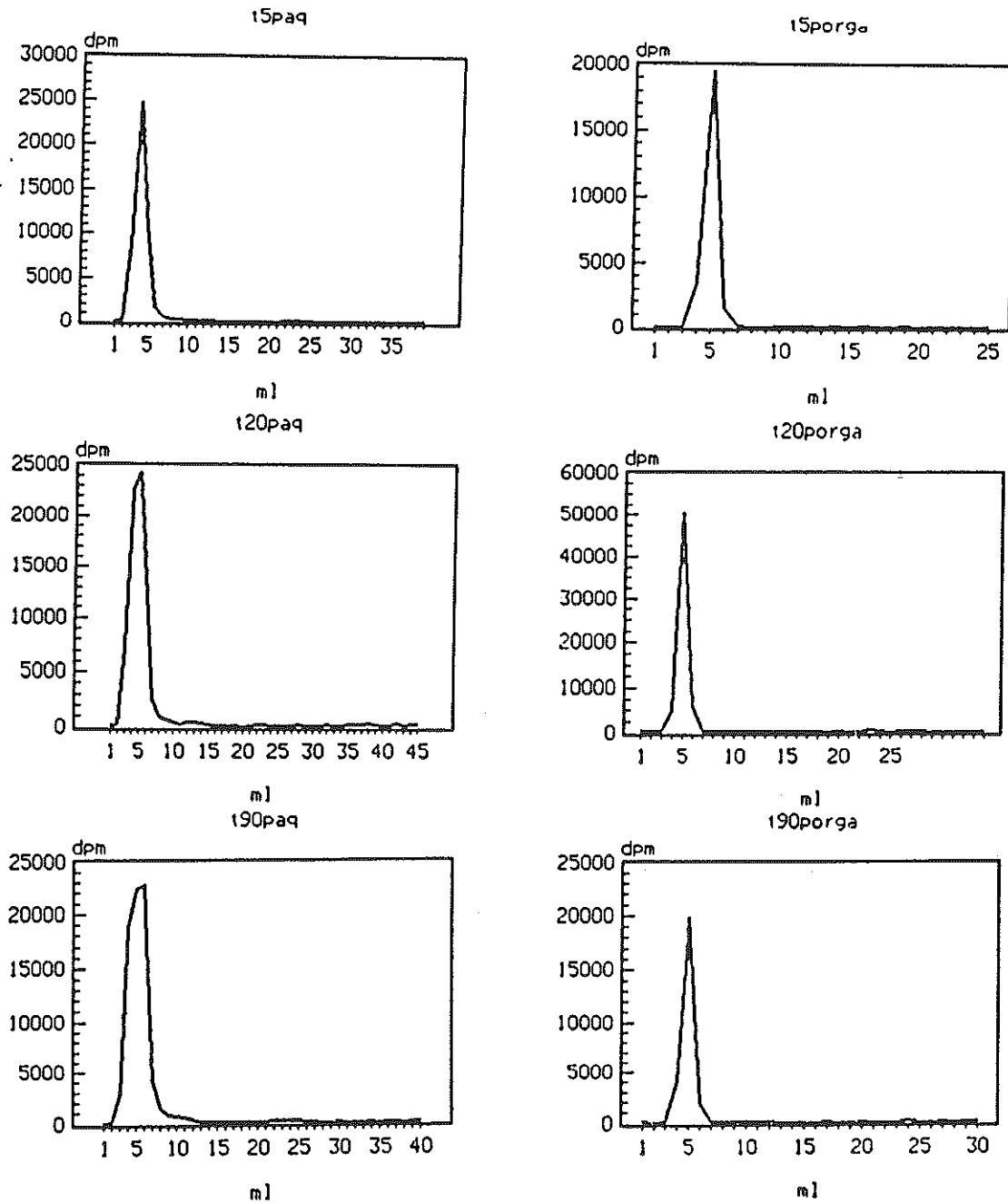


figure 9: Profils chromatographiques des milieux réactionnels des produits, issus de l'incubation

Légende:

t5=temps d'incubation de 5 min

t20=temps d'incubation de 20 min

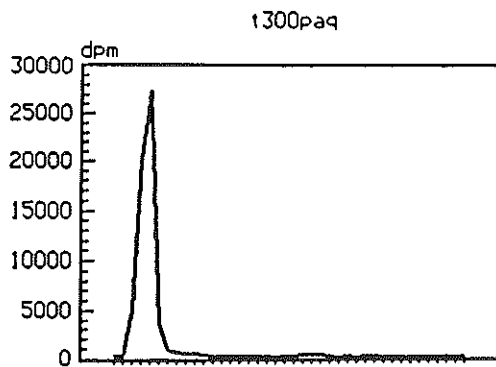
t90=temos d'incubation de 90 min

porga=phase organique

paq=phase aqueuse

SEPHADEX DEAE A25

(cf §2.3./MATERIEL-METHODES)



SEPHADEX LH20

(cf §2.2.2./MATERIEL-METHODES)

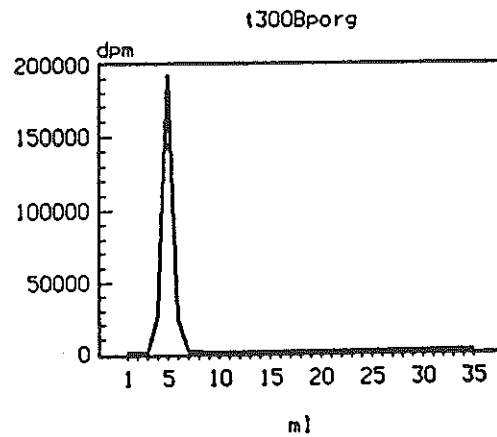
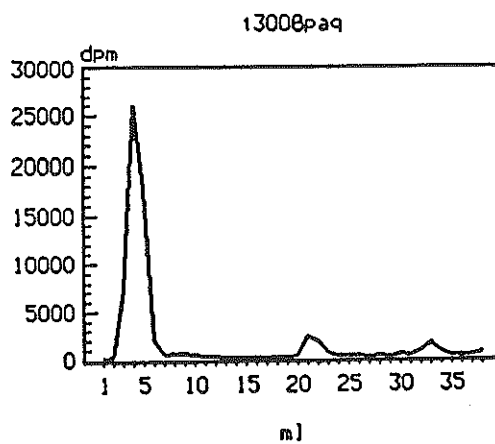
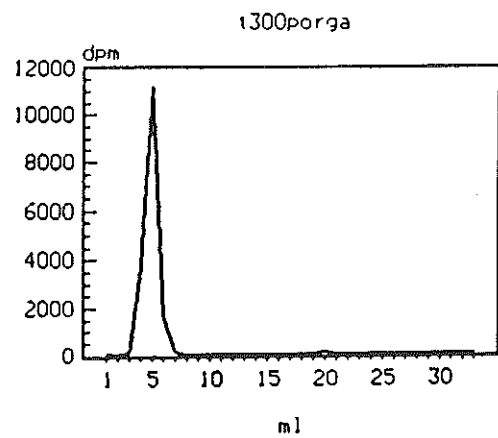


figure 9bis: Profils chromatographiques des milieux réactionnels des produits, issus de l'incubation

Légende:

t300=temps d'incubation de 300 min

B=incubation B

porga=phase organique

paq=phase aqueuse

3.1.1. Rendement de colonne

Les rendements des différentes colonnes sont réalisés en prélevant des aliquotes témoins sur les dépôts initiaux en tête de colonne et sur une prise de chaque ml d'éluat .Le volume des aliquotes ainsi que le calcul des différents rendements obtenus sont indiqués dans le tableau V.

3.1.2. Commentaires

Les rendements totaux des différentes colonnes montrent que toute la radioactivité déposée a été retrouvée pour l'incubation A .Les pourcentages des différentes formes obtenues soulignent la prépondérance représentée par les Norstéroïdes libres .Les glucuronoconjugués existent en faible proportion, alors que les sulfoconjugués ne sont présents qu'à l'état de traces .

Par contre, nous pouvons noter qu'au cours de l'incubation B, le pourcentage des Norstéroïdes conjugués formé est plus élevé que celui obtenu lors de l'incubation A .Il semblerait donc que le milieu réducteur (caractéristique de l'Inc B) favorise nettement l'activité transférasique des hépatocytes et, de ce fait, la formation de Norstéroïdes conjugués de façon plus rapide ,grâce aussi à l'UDPGA .

3.2. Métabolites présents en phase organique

La méthode de séparation des composés stéroïdiques présents en phase organique est donnée au § 2.2.2 du chapitre MATERIEL-METHODES .

Après évaporation à sec, chaque extrait est repris par 1 ml de solvant de chromatographie et le dépôt est effectué selon le protocole décrit dans le tableau suivant:

	Temps (min)	volume de reprise (μ l)	volume de Ch/M 50:50, v/v (μ l)	Total (μ l)
i	0	850	150	1000
n	5	900	100	1000
c	20	900	100	1000
	90	800	200	1000
A	300	800	200	1000

incB	300	800	200	1000
-------------	-----	-----	-----	------

L'élution des différents composants est représentée figures 9 et 9 bis .

3.2.1. Rendement de colonne

Les calculs des différents rendements des colonnes organiques s'effectuent selon le même principe que celui employé pour les colonnes de DEAE SEPHADEX A25® .Le tableau VI résume d'une part, les volumes des aliquotes sur lesquels on mesure la radioactivité, et d'autre part les résultats obtenus .

TABLEAU V: Répartition de la radioactivité en fonction des différentes formes de métabolites obtenues (libres, glucurono et sulfoconjugués) DEAE SEPHADEX A25

INCUBATION	DUREE (min)	Aliquote dépôt (μ l)	Aliquote éluat (μ l)	Différentes formes séparées		
				Libre (%)	Glucuro (%)	Sulfo (%)
A	0	2x50	100	100	0	0
	5	2x50	100	98	1,6	0
	20	2x50	100	93,5	3,3	traces
	90	2x50	100	97	1,7	0
	300	2x50	100	96	2	0
B	300	2x50	100	80,8	8,2	5,3

TABLEAU VI: Répartition de la radioactivité en fonction des différentes formes de métabolites obtenues (libres, glucurono et sulfoconjugués) SEHADEX LH20

INCUBATION	DUREE (min)	Aliquote dépôt (μ l)	Aliquote éluat (μ l)	Différentes formes séparées		
				L + G (%)	Sulfo (%)	Disulfo (%)
A	0	2x50	100	100	0	0
	5	2x50	100	100	0	0
	20	2x50	100	100	0	0
	90	2x50	100	99	0	0
	300	2x50	100	100	0	0
B	300	2x50	100	97	3	traces

3.2.2. Commentaires

Les stéroïdes présents dans la phase organique sont exclusivement sous forme libres et glucuronoconjugués (pas de séparation de ces derniers sur gel de SEPHADEX LH20®). Les sulfo ou disulfoconjugués n'apparaissent pas lors de l'incubation A, alors que les conditions de l'incubation B favoriseraient nettement, même faiblement, la conjugaison (3% et traces, respectivement de sulfo et disulfoconjugués) . De plus, la forte proportion de libres s'explique par la bonne solubilité des stéroïdes en phase organique . De ce fait, il est normal que les formes conjuguées solubles en phase aqueuse soient retrouvées dans la fraction d'élution leur correspondant, après chromatographie sur gel de DEAE SEPHADEX A25® .

4. HYDROLYSE DES DIFFERENTES FORMES DE NORSTEROIDES CONJUGUES

4.1. Préparation des échantillons

Pour extraire les différentes formes conjuguées ou libres, nous utilisons leurs différences de solubilités .

-Formes libres:

solubles en milieu organique

insolubles en milieu aqueux

-Formes conjuguées:

solubles en milieu aqueux

insolubles en milieu organique

Deux extractions successives sont effectuées en tubes de 50 ml ou en ampoules à décanter, selon le volume à extraire.

4.2.Hydrolyses

4.2.1.Incubation A

Les glucuronoconjugués sont traités par de la β -glucuronidase (1 goutte pour 5 ml de solution aqueuse ajustée à pH 6,5) .

Les stéroïdes libres obtenus sont extraits de la phase aqueuse par un mélange de CH/AE, 50:50, v/v, puis les échantillons sont évaporés à sec .Les résidus sont repris dans 300 μ l de Benzène/ Méthanol, 95:5, v/v .

La solution organique de stéroïdes obtenue, est évaporée à sec (bloc chauffant, 60°C, sous N₂), et le résidu repris par 300 μ l de B/M, 95:5, v/v .

4.2.2.Incubation B

Les différents conjugués issus de la colonne de chromatographie DEAE SEPHADEX A25® sont hydrolysés de la façon suivante:

G : β -glucuronidase

SHP

L : SHP

Solvolyse

Les conditions sont décrites §2.6. du chapitre MATERIEL-METHODES.

En fin de manipulation, les molécules sont extraites par du CH/AE, les solutions sont évaporées à sec et les résidus repris par du solvant de chromatographie utilisé pour la séparation des stéroïdes selon leur nature (SEPHADEX LH20®). En ce qui concerne les stéroïdes conjugués séparés par la colonne de SEPHADEX LH20®, seuls les disulfoconjugués subissent une solvolyse, pour des raisons de rendement .

De même, la solution organique contenant les stéroïdes libres, après la réaction d'hydrolyse, est évaporée à sec et le culot est repris par 300 μ l de B/M, 95:5, v/v .

5. SEPARATION DES NORSTEROIDES SELON LEUR STRUCTURE

5.1. Introduction

Nous pouvons séparer selon leur structure les composés formés à la suite des incubations (cétones, monoalcool-monocétones, diols, estradiols), par chromatographie sur SEPHADEX LH20® (10x0,8 cm) en utilisant un mélange de solvants Benzène/Méthanol, 95:5, v/v, selon la méthode décrite au §2.2.1. du chapitre MATERIEL-METHODES .

5.2. Préparation des solutions à déposer sur la colonne de SEPHADEX LH20®

200 μ l de solution organique obtenue précédemment sont déposés en tête de colonne .L'élution a lieu comme il est prescrit au §2.2.1. du chapitre MATERIEL-METHODES .

On prélève sur les 100 μ l restant, deux aliquotes de 20 μ l pour mesurer la radioactivité réellement déposée .

5.3. Elution

Sur chaque éluat de 200 μ l, 2x20 μ l sont pipetés pour effectuer un comptage radioactif, afin de calculer le rendement de la colonne et de tracer un chromatogramme .Ce dernier permettra de déterminer quelles fractions éluées sont à prélever pour la suite des analyses .

5.4. Rendements de colonnes

Les tableaux VII, VIII et les figures 10, 10bis, 11 et 11bis leur correspondant, ont été établis selon les comptages radioactifs obtenus .

