



Analyse quantitative de l'Estradiol dans les tissus cérébraux et le plasma de souris

Ecaterina Lozan

► To cite this version:

Ecaterina Lozan. Analyse quantitative de l'Estradiol dans les tissus cérébraux et le plasma de souris. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2015. Français. ⟨NNT : 2015BORD0390⟩. ⟨tel-01292587⟩

HAL Id: tel-01292587

<https://theses.hal.science/tel-01292587v1>

Submitted on 23 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Ecaterina LOZAN

**Analyse quantitative de l'Estradiol dans les tissus
cérébraux et le plasma de souris**

Sous Co-direction : **Svitlana POIX-SHINKARUK**
Jean-Marie SCHMITTER

Soutenue le 17 Décembre 2015 à 9h30

Membres du jury :

M. COLE Richard, Professeur - Université Pierre et Marie Curie
M. LE BIZEC Bruno, Professeur - Université de Nantes
Mme LOUTELIER-BOURHIS Corinne, Maître de conférences - Université de Rouen
Mme BURÉ Corinne, IR - CBMN CNRS Bordeaux
Mme BENNETAU-PELISSERO Catherine, Professeur - Bordeaux Sciences Agro

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité

A mon mari,

A mes parents et ma sœur,

"Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs, n'a jamais tenté d'innover"

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Merci à l'Union Européenne et notamment au programme Erasmus Mundus (BMU-MID Action 2) d'avoir financé cette thèse.

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de thèse, Madame Svitlana Poix-Shinkaruk sans qui cette jolie aventure n'aurait pu commencer. Je tiens à la remercier de m'avoir communiqué sa passion pour la recherche et pour sa confiance, pour ses permanents encouragements et pour ses précieux conseils et recommandations tout au long de ce travail. Je la remercie également pour le financement trouvé pour compléter ma dernière année de thèse.

J'adresse ma profonde gratitude à mon co-directeur de thèse Monsieur le Professeur Jean-Marie Schmitter pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour avoir mis à ma disposition des moyens performants pour réaliser ces travaux. J'apprécie beaucoup votre expertise scientifique et vos qualités humaines.

Je tiens également à remercier Madame Corinne Buré pour son encadrement, sa rigueur, sa disponibilité ainsi que pour l'autonomie et la confiance qu'elle m'a accordées. Merci pour son soutien moral et technique, si précieux tout au long de cette thèse, notamment pendant les périodes agitées lorsque plus rien ne fonctionnait...

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Professeurs Richard Cole et Bruno Le Bizec qui ont aimablement accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs, ainsi que Madame Corinne Loutelier-Bourhis pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour le regard attentif qu'ils ont donné à mon travail.

Ma reconnaissance va également à Catherine Bennetau-Pelissero pour son aide au niveau de la partie biologique de mes résultats, ainsi que pour ses encouragements.

J'adresse un grand et chaleureux MERCI à tous les chercheurs, étudiants et techniciens que j'ai eu le plaisir de côtoyer à l'ISM, au CBMN, au Neurocentre Magendie et à la Plateforme Protéome (CGFB) pour la bonne humeur et la convivialité qu'ils ont répandues au quotidien. Par peur d'en oublier, je ne les cite pas mais n'oublie pas pour autant leur rôle dans cette aventure humaine...

Je remercie vivement Chloé PAPIN et Marie DARTIAILLH qui ont contribué à ce travail de thèse durant leur stage au laboratoire.

Je tiens aussi à remercier mes amis moldaves : Sergiu et Mihai qui m'ont soutenu, aidé et encouragé de près ou de loin.

Je remercie également de tout mon cœur l'ensemble de ma famille pour son soutien. À mes parents, pour leur amour et soutien, sans leurs efforts et sacrifices je ne serai jamais arrivée si loin. À ma sœur qui est toujours mon exemple, c'est grâce à toi que je suis arrivée jusqu'à cette étape.

Le mot de la fin sera pour mon mari Ivan, mon soleil lors de ces trois années (et de toute ma vie), merci pour ta patience, ton soutien, et ta confiance. Ton amour m'a donné toujours la force de défaire toutes les difficultés pour atteindre l'objectif final. Enfin ensemble pour le reste de nos vies!!!

MERCI à tous

TABLE DE MATIERES

Liste des abréviations.....	9
INTRODUCTION GENERALE	11
CHAPITRE I: ETAT DE L'ART	13
I.1 PRESENTATION GENERALE DES ŒSTROGENES	15
<i>I.1.1 Structures et métabolisme</i>	<i>15</i>
<i>I.1.2 Rôle des œstrogènes dans le traitement des maladies neurodégénératives</i>	<i>21</i>
<i>I.1.3 Mécanismes d'action des œstrogènes dans le cerveau</i>	<i>26</i>
I.2 QUANTIFICATION DES ŒSTROGENES	37
<i>I.2.1 Dosages radio-immunologique (RIA)</i>	<i>37</i>
<i>I.2.2 Chromatographie en Phase Gazeuse (GC)</i>	<i>38</i>
<i>I.2.3 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....</i>	<i>39</i>
<i>I.2.4 Chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)</i>	<i>39</i>
<i>I.2.5 Détection par spectrométrie de masse</i>	<i>44</i>
I.2.5.1 Source d'ionisation electrospray (ESI)	45
I.2.5.1.a La production de gouttelettes chargées	46
I.2.5.1.b Fission des gouttelettes chargées, l'explosion coulombienne.....	47
I.2.5.1.c Emission des ions en phase gazeuse.....	48
I.2.5.2 Analyseur	49
I.2.5.2.a Les analyseurs de type quadripôle	49
I.2.5.2.b Les analyseurs de type piège ionique linéaire (LIT).....	51
I.2.5.3 Spectromètre de masse en tandem (MS/MS).....	51
I.2.5.3.a La dissociation induite par collision (CID)	53
I.2.5.3.b Paramètres de la source	54
I.2.5.3.c Les modes de balayage disponibles en MS/MS	56
<i>I.2.6 La dérivation chimique - amélioration de la sensibilité de détection des œstrogènes.....</i>	<i>58</i>
<i>I.2.7 Validation et évaluation des résultats de mesure</i>	<i>62</i>
I.3 EXTRACTION DES ŒSTROGENES D'UNE MATRICE BIOLOGIQUES	66
<i>I.3.1 Introduction</i>	<i>66</i>
<i>I.3.2 Extraction liquide-liquide (ELL)</i>	<i>67</i>
<i>I.3.3 Purification - extraction sur phase solide (SPE).....</i>	<i>68</i>
<i>I.3.4 Extraction sur phase solide : applications à des échantillons biologiques</i>	<i>72</i>
<i>I.3.5 Effets de matrice (MEs)</i>	<i>73</i>
I.4 INTERET DE LA HPLC-MS/MS AVEC OU SANS DERIVATION POUR L'ANALYSE DES ŒSTROGENES.....	77

CHAPITRE II: LES ŒSTROGENES DANS LE CERVEAU ET LE PLASMA : PREPARATION DES ECHANTILLONS ET ELABORATION DE LA METHODE D'ANALYSE PAR LC-MS/MS	85
II.1 INTRODUCTION	89
II.2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION PAR MS/MS.....	92
II.2.1 Optimisation des paramètres MS : le mode d'ionisation et l'augmentation de l'intensité du signal.....	92
II.2.2 Détermination des ions précurseurs et des ions fragments.....	97
II.3 MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE PAR LC-MS/MS	104
II.3.1 Conditions analytiques.....	104
II.3.2 Principe des courbes d'étalonnage en HPLC-MS/MS.....	106
II.3.3 Gamme d'étalonnage sur la solution standard du 17β-E ₂	106
II.3.4 Etude de l'influence des paramètres en HPLC-ESI(-)MS/MS sur la réponse du 17β-E ₂ : le volume d'échantillon injecté et le «Dwell time».....	109
II.3.5 Conditions analytiques et gamme d'étalonnage sur les solutions standards des œstrogènes.....	110
II.3.6 Gamme d'étalonnage sur la matrice biologique	112
II.3.7 Validation de la méthode HPLC-ESI(-)-MS/MS	114
II.4 PREPARATION D'ECHANTILLON: OPTIMISATION DE LA METHODE SPE ..	120
II.4.1 Choix du support d'extraction et du solvant d'élution	120
II.4.2 Choix du pH d'extraction.....	123
II.4.3 Influence de l'étape d'évaporation sur le taux de récupération	125
II.4.4 Le prétraitement des échantillons biologiques : homogénéisation et ELL	127
II.4.5 Effet matrice	130
II.4.6 Application biologique : hippocampe, cerveau et plasma de souris.....	131
II.5 CONCLUSIONS	134
CHAPITRE III: ANALYSE DES ŒSTROGENES PAR LC-MS/MS APRÈS DÉRIVATION CHIMIQUE	137
III.1 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DU 17β-E ₂	139
III.2 CHOIX DE L'AGENT DE DÉRIVATION.....	146
III.2.1 Détermination des ions précurseurs.....	146
III.2.2 Détermination des ions fragments.....	147
III.3 MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE PAR LC-MS/MS	158
III.4 PREPARATION D'ECHANTILLON: SPE.....	164
III.5 APPLICATION DE LA DÉRIVATION CHIMIQUE À L'ANALYSE D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	166
III.6 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DU 17β-E ₂ DANS LE CERVEAU DE SOURIS – RÉALISÉE AVEC ET SANS DÉRIVATION CHIMIQUE	168
III.7 CONCLUSIONS	171
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	173
ANNEXES.....	177
RÉFÉRENCES	209

Liste des abréviations

17α- et 17β-E₂	Estradiol
3β-HSD	3 β -hydroxystéroïde-déhydrogénase
Aβ	Protéine β -amyloïde
Ac	Anticorps
ACN	Acétonitrile
Ag	Antigène
AED	Androstènedione
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine précurseur d'amyloïde
APPI	Photoionisation à pression atmosphérique
ATP	Adénosine triphosphate
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CE	« Collision Energy »
CI	Ionisation chimique
CID	Dissociation induite par collision
CRM	Modèle du résidu chargé
CV	Coefficient de variation
CXP	« Collision Cell Exit Potential »
CYP11A1	Cholestérol-monooxygénase
CYP17A	Stéroïde-17 α -monooxygénase
CYP19	Aromatase
DCM	Dichlorométhane
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHP	Dihydroprogestérone
DHT	Dihydrotestostérone
DMABC	Chlorure de (4-diméthylamino)-benzoyle
DMAPI	4-(Diméthylamino)-phényl isocyanate
DMIS-Cl	Chlorure de 1,2-diméthyl-1H-imidazole-4-sulfonyle
Dns-Cl	Chlorure de dansyle
DP	« Declustering Potential »
E₁	Estrone
E₃	Estriol
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EI	Impact électronique
ESI	Electrospray
EtOAc	Acétate d'éthyle
FPhI	4-Fluorophenyl isocyanate
GC	Chromatographie en Phase Gazeuse
GPR30	Récepteur aux estrogènes couplé aux protéines G
HEPT	Hauteur de plateau réduite
HILIC	Chromatographie d'interactions hydrophiles
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IC	Chromatographie d'échange d'ions
ICR	Résonance cyclotronique
IEM	Modèle de l'évaporation des ions
IEX	Echange d'ions
IT	Piège ionique
k'	Facteur de capacité

LC	Chromatographie liquide
LOD	Limite de détection
LIT	Analyseur de type piège ionique linéaire
ELL	Extraction liquide-liquide
LOQ	Limite de quantification
MA	Maladie d'Alzheimer
ME	Effet de matrice
MMP-9	9-métallopeptidase
MRM	«Multiple Reaction Monitoring»
MS	Spectromètre de masse
MS/MS	Spectromètre de masse en tandem
NP	Phase normale
PBS-Cl	Chlorure de 4-(1H-pyrazol-1-yl)-benzènesulfonyl
PE	Processus de récupération
PFBBr	Pentafluorobromobenzène
PhI	Phenylisocyanate
NO₂PhI	<i>p</i> -Nitrophényl isocyanate
PP	Précipitation des protéines
PREG	Pregnénolone
PG	Progestérone
PS-Cl	Chlorure de pyridine-3-sulfonyl
<i>p</i>TSI	<i>p</i> -Toluènesulfonyl isocyanate
Q	Quadripôle
Q8S-Cl	Chlorure de quinoline-8-sulfonyl
R²	Coefficient de corrélation
Ré	Récupération
REs	Récepteurs des œstrogènes
RF	Radio-fréquence
RIA	Analyse radio-immunologique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP	Phase inverse
RSD	Déviation standard relative
SD	Déviation standard
SI	Standard interne
SPE	Extraction sur phase solide
SSd	Solution Standard
T	Testostérone
TEA	Triéthylamine
THP	Tétrahydroprogestérone
TOF	Analyseur à temps de vol
t_R	Temps de rétention
U	Tension continue
V	Tension alternative

INTRODUCTION GENERALE

Depuis très longtemps, l'humanité s'intéresse au plus complexe des organes du corps humain, le cerveau. L'étude des effets des hormones sexuelles sur le système nerveux âgé a révélé que les hormones femelles, et notamment les œstrogènes qui peuvent aussi être directement synthétisés dans le cerveau, pourraient avoir des effets bénéfiques sur certaines anomalies liées à l'âge (déclin mnésique, maladie d'Alzheimer). Les données expérimentales obtenues chez l'animal montrent une amélioration de la viabilité et de la capacité de régénération des cellules nerveuses, ainsi qu'une stimulation de la neurotransmission et des fonctions cognitives lors d'un apport en œstrogènes. Cependant, il est difficile de doser de faibles quantités d'œstrogènes dans une région cérébrale. Pour une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action permettant d'apporter des solutions thérapeutiques, des études de leur biodisponibilité dans les tissus cérébraux deviennent indispensables. Dans ce contexte, des méthodes d'analyse précises et sensibles sont nécessaires afin de détecter de faibles concentrations de ces composés dans les différents tissus et fluides biologiques.