TABLEAU VII: Répartition de la radioactivité en fonction de la nature des stéroïdes (inc A)

Temps (min)	% LIBRES		% GLUCUROCONJUGUES	
	CETONES	DIOLS	CETONES	DIOLS
T5 1	100.0	0.0	73.0	29.0
T5 2	80.0	8.4		28.0
T20 1	95.0	4.6	69.0	30.0
T20 2	93.0	7.0		
T90 1	87.0	12.0	72.0	28.0
T90 2	94.7	5.3		
T300 1	88.0	12.0	67.0	33.0
T300 2	90.0	10.0		

TABLEAU VIII: Répartition de la radioactivité en fonction de la nature des stéroïdes (inc B)

Temps (min)	% LIBRES			% SULFOCONJUGUES		
	CETONES	DIOLS	POLYOLS	CETONES	DIOLS	POLYOLS
T300 2	64.0	7.4	23.0	40.0	31.0	14

Chromatographie sur SEPHADEX LH20
Incubation A

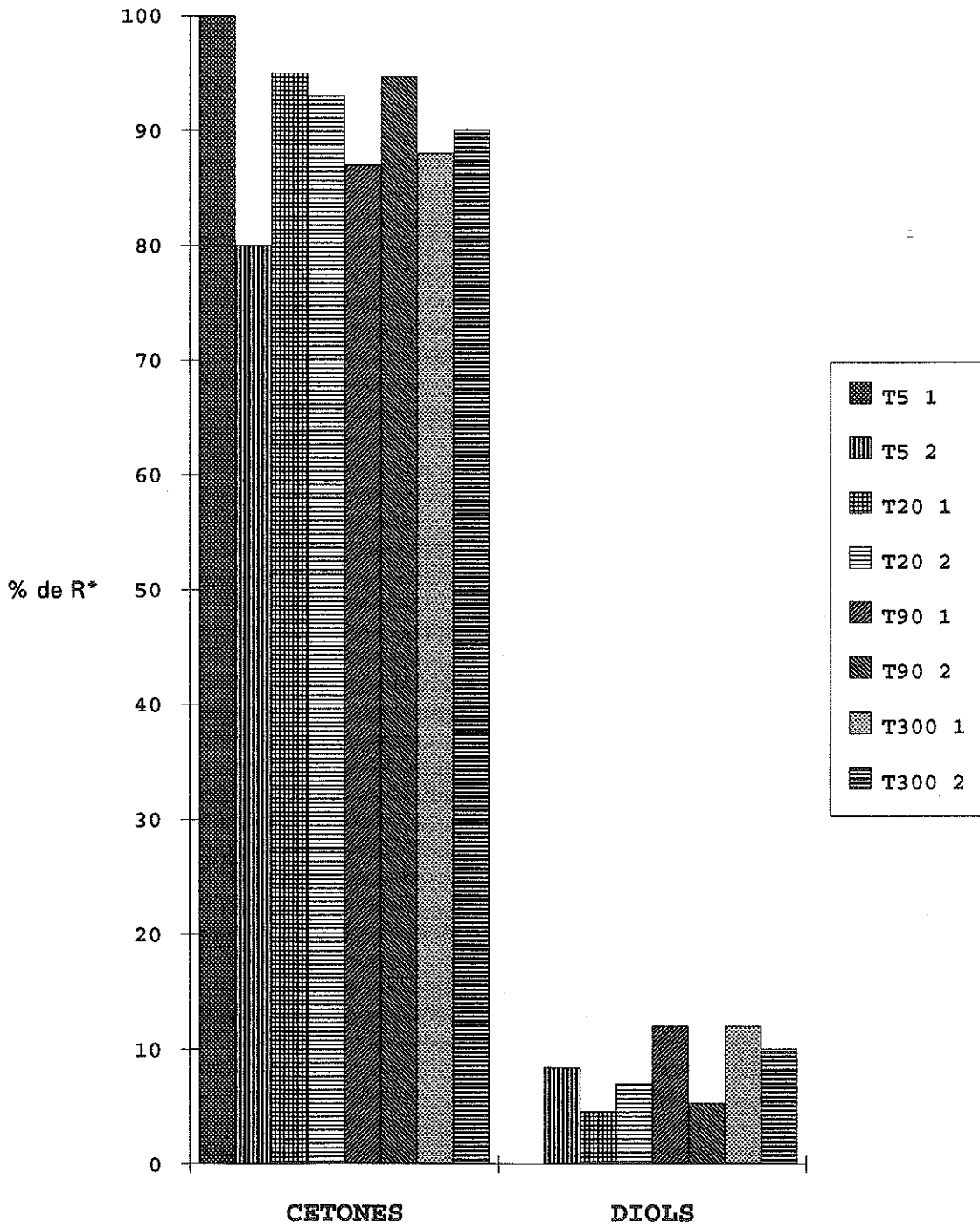


figure 10: Nature des stéroïdes libres

Chromatographie sur SEPHADEX LH20
Incubation A

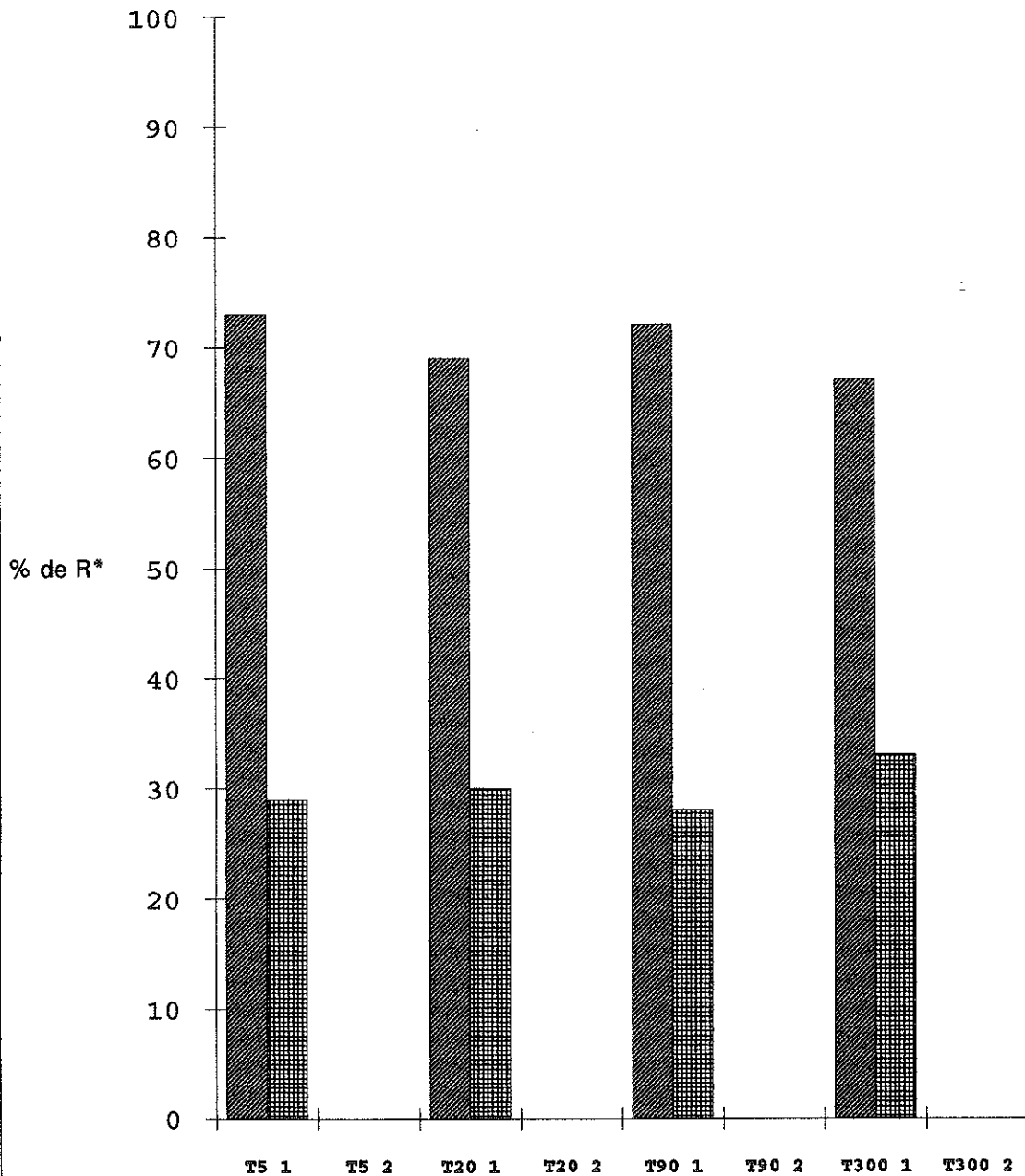


figure 10bis: Nature des stéroïdes glucuroconjugués

■ CETONES ▣ DIOLS

Chromatographie sur SEPHADEX LH20
Incubation B (T300 2)

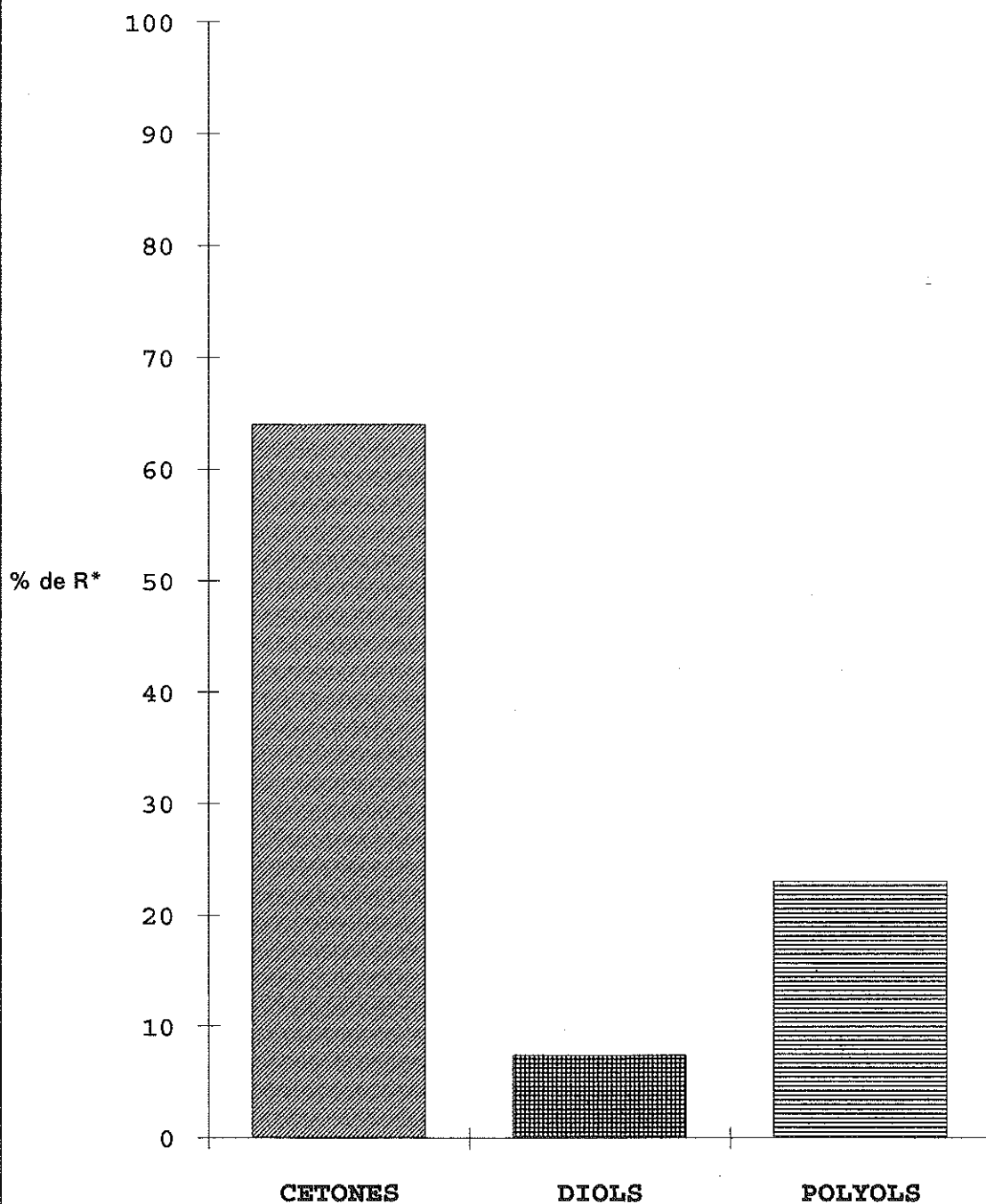


figure 11: Nature des stéroïdes libres

Chromatographie sur SEPHADEX LH20
Incubation B (T300 2)

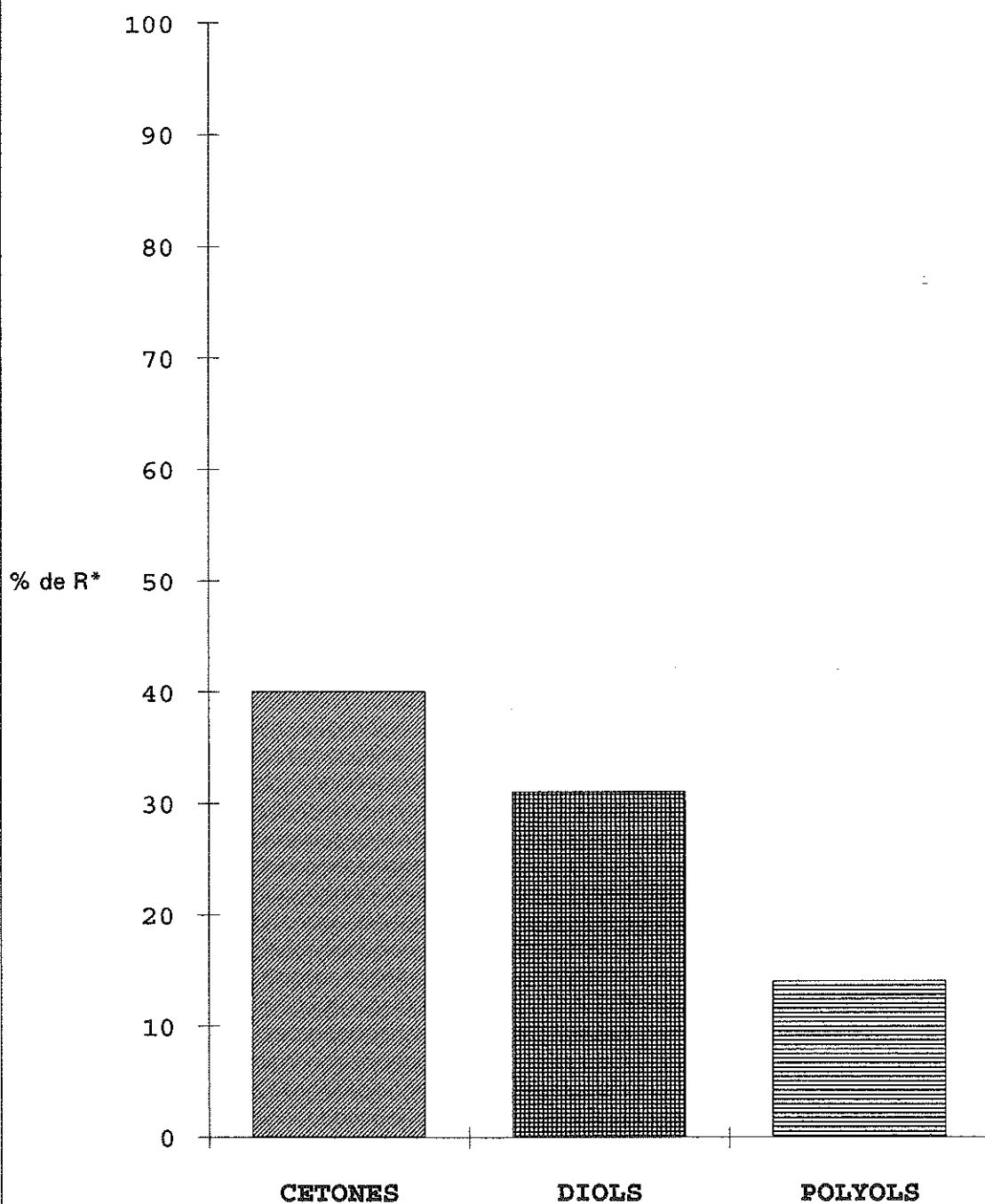


figure 11 bis: Nature des stéroïdes sulfoconjugués

5.5. Commentaires

5.5.1. Incubation A

La nature des stéroïdes libres, quel que soit le temps d'incubation, est essentiellement cétonique et monoalcool-monocétonique (moyenne de rendement = 91%). Les 9% restant sont sous forme de composés dihydroxylés.

L'élution des stéroïdes libres issus des glucuronoconjugués montre une répartition différente: 70% de cétones, monoalcool-monocétones et 30% de composés dihydroxylés.

Il n'y a pas d'évolution dans le temps. Il semblerait donc que les métabolites de la Nandrolone recueillis dans la fraction "diols" soient à l'origine des glucuronoconjugués.

5.5.2. Incubation B

Pour les libres, nous pouvons noter les mêmes observations que pour l'incubation A, mais ici, une quantité notable de radioactivité est retrouvée dans la fraction polyols.

Le niveau de radioactivité présent dans la fraction "sulfoconjugués" a permis de faire, après solvolysse, une séparation des stéroïdes sur SEPHADEX LH20® et d'évaluer leur répartition selon leur nature. On observe, comme pour les libres issus des glucuronoconjugués dans l'incubation A, la même répartition avec, en plus, la présence d'un pic dans la fraction polyols.

6. SEPARATION DES STEROIDES DE NATURE CETONIQUE, MONOALCOOLIQUE-MONOCETONIQUE SUR CELITE®

6.1. Introduction

Ces stéroïdes proviennent initialement des fractions de DEAE

SEPHADEX A25® et SEPHADEX LH20® contenant les stéroïdes libres.

Puis, après une séparation sur SEPHADEX LH20® (colonne de 0,8x10 cm), une chromatographie sur Chromatolithe A (MATÉRIEL-MÉTHODES-§2.4.) permet d'améliorer l'isolement de certaines molécules de nature cétonique .

6.2. Préparation des échantillons

Après évaporation à sec des fractions A issues des colonnes de SEPHADEX LH20® , les résidus sont repris par 1 ml d'Isooctane, agités durant 2 min et laissés reposer pendant au moins 48 heures avant d'être élués .

6.3. Elution

1 ml de solution organique contenant les stéroïdes est déposé en tête de colonne .En fonction de l'élution de la 19-NT tritiée, et par analogie avec l'élution des dérivés stéroïdiques en C19, trois fractions (F) sont ensuite récupérées:

F 1 :élution théorique de la Nor Δ 4 (2 à 8 ml)

F 2 :élution théorique de la NorDHT (9 à 15 ml)

F 3 :élution théorique de la 19-NT (18 à 24 ml)

6.4. Rendements de colonne

6.4.1. Prise des aliquotes

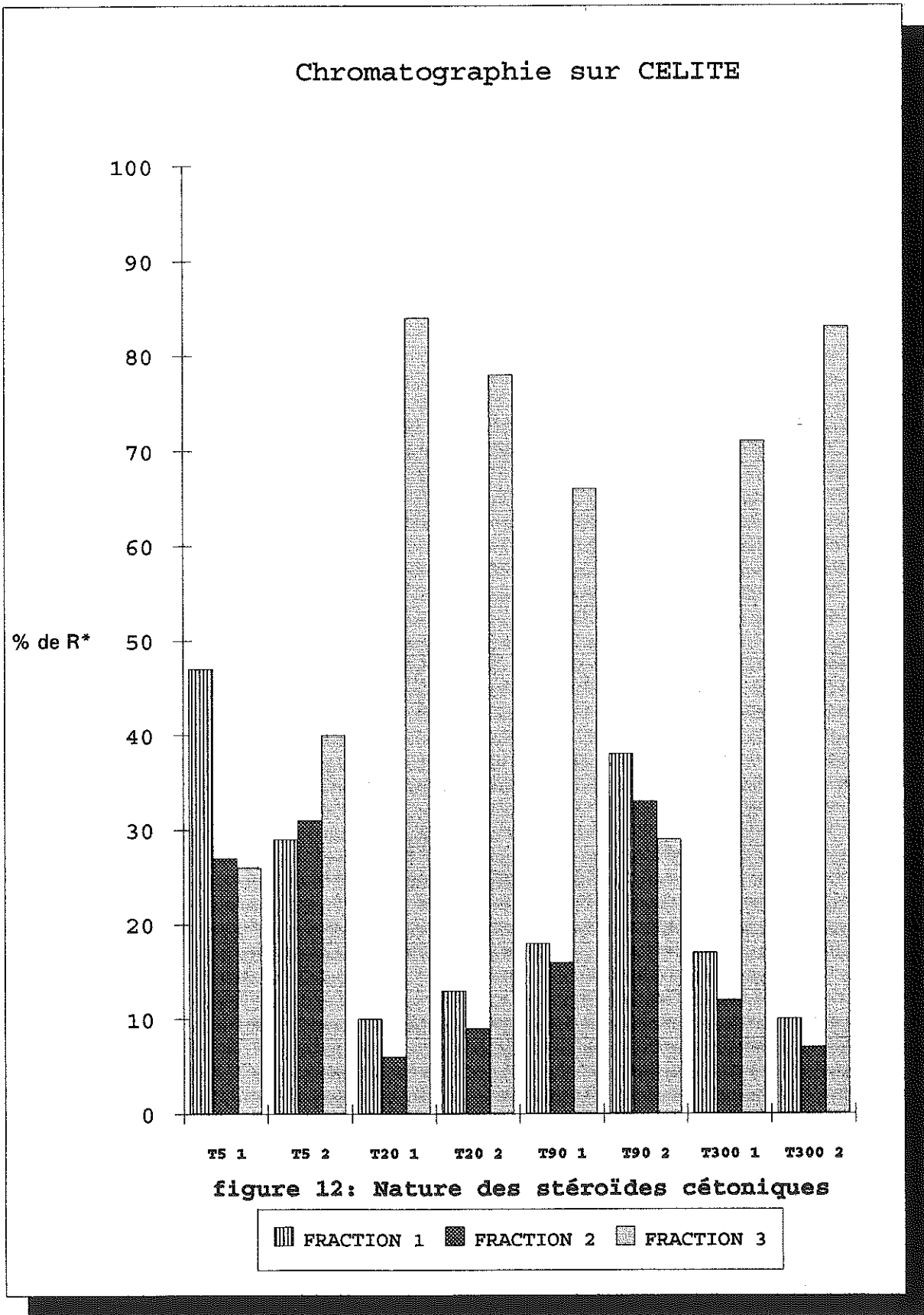
Deux aliquotes de 20 μ l sont prélevées sur la solution à éluer. Puis, après la chromatographie, chaque fraction est récupérée et évaporée à sec, à 60°C, sous un flux d'azote .Le résidu est repris par 1 ml d'éthanol dont on prélève 2x100 μ l pour effectuer un comptage radioactif .

6.4.2. Résultats

Les résultats sont reportés dans le Tableau IX et figure 12.

TABLEAU IX: Répartition de la radioactivité en fonction des formes cétoniques, après chromatographie sur CELITE

Référence des tubes		T5 1	T5 2	T20 1	T20 2	T90 1	T90 2	T300 1	T300 2
Rendements colonne (%)		>100	33	81	77	81	15	54	52
FRACTIONS % de R*	1	47	29	10	13	18	38	17	10
	2	27	31	6	9	16	33	12	7
	3	26	40	84	78	66	29	71	83



6.4.3. Commentaires

Les rendements non satisfaisants obtenus pour T5 2, T90 2, et T300 1 et 2, sont dûs à une mauvaise récupération des résidus secs des éluats dans l'éthanol .

De façon générale nous pouvons remarquer que la majorité de la radioactivité est retrouvée dans la fraction 3, correspondant théoriquement à l'élution de la 19-NT .

7. ANALYSE PAR COUPLAGE CG/SM

7.1. Introduction

Tous les échantillons précédemment obtenus sont traités selon le protocole indiqué dans les § 2.9 et 2.10. du chapitre MATERIEL-METHODES.

L'identification d'un stéroïde en chromatographie gazeuse , sera obtenue lorsque son temps de rétention relatif par rapport au standard externe, ainsi que son spectre de masse, coïncideront avec ceux d'un stéroïde de référence connu .

7.2. Incubation A

7.2.1. Traitement des stéroïdes cétoniques

Molécules recherchées:

- 19-NT
- Nor Δ_4

Conditions d'analyse:

CPG: colonne SE 54

15 ou 5°C/min de 180°C à 300°C

mode automatique, injections de 1 μ l

SM: fragmentométrie en simple ionset

ions recherchés	416	418	420
Nor Δ_4	majoritaire	minoritaire	absent
19-NT	absent	majoritaire	majoritaire

Résultats:

Le dépouillement des spectres a permis de construire le tableau suivant :

Temps (min)	1 ^{ère} colonne séparatrice	sensibilité pour 100 mm	Nor Δ_4	sensibilité pour 100 mm	19-NT
5	LH20	0	0	409500	+
	DEAE	14280	0	409500	+ + +
20	LH20	409500	+ + + +	409500	+ + + +
	DEAE	409500	+ + + +	409500	+ + + +
90	LH20	261100	0	409500	0
	DEAE	7600	+ +	7960	+
300	LH20	15100	+	409500	+ + + +
	DEAE	409500	+ + + +	409500	+ + + +

Commentaires:

L'absence de standard de NorDHT n'a pas permis d'interpréter des spectres obtenus à partir de la Fraction 2 de la colonne de Chromatholithe A. Par contre, de fortes quantités de 19-NT sont présentes à tous les temps, ainsi que de la Nor Δ_4 , particulièrement au bout de 20 min d'incubation.

7.2.2. Traitement des stéroïdes élués dans la fraction "diols" de LH20

Molécules recherchées:

Estrane-diols de configuration →
 5β 3α 17α
 5α 3β 17α
 5β 3α 17β

Conditions d'analyse:

CPG: colonne SE 54
 5°C/min de 180°C à 300°C
 mode automatique, injections de 1 μ l

SM: fragmentométrie en simple ionset

ions recherchés 242 422 416 418

Remarque: les m/z 416 et 418 ne correspondent pas à un état de fragmentation des stéroïdes dialcooliques étudiés, mais à des stéroïdes cétoniques éventuellement présents dans des échantillons analysés en même temps .

Résultats:

Le dépouillement des spectres a permis de construire le tableau suivant :

Temps (min)	1 ^{ère} colonne séparatrice	sensibilité pour 100 mm	diols		
			5 β 3 α 17 α	5 α 3 β 17 α	5 β 3 α 17 β
5	LH20	4000	traces	traces	traces
20	LH20	8610			+
	DEAE	87000	traces	traces	+
90	LH20	26480			++
	DEAE	5170	traces	traces	traces
300	LH20	9740	+ -	+ -	++
	DEAE	14360	+ -	+ -	+

7.2.3. Traitement des stéroïdes initialement conjugués

Conditions d'analyse:

CPG: colonne SE 54

5°C/min de 180°C à 300°C

mode automatique, injections de 1 μ l

SM: fragmentométrie en simple ionset

ions recherchés 242 422 (diols)
 416 418 (cétones)

Résultats:

Les résultats obtenus à partir du dépouillement des spectres sont reportés dans les tableaux , présentés ci-après .

Temps (min)	1 ^{ère} colonne séparatrice	sensibilité pour 100 mm	Nor Δ_4	19-NT	Diols
5	LH20	10400	+ -	+ + +	
20	LH20	6840	traces	+	traces
90	LH20	24680	+ -	+ + +	traces
	DEAE	409500	+ ?	+ + + +	
300	LH20	12280	+	+ +	+
	DEAE	6280	traces	+	traces

Temps (min)	1 ^{ère} colonne séparatrice	sensibilité pour 100 mm	diols		
			5 β 3 α 17 α	5 α 3 β 17 α	5 β 3 α 17 β
5	LH20	2000	+ -	+ -	+ -
20	DEAE	2000	0	traces	traces
90	LH20	2000	traces	traces	+
	DEAE	18400	traces	traces	traces
300	LH20	2000	traces	traces	traces
	DEAE	2000	0	0	0

Commentaires:

La présence de pics dont les fragments présentent les masses correspondant aux diols, s'explique par une tête de fraction de diols de LH20 dans la fraction cétone .

La nature d'un pic ayant les mêmes masses, temps de rétention, rapports de surfaces de pics que la Nor Δ_4 de référence, est à confirmer .

7.3. Incubation B

Conditions d'analyse:

Le protocole d'analyse par couplage CG/SM, qui est suivi ultérieurement, est identique pour tous les échantillons issus de la 2^{ème} incubation .

CPG: colonne OV 5

5°C/min de 180°C à 300°C

mode automatique, injections de 2 µl

SM: fragmentométrie en double ionset

ions recherchés:

1^{er} ionset → estrane-diols, Norandrostérone

242, 422, 407, 405

2^e ionset → cétones, 17β-E₂, 17α-E₂

416, 418, 420 ou 419, 285

Résultats: (cf figures 13 à 17)

Le dépouillement des spectres a permis de construire les deux tableaux, présentés ci-après :

FRACTION (DEAE A25)	Hydrolyse	NorΔ ₄	17β-NT	17α-NT	Norandrostérone
Libres		++	++++	traces	0
Glycuro	β-glu	0	+	traces	0
	SHP	0	+++	++	0
Sulfo	SHP	0	±	0	0
	Solvolyse	0	±	0	traces

Remarque:

Un métabolite coélué avec l'estradiol-17β dans la fraction libre, a été isolé.

FRACTION	Hydrolyse	diols		
		5β 3α 17α	5α 3β 17α	5β 3α 17β
Libres (DEAE A25)				+
Glycuro (DEAE A25)	β-glu	+		++
	SHP			++
Sulfo (DEAE A25)	SHP		+	
	Solvolyse		+	
Disulfo (LH20)	Solvolyse		traces	traces

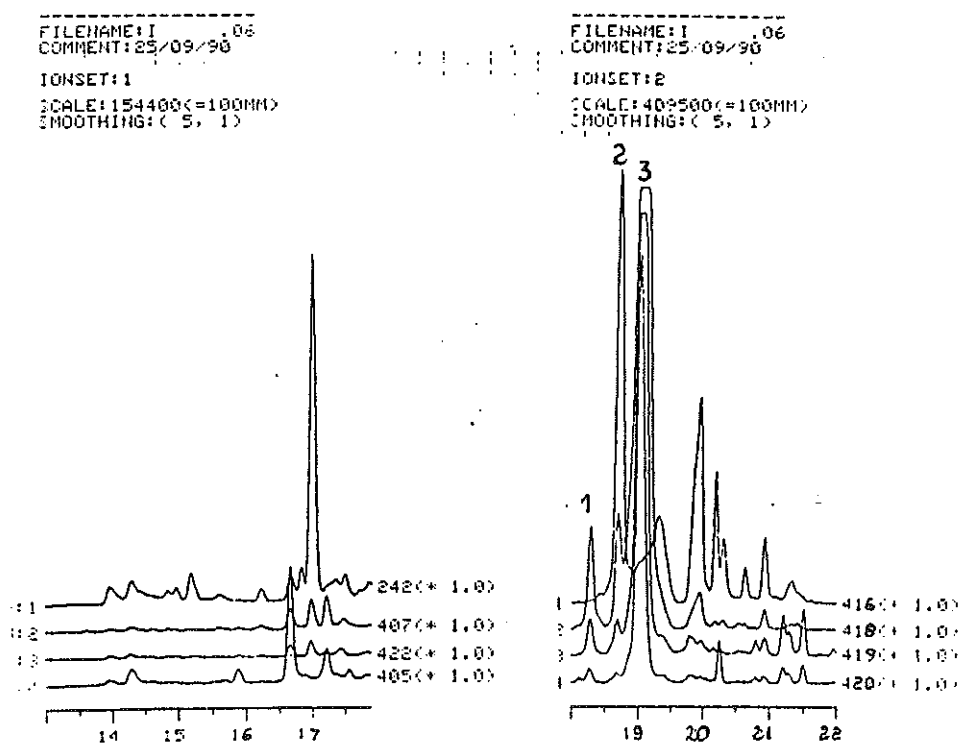


figure 13: Incubation B
 fragmentogramme en double ionset des Libres
 sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
 1-17 α -NT
 2-Nor Δ_4
 3-17 β -NT