Le but de notre travail a été de développer une nouvelle méthode d'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) afin d'identifier et de doser des œstrogènes (Estrone, Estradiol et Estriol) dans un extrait de cerveau, d'hippocampe et de plasma de souris. La difficulté de cette étude reposait sur le fait que c'était un projet nouveau au sein des deux équipes co-directrices de la thèse, nécessitant de mettre au point tous les aspects essentiels au dosage (de la préparation de l'échantillon à l'interprétation des résultats) et que la littérature existante dans ce domaine donnait des résultats très différents. Afin de trouver les meilleures conditions analytiques pour atteindre notre objectif, il nous a fallu prendre en compte la faible capacité de ces molécules à s'ioniser et la difficulté d'extraire les œstrogènes présents dans des échantillons biologiques. Nous avons ainsi travaillé, d'une part, sur l'influence des divers additifs ajoutés dans la phase mobile et sur l'application de la dérivation chimique afin d'augmenter le rendement d'ionisation des œstrogènes dans la source électrospray (ESI) en spectrométrie de masse, et d'autre part, sur la nécessité d'une préparation et d'une purification adaptées aux échantillons biologiques.

Le premier chapitre bibliographique de ce mémoire montre l'importance des œstrogènes dans l'organisme à travers leurs rôles, leur mécanisme d'action dans le cerveau et leur implication dans différentes maladies neurodégénératives. Les différentes méthodes de dosage actuelles pour ces composés et plus particulièrement celles qui utilisent la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem sont également résumées.

Le deuxième chapitre présente les résultats obtenus au cours de la mise au point de la méthode chromatographique en phase inverse (RP-LC) et l'amélioration de la sensibilité de détection par spectrométrie de masse en utilisant le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM). Nous montrons que l'utilisation de la triéthylamine comme additif dans la phase mobile et d'un support chromatographique de type C18 permettent de réaliser la séparation de nos analytes. Une validation de la méthode développée a été réalisée afin de montrer la précision et la robustesse des analyses effectuées. Cependant, deux étapes de purification de l'échantillon se sont avérées nécessaires pour améliorer les limites de détection lors de l'analyse d'échantillons biologiques. La première étape consiste en une extraction liquide-liquide puis, lors de la deuxième étape, les performances de différentes cartouches d'extraction sur phase solide (SPE) ont été évaluées pour augmenter le taux de récupération des œstrogènes à partir de tissus cérébraux et de plasma de souris.

La dérivation chimique est considérée comme une alternative prometteuse pour augmenter la capacité d'ionisation des œstrogènes et pour améliorer la limite de détection. La synthèse et la caractérisation de différents dérivés du 17β -E₂ ont fait l'objet du troisième chapitre de ce mémoire. Un nouvel agent de dérivation a été proposé et son efficacité a été étudiée. Cette nouvelle méthode de dérivation a été appliquée pour le dosage du 17β -E₂ dans le cerveau de souris. Les limites de détection obtenues avec et sans dérivation, ainsi que les concentrations dosées, ont été comparées afin d'évaluer les avantages et les inconvénients de chacune des deux méthodes vis-à-vis de l'analyse des œstrogènes dans le cerveau de souris.

Enfin, nous avons présenté des conclusions sur l'intégralité de ce travail et les perspectives sur sa continuité.

CHAPITRE I: ETAT DE L'ART

I.1 PRESENTATION GENERALE DES ŒSTROGENES

I.1.1 Structures et métabolisme

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles femelles, lipophiles, synthétisées principalement au niveau des ovaires, mais également, dans un moindre degré, par les tissus périphériques. Le mot «œstrogène» dérive de la racine latine «*œstrus*», qui désigne chez les mammifères femelles la période où l'ovulation et la réceptivité vis-à-vis du mâle coïncident.

Les œstrogènes naturels sont des hormones stéroïdes à dix-huit atomes de carbone (*Figure I.1*), il s'agit principalement des 17 α - et 17 β -Estradiol (17 α - et 17 β -E₂), de l'Estrone (E₁) et de l'Estriol (E₃). Les œstrogènes sont générés à partir du cholestérol *via* la testostérone et l'androstènedione (*Figure I.2*) [1-3] dans les ovaires, le cerveau et les tissus adipeux.[4]

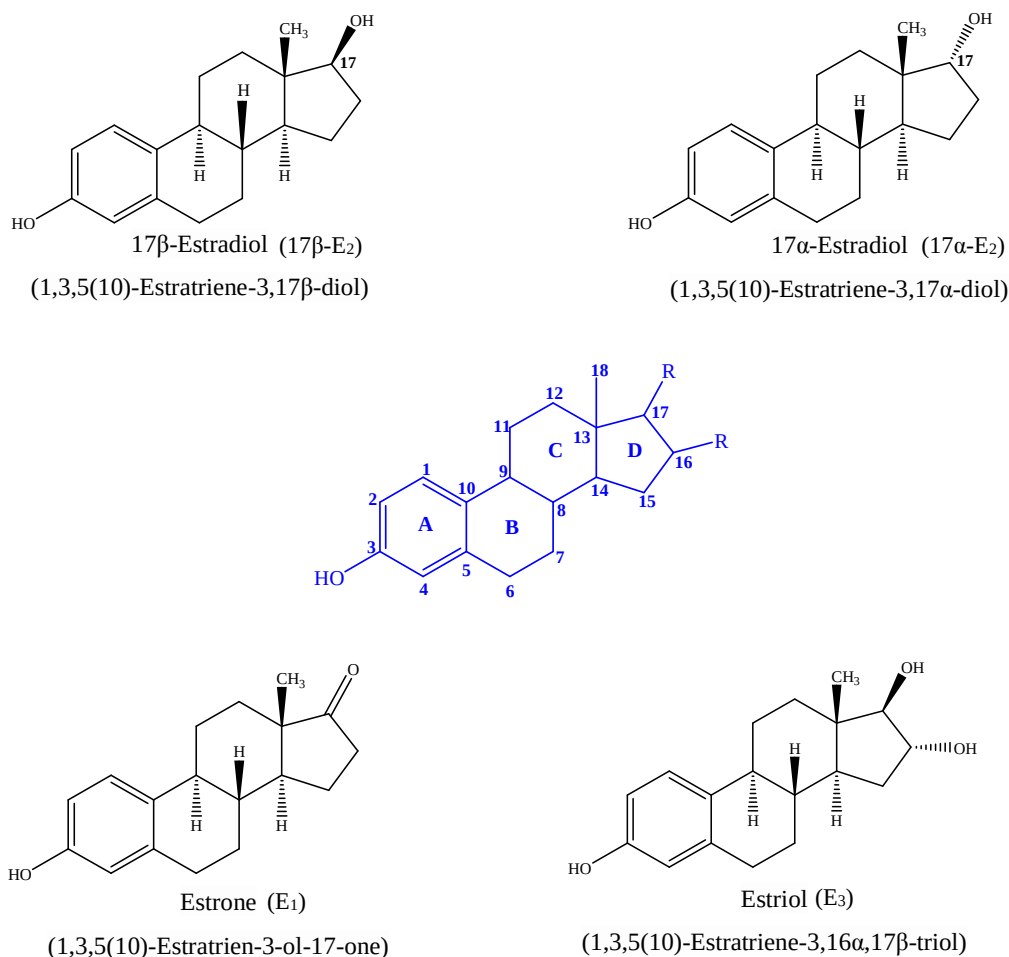


Figure I.1 : Structure des œstrogènes

Au cours d'une première phase mitochondriale, le cholestérol, apporté par les lipoprotéines, subit l'action de l'enzyme de clivage de la chaîne latérale, la cholestérol-monooxygénase (CYP11A1). La prégénolone, le premier métabolite, est ainsi formée. Au

cours d'une seconde phase extra-mitochondriale, la prégénolone subit l'action d'une 3 β -hydroxystéroïde-déhydrogénase (3 β -HSD) pour devenir la progestérone. Celle-ci peut être transformée en 17 α -hydroxyprogestérone par la stéroïde-17 α -monooxygénase (CYP17A) qui peut également agir avant l'enzyme précédente pour convertir la prégénolone en 17 α -hydroxyprégénolone. Cet intermédiaire sous l'action de la 3 β -HSD est ensuite métabolisé en 17 α -hydroxyprogestérone.[5] Les quatre hormones forment le groupe des progestagènes à 21 atomes de carbone. Sous l'action d'une CYP17A, les 17 α -hydroxyprogestagènes sont ensuite transformés en déhydroépiandrostérone (DHEA) et en androstènedione. Le dernier est ensuite réduit en testostérone.[6] Ces stéroïdes appartiennent au groupe des androgènes à 19 atomes de carbone. Sous l'action de l'aromatase (CYP19), l'androstènedione peut être convertie en E₁ et la testostérone en 17 β -E₂. L'E₁ est en équilibre avec le 17 β -E₂ : ils peuvent être interconvertis par les réactions d'oxydo-réduction en position C₁₇ par les enzymes 17 β -HSD de type 1 et 2. Les propriétés œstrogéniques de l'E₁ sont 100 fois plus faibles que celles du 17 β -E₂. L'E₁ peut être considéré comme une réserve inactive rapidement disponible de 17 β -E₂. [7] Cependant, il existe un métabolisme irréversible du 17 β -E₂ et l'E₁. Il est initié par l'hydroxylation de la position C₁₆, ce qui résulte en la formation de l'E₃. L'E₃ est un œstrogène plus faible que le 17 β -E₂ d'action courte et d'élimination rapide. Par la suite, l'introduction d'un groupement hydroxyle en position C₂ ou C₄ aboutit à la formation de métabolites comme : le 2-hydroxyestrone, le 4-hydroxyestrone ou le 2-hydroxyestradiol, le 4-hydroxyestradiol, qui peuvent ensuite être méthoxylés ou transformés par oxydation en quinones œstrogéniques.[8] Les trois œstrogènes peuvent être convertis en métabolites hydrosolubles par des réactions de conjugaison (glucuronidation, sulfatation). Pour être éliminées définitivement, ces formes essentiellement inactives sont excrétées dans l'urine et/ou les matières fécales. Elles peuvent également être excrétées dans la bile pour participer à un cycle entéro-hépatique.[9, 10]

L'introduction des groupements sulfate ou glucuronide s'effectue sur la fonction hydroxyle des œstrogènes (*Figure I.3*). Le sulfate d'E₁ est la forme circulante la plus abondante à une concentration 10 fois plus élevée que celle de l'E₁ non conjuguée.[9-11]