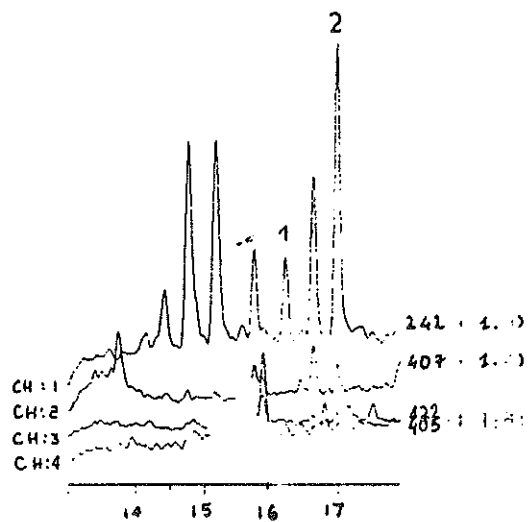


figure 14: Incubation B
fragmentogramme en double ionset des
Sulfoconjugués traités par solvolysse
sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
1-5 α -estrane-3 β ,17 α -diol
2-Norandrostérone

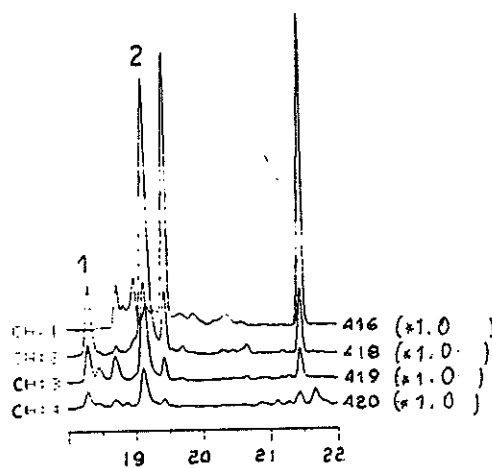


figure 15: Incubation B
fragmentogramme en double ionset des
Glucuronoconjugués traités par le SHP
sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
1-17 α -NT
2-17 β -NT

 FILENAME: I 07
 COMMENT: 25/09/90
 ICHMET: 1
 SCALE: 345800*100MM
 SMOOTHING: (5, 1)

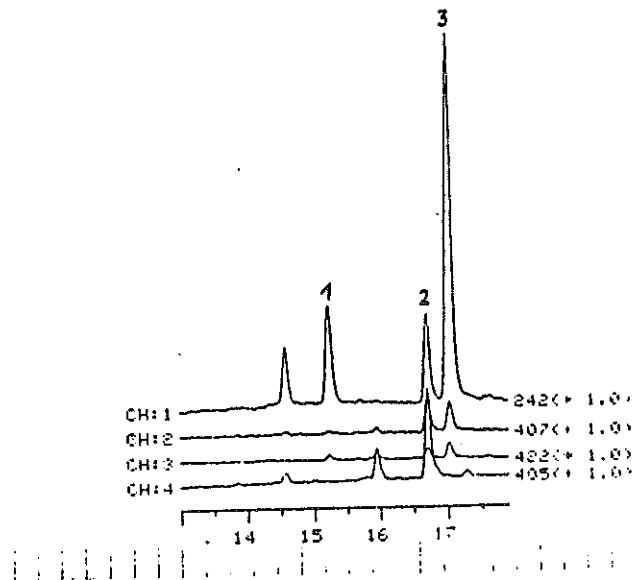


figure 16: Incubation B
 fragmentogramme en double ionset des
 Glucuronoconjugués traités par la β -glu.
 sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
 1+2-Estrane-diols
 3-Norandrostérone

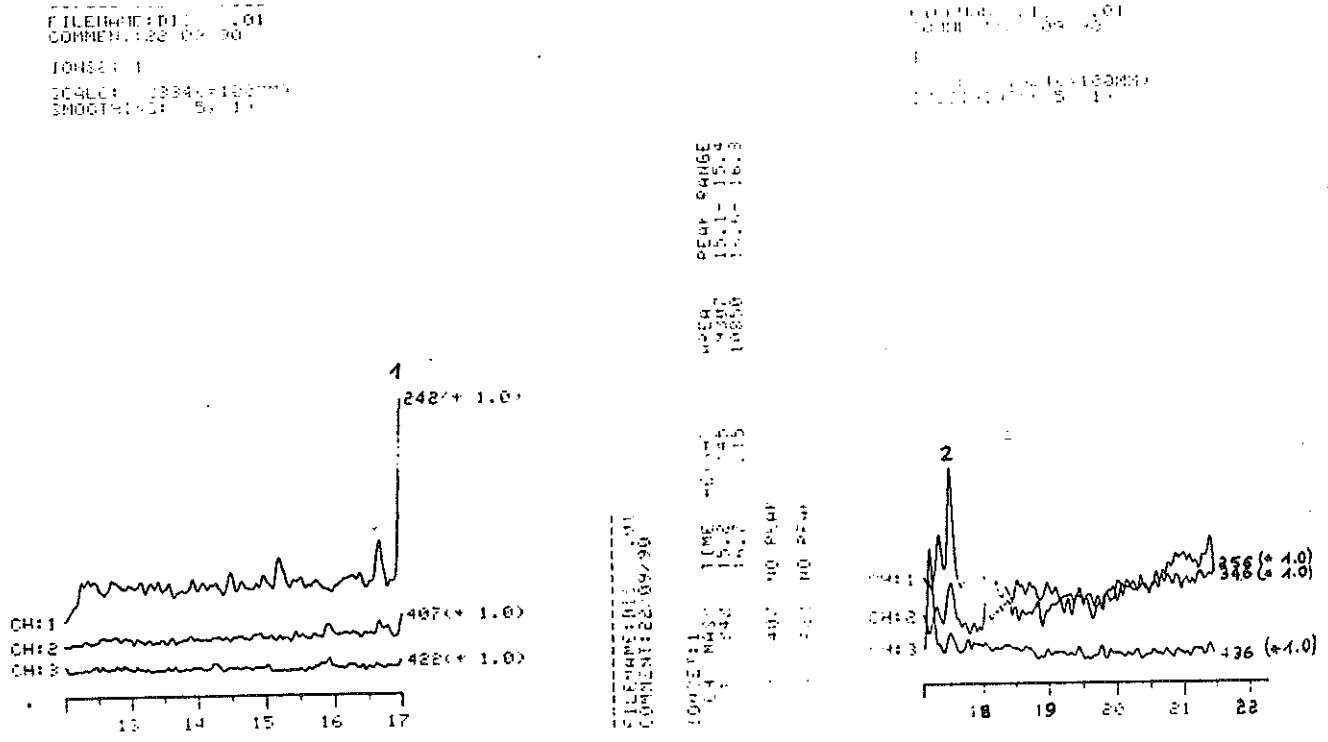


figure 17: Incubation B
 fragmentogramme en double ionset des
 Disulfoconjugués sous forme de dérivés
 di-O-TMS

légende:
 1-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol
 2-17 α -estradiol (?)

7.4. Résultats (cf figures 18 à 26)

7.4.1. Nature des stéroïdes obtenus

7.4.1.1. Fraction libre

On constate la présence d'un composé dihydroxylé de la série estrane avec un temps de rétention identique à celui du 5β -estrane- $3\alpha,17\beta$ -diol. Dans la fraction cétone isolée, on retrouve bien sûr, la 19-NT non transformée, ainsi que des traces de 19-Norépitestostérone.

7.4.1.2. Fraction glucuronoconjuguée

-Hydrolyse par la β -glucuronidase d'E.Coli

Dans la fraction cétone des stéroïdes libérés, la 19-NT non transformée est présente, de même que son épimère α en faible quantité, toutefois. Par contre des stéroïdes dihydroxylés, ayant les même temps de rétention que les stéroïdes 5β -estrane- $3\alpha,17\alpha$ -diol et 5β -estrane- $3\alpha,17\beta$ -diol, sont retrouvés en quantités appréciables.

-Hydrolyse par le SHP

Les stéroïdes dihydroxylés mis en évidence sont semblables à ceux obtenus par action de la β -glucuronidase d'E.Coli. Cependant dans la fraction cétone, la 19-NT et son épimère α sont présents en plus grande quantité que dans la fraction cétone obtenue après action de la β -glucuronidase d'E.Coli.

7.4.1.3. Fraction sulfoconjuguée

Après solvololyse, hydrolyse par le SHP, seul est observé dans la fraction diol, un stéroïde, dont le temps de rétention en CG/SM est identique au 5α -estrane- $3\beta,17\alpha$ -diol. Dans la fraction cétone, on peut noter la présence de 19-NT.

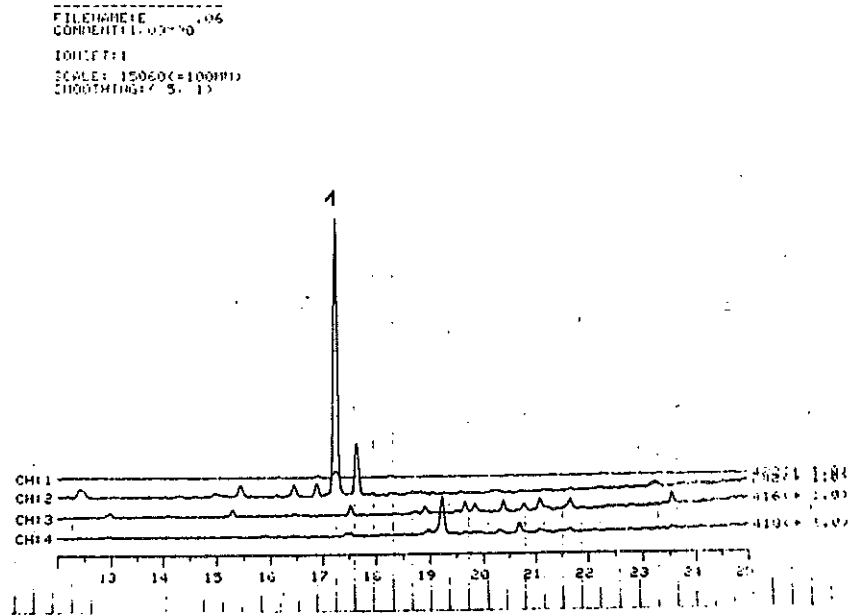


figure 18: Incubation A, t20
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction DIOLS-Libres sous forme de dérivés
 di-O-TMS

légende:
 1-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol

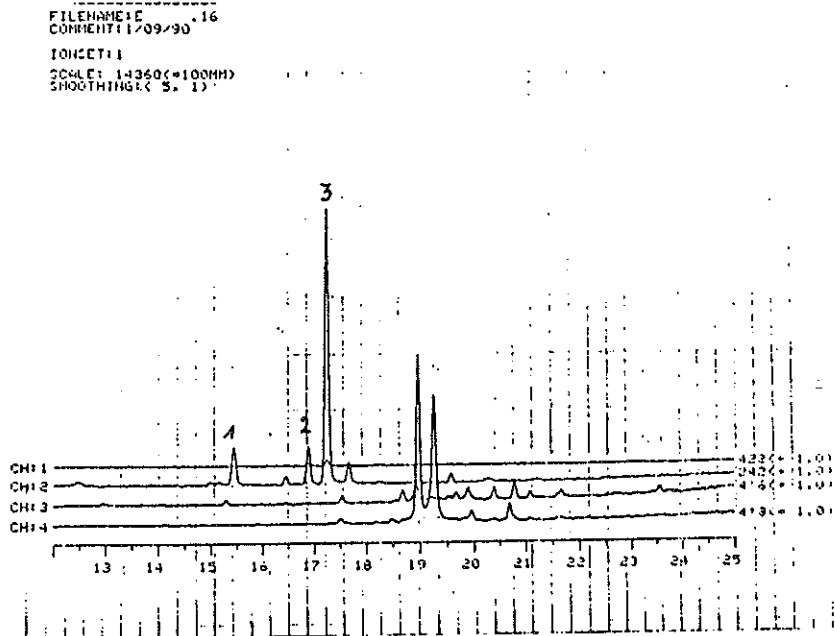


figure 19: Incubation A, t300
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction DIOLS-Libres sous forme de dérivés
 di-O-TMS

légende:

- 1-5 β -estrane-3 α ,17 α -diol
- 2-5 α -estrane-3 β ,17 α -diol
- 3-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol

FILENAME: E .09
COMMENT: 1/09/90
IONSET: 1
SCALE: 264800(=100MM)
SMOOTHING: (5, 1)

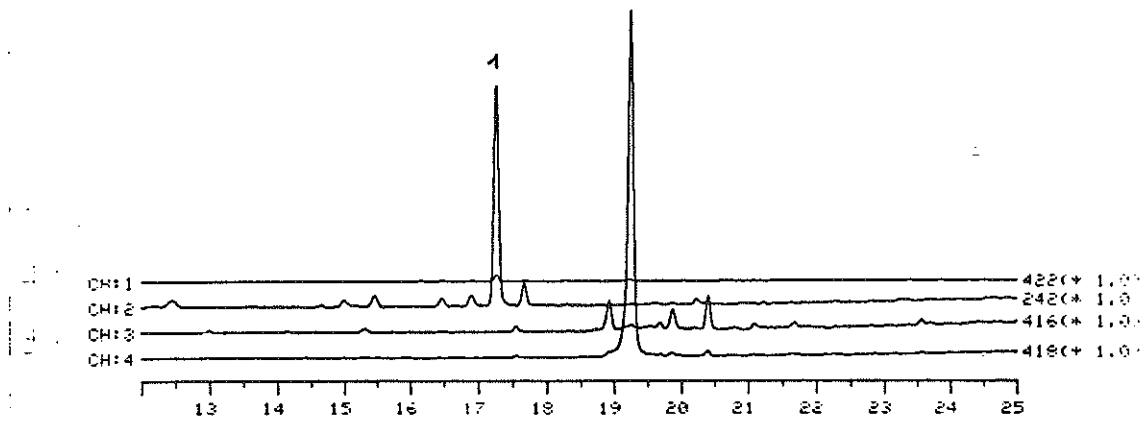


figure 20: Incubation A, t90
fragmentogramme en simple ionset de la
fraction DIOLS-Libres sous forme de dérivés
di-O-TMS

légende:
1-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol

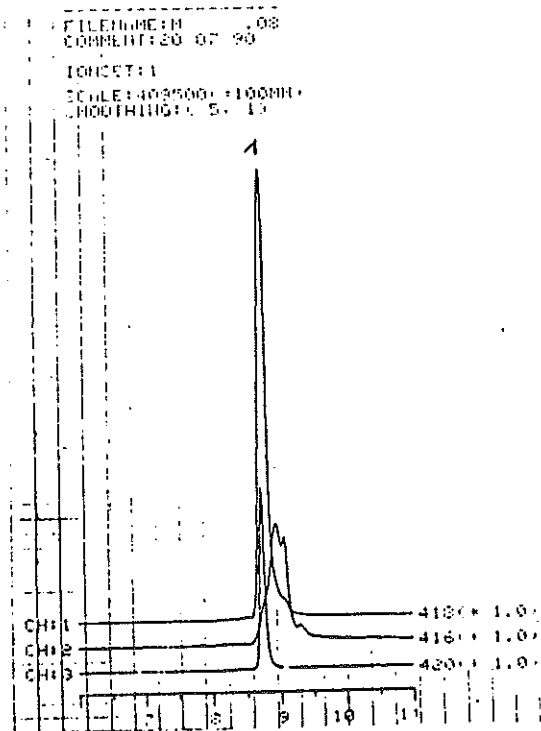


figure 21: Incubation A, t300
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction 3 de CELITE® sous forme de dérivés
 di-O-TMS . 15°C/min

légende:
 1-17 β -NT

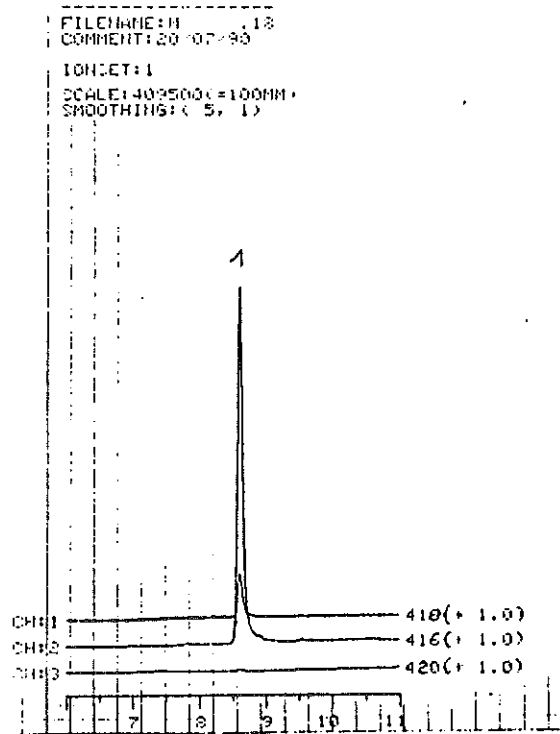


figure 22: Incubation A, t300
fragmentogramme en simple ionset de la
fraction 1 de CELITE® sous forme de dérivés
di-O-TMS .15°C/min

légende:
1-Nor Δ_4

FILENAME: E
 COMMENT: 1/09/90
 F0HSET: 1
 SCANS: 10400 (=100MH)
 SMOOTHING: (5, 1)

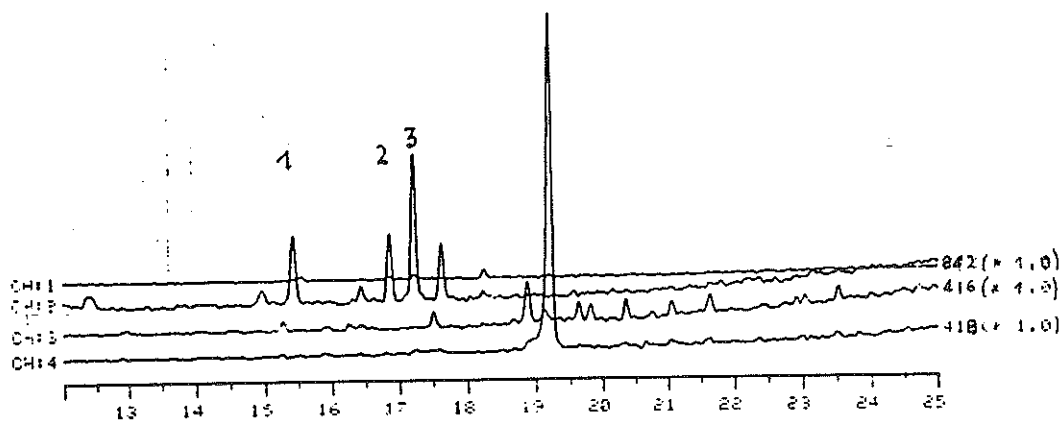


figure 23: Incubation A, t5
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction DIOLS-Glucuronocjugués sous forme
 de dérivés di-O-TMS

légende:

- 1-5 β -estrane-3 α ,17 α -diol
- 2-5 α -estrane-3 β ,17 α -diol
- 3-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol

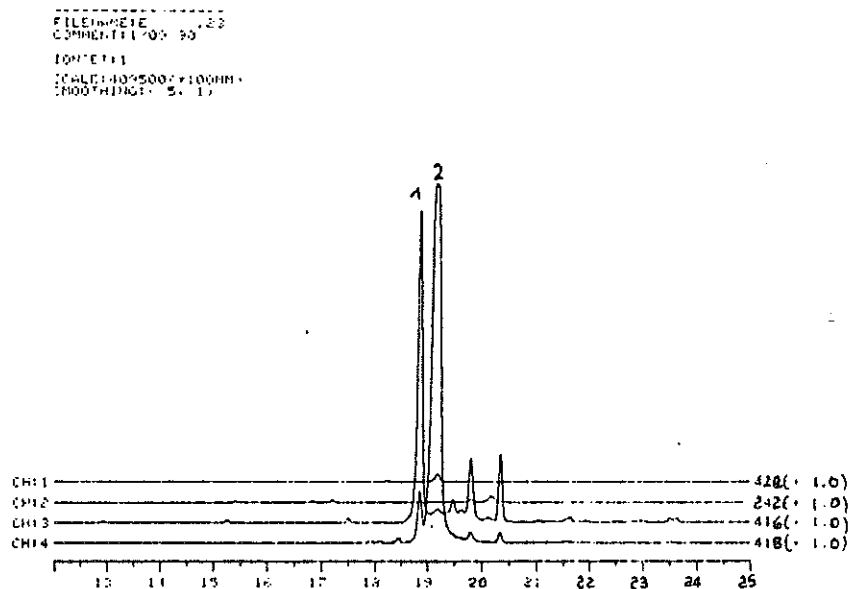


figure 24: Incubation A, t90
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction 3 de CELITE®-Glucuronoconjugués
 sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:

1-Nor Δ_4

2-17 β -NT

FILENAME: E...13
COMMENT: 1-09-98

IONSET: 1

SCALE: (18400) (1.000)
SMOOTHING: (5)

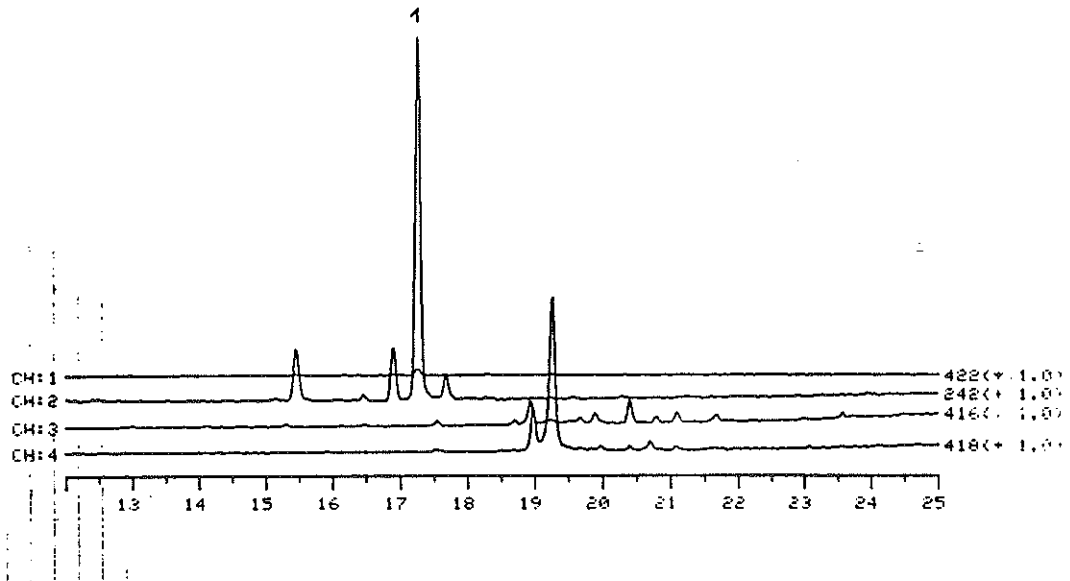


figure 25: Incubation A, t90
fragmentogramme en simple ionset de la
fraction DIOLS-Glucuronoconjugués sous
forme de dérivés di-O-TMS

légende:

1-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol

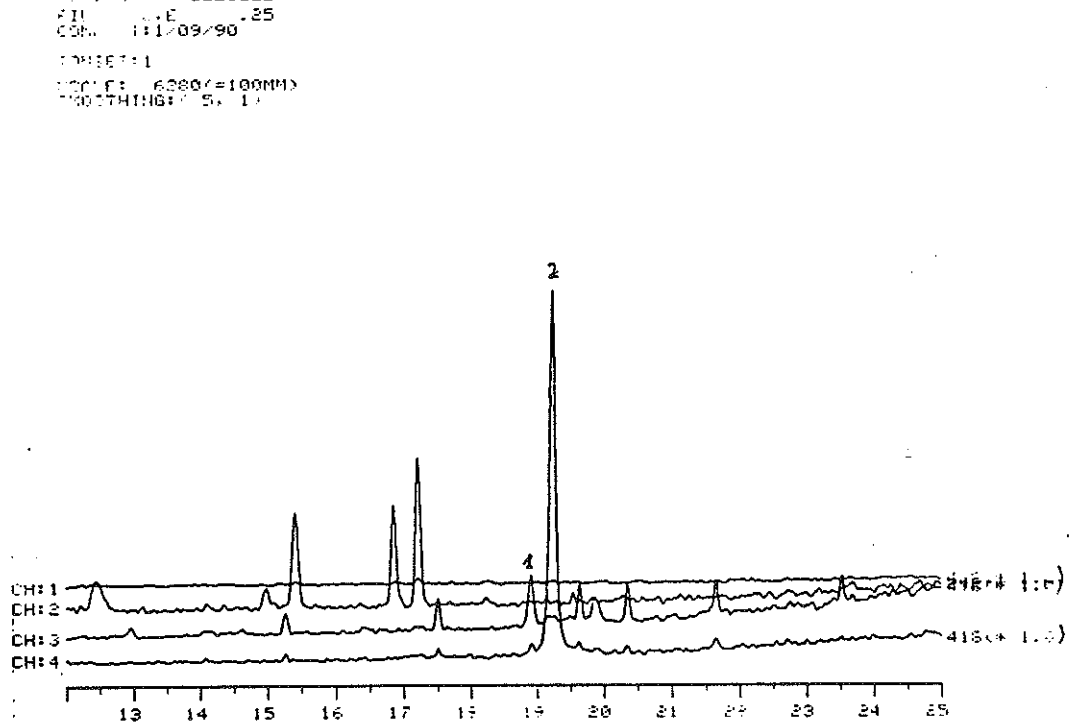


figure 26: Incubation A, t300
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction CETONES-Glucuronoconjugués
 sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
 1-Nor Δ_4
 2-17 β -NT

8. DISCUSSION

8.1. Incubation

En utilisant un homogénat de foie de bovin et un traceur radioactif, nous montrons qu'il est possible de déterminer rapidement les métabolites d'un xénobiotique, ainsi que leurs modes de conjugaison. Mais, pour obtenir des conjugués en quantité notable, il est nécessaire de bien définir le milieu d'incubation. Dans nos conditions, et pour étudier le métabolisme de la 19-Nortestostérone, nous montrons qu'il faut opérer en milieu réducteur (NADPH et NADH), et en présence d'UDPGA. La réduction de la fonction $\Delta_4,3$ céto aboutit à la formation de composés dihydroxylés, qui peuvent ensuite être glucuronoconjugués ou sulfoconjugués, grâce aux activités transférases hépatiques. Dans ces conditions d'incubation il est alors possible de déterminer les modes d'hydrolyse les mieux adaptés pour étudier ensuite la nature des métabolites formés.

8.2. Conjugaison

Seule l'hydrolyse par le SHP permet de libérer de la 19-NT et son épimère de la fraction glucuronoconjuguée.

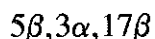
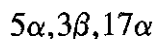
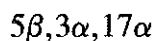
Les estrane-diols glucuronoconjugués sont hydrolysés aussi bien sous l'action de la β -glucuronidase d'E. Coli que sous l'action du SHP.

Il faut remarquer que la solvolysse et l'hydrolyse par le SHP libèrent de la fraction sulfate un estrane-diol, qui, compte tenu de la spécificité d'action des sulfatases présentes dans le SHP, aurait une configuration $5\alpha,3\beta$. Dans nos conditions de chromatographie en CG/SM ce stéroïde pourrait être le 5α -estrane- $3\beta,17\alpha$ -diol. Ce stéroïde aurait été identifié par différents auteurs (17,18), dans différents milieux, comme étant un métabolite de la 19-Nortestostérone.

8.3. Nature des métabolites (cf Tableau X)

Dans la fraction cétone des stéroïdes libres et glucuronoconjugués, il est possible de mettre en évidence la 19-NT non transformée, ainsi que son épimère. La formation de cet épimère est en accord avec des travaux antérieurs, où des auteurs ont montré la présence de 19-Norépitestostérone dans les urines de bovins (1,17) et les fécès (16).

La formation d'estrane-diols est réalisée dès les premières 20 min d'incubation. Après hydrolyse, purification et CG/SM, on peut noter la présence d'au moins trois estrane-diols ayant les configurations :



Mais, compte-tenu des conditions de chromatographie et des propriétés chromatographiques des différents épimères (8), il n'est pas possible d'affirmer avec certitude la configuration spatiale de ces trois estrane-diols. Toutefois, le protocole expérimental suivi a permis de montrer, que l'estrane-diol formé en quantité la plus importante, avait la configuration $5\alpha,3\beta,17\beta$ ou $5\beta,3\alpha,17\beta$, et non $5\alpha,3\beta,17\alpha$ comme il est obtenu à partir de milieux biologiques (17).

Des travaux complémentaires sont donc nécessaires, pour déterminer d'une façon certaine la nature de ces estrane-diols formés.

Au travers de ces résultats préliminaires, il semble intéressant de noter, que ce modèle permet d'imaginer la mise au point d'un profil d'estrane-diols issus de la 19-NT, transposable aux urines et utilisable en routine pour la recherche de l'utilisation frauduleuse de la Nandrolone chez les bovins.

TABLEAU X: Récapitulation de l'origine et de la structure
des métabolites hépatiques de la 19-NT, chez le bovin

FRACTION	HYDROLYSE	DIOLS			17 α - NT	17 β - NT
		5 β - 3 α , 17 α	5 α - 3 β , 17 α	5 β - 3 α , 17 β		
LIBRES				+	traces	>>>>
GLUCURO	β -GLU	+		>>	traces	>
	SHP			>>	>>	>>>
SULFO	SHP		+			+
	solvolysé		+			
DISULFO	solvolysé		traces	traces		

TROISIEME PARTIE

RECHERCHE DES METABOLITES DE LA 19-NORTESTOSTERONE DANS LES URINES DE CHEVAUX

1. INTRODUCTION

L'utilisation des anabolisants chez les chevaux de course a suscité de nombreux travaux scientifiques, notamment dans la recherche de la 19-NT et/ou de ses métabolites dans des échantillons urinaires . (2,3,4,5,6,7,8)

Les conditions analytiques difficiles imposées par les urines de chevaux (molarité importante, précipitation des sels, oxydation rapide), nécessitent l'élaboration de plusieurs modèles expérimentaux d'analyse des dérivés de la 19-NT, dans les urines de chevaux éliminant des métabolites "Nor" (étalon), ou n'en éliminant pas (hongre) .

Pour cela, des urines d'étalon et de hongre ont été recueillies et traitées selon des protocoles analytiques inspirés de ceux utilisés pour les bovins détaillés dans les §2.2. et 2.3. ci-après .