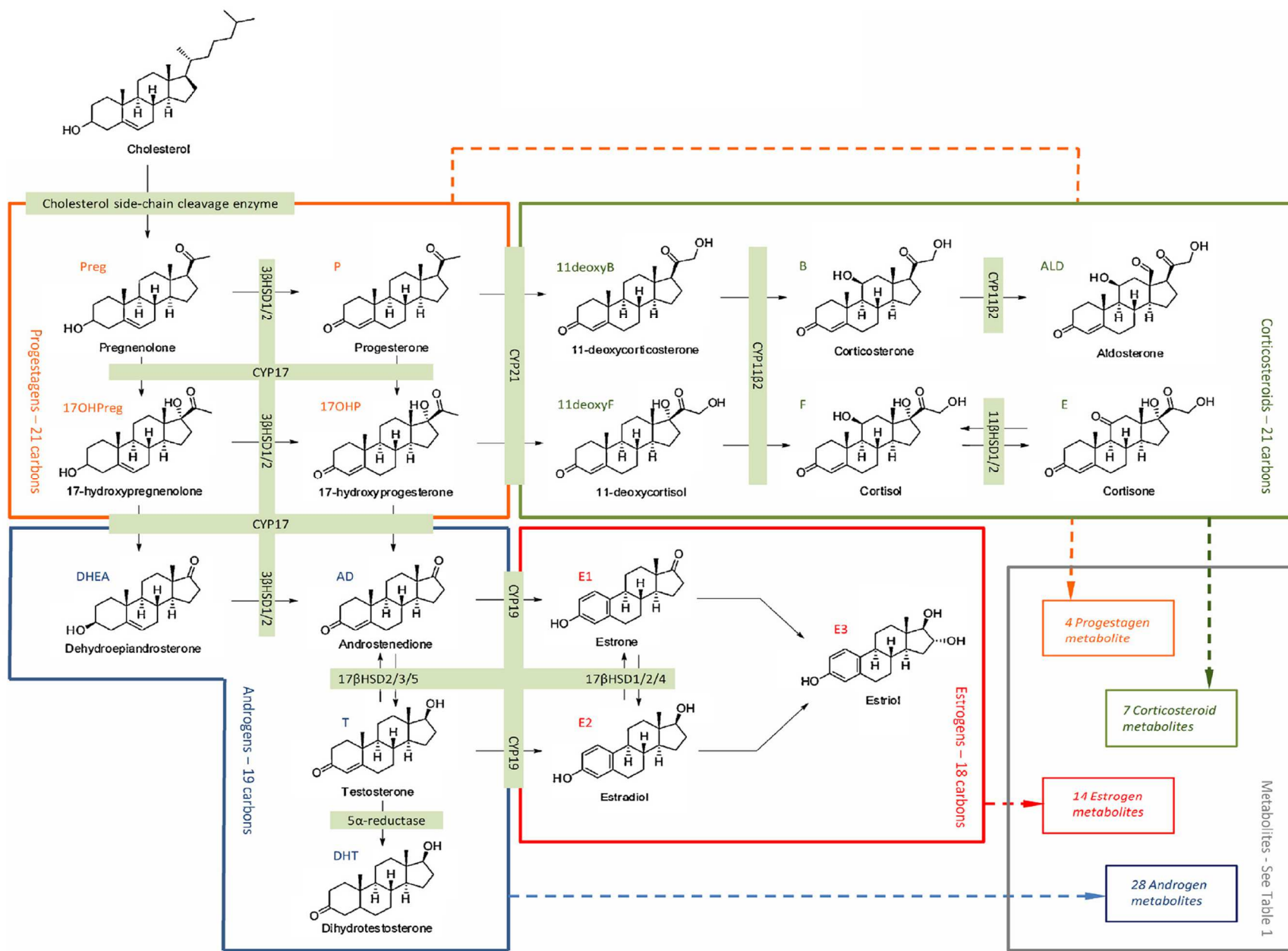


Figure I.2 : La stéroïdogénèse humaine avec les principales classes d'hormones stéroïdes, et les principales voies enzymatiques.[1-3]

Une hypothèse actuelle soutient que le sulfate d'E₁ inactif est transporté aux tissus cibles par l'intermédiaire du système vasculaire et intégré dans les cellules cibles, probablement par les polypeptides-transporteurs d'anions.[11, 12] Dans la cellule cible, il est ensuite hydrolysé en E₁ par des sulfatases intracellulaires liées à la membrane, et puis réduit en 17β-E₂ actif par la 17β-HSD.[9-11] Le transport des conjugués des œstrogènes dans les cellules cibles est assuré par des transporteurs intracellulaires qui appartiennent à la famille des « Multidrug Resistance Complex » et des transporteurs ABC pour « A Binding Cassette ». Ces enzymes font partie des enzymes dites de détoxification de phase III . Toutefois la forte affinité de ces polypeptides-transporteurs d'anions, pour les sulfates et les glucuronides des stéroïdes, a été mise en évidence *in vitro*.[11, 12] Les glucuronides ont été moins étudiés comme précurseurs d'hormones stéroïdiennes, principalement en raison de leur moindre abondance et d'une excrétion plus rapide.[10]

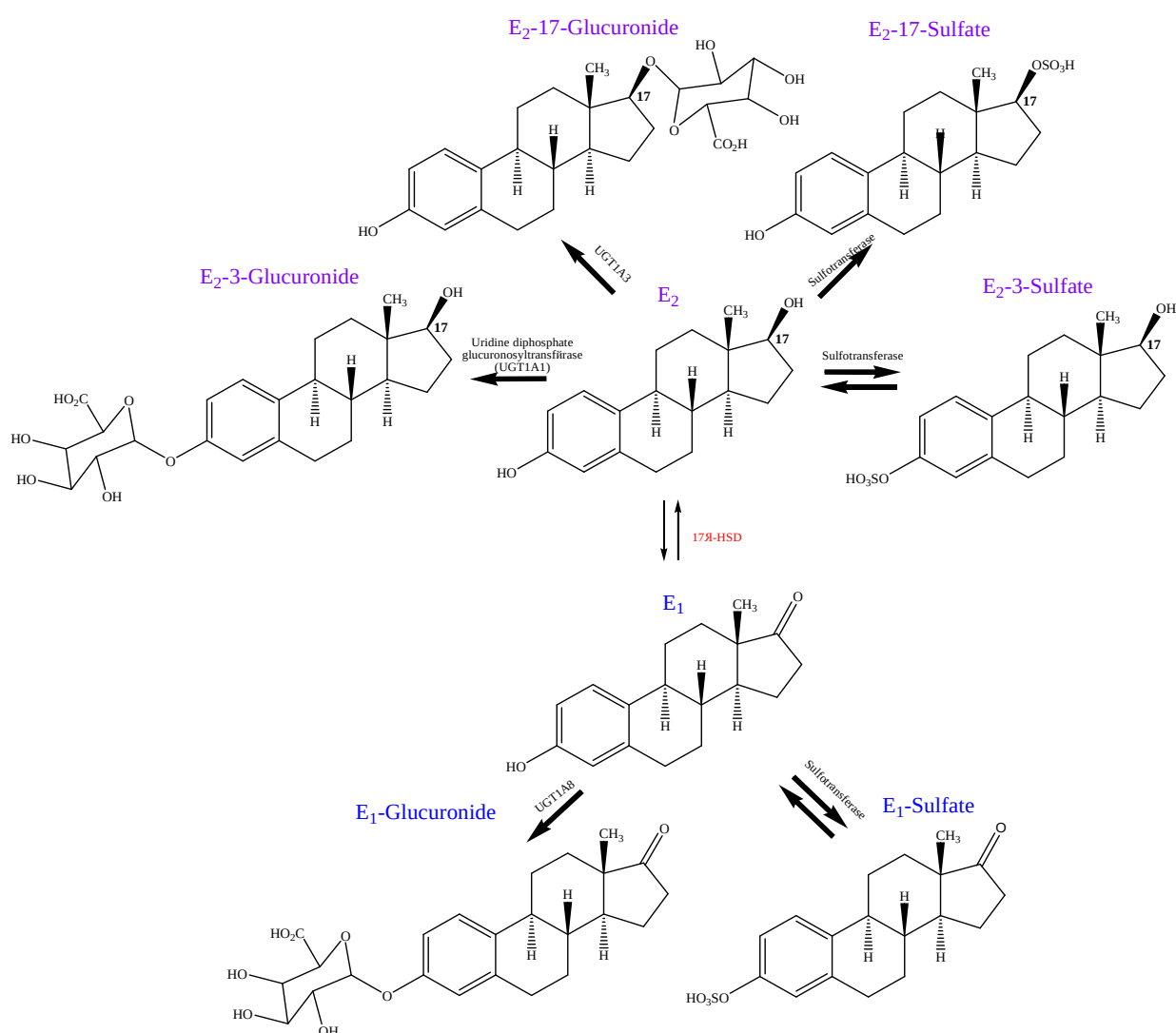


Figure I.3 : Les formes conjuguées du 17β-E₂ et l'E₁ [9]

Les œstrogènes régulent les fonctions de la reproduction et sont impliqués dans la régulation du développement et de la différenciation des différentes cellules cibles dans le système nerveux, cardiovasculaire, gastro-intestinal, immunitaire... Les deux principaux récepteurs des œstrogènes (REs) sont les récepteurs RE- α et RE- β . [13, 14] La fixation des œstrogènes aux récepteurs favorise leur dimérisation et la translocation vers le noyau.

Les REs dimérisés peuvent moduler la transcription des gènes œstrogéno-dépendants par interaction directe ou indirecte avec des séquences spécifiques d'ADN de la région du promoteur des gènes cibles. Ceci conduit à la régulation de la transcription (*Figure I.4*). [15] Les REs membranaires seulement activés par la fixation des œstrogènes peuvent également déclencher des voies de signalisation de réactions en cascade dites non-génomiques, très rapides, qui provoquent des effets cytoplasmiques comme l'activation de certaines kinases, le changement de concentration de calcium, la modulation d'autres récepteurs. [16] Toutes ces cascades de signalisation peuvent être induites à des concentrations d'hormones différentes, avoir lieu en parallèle ou en série et entraîner différentes réponses cellulaires, telles que la prolifération, la différenciation, ou encore la maturation. [16, 17] Un nouveau médiateur des effets non génomiques du 17β -E₂ a été formellement identifié au début des années 2000 : il s'agit du récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, GPR30. [18] Les récepteurs RE diffèrent par leurs affinités et spécificités pour des ligands et par leur distribution tissulaire. [19, 20]

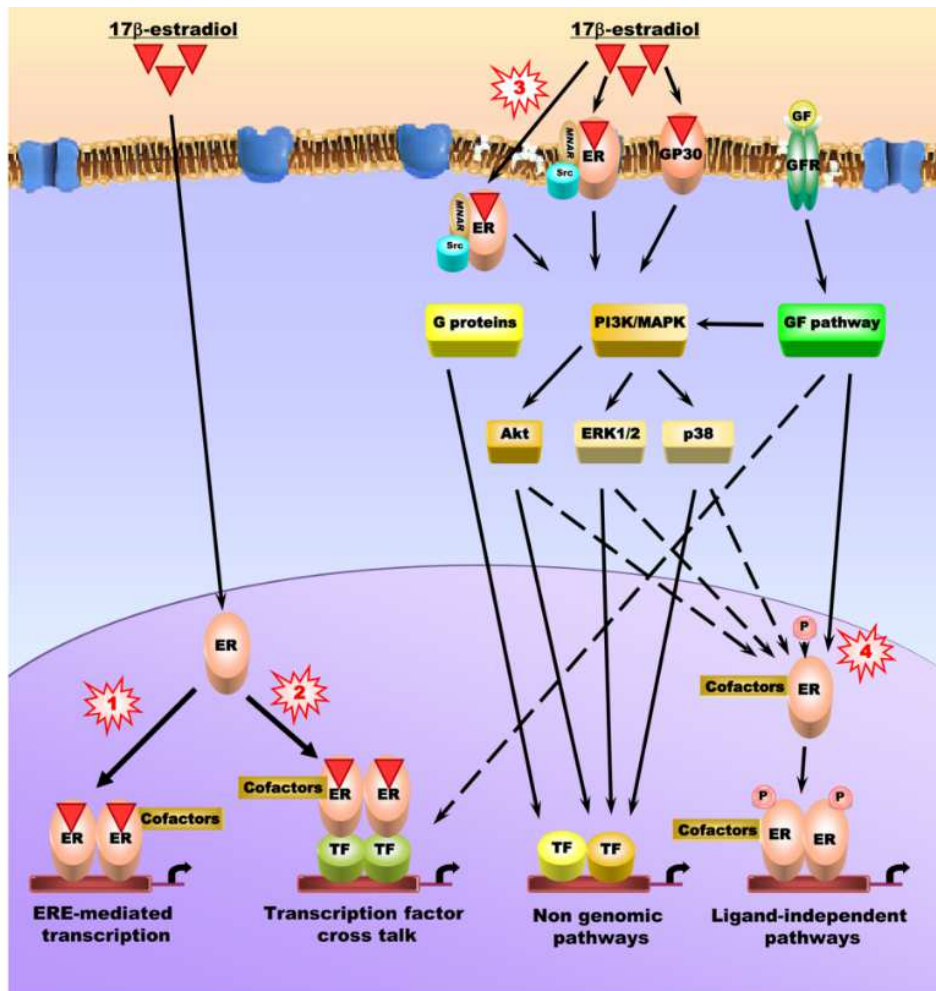


Figure I.4 : Les mécanismes putatifs de l'action des œstrogènes[21]