2. ESSAIS SUR LES URINES D'ETALON

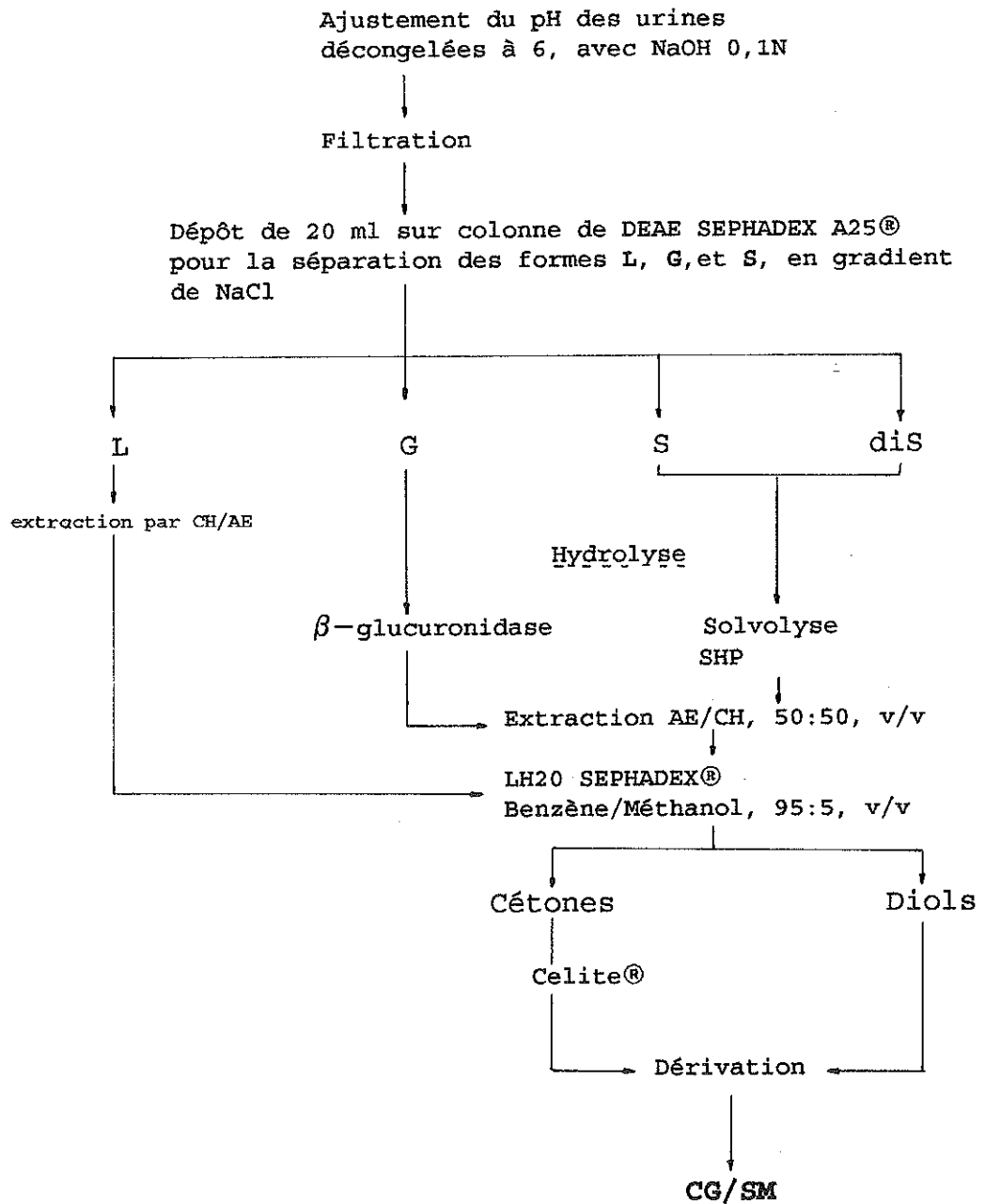
2.1. Préparation des urines

Dans l'heure qui suit leur recueil, les urines sont précipitées à température ambiante, filtrées, et ajustées à pH 5 . La conservation est assurée par une congélation à -20°C .

Les urines sont décongelées à température ambiante avant chaque manipulation .

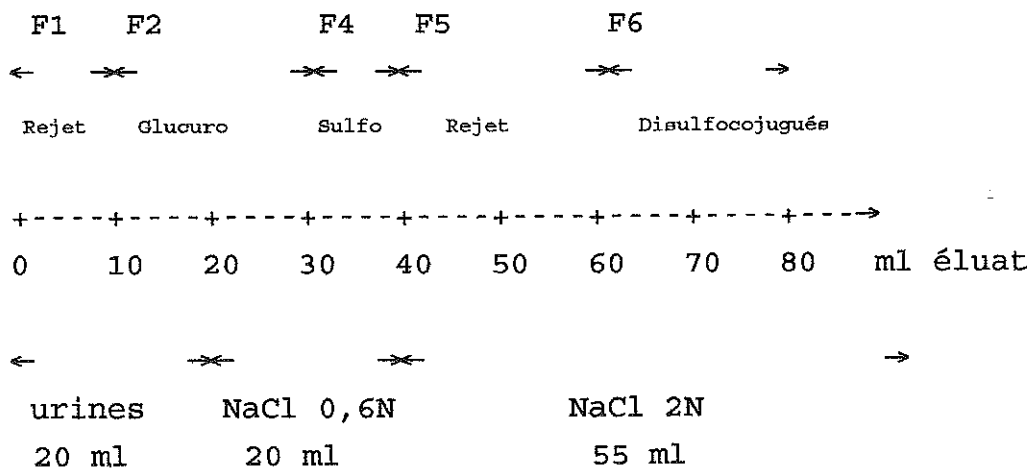
2.2. Protocole 1

2.2.1. Schéma



2.2.2. Séparation des formes conjuguées par chromatographie sur gel de DEAE SEPHADEX A25® , colonne 0,8x25 cm

20 ml d'urines d'étalon sont éluées selon le schéma suivant (9) :



F = Fraction

2.2.3. Hydrolyse

Les fractions 2, 4, 6, sont récupérées et traitées respectivement par la β -glucuronidase, SHP/solvolyse et SHP/solvolyse selon les méthodes décrites au § 2.6. du chapitre MATERIEL-METHODES .

2.2.4. Extraction

Les stéroïdes ainsi libérés sont extraits de la phase aqueuse par un mélange solvant AE/CH, 50:50, v/v . Les extraits sont ensuite évaporés à sec et repris par 300 μ l de Benzène/Méthanol, 95:5, v/v .

2.2.5. Séparation des formes cétoniques
et dihydroxylées sur gel de SEPHADEX
LH20® , colonne 0,8x10 cm

Les extraits sont traités selon le protocole décrit au §
2.2.1. du chapitre MATERIEL-METHODES.

2.2.6. Séparation des formes cétoniques
par chromatographie sur CELITE®

cf §2.4. du chapitre MATERIEL-METHODES

2.2.7. Silylation

cf §2.2.9.1. du chapitre MATERIEL-METHODES

2.2.8. Analyse par couplage CG/SM

Cf §2.9. et 2.10. du chapitre MATERIEL-METHODES

2.2.8.1. Conditions opératoires

Molécules recherchées:

- diols de la série estrane
- cétones de la série estrane

Conditions d'analyse:

CPG: colonne OV5

15°C/min de 180°C à 300°C

mode automatique, injections de 1 µl

SM: fragmentométrie en simple ionset

ions recherchés:

	m/z	
estrane-diols	242	422
dérivés cétoniques de la 19-NT	416	418

2.2.8.2. Résultats (cf figure 27)

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Fraction	Hydrolyse	Diols			19-NT		Nor Δ_4
		5 β 3 α 17 α	5 α 3 β 17 β	5 β 3 α 17 β	17 α	17 β	
G	β -glu	0	0	0	0	0	+++
S	solvolyse	0	0	0	t	+	+++ (1)
	SHP	0	0	0	t	+	+++
dis	solvolyse	0	0	0	0	0	0

légende:

t= traces

β -glu= β -glucuronidase

(1) pic de m/z 416 très important, à un temps de rétention supérieur à celui de la 17 β -NT .

Nature des stéroïdes obtenus

-Fraction des glucuronoconjugués

Seul un composé ayant le même temps de rétention que la Nor Δ_4 a pu être mis en évidence .De même, la présence d'un composé (mêmes m/z) de temps de rétention égal à 15,9 min est notée mais, faute de standard correspondant, il n'a pu être identifié .

-Fraction des sulfoconjugués

Les deux modes d'hydrolyse de la fraction sulfoconjuguée ont permis de libérer de la 17 β -NT en faibles quantités, ainsi qu'un autre composé dont le temps de rétention est identique à la Nor Δ_4 .



figure 27: Etalon, Protocole 1
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction 1 de CELITE®-Sulfoconjugués
 traités par le SHP sous forme de dérivés
 di-O-TMS

légende:
 1-Nor Δ_4

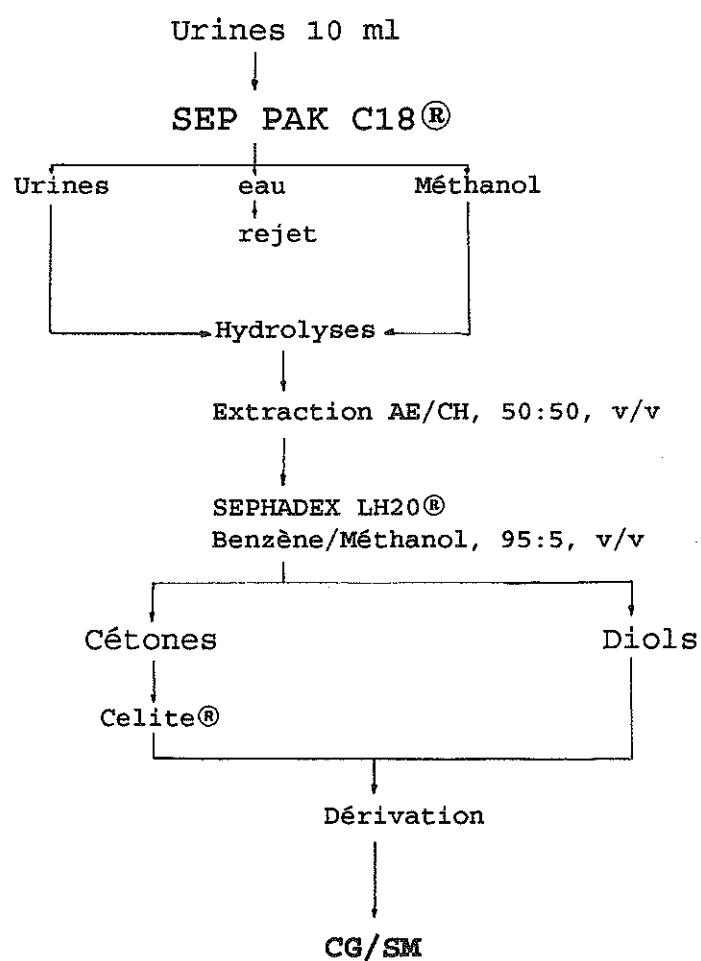
-Fraction des disulfoconjugués

Aucune molécule recherchée n'a pu être mise en évidence .

Il est à remarquer qu'aucun des estrane-diols attendus n'a pu être caractérisé, et ceci quelle que soit la fraction chromatographique récupérée .

2.3. Protocole 2

2.3.1. Schéma



2.3.2. Purification des urines par chromatographie sur SEP PAK C18®

Cf §2.5. du chapitre MATERIEL-METHODES

2.3.3. Hydrolyse des différentes fractions

Les fractions méthanolique et urinaire sont traitées chacune selon les trois principes d'hydrolyse décrits au §2.6. du chapitre MATERIEL-METHODES .

2.3.4. Extraction

Les stéroïdes ainsi libérés sont extraits de la phase aqueuse par un mélange solvant AE/CH, 50:50, v/v .Les extraits sont ensuite évaporés à sec et repris par 300 μ l de Benzène/Méthanol, 95:5, v/v .

2.3.5. Séparation des formes cétoniques et dihydroxylées sur gel de SEPHADEX LH20® , colonne 0,8x10 cm

Les extraits sont traités selon le protocole décrit au §2.2.1. du chapitre MATERIEL-METHODES .

2.3.6. Séparation des formes cétoniques par chromatographie sur CELITE®

cf §2.4. du chapitre MATERIEL-METHODES .

2.3.7. Silylation

cf §2.2.9.1. du chapitre MATERIEL-METHODES

2.3.8. Analyse par couplage CG/SM

Cf §2.9. et 2.10. du chapitre MATERIEL-METHODES

2.3.8.1. Conditions opératoires

Molécules recherchées:

- diols de la série estrane
- cétones de la série estrane

Conditions d'analyse:

CPG: colonne OV5

15°C/min de 180°C à 300°C

mode automatique, injections de 1 µl

SM: fragmentométrie en simple ionset

ions recherchés:

	m/z	
estrane-diols	242	422
dérivés cétoniques de la 19-NT	416	418

2.3.8.2. Résultats (cf figure 28)

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Fraction	Hydrolyse	Diols			19-NT		Nor Δ_4
		5 β 3 α 17 α	5 α 3 β 17 β	5 β 3 α 17 β	17 α	17 β	
G	β -glu	0	0	0	+	+++	±
S	solvolyse	0	0	0	+	+++	±
	SHP	0	0	0	0	0	0
diS	solvolyse	0	0	0	0	0	0

légende:

 β -glu= β -glucuronidase

FILENAME:11-2010.01
 COMMENT:21-08-90
 IONSET:1
 SCALE:1402500(+10000)
 SMOOTHING:7 5 1

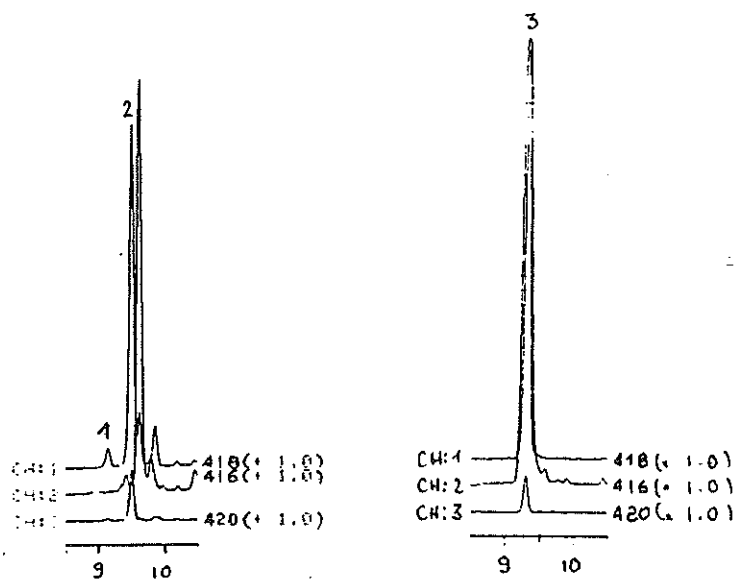


figure 28: Etalon, Protocole 2
 fragmentogramme en simple ionset de la
 fraction 3(A) et 1(B) de CELITE®,
 Sulfoconjugués sous forme de dérivés
 di-O-TMS

légende:
 1-17 α -NT
 2-17 β -NT
 3-Nor Δ_4

Nature des stéroïdes obtenus

-Fraction des glucuronoconjugués

On retrouve en quantité importante la 19-NT et des traces de son épimère α . Un composé, dont le temps de rétention et le fragment ionique m/z 416 sont identiques à ceux de la $Nor\Delta_4$, est toujours présent, mais en faible proportion.

-Fraction des sulfoconjugués

Les mêmes stéroïdes que dans la fraction précédente sont retrouvés; cependant ils seraient seulement libérés de l'aglycone par solvololyse.

-Fraction des disulfoconjugués

Aucun stéroïde n'a été décelé dans les échantillons issus de cette fraction.

Ce mode de purification n'a, lui aussi, pas permis de caractériser des estrane-diols conformes aux molécules étalons.

2.4. Discussion

Il semblerait donc d'après ces résultats, que la 17β -Nortestostérone soit le dérivé "NOR" le plus important chez l'étalon, surtout sous la forme de sulfoconjugué (2,7). La présence en quantité non négligeable de son épimère α est à noter (3,7).

Un composé de même nature que la $Nor\Delta_4$ (même temps de rétention et m/z à 416) est présent en quantité élevée, aussi bien sous formes de glucurono que de sulfoconjugué. Or, il est justement difficile d'affirmer la véritable nature de cette molécule car elle ne présente théoriquement pas une structure favorable à la conjugaison.

De plus, ces deux techniques d'analyse se révèlent être insuffisantes dans le cas de la détection des estrane-diols:

- purification insuffisante ou inadaptée
- seuil de sensibilité trop faible

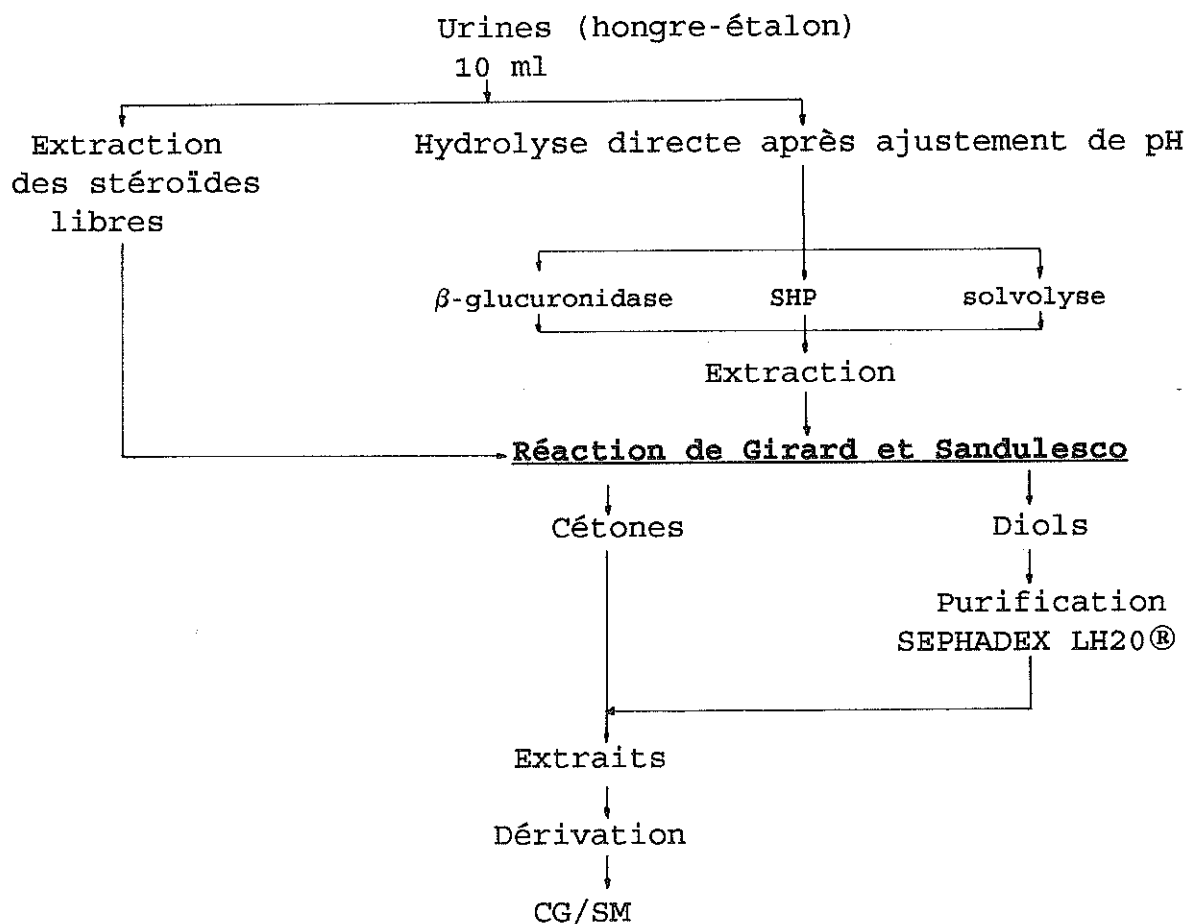
Il serait donc intéressant d'utiliser une méthode, où l'on concentre mieux les extraits urinaires (forte quantité de produits recherchés sous un faible volume), ainsi qu'une purification préliminaire plus sélective, selon la nature des composés (séparation diols/cétones) .

3. ESSAIS SUR LES URINES DE HONGRE ET D'ÉTALON

3.1. Préparation des urines

Les urines de hongre et d'étalon sont traitées de la même manière qu'au § 2.1. de cette partie .

3.2. Protocole expérimental



3.3.Extraction directe des stéroïdes libres

Les stéroïdes libres présents dans les urines sont extraits directement par de l'Acétate d'éthyle .Les solutions organiques obtenues sont ensuite évaporées à sec, sous flux d'azote .

3.4.Hydrolyse des formes stéroïdiques conjuguées

Après avoir ajusté les échantillons urinaires au pH adéquat, ceux-ci subissent les trois modes d'hydrolyse décrits au §2.6. du chapitre MATERIEL-METHODES .

3.5.Extraction

Les stéroïdes ainsi libérés de leur fraction conjuguée sont extraits de la phase aqueuse s'il y a lieu, comme il est décrit au § 2.8. du chapitre MATERIEL-METHODES .

3.6.Séparation des formes cétoniques et dihydroxylées par la méthode de Girard et Sandulesco

Cet ancien procédé de purification et de séparation des stéroïdes, dont Mediema s'est servi chez le lapin (19), est appliqué aux extraits selon les modalités du § 2.7. du chapitre MATERIEL-METHODES .

Les deux fractions recueillies après cette réaction contiennent théoriquement d'une part les stéroïdes cétoniques et, d'autre part, les stéroïdes dialcooliques .Ces derniers seront purifiés et séparés des composants urinaires (pigments ...) par une chromatographie sur gel de SEPHADEX LH20® (§2.2.1. chap. MATERIEL-METHODES) .

3.7.Dérivation

Cf § 2.9.1. du chapitre MATERIEL-METHODES

3.8.Analyse par couplage CG/SM

3.8.1.Conditions opératoires

Molécules recherchées:

- diols des séries estrane et androstane
- cétones des séries estrane et androstane

Conditions d'analyse:

CPG: colonne

5°C/min de 180°C à 300°C

mode automatique, injections de 2 μ l

SM: fragmentométrie en double ionset

ions recherchés	m/z
estrane-diols	422 407 242 405
androstane-diols	436 346
norandrostérone	405 315 225
androstérone	434 435 329 239
19-NT, Nor Δ_4 , 17 β / α -estradiol	416 418 420 285

3.8.2.résultats (figures 29 à 31)

Le dépouillement des spectres a permis d'établir le tableau présenté page suivante .

Cheval	Hydrolyse	Diols		Cétones	
		estrans	androstanes	Norandrostérone*	androstérone
E	Libres	+ (5 β 3 α 17 α)	0	+	0
H		0	0	0	0
E	β -glu	+ (5 β 3 α 17 α)	pic T _r =17,5	0	0
H		0	"	0	+
E	SHP	0	"	+	0
H		0	0	±	±
E	Solvolyse	0	traces 5 β 3 α 17 β 5 α 3 α 17 β	+	0
H		0	0	0	0

légende:

H= hongre

E= étalon

*=présence à l'état de traces de 17 β -NT et de 17 β -estradiol chez l'étalon

Chez le Hongre:

On ne retrouve pas de composé de la série "Nor"(ou estrane) chez cet animal, hormis des traces de norandrostérone (l'origine des urines n'étant pas connue, le cheval a pu recevoir de la 19-NT) .

La dégradation de la testostérone conduit à la formation d'une quantité peu importante d'androstérone qui a été mise en évidence surtout dans les fractions glucurono et sulfoconjuguées, et en très faible proportion dans les libres.

Chez l'étalon:

.Composés dihydroxylés

Une abondance relative des fragments d'un métabolite dihydroxylé de la série estrane, correspondant au standard de configuration 5 β 3 α 17 α (même temps de rétention, m/z

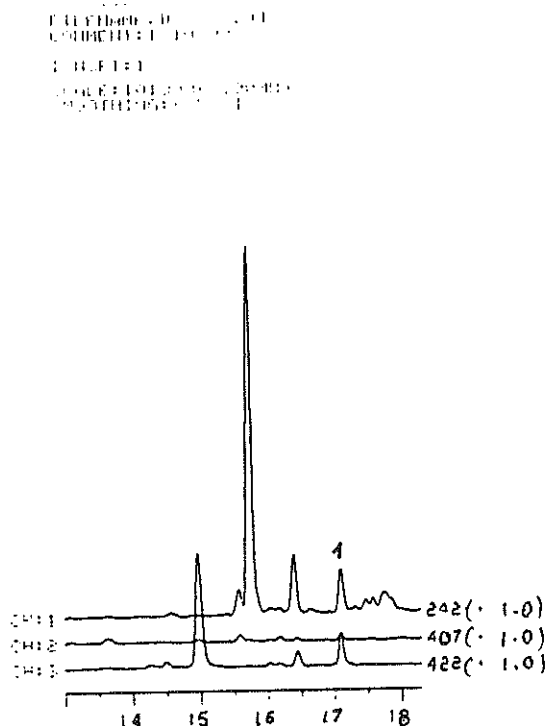


figure 29: fragmentogramme en double ionset des urines d'étalon traitées par la β -glucuronidase sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
 1-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol

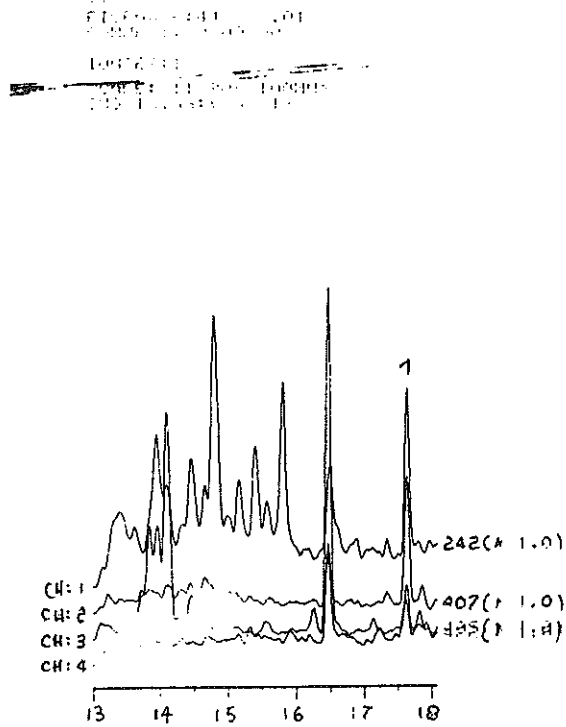


figure 30: fragmentogramme en double ionset des urines de hongre traitées par la β -glucuronidase sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
1-Androstérone

2011-04-14 10:00:00
 2011-04-14 10:00:00
 2011-04-14 10:00:00
 2011-04-14 10:00:00

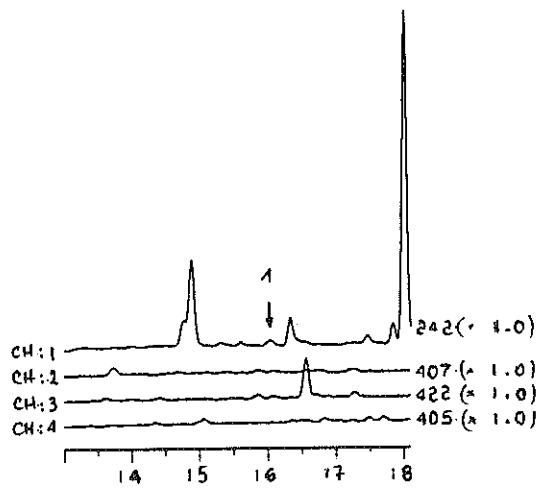


figure 31: fragmentogramme en double ionset des urines d'étalon traitées par le SHP sous forme de dérivés di-O-TMS

légende:
 1-Norandrostérone

identiques), a été détectée en quantité très importante .Il serait présent dans les urines sous formes libre et glucuroconjuguée (hydrolyse par la β -glucuronidase d'E.Coli) .

En ce qui concerne les androstane-diols, plusieurs molécules sont mises en évidence mais, faute de substances témoins, n'ont pu être identifiées (pic à un temps de rétention de 17,5 min dans les fractions glucuroconjuguée et sulfoconjuguée hydrolysées par le SHP) .En outre, deux métabolites ayant les mêmes caractéristiques chromatographiques et spectrométriques que les androstane-diols standards de configuration $5\beta 3\alpha 17\beta$ et $5\alpha 3\alpha 17\beta$ sont présents à l'état de traces et sont, à l'origine, éliminés sous forme de sulfoconjugués .

.Composés cétoniques

Des quantités notables de norandrostérone ont été retrouvées dans les fractions libres et sulfoconjugués (quelque soit le mode d'hydrolyse) .

.Ce mode d'analyse a mis aussi en évidence d'infimes quantités de 17β -Nortestostérone et de 17β -estradiol .

3.9.Discussion

Dans cette étude sur les urines de hongre et d'étalon, les résultats recherchés devaient permettre d'établir des profils chromatographiques des métabolites - théoriquement finaux - de la testostérone et de la Nortestostérone, à savoir deux séries de composés : les estrane-diols (C18)
et les androstane-diols (C19) .

Hydrolyse:

.Dans de nombreux travaux antérieurs, les métabolites conjugués de la 19-NT sont essentiellement hydrolysés par action du SHP .Or, la stéréospécificité des sulfatases de ce réactif enzymatique (configuration $5\alpha 3\beta$), ne permet pas, ou très faiblement, de libérer des composés $5\beta 3\beta$, et pas du tout

des composés de configuration $5\alpha 3\alpha$. De plus, les sulfates de 17-hydroxystéroïdes ne sont pas hydrolysés (testostérone + estrane-diols) (20, 21, 22).

Pour remédier à cela, la solvolysse paraît être une bonne méthode d'hydrolyse. Cependant, il est alors nécessaire de posséder de nombreuses substances étalons, car on ne peut dans ce cas déduire la configuration spatiale de la molécule mise en évidence.

Formes d'élimination:

.Stéroïdes éliminés sous forme libre:

Ils ne sont retrouvés que chez l'étalon en tant que 5β -estrane- $3\alpha, 17\alpha$ -diol, et de Norandrostérone.

.Stéroïdes éliminés sous forme de glucuronoconjugués:

La β -glucuronidase d'E.Coli permet de libérer des urines d'étalon des composés dihydroxylés de la série estrane (5β -estrane- $3\alpha, 17\alpha$ -diol) et androstane (pic d'un androstane-diols à 17,5 min d'élution, que nous n'avons pu identifier).

Chez le hongre, une faible quantité d'androstérone est retrouvée.

Il semblerait donc que cela confirme la glucuronoconjugaison des composés en $17\alpha(7)$.

D'autres résultats, obtenus après analyse des urines d'étalon semblent montrer que les composés en 17β et les dérivés de la testostérone seraient essentiellement éliminés sous forme de sulfoconjugués (traces de Norandrostérone, de 5α -androstane- $3\alpha, 17\alpha$ -diol et de 5β -androstane- $3\alpha, 17\alpha$ -diol).

4. CONCLUSION CHEZ LES CHEVAUX

Peu de métabolites dérivés de la 19-NT sont retrouvés éliminés sous forme libre dans les urines d'étalon, hormis le 5β -estrane- $3\alpha, 17\alpha$ -diol. En effet, différentes expériences ont montré que 90% des composés éliminés dans les urines étaient des conjugués hydrosolubles (2, 3).

Les trois méthodes expérimentales utilisées pour l'analyse des urines d'étalon - (le hongre jouant ici le rôle de témoin négatif car il ne produit pas de 19-NT endogène,

contrairement à l'étalon (2)) - ont permis d'obtenir des résultats résumés dans le tableau suivant :

<u>LIBRES</u>	<u>GLUCURONOCONJUGUES</u>	<u>SULFOCONJUGUES</u>
5 β -estrane-3 α ,17 α -diol	5 β -estrane-3 α ,17 α -diol	17 α -Nortestostérone
Norandrostérone	Nor Δ_4	17 β -Nortestostérone
	17 α -Nortestostérone	Nor Δ_4
	17 β -Nortestostérone	Norandrostérone
	androstanediol à 17,5 min	androstérone
		5 β -androstane-3 α ,17 β -diol
		5 α -androstane-3 α ,17 β -diol

.Le pH particulier des urines des chevaux nous a amené à envisager plusieurs protocoles analytiques, qui se révèlent être plus ou moins appropriés, selon les types de composés stéroïdiques recherchés :

le protocole 1 semble assez bien adapté à la recherche des stéroïdes cétoniques, mais les estrane-diols n'ont pu être mis en évidence .

le protocole 2 n'est pas assez performant, en ce qui concerne la purification des urines, ce qui rend l'interprétation des chromatogrammes et des spectres difficile .

le troisième protocole offre lui, une bonne caractérisation des stéroïdes dihydroxylés issus de la 19-NT ou de la testostérone, grâce à la réaction de Girard et Sandulesco, qui les séparent des autres composés cétoniques. Le seul inconvénient de cette méthode est sa complexité, ce qui la rend difficilement réalisable en routine.