ERK - Extracellular Regulated kinase; GF - Growth Factor ; GFR – Growth Factor Receptor ; MNAR – Modulator of Non Genomic Action Receptor ; TF - Transcription Factor ; ER - Estradiol receptor

1.1.2 Rôle des œstrogènes dans le traitement des maladies neurodégénératives

Bien que les œstrogènes soient connus depuis longtemps comme des hormones qui régulent les fonctions de reproduction chez les femelles, ils ont également des effets protecteurs sur les os, le système cardio-vasculaire et le cerveau.[22-24]

Les œstrogènes ont été couramment utilisés dans l'industrie du médicament comme contraceptif et dans l'hormonothérapie substitutive. Ils ont été recommandés pour la ménopause, les symptômes de la ménopause, et dans la prévention de l'ostéoporose et les maladies cardiovasculaires. Le rôle neuroprotecteur de l'œstrogène naturel $17\beta\text{-E}_2$ a été découvert au début des années 90.[25-28] Depuis, plus de 600 articles ont été publiés confirmant ces observations.

Ces études ont ravivé l'intérêt pour l'implication des œstrogènes dans les processus mnésiques et notamment chez la femme.[29] Depuis, les effets bénéfiques des œstrogènes sur les processus d'apprentissage et de la mémoire ont été montrés dans différentes études.[29-37] La majeure partie de la recherche actuelle sur les œstrogènes et leurs fonctions dans l'hippocampe se concentre sur la neuroprotection contre le déclin cognitif au cours du vieillissement normal ou pathologique surtout chez les femmes. Mais d'autres pathologies neurodégénératives semblent être positivement impactées par les œstrogènes en particulier la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson. [38-41] L'implication des œstrogènes dans la sclérose en plaque, l'accident ischémique, la schizophrénie et la dépression mentale attire tout autant l'attention.[34, 42, 43] Toutes ces études ont montré les effets néfastes du vieillissement sur les systèmes noradrénergiques et dopaminergiques. Elles ont aussi démontré l'importance de la préservation des fonctions cérébrales au cours du vieillissement.

Neuropathologiquement, la MA se caractérise essentiellement par le dépôt extracellulaire de la protéine β -amyloïde ($A\beta$) sous la forme de plaques séniles. L' $A\beta$ est un peptide qui résulte de la maturation protéolytique de la protéine précurseur d'amyloïde (APP) transmembranaire. De plus, l'hyperphosphorylation de la protéine cytosquelettique Tau dans les neurones conduit à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires au sein de certaines régions du cerveau (y compris l'hippocampe et le cortex cérébrale). Ces lésions dégénératives sont associées à l'activation des cellules gliales, la dystrophie neuritique, la perte des synapses et enfin la mort des neurones. Par conséquent, le facteur déterminant qui conduit à la neurodégénération liée à la MA, est l'accumulation anormale d' $A\beta$.[44]

Le rôle protecteur des œstrogènes contre la MA pourrait s'expliquer par plusieurs modes d'actions, dont certains ont été également mis en évidence dans les études d'autres pathologies.

Ces effets neuroprotecteurs se répartissent en trois catégories :

- 1) l'amélioration de la cognition à travers la régulation de divers processus, y compris la modulation de la densité et de la morphologie dendritique, la plasticité neuronale, divers systèmes de neurotransmission [45-47] ;
- 2) la protection contre la mort des cellules neuronales par les mécanismes mitochondriaux [48] ;
- 3) le ralentissement de la progression de la MA non seulement par l'augmentation de la résilience neuronale contre des lésions cérébrales excitotoxiques ou inflammatoires provoquées par son évolution, mais surtout par la diminution de l'accumulation des plaques amyloïdes et de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. [36]

La capacité du 17β -E₂ à réduire l'accumulation d'A β est l'une des actions neuroprotectrices les plus intéressantes.[36] Son action passe par la favorisation du métabolisme non-amyloïdogénique des protéines précurseurs APP. En effet, les APPs peuvent être métabolisées par deux voies alternatives qui dépendent de la protéase impliquée dans le premier clivage (*Figure I.5*). La voie amyloïdogénique responsable de la production du peptide A β et des plaques séniles est initiée par les β -sécrétases. L'utilisation de l'APP par les α -sécrétases mène vers la production des petites protéines sAPP- α , qui auraient des propriétés neuroprotectrices et un rôle utile dans la plasticité neuronale.[49, 50] Il s'agit du métabolisme physiologique le plus commun, dit voie non-amyloïdogénique. Dans plusieurs lignées cellulaires, 17β -E₂ favorise la production de sAPP- α ce qui réduit par conséquent la quantité de l'A β . [32, 51]

De plus, des données récentes indiquent que le 17β -E₂ peut moduler le métabolisme de l'APPs par régulation de l'expression des sécrétases impliquées (*Figure I.5*). [32, 52, 53] Il n'est pas encore certain que cet effet dépende des REs, s'il est médié par des actions génomiques classiques, ou s'il est plutôt médié par la régulation transcriptionnelle.

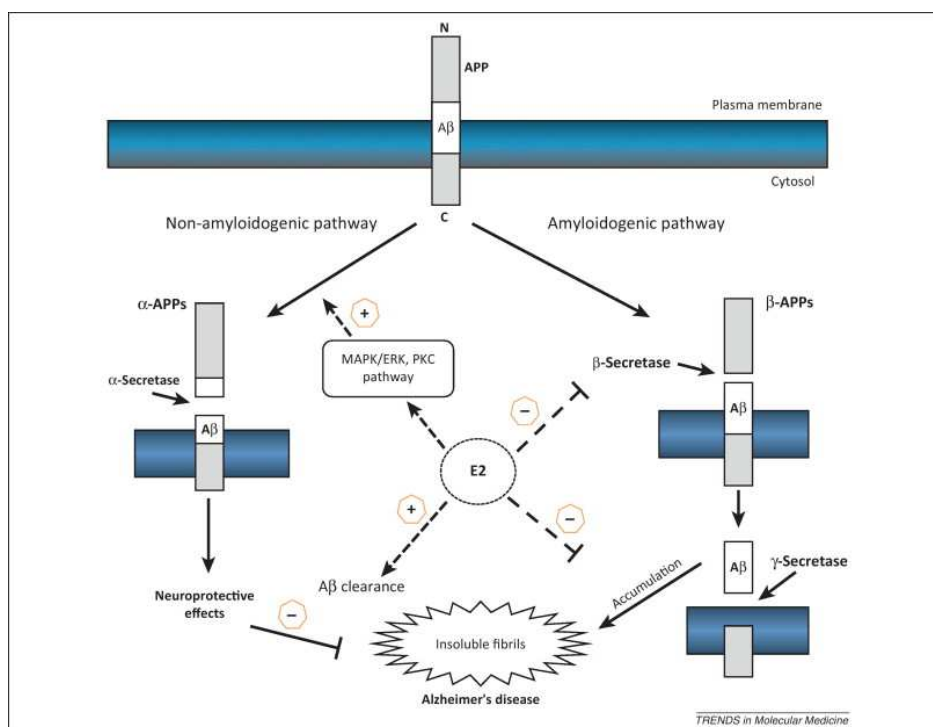


Figure I.5 : Les mécanismes de prévention d'accumulation des plaques amyloïdes par le 17β-E₂. [53]

Le 17β-E₂ réduit les lésions ischémiques cérébrales, lorsqu'il est administré avant ou même après la lésion au sein d'une fenêtre thérapeutique étroite de moins de trois heures.[54] Le 17α-E₂ est considéré comme moins actif car il se lie avec moins d'affinité aux récepteurs des œstrogènes, mais il fournit également un effet neuroprotecteur positif.[55, 56] Les études expérimentales chez les animaux ont mis en évidence un rôle important de ces deux isomères d'Estradiol dans le contrôle de la fonction du système nerveux central (SNC). [30, 57] Ceci suggère qu'ils pourraient être de bons candidats dans l'élaboration des stratégies (utilisation des hormones ou de leurs analogues naturels ou de synthèse capables de lier les récepteurs des œstrogènes (SERM)) pour vaincre ou prévenir les maladies neurodégénératives et psychiatriques.

Les œstrogènes ont démontré la capacité à moduler la maturation des cellules neuronales et la plasticité de la croissance axonale et dendritique.[58] Dans les astrocytes, cellules de soutien du SNC, les œstrogènes augmentent l'absorption du glutamate afin de diminuer son excitotoxicité et prévenir la perte des cellules neuronales.[59] Le 17β-E₂ peut également moduler la réponse immunitaire dans le SNC en intervenant à différentes étapes inflammatoires et niveaux d'interaction entre les cellules immunomodulatrices telles que les microglies, les astrocytes et les lymphocytes-T.[58] De plus, le 17β-E₂ stimule la production de l'apolipoprotéine E (ApoE) dans les astrocytes. L'ApoE est essentielle à l'entretien et au remodelage des membranes neuronales et est impliquée dans la croissance axonale.[60, 61]

Les effets du 17β -E₂ peuvent également faire intervenir des récepteurs localisés dans la mitochondrie, petites organelles impliquées dans les conversions énergétiques résultant de la respiration cellulaire.[62] La forme prédominante des REs présente sur les membranes de cette organelle est le RE- β , même si les deux types (α et β) sont capables de se lier directement à l'ADN mitochondriale.[63, 64] Le cerveau humain représente seulement 2% de la masse corporelle, pourtant il consomme 20% de l'énergie totale de l'organisme utilisée pour la respiration mitochondriale et la génération d'ATP. Ainsi, le cerveau est particulièrement tributaire d'une fonction mitochondriale efficace, et, si elle est altérée, rapidement menacé de détérioration bioénergétique. Les effets bénéfiques du 17β -E₂ sur l'ensemble du système bioénergétique du cerveau passent par plusieurs mécanismes :

- la régulation de transport du glucose *via* le contrôle de l'expression des protéines impliquées comme les transporteurs et les enzymes [65, 66] ;
- la stimulation de l'assimilation du glucose par glycolyse aérobie [37, 58, 62, 67] ;
- la potentialisation de la production d'énergie *via* l'augmentation d'expression des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, dans la phosphorylation oxydative et la production d'ATP [37, 58, 62, 67, 68] ;
- la protection contre le stress oxydatif par la prévention des altérations de l'ADN et par l'augmentation de l'expression des enzymes anti-oxydatifs.[69-72]

Comme la mitochondrie est la source principale des dérivés réactifs de l'oxygène (radicaux libres, peroxydes, ions oxygénés), elle devient naturellement la première cible si la surproduction a lieu. De ce fait, les mécanismes de régulation du stress oxydatif par le 17β -E₂ jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de la mitochondrie, et, par conséquence, de la cellule entière.[68] Les données expérimentales *in vivo* confirment la diminution du stress oxydatif par traitement avec du 17β -E₂ [73-75], et appuient la théorie sur le rôle des hormones androgènes et œstrogènes dans le vieillissement en bonne santé et la longévité.[70, 72]

Des effets bénéfiques des œstrogènes ont été également démontrés dans le modèle de souris EAE (encéphalomyélite auto-immune expérimentale). [76, 77] Chez ce modèle, le traitement avec le 17β -E₂ entraîne une altération de la production des cytokines, des récepteurs de chimiokines, des facteurs de croissance et d'adhésion moléculaire. Ceci conduit à des effets anti-inflammatoires. Le 17β -E₂ peut également exercer des propriétés anti-inflammatoires indirectes, par modification des populations de lymphocytes T.[78] Le 17β -E₂ en diminuant l'expression de la 9-métallopeptidase (MMP-9) permet aux lymphocytes T de migrer dans le SNC à travers la barrière hémato-encéphalique.[79]

Par ailleurs, comme le 17β -E₂, l'E₁ a également montré des effets bénéfiques dans le modèle de souris EAE. Il prévient l'inflammation et la démyélinisation *via* son effet sur les cellules dendritiques et la moelle épinière.[80-82]

Il est important de souligner qu'après certaines études effectuées sur différents modèles expérimentaux, dans des conditions physiologiques et pathologiques, les changements de concentration de stéroïdes neuroactifs dans le plasma ne reflètent pas exactement les changements qui ont lieu dans le SNC.[83-86]

Des études chez l'homme montrent que la concentration de stéroïdes neuroactifs est modifiée par les maladies neurodégénératives du cerveau humain [87-91], ce qui corrobore les résultats obtenus sur différents modèles animaux.[83-86, 92-94] Un certain nombre de données concernant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaque, obtenues au cours des dernières années indiquent des changements dans les voies de la neurostéroïdogénèse à différents niveaux.[90, 91, 95] Les analyses par immunohistochimie des taux protéiques et par PCR quantitative de 37 gènes codants pour des enzymes du métabolisme des stéroïdes, des récepteurs hormonaux et neuronaux ont montré que des changements ont lieu dès le début des maladies neurodégénératives et deviennent plus prononcés dans les derniers stades. Les corrélations entre toutes ces régulations (négatives ou positives) ne sont pas encore bien comprises. Certains de ces changements peuvent contribuer à la pathologie, tandis que d'autres, à l'inverse, peuvent plutôt être impliqués dans les mécanismes de compensation neuro-hormonaux (« programme de sauvetage » tenté par le cerveau malade). Ces données soutiennent également la perspective d'utilisation thérapeutique et préventive des stéroïdes ou leurs analogues pour le traitement des maladies neurodégénératives. L'utilisation d'un œstrogène moins ou non-œstrogénique lors d'une thérapie neuroprotectrice peut être avantageux étant donné qu'elle permettrait de réduire les complications provoquées par les effets secondaires indésirables (par exemple, effets féminisants mais aussi des effets pro-thrombotiques).[96, 97]

1.1.3 Mécanismes d'action des œstrogènes dans le cerveau

Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, les œstrogènes régulent des fonctions de différents systèmes et organes en se liant à des récepteurs spécifiques. Ces récepteurs sont exprimés dans tout le SNC et en particulier dans le cerveau, quel que soit le type cellulaire, et pourraient servir de médiateur de la neuroprotection.[53, 98] La distribution des REs est différente dans le cerveau masculin et féminin, elle change également durant la vie. [20, 59, 99-101] Le maintien des fonctions cérébrales dépend d'un équilibre entre le taux des œstrogènes et l'expression relative des REs. Même si un recouvrement important de l'expression des REs est observé dans de nombreuses régions cérébrales, le schéma de distribution spatio-temporelle (*Tableau I.1*) et le niveau d'expression restent différents pour chaque type de récepteurs. [53, 102]

Un fait important à noter est que les RE- α et RE- β peuvent exister et agir non seulement comme homodimères,[14, 103] mais également sous forme d'hétérodimères, ce qui suggère une interaction fonctionnelle entre le RE- α et le RE- β . Ainsi, un équilibre "approprié" entre les taux de RE- α et de RE- β peut être également nécessaire pour arbitrer la neuroprotection induite par les œstrogènes. Les modifications des rapports entre ces récepteurs peuvent déterminer si le 17β -E₂ joue un rôle protecteur.[104, 105]

Dans le SNC, les RE- α et RE- β sont largement présents et exprimés dans des cellules neuronales et non-neuronales. Ils sont présents dans les noyaux cellulaires, les prolongements dendritiques et les terminaisons axonales des neurones pyramidaux, dans les astrocytes et les cellules gliales (*Figure I.6*). [106] Les RE- α et RE- β sont détectés dans tous les compartiments cellulaires (membranes, cytoplasme, noyau, mitochondrie) tandis que le GPR30 se trouve surtout sur les membranes des structures cytoplasmiques comme, par exemple, le réticulum endoplasmique (le lieu de stockage du calcium). Cette localisation du GPR30 est associée à son rôle d'activation des voies de signalisation dépendantes du calcium, responsables des effets non-génomiques du 17β -E₂. [107] Initialement identifié dans les cellules cancéreuses, le GPR30 a été retrouvé dans plusieurs zones cérébrales et est de plus en plus associé avec les effets neuroprotecteurs du 17β -E₂. [108]

Tableau I.1. Distribution des REs dans différentes zones cérébrales (adapté de [53, 109])

Type de récepteur aux œstrogènes	Distribution dans le cerveau			
	<i>Forte</i>	<i>Modérée</i>	<i>Faible</i>	<i>Néant</i>
RE- α	Amygdale, Noyau des stria terminalis, Aire pré-visuelle, Substance grise periaqueducatale	Allocortex, Hypothalamus, Locus Cœruleus, Noyau gélatineux de Rolando	Hippocampe, Noyaux du Raphé, Région sous-thalamique	Thalamus, Cerebellum, Isocortex, Tegmentum Noyau tegmental antérieur, Aire ventrale Tegmentale, Pallidum, Olive bulbaire, Noyaux inférieur et supérieurs de l'Olive. Substance noire
RE- β	Amygdale, Noyaux du Raphé, Substance noire Noyaux des stria terminalis	Hippocampe, Allocortex, Locus Cœruleus, Tegmentum ventral, Aire pré-visuelle, Globus pallidus	Hypothalamus, Olive bulbaire inférieure, Isocortex, Thalamus, Tegmentum, Substance grise périaqueducatale, Pontine nuclei, Noyaux trigéminés	Cervelet, Sub-thalamus
GPR30	Allocortex, Hippocampe, Hypothalamus, Isocortex, Cervelet, Aire pré-visuelle, Locus Cœruleus, Pontine Nuclei, Tegmentum, Noyaux trigéminés, Olive bulbaire supérieure	Substance grise périaqueducatale	Amygdale, Noyau des stria terminalis, Noyaux du Raphé, Substance grise	Tegmentum ventral

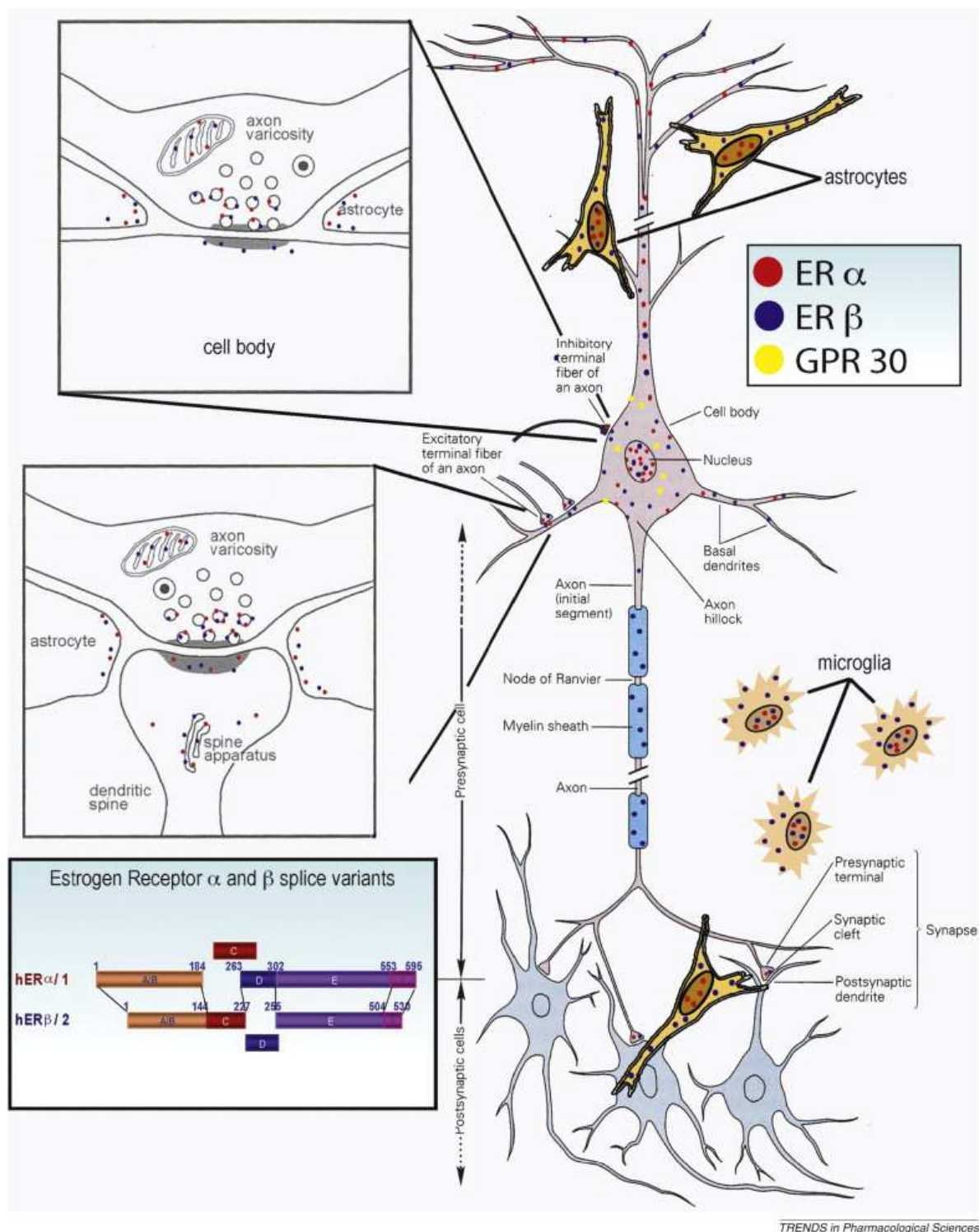


Figure I.6 : La diversité et la complexité de l'expression et de la localisation des REs dans les neurones et les cellules gliales du SNC humain.[106]

Cependant, les mécanismes moléculaires exacts de l'activation des REs par différents modulateurs œstrogéniques doivent être davantage étudiés. Des découvertes récentes des interférences (cross-talking) entre les REs et des formations de complexes entre le GPR30 d'un côté, et les REs nucléaires (RE- α et RE- β) et/ou des protéines d'échafaudage de l'autre, incitent

à clarifier le rôle de chaque type de récepteur dans les différents effets des œstrogènes.[108, 110, 111]

Dans l'hippocampe, les deux voies de signalisation des REs, génomique et non-génomique, ont été décrites dans plusieurs types cellulaires.[110, 112] Par exemple, en 2014 Sellers *et al.*, [110] décrivent les effets membranaires du 17β -E₂ et leurs implications sur la cognition. Ils défendent l'idée selon laquelle les effets membranaires sont articulés avec les effets nucléaires et qu'un défaut dans cette articulation pourrait être à l'origine du déclin mnésique lié à l'âge. Cependant il n'est pas fait référence aux concentrations locales de 17β -E₂ qui pourtant sont probablement à l'origine de la modulation d'une voie par rapport à l'autre. Quoiqu'il en soit, les effets restent complexes car au-delà du fonctionnement cellulaire, il faut prendre en compte le fait qu'une tâche mnésique implique dans la grande majorité des cas plusieurs territoires cérébraux et plusieurs types cellulaires qui ne réagissent pas forcément de la même façon aux œstrogènes. Ainsi l'effet du 17β -E₂ sur une tâche mnésique n'est pas forcément transposable à une autre tâche. Il faut donc être prudent et le plus précis possible lorsque l'on décrit les effets de cette molécule sur le cerveau et au-delà sur les fonctions cognitives.