Il faut aussi noter, que la force ionique des urines n'est pas favorable à des activités optimales de la β -glucuronidase et des enzymes contenues dans le SHP (0.2M maximum), lors des hydrolyses directes .

.La(es) principale(s) voie(s) métabolique(s) de la 17 β -Nortestostérone peut(vent) maintenant être ébauchée(s) (cf figure 32, page suivante).

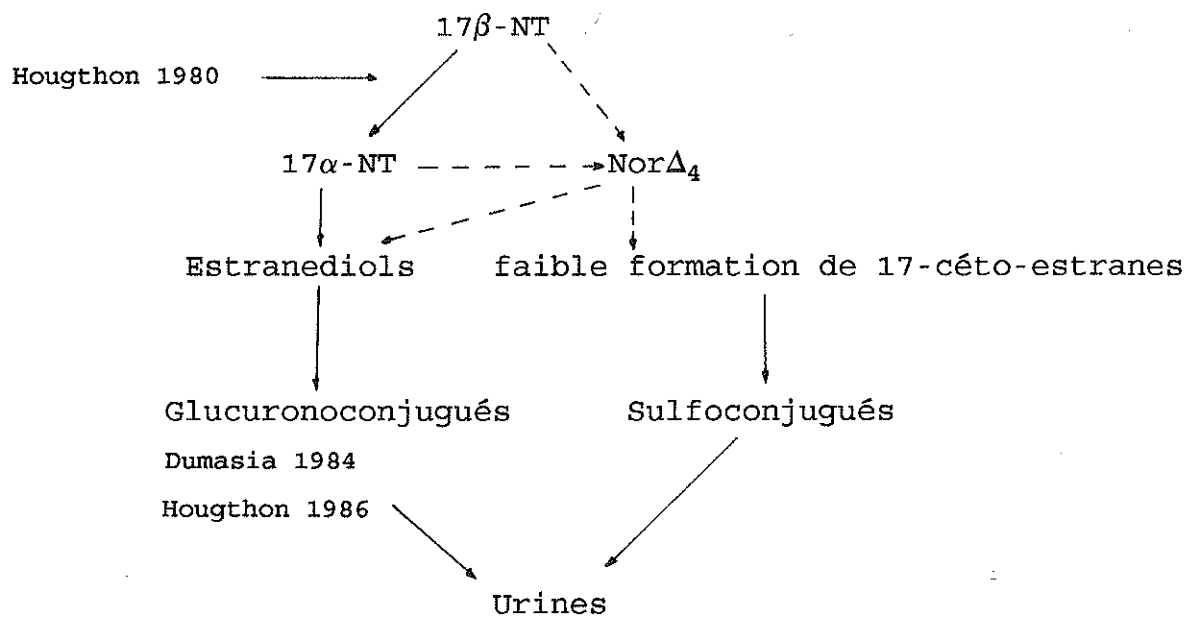


figure 32: Ebauche du catabolisme de la 17β-Nortestostérone chez le cheval

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Alors que chez l'homme, la Nandrolone est détectée par une recherche de Norandrostérone, d'épiNorandrostérone et de Norétiocholanolone(23), leurs faibles quantités produites chez les herbivores, ne facilitent pas leur mise en évidence. Grâce à l'étude métabolique réalisée chez le bovin et les nombreux travaux effectués sur les chevaux (2,3,4,5,6,7,8,24), la recherche des estrane-diols (présents en quantité importante dans les urines) constitue un procédé plus judicieux de prouver l'administration de Nandrolone .

Cependant, comme la date où un animal suspect a reçu de l'anabolisant n'est pas connue, il est possible d'associer les recherches de divers composés issus de la Nortestostérone (17 α -NT, Nor Δ_4 , Norandrostérone, estrane-diols), pour couvrir une période de détection plus longue .En effet, l'élimination de la Nandrolone non transformée se fait entre 40 heures et 6 à 7 jours (1,2,3) .Leur seule présence prouverait l'usage de Nandrolone, notamment chez le bovin .Le problème s'avère être plus complexe pour l'étalon, puisque celui-ci produit une faible quantité de 19-NT (24) .Donc, il conviendrait plutôt d'envisager dans ce cas, une analyse quantitative .

En outre, ce travail montre l'importance des méthodes analytiques mises en oeuvre, surtout au niveau de la purification des extraits biologiques, du mode d'hydrolyse et de la séparation des différents composés recherchés, car ceci conditionne la détection finale en CG/SM .

Tous les résultats obtenus selon les différents protocoles sont récapitulés dans le tableau XI .

Forme éliminée	<u>BOVINS</u> (foie)	<u>CHEVAUX</u> (urines)
LIBRES	17 β -NT 17 α -NT 17 β -E ₂ <u>NorΔ₄</u> 5 α -estrane-3 α ,17 β -diol	17 β -NT 17 β -E ₂ Norandrostérone 5 α -estrane-3 α ,17 β -diol
GLUCURONOCONJUGUES	17 β -NT <u>17α-NT</u> 5 β -estrane-3 α ,17 α -diol <u>5β-estrane-3α,17β-diol</u>	<u>NorΔ₄</u> 17 β -NT 17 α -NT <u>5β-estrane-3α,17α-diol</u> Androstérone
SULFOCONJUGUES	Norandrostérone 5 α -estrane-3 β ,17 α -diol	Norandrostérone 17 β -NT 17 α -NT <u>NorΔ₄</u> Androstérone
DISULFOCONJUGUES	5 α -estrane-3 β ,17 α -diol 5 β -estrane-3 β ,17 β -diol	

Tableau XI : Récapitulation des métabolites de la Nandrolone et de la Testostérone trouvés chez des herbivores

légende:

caractères gras: quantité très importante
caractères soulignés: quantité élevée
caractères normaux: faibles quantités ou traces

Ce tableau permet d'apprécier les différences métaboliques, qui peuvent exister, d'un animal à l'autre .

La détermination exacte des épimères estrane-diols devrait être réalisée d'une part en utilisant des méthodes plus performantes en chromatographie gazeuse ainsi qu' une gamme de stéroïdes standards plus complète et, d'autre part, en s'appuyant sur le très important travail analytique de Houghton (8) portant sur la détermination des unités méthylène des stéroïdes .Malgré tout, connaissant le métabolisme, même partiel, de la Nandrolone chez le bovin, il est possible de proposer un protocole de mise en évidence

d'un profil d'élimination des estrane-diols pour détecter une présence frauduleuse de 19-Nortestostérone .

La validation de cette méthode reste à réaliser sur des bovins, après une injection confirmée .

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

(1) RICO A. G...-Contribution des techniques radioisotopiques à l'étude du métabolisme des médicaments et à la détermination des niveaux des résidus dans les tissus des animaux. Annales de Recherches Vétérinaires. 1976, 7, (2), 161-164.

(2) DUMASIA M.C. and HOUGHTON E..-Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: the phase I and phase II biotransformation of 19-nortestosterone in the equine castrate. Xenobiotica, 1984, 14(8), 647-655.

(3) HOUGHTON E., DUMASIA M.C., ..-Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: The identification of some 16-oxygenated metabolites of 19-Nortestosterone .Xenobiotica., 1980, 10(5), 381-390.

(4) HOUGHTON E. .-Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: 19-Nortestosterone. Xenobiotica., 1977, 7(11), 683-693.

(5) HOUGHTON E., OXLEY G.A. and MOSS M.S. .-Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: A gas chromatographic mass spectrometric method to confirm the administration of 19-Nortestosterone or its esters to horses. Biomedical Mass Spectrometry., 1978, 5(2), 170-173.

(6) CHAPMAN D.I., CLOSE PENNY M., MOSS M.S., SNOW D.H..- Plasma concentrations and urinary excretion of Nandrolone and/or its metabolites after intramuscular injection of Nandrolone phenylpropionate to horses. Equine Veterinary Journal, 1982, 14, (3), 213-218.

(7) HOUGHTON E., DUMASIA M.C., TEALE P. and MOSS M.S..- Development of a gas chromatographic-mass spectrometric method using multiple analytes for the confirmatory analysis of anabolic steroid residues in horse urine. J. Chromatogr., 1986, 383, 1-8.

(8) HOUGHTON E., GINN A., TEALE P., DUMASIA M.C. and COPSEY J..- Comparison of the use of mass spectrometry and methylene unit values in the determination of the stereochemistry of estranediol, the major urinary metabolite of 19-Nortestosterone in the horse., J. Chromatogr., 1989, 479, 73-83.

(9) HABRIOUX G..- Analyse des androgènes dioxycénés conjugués urinaires et plasmatiques. Application à l'exploration fonctionnelle du follicule pilosébacé en pathologie humaine. Thèse Doctorat, Université PARIS XI, 1983.

(10) CARR B.R., MIKHAIL G. and FLICKINGER G.L..- Chromatography of steroids on SEPHADEX LH20®. Journal Clinic Endocrino., 1971, 33, 358-360 .

(11) SJOVALL J., VIHKO R..-Determination of androsterone and dehydroepiandrosterone sulfates in human serum by gas-liquid chromatography. *Steroids*, 1965, 11, 703-715.

(12) YAMAMOTO Y., OSAWA Y., KIRDANI R.Y. and SANDBERG A.A..- Testosterone metabolites in dog bile. *Steroids*, 1978, 31, 233-237 .

(13) DE LAUZON S..-Contribution à l'étude des fonctions ovarienne et placentaire chez les mammifères à l'aide de microméthodes d'analyses spécifiques .Thèse de Doctorat es Sciences, Paris, 1974, n°CNRS : AO 9332 .

(14) BERTHOU F.L..-Application de la chromatographie gazeuse sur colonnes capillaires en verre à l'analyse des dihydroxystéroïdes urinaires humains .Thèse de Doctorat ès Sciences, Brest, 1977, série 42-35 .

(15) HOOGENBOOM L.A.P., BERGHAMS M.C.J. and TRAAG W.A..- Biotransformation of β -Nortestosterone by cultured porcine hepatocytes. *J.Chromatogr.*, 1989, 489, 105-109.

(16) DELAHAUT P., DUBOIS M., MAGUIN-ROGISTER G..-Androgènes anabolisants de synthèse dans les matières fécales des bovins: dosage radioimmunologique après purification par Chromatographie liquide à haute performance. *Ann.Rech.Vet.* 1990, 21, 13-22.

(17) BENOIT E., GUYOT J.L., COURTOT D. and DELATOURE P..-Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone urinary metabolites in cattle. Ann. Rech. Vet., 1989, 20, 485-491.

(18) BENOIT E., CHAMPALLE E., COURTOT D., DELATOURE P..-Dépistage de l'utilisation de la nandrolone en élevage bovin; Recours à une méthode radio-immunologique et confirmation par spectrométrie de masse. , Rech. Méd. Vet., 1989, 165, (8-9), 737-740.

(19) BOTH-MIEDEMA R., VAN GROENESTEIN T.J.A., DE GROOT W.C., HUIS IN 'T VELD L.G., RIJSDIJK J.C.J.M. and STEKELENBURG P..-19-Nortestosterone. Its Metabolism in the Rabbit. Steroids Lipids Res., 1972, 3, 49-58.

(20) CAWLEY LEO P., M.D., FAUCETTE WENDEL, B.A., C(ASCP), MUSSER BILLY O., B.S., C(ASCP), and BECKLOFF STANLEY, B.S., C(ASCP)..-Steric hindrance of the sulfatase of Helix Pomatia on some 17-ketosteroid sulfate conjugates., The American Journal of Clinical Pathology, 1969, 52(6), 652-655.

(21) JARRIGE P..-Purification et propriétés des sulfatases du suc digestif d'Helix Pomatia. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 1963, XLV, 7-8, 761-782.

(22) JARRIGE P., YON J., JAYLE M.F..-Spécificité des sulfatases d'*Helix Pomatia*. Etude de la cinétique de l'hydrolyse des esters sulfatés. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 1963, XLV, 7-8, 783-802.

(23) MASSE R., LALIBERTE C., TREMBLAY L. and DUGAL R..-Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis of 19-Nortestosterone Urinary Metabolites in Man. Biomed. Mass Spectrometry, 1985, 12(3), 115-121.

(24) COURTOT D., GUYOT J.L., BENOIT E..-Mise en évidence de l'élimination urinaire de la 19-Nortestostérone d'origine endogène chez le cheval mâle. R.C.Acad .Sci.Paris. ,1984, 299, 139-141.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

	page
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE : MATERIEL - METHODES.....	15
1. REACTIFS.....	16
2. METHODES.....	17
DEUXIEME PARTIE : METABOLISME HEPATIQUE DE LA 19-NORTESTOSTERONE CHEZ LE BOVIN.....	31
1. INTRODUCTION.....	32
2. CONDITIONS D'INCUBATION.....	32
3. SEPARATION DES DIFFERENTES FORMES DE METABOLITES.....	40
4. HYDROLYSE DES DIFFERENTES FORMES DE NORSTEROIDES CONJUGUES.....	46
5. SEPARATION DES NORSTEROIDES SELON LEUR STRUCTURE.....	48
6. SEPARATION DES STEROIDES DE NATURE CETONIQUE, MONOALCOOLIQUE-MONOCETONIQUE SUR CELITE®.....	54
7. ANALYSE PAR COUPLAGE CG/SM.....	58
8. DISCUSSION.....	78

TROISIEME PARTIE : RECHERCHE DES METABOLITES DE LA 19-NORTESTOSTERONE DANS LES URINES DE CHEVAUX	81
1. INTRODUCTION.....	82
2. ESSAIS SUR LES URINES D'ETALON.....	82
3. ESSAIS SUR LES URINES DE HONGRE ET D'ETALON.....	93
4. CONCLUSION SUR LES CHEVAUX.....	101
CONCLUSION GENERALE.....	104
BIBLIOGRAPHIE.....	108
TABLE DES MATIERES.....	114

GIBIAT (Catherine).-- Métabolisme hépatique de la 19-Nortestostérone chez le bovin.-- 116 f.; ill.; tabl.; 30 cm (Thèse : Pharm. ;Limoges ;1991).

RESUME :

La première partie de cette étude est consacrée au métabolisme hépatique in-vitro de la Nortestostérone chez le bovin .Les métabolites issus des incubations en présence de 4-estrène-17 β -ol-3-one radioactive et non radioactive (isolés sous formes libre, glucurono et sulfoconjuguée) sont analysés par couplage CG/SM après hydrolyse des conjugués et purification .L' examen des résultats met en évidence, outre la formation de 17 α -Nortestostérone, la présence de 3,17-estrane-diols, libres ou glucuronoconjugués, dont la stéréoisomérisation est discutée .

Dans une deuxième partie, trois protocoles analytiques inspirés de la méthode utilisée chez le bovin, sont appliqués à la recherche des métabolites urinaires de la 19-Nortestostérone chez l'étalon et le hongre .Ainsi, l'analyse des différentes formes de conjugués montre que la fraction glucuronoconjuguée est la plus riche en métabolites .Parmi ceux-ci, on peut noter des quantités non négligeables de 4-estrène-17 β -ol-3-one, 4-estrène-17,3-dione, 5 β -estrane-3 α ,17 α -diol et, en moindre importance, de Norépitestostérone .

MOTS-CLES :

- Nandrolone
- 19-Nortestostérone
- Métabolites hépatiques
- Métabolites urinaires
- Bovins
- Chevaux
- Métabolisme hépatique in-vitro
- Estrane-diols

JURY : Président	: Monsieur le Professeur HABRIOUX
Juges	: Monsieur le Professeur NICOLAS
	Monsieur le Professeur CHASSAIN
	Monsieur le Professeur LAFARGE