Les REs α et β sont indispensables pour la médiation des tâches d'apprentissage hippocampe-dépendantes. [112] Plusieurs études *in vivo* ont démontré que l'inactivation génétique (knockout) d'un seul récepteur (soit le RE- α , soit le RE- β) détériore significativement les performances des souris femelles dans l'apprentissage de la navigation spatiale ou dans les conditions de stress.[113-115] Les deux REs, α et β , sont impliqués dans la neurogenèse stéroïdo-dépendante de l'hippocampe [116] et la spinogenèse [117], même si le rôle de chacun des récepteurs n'est pas similaire.[118] En effet, la signalisation par le RE- α et le RE- β conduit à l'expression différentielle de protéines synaptiques, ce qui indique que ces deux récepteurs ont des rôles distincts. [119]

Des études *in vivo* ont également été réalisées pour déterminer le rôle de ces récepteurs aux œstrogènes dans la médiation de la neuroprotection pendant le vieillissement.[105] Han *et al.* ont montré que le maintien des fonctions mnésiques dans l'hippocampe dépend de l'équilibre entre le taux du 17β -E₂, d'un côté, et le rapport des niveaux d'expression des deux récepteurs, le RE- α et le RE- β de l'autre (*Figure I.7*). Le RE- α est fondamental pour le maintien des processus cognitifs, tandis que le RE- β semble jouer un rôle mineur. Avec le vieillissement, les niveaux des œstrogènes diminuent et l'expression dans l'hippocampe du RE- α par rapport au RE- β est réduite, ce qui diminue la capacité des œstrogènes à préserver la cognition. L'augmentation de l'expression RE- α peut préserver la mémoire même si la concentration du 17β -E₂ reste faible. En même temps, le dysfonctionnement mnésique dû à l'inactivation des RE-

α peut être compensé par un traitement avec du 17β -E₂ : la mémorisation est améliorée 72 h après l'administration, ce qui suppose le déclenchement de mécanismes compensatoires, probablement *via* le RE- β . [105] Cependant, il faut rester prudent au regard de ces analyses et théories annoncées, car uniquement les récepteurs RE- α et le RE- β ont été considérés.

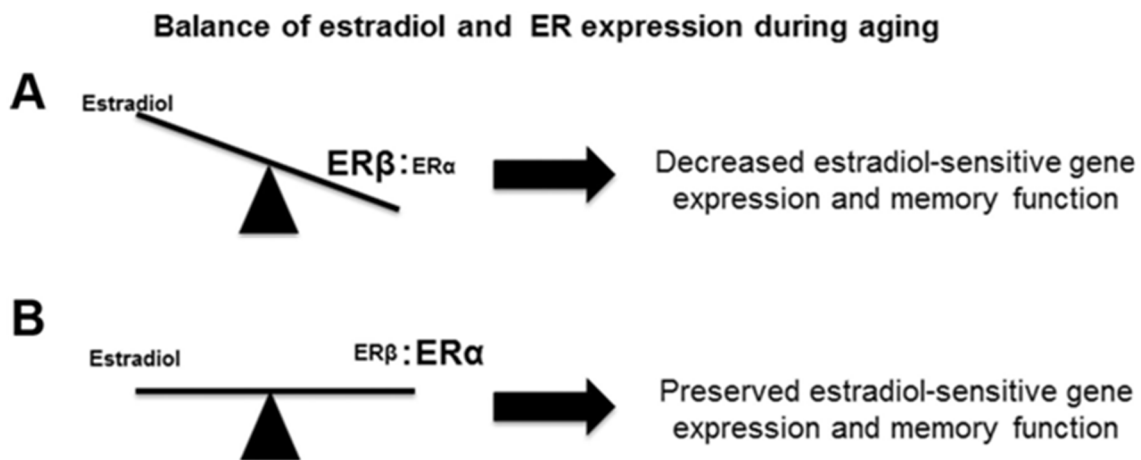


Figure I.7 : Rôle des relations entre les taux de 17β -E₂ et l'expression de ses récepteurs dans les fonctions mnésiques hippocampo-dépendantes pendant le vieillissement. [105] **A)** La diminution du taux de 17β -E₂ et de l'expression du RE- α par rapport au RE- β lors du vieillissement perturbe les processus transcriptionnels indispensables pour le maintien des fonctions cognitives. **B)** dans un contexte de faibles taux d'œstrogènes, l'augmentation de l'expression du RE- α par rapport au RE- β peut préserver le bon fonctionnement de la mémoire.

Dans différentes régions de l'hippocampe, le rapport RE- α / RE- β change avec l'âge. Chez les rats jeunes et d'âge moyen, le RE- β est le récepteur dominant, tandis que le RE- α est présent en faibles quantités. Avec le vieillissement, la localisation nucléaire du RE- α augmente dans le gyrus denté et le CA3, mais diminue dans le CA1. [120]

Récemment, Foster a défendu dans une revue la théorie selon laquelle l'équilibre de concentrations entre les récepteurs RE- α et RE- β était la principale explication du déclin cognitif lié à l'âge. [104] Son argumentaire se base sur plusieurs espèces (homme, singe, rat, souris) qui n'expriment pas forcément les mêmes récepteurs au niveau hippocampique. Cette expression peut être modifiée de façons différentes en fonction de l'âge et suivant les espèces. Par ailleurs, il néglige la voie membranaire et ne mentionne pas le rôle de GPR-30 dans la fonction neuronale hippocampique. Il évoque une réponse aux œstrogènes non monotonique qui peut sans doute s'expliquer par la conjonction des voies nucléaires et membranaires qu'il ne prend pas en compte. Il évoque les concentrations cérébrales et hippocampiques de 17β -E₂ sans distinguer les rates des souris, s'intéresse essentiellement aux femelles et reprend des données que l'on peut juger contestables compte tenu des très faibles taux de récupération décrit par les auteurs. Finalement bien que cette théorie s'appuie sur un certain nombre de données, elle souffre essentiellement d'une absence de données précises sur les concentrations de 17β -

E₂ au cours du vieillissement et s'appuie uniquement sur l'activité aromatasase comme preuve de la présence ou de l'absence de 17β-E₂ au niveau local.

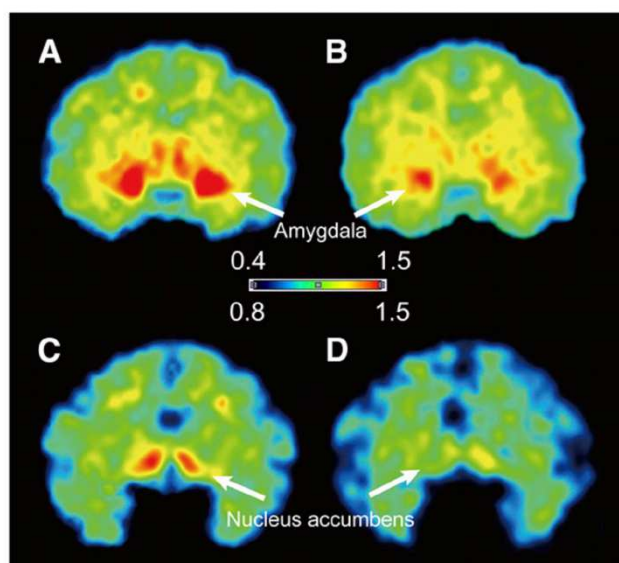


Figure I.8 : Exemple de distribution de l'aromatase dans différentes zones de cerveau chez les singes rhésus.[121] Le dégradé de couleurs du bleu au rouge représente la fonction linéaire croissante de la concentration d'enzyme. **A** et **C** : imagerie TEP au ¹¹C-cétrozole ; **B** et **D** : imagerie au ¹¹C-vorozole.

Avant la mise en évidence de l'activité aromatasase dans le cerveau, il a été généralement admis que les effets neuroprotecteurs du 17β-E₂ sont principalement dus au 17β-E₂ produit dans les ovaires.[122] Les œstrogènes peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique, mais en parallèle, le cerveau peut produire des œstrogènes endogènes à partir du cholestérol.[53] Certaines zones du cerveau présentent une expression élevée de l'enzyme considérée comme génératrice du 17β-E₂ - l'aromatase.[123] Par exemple, Takahashi *et al.* ont récemment mis en évidence la distribution de l'aromatase dans les conditions physiologiques chez les singes adultes (Figure I.8).[121] Les plus fortes concentrations de l'aromatase ont été observées dans l'amygdale et l'hypothalamus par imagerie TEP (tomographie par émission de positions) à l'aide de traceurs faiblement radioactifs, ¹¹C-cétrozole (images A et C) et ¹¹C-vorozole (images B et D). Les deux traceurs sont des analogues des inhibiteurs de l'aromatase développés pour le traitement de cancers œstrogène-dépendants. Le ¹¹C-cétrozole possède une affinité plus élevée vis-à-vis de l'enzyme et a permis également de détecter son expression dans les noyaux accumbens (image C par rapport à l'image D). Cette étude illustre bien l'importance du choix de la méthode de détection pour la mise en place d'expériences en neurosciences.

Stoffel-Wagner *et al.* ont utilisé les méthodes de dosage enzymatique pour mesurer l'activité de l'aromatase vis-à-vis de l'un de ces substrats, l'Androstènedione, dans différentes régions du cerveau humain (comparaison entre les hommes et les femmes), telles que : le lobe

temporal, le lobe frontal et l'hippocampe.[124] Dans la région de l'hippocampe, une concentration élevée d'aromatase a été démontrée par hybridation *in situ* et l'analyse immunohistochimique. [125, 126] Cela peut conduire à la production locale de concentrations importantes de 17β -E₂ qui peuvent être équivalentes ou même supérieures aux taux circulants.[125, 126] Il faut souligner que le cortex cérébral exprime l'aromatase et produit ainsi le 17β -E₂ endogène, qui peut également réguler les fonctions corticales.[123, 127] L'inhibition de l'aromatase par administration intracérébrale des inhibiteurs de l'aromatase entraîne une diminution du taux du 17β -E₂. Ainsi, des oligonucléotides spécifiques anti-sens ont été utilisés chez des rates ayant subi une ovariectomie. Celles-ci ont subi une ischémie induite afin d'observer la modification d'expression de l'aromatase et de la concentration locale de 17β -E₂ dans la région CA1 de l'hippocampe.[122] Lors de l'ischémie, le taux de l'aromatase et de 17β -E₂ augmentent localement. Parallèlement, le traitement chronique avec les oligonucléotides anti-sens atténue de manière significative la concentration l'aromatase et le taux de 17β -E₂ dans la région CA1 de l'hippocampe. Selon les auteurs qui ont dosé le 17β -E₂ *in situ* par ELISA, les concentrations de 17β -E₂ passent de 35 à 20 fmoles par mg de protéine.[122]

Il est vrai qu'en raison des effets neuroprotecteurs du 17β -E₂ mis en évidence sur les cultures cellulaires et chez les modèles animaux et parce que l'aromatase est considérée comme l'enzyme-clé de la biosynthèse du 17β -E₂, il est important de déterminer les circuits neuronaux spécifiques qui expriment l'aromatase dans le cerveau humain. Il est également important de déterminer si cette expression est modulée par des conditions physiologiques ou pathologiques.[123] Plusieurs approches décrites précédemment (dosages biochimiques, immunohistochimie, techniques de réplique ciblée *in vitro*, imagerie *in vivo*...) peuvent être utilisées pour obtenir la cartographie de l'aromatase dans le cerveau, cependant son activité enzymatique ou son niveau d'expression ne peuvent pas être directement transposés au taux de 17β -E₂. L'aromatase est une enzyme polyvalente qui produit selon le substrat soit l'E1, soit le 17β -E₂, d'un côté et de l'autre, l'homéostasie du 17β -E₂ est maintenue par différents processus de régulation (*Figures I.2 et I.3*).

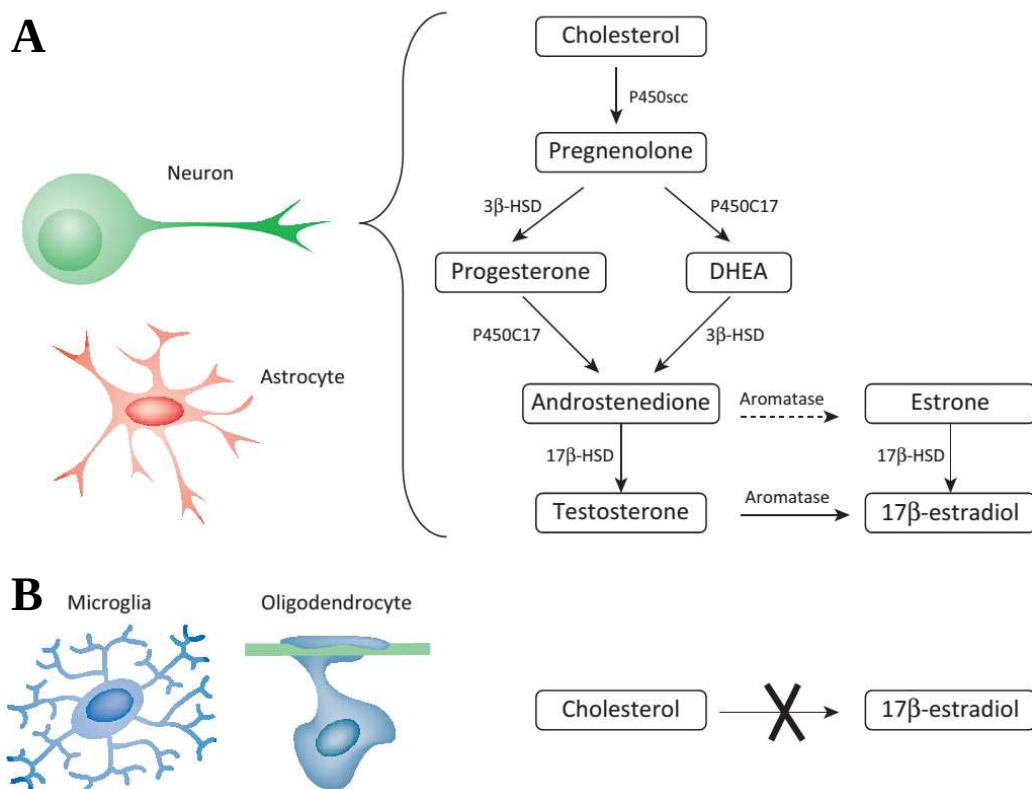


Figure I.9 : Stéroïdogénèse selon le type cellulaire du cerveau. [53] **A** : les neurones et les astrocytes expriment toutes les enzymes indispensables pour la production locale du 17β -E₂. **B** : la synthèse du 17β -E₂ endogène n'est pas démontrée dans la microglie et les oligodendrocytes.

La récente revue de Cui *et al.* résume l'activité et la présence des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse selon le type cellulaire du cerveau, comme les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (ou microgliocytes) (Figure I.9).[53] Les neurones et les astrocytes de différentes régions cérébrales (hippocampe, hypothalamus, amygdale, thalamus, cortex cérébral etc...) expriment toutes les enzymes indispensables pour la production locale du 17β -E₂ à partir du cholestérol. L'expression et l'activité de l'aromatase n'ont pas pu être mises en évidence dans la microglie et les oligodendrocytes. Cependant, la microglie peut exprimer la réductase 17β -HSD, responsable de la synthèse du 17β -E₂ à partir de l'E₁ et de la testostérone à partir de l'Androstènedione.[128] Cette inégalité cellulaire vis-à-vis de la production locale des œstrogènes suggère leur importante implication dans le fonctionnement spécifique du cerveau à différents niveaux et démontre que leurs concentrations locales peuvent être très différentes des taux circulants.

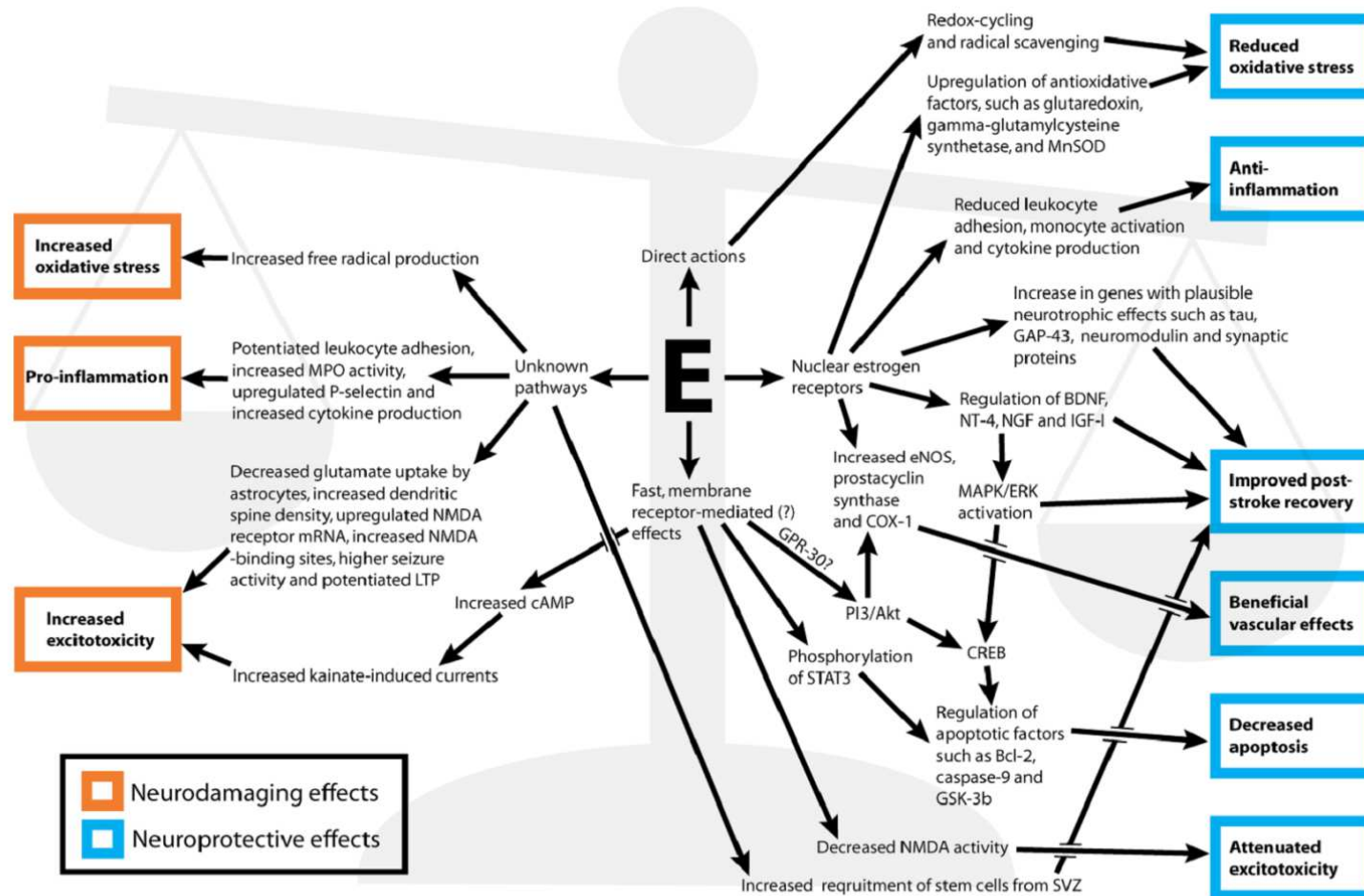


Figure I.10 : Schéma simplifié des éventuelles voies de signalisation modulées par les œstrogènes dans le cerveau.[129] E = œstrogènes ; cadre orange : effets néfastes ; cadre bleu : effets neuroprotecteurs. La balance dans le fond de l'image symbolise l'équilibre entre les deux, lequel peut être modifié par des circonstances particulières.

En résumé, le rôle neuroprotecteur ou l'effet neuro-préjudiciable du $17\beta\text{-E}_2$ dans le cerveau dépend à chaque moment donné de plusieurs paramètres : au niveau moléculaire, de sa concentration locale (apport exogène et production endogène) et de l'expression (totale et relative) de différents récepteurs des œstrogènes et d'autres acteurs des voies de signalisation ; du type cellulaire ; des zones cérébrales particulières et des connections entre elles ; du contexte physiologique ou pathologique, de l'âge, du genre, des conditions environnementales (stress, infection, pollution), etc... Nous n'avons pas parlé ici des effets néfastes des œstrogènes également répertoriés dans la littérature scientifique.[129] Ils peuvent avoir lieu dans certaines conditions particulières et notamment dans le cas d'exposition à des concentrations supra-physiologiques. A ce jour, les mécanismes moléculaires conduisant à des effets différents ne sont pas bien compris (*Figure I.10*). Très peu de données existent sur les relations entre les doses bioactives et biodisponibles des œstrogènes dans des zones cérébrales et les effets observés. La possibilité de pouvoir doser le $17\beta\text{-E}_2$ et d'autres stéroïdes œstrogéniques de façon fiable, sensible et spécifique dans différentes matrices biologiques pourrait nous apporter des éléments de réponses.

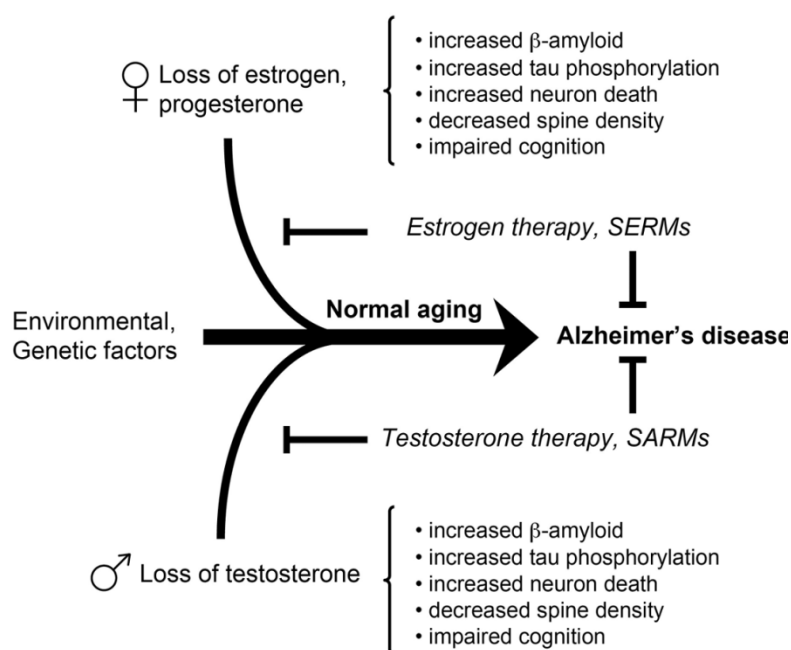


Figure I.11 : Les relations entre la perte hormonale liée à l'âge et le risque des maladies neurodégénératives.[130] L'utilisation des hormones ou de leurs analogues naturels ou de synthèse capables de lier les récepteurs des œstrogènes (SERM) ou des androgènes (SARM), dans une fenêtre thérapeutique bien définie, pourrait prévenir le vieillissement pathologique.

Dans le contexte du vieillissement général de la population, la question de ce que pourrait être un vieillissement réussi pour chacun de nous est posée. Ce processus inéluctable et, dans un certain sens, normal, peut être fortement impacté par des pathologies

neurodégénératives. Les œstrogènes sont considérés comme des médiateurs importants des fonctions cérébrales particulièrement touchées au cours du vieillissement physiologique ou pathologique, incluant la mémoire et les troubles cognitifs et psychologiques. En même temps, la diminution des taux hormonaux au cours de la vie est un processus naturel. L'exposition durant la vie à la combinaison de différents facteurs de risques, génétiques et environnementaux, interfère avec de nombreux changements dans le corps liés à l'âge : l'ensemble de ces éléments pourrait provoquer un certain nombre de processus neuropathologiques. L'idée d'utilisation thérapeutique et préventive des stéroïdes ou leurs analogues de type SERMs ou SARMS (modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes ou des androgènes, respectivement) peut s'avérer bénéfique. Les phyto-œstrogènes sont des SERMs d'origine alimentaire et sont considérés comme des candidats potentiels. Il est essentiel, lorsqu'on évalue une substance SERM, d'apprécier son activité biologique dans les tissus cibles des œstrogènes dans le contexte donné (comme la concentration locale des œstrogènes natifs, par exemple) afin d'estimer ses avantages et ses potentiels effets secondaires délétères. Le traitement appliqué au moment opportun et à des concentrations effectives pourrait restaurer les effets neuroprotecteurs des œstrogènes et prévenir le développement des processus neurodégénératifs (*Figure I.11*).

I.2 QUANTIFICATION DES ŒSTROGENES

Afin de quantifier les œstrogènes dans des matrices complexes, différentes méthodologies analytiques ont été décrites dans la littérature reposant principalement sur des techniques de dosage immunologique comme l'analyse radio-immunologique (RIA) et des systèmes de chromatographie couplée à un spectromètre de masse en tandem. La difficulté principale de l'analyse est due à la faible concentration de ces stéroïdes dans les échantillons biologiques (de l'ordre de la pg.mL^{-1}).

I.2.1 Dosages radio-immunologique (RIA)

La méthode RIA a été mise au point dans les années 1960 par les américains *Berson* et *Yalow*. [131] C'est une technique très précise de dosage des substances biologiques telles que les enzymes, les hormones et les stéroïdes, dans le sang, l'urine, la salive, ou tout autre échantillon biologique dans lequel la formation du complexe antigène-anticorps est détectée grâce à l'utilisation de composés radioactifs (Iode 125). [132] La RIA classique repose sur le principe d'une liaison compétitive, mettant en présence une quantité connue d'anticorps (Ac) spécifique d'un antigène (Ag) donné à analyser et ce même antigène préalablement marqué par un radioisotope. Un complexe anticorps-antigène se forme selon le schéma suivant (*Figure I.12*) :

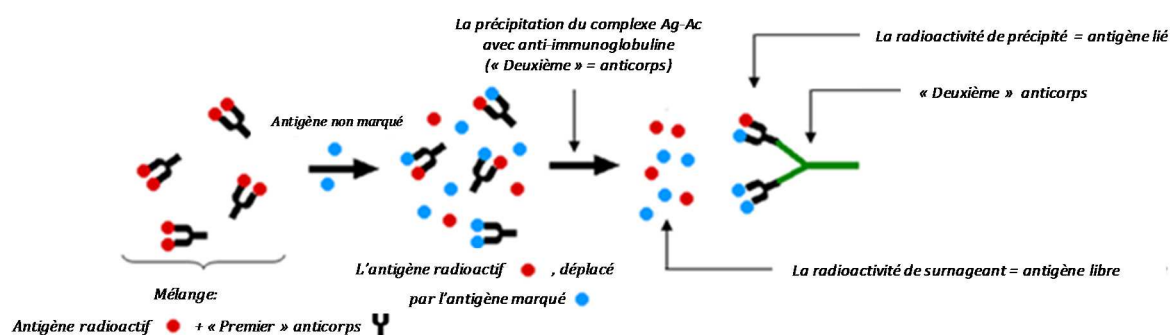


Figure I.12 : Principe de la technique RIA

La quantification des œstrogènes par RIA directe dans le sérum a été décrite par Abraham en 1970. [133] Dans le cas où les œstrogènes sont présents en faible quantité (de l'ordre de la pg.mL^{-1}), la méthode RIA révèle un manque de spécificité. Dans l'organisme humain, les œstrogènes sont convertis en plus de 100 métabolites conjugués et non conjugués. Certains œstrogènes conjugués, tels que le sulfate d'estrone, ont des concentrations plasmatiques très élevées, et peuvent réagir de façon croisée avec les anticorps, induisant une surestimation brute des niveaux d'œstrogènes. Dans ce cas, il est nécessaire d'éliminer tous les

métabolites qui interfèrent, ce qui implique une étape de purification. Parallèlement, est apparue la RIA-conventionnelle, qui est caractérisée par une étape d'extraction avec un solvant organique et une purification sur une colonne chromatographique. Dans le cas de la RIA-directe, la limite de détection du 17β -E₂ est de 5 pg.mL⁻¹ de sérum humain et dans le cas de la RIA conventionnelle, 2 pg.mL⁻¹ de sérum humain.[134]

Comme la technique RIA requiert l'utilisation de radioéléments, il y a un risque pour l'expérimentateur. En même temps, elle s'avère être plus complexe et moins sensible que les autres méthodes existantes.

Comme alternative, l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS) couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou liquide (LC), fut au fil des années considérée comme la technique de référence pour la quantification des neurostéroïdes comme la Pregnénolone [135], et les œstrogènes dans le plasma [136], le sérum [137], l'urine [138] et l'eau [139].

1.2.2 Chromatographie en Phase Gazeuse (GC)

La GC est un mode d'analyse adapté pour les composés volatils. Les œstrogènes n'étant pas des substances volatiles (leurs points d'ébullition sont de l'ordre de 450°C), une dérivation sera donc nécessaire avant leur analyse en GC. Pour l'analyse des œstrogènes dérivés, la GC est couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). L'ionisation électronique est couramment utilisée comme mode d'ionisation.[140, 141] Les limites de détection dans ces conditions sont de l'ordre du pg.mL⁻¹ de plasma.[142]

Les composés les plus utilisés pour la dérivation des œstrogènes, en vue de leur analyse par GC, sont l'anhydride pentafluoropropionique [142], le *N*-(triméthylsilyl) imidazole [140], l'alkylation et la silylation avec le pentafluorobromobenzène (PFBBBr) et le *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA).[141, 143] Les réactions de dérivation sont la plupart du temps réalisées en milieu anhydre, dans des solvants organiques tels que l'acétonitrile ou l'éthanol, avec du KOH comme catalyseur pour certaines réactions. Elles peuvent être lentes, de 40 minutes à plusieurs heures, et peuvent nécessiter une température élevée, jusqu'à 60°C.

La GC-MS est encore utilisée pour les analyses des œstrogènes présents dans l'eau et dans l'urine.[144] Cela est dû à la grande quantité d'échantillons, au coût relativement réduit du matériel et à la simplicité de la technique. Cependant, le besoin de dérivation pour cette technique reste un désavantage majeur en raison de la complexité de la méthode, de l'obtention de produits de dérivation instables et sensibles à l'humidité, ce qui peut augmenter les risques d'erreurs de mesure.

1.2.3 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est l'une des méthodes les plus efficaces pour la séparation de mélanges complexes. Elle est largement utilisée en chimie analytique.

Pour atteindre une sensibilité maximale avec une consommation minimale de solvant, des pompes capables de délivrer des volumes de solvants de l'ordre du μL ou nL par minute et des colonnes de très faibles diamètres internes (inférieurs à 1 mm) ont été mises au point lors de cette dernière décennie (nano-LC).

En fonction des caractéristiques des molécules à analyser, plusieurs modes d'interactions ont été développés en HPLC. Par exemple, la chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) permet de séparer des composés en fonction de leur caractère hydrophobe, tandis que les ions et les molécules ionisables sont plutôt séparés par chromatographie d'échange d'ions (IC). La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) est plus adaptée aux molécules hautement polaires et solubles dans l'eau. Pour l'analyse des œstrogènes, molécules de faible masse moléculaire, très peu polaires et faiblement solubles dans l'eau, la chromatographie en phase inverse est le plus souvent utilisée.[145, 146]

Le couplage HPLC-MS permet l'identification des composés grâce à deux types d'informations : le temps de rétention (t_R , le temps que met l'analyte à traverser la colonne) offert par la chromatographie et les informations structurales offertes par la MS. La MS étant une technique sensible utilisée pour détecter, identifier et quantifier les molécules en fonction de leur masse et de leur charge (m/z). La complémentarité de ces deux techniques facilite l'analyse des œstrogènes dans différentes matrices complexes telles que le cerveau ou le plasma.

1.2.4 Chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)

C'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire. Elle est constituée, la plupart du temps, par des silices greffées par des chaînes alkyles. Il existe des greffons apolaires de taille différente, de 4 à 18 atomes de carbone (C4 à C18), donc de polarités différentes (*Figure I.13*). Le facteur de capacité (k') augmente en fonction de la densité de greffage et de la surface des greffons alkyles ($\log k'$ varie linéairement avec le produit NS, N densité de greffage, S surface des greffons).[147] Le facteur de capacité k' caractérise la rétention d'un analyte, indépendamment du nombre de plateaux de la colonne (*Equation 1*).

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

où :

t'_R – le temps de rétention réduit, c'est le temps passé par un analyte dans la phase stationnaire ;

t_M – le temps mort, c'est le temps passé dans la phase mobile.

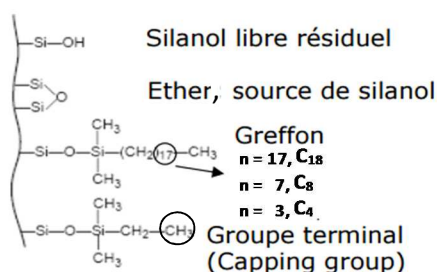


Figure I.13 : Exemple de phase greffée

La phase mobile joue aussi un rôle important et permet de jouer sur deux propriétés distinctes :

- la force éluante qui influe sur la séparation. Les facteurs de capacité des molécules à séparer doivent être entre 2 et 5 pour un mélange simple et entre 0,5 et 20 pour un mélange complexe ;
- la sélectivité qui doit être optimale pour le couple le plus difficile à séparer. Le facteur de sélectivité $\alpha = k'_2/k'_1$ mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés.

L'augmentation du pourcentage de solvant organique tend à augmenter la solubilité de l'analyte dans la phase mobile, conduisant à une diminution du t_R . Les solvants sont classés selon leur force éluante qui va dans le même sens que leur polarité (*Tableau I.2*).

Des additifs peuvent être utilisés pour stabiliser le pH de l'éluant (acide formique, acide trifluoroacétique, triéthylamine, acétate d'ammonium, etc...) et modifier les interactions avec les chaînes alkyles. De manière usuelle, si les composés étudiés possèdent des groupements acides, ils seront analysés à un $\text{pH} = \text{pK}_a - 2$, et en cas de groupements basiques, à un $\text{pH} = \text{pK}_a + 2$. [148]

Tableau I.2 : Propriétés des quelques solvants utilisés en LC [149]

Solvant	UV cutoff, nm	Viscosité, cP	Point d'ébullition (T _E), °C	Indice de miscibilité, M	Polarité, (P)
Isooctane	215	0.50	99	29	0.1
Hexane	195	0.31	69	29	0.1
Toluène	284	0.59	111	23	2.4
Méthyl- <i>t</i> -butyléther	210	0.27	55	-	2.5
Dichlorométhane	233	0.44	40	20	3.1
Propanol-1	210	2.30	97	-	4.0
Tétrahydrofurane	212	0.55	66	17	4.0
Chloroforme	245	0.57	61	19	4.1
Ethanol	210	1.08	78	-	4.3
Acétate d'éthyle	256	0.45	77	19	4.4
1,4-Dioxane	215	1.37	101	17	4.8
Acétone	330	0.36	56	15	5.1
Méthanol	205	0.55	65	-	5.1
Acétonitrile	190	0.38	82	11	5.8
Eau	190	1.00	100	-	10.2

Plusieurs paramètres concernant la colonne influencent la séparation, comme le diamètre et la longueur de la colonne et la taille des particules du support. Plus la taille des particules sera faible, plus l'efficacité sera grande, mais la pression au sein de la colonne sera plus élevée (loi de Darcy).

La théorie des plateaux (N) établit qu'après un certain parcours dans la colonne, les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de Gauss dont l'écart type (exprimé en unité de temps) est lié au nombre de plateaux théoriques parcourus, selon la relation (*Equation 2*):

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (2)$$

où :

t_R – temps de rétention

σ – variance du pic d'élution

En LC, il existe pour la phase mobile plusieurs chemins possibles à travers les particules de la phase stationnaire et les vitesses instantanées de la phase mobile en divers points d'une même section droite sont différentes. Tandis que le temps de rétention est régulé par la vitesse moyenne et ces différences entraînant un certain étalement du profil de concentration du soluté (étalement du pic). Cependant, ce phénomène se trouve atténué par le fait que les molécules de soluté ne sont pas prisonnières d'une veine liquide, mais au contraire peuvent changer de veine par diffusion transversale. Ceci contribue à une relaxation du profil des vitesses et limite la

dispersion du soluté. Knox a montré que le calcul de la contribution du spectre de vitesses de ce couplage à la hauteur de plateau réduite peut être pris avec une bonne approximation (*Equation 3*). [147]

$$h_{flux} \approx A v^{1/3} \quad (3)$$

où :

A – l'influence de la diffusion turbulente due aux hétérogénéités dans l'écoulement
 v – vitesse réduite de la phase mobile

La valeur de la constante A dépend beaucoup de la régularité du remplissage et de l'uniformité de la répartition granulométrique de la phase stationnaire utilisée.

Finalement la hauteur de plateau réduite (HEPT) varie avec la vitesse réduite selon l'*Equation 4*.

$$HEPT = A v^{1/3} + B/v + Cv \quad (4)$$

où :

B/v - l'influence de la dispersion des molécules par diffusion longitudinale
 Cv - l'influence de la résistance au transfert de masse, C peut être diminué en réduisant les distances à parcourir par le soluté dans chaque phase (diminution du diamètre des particules)

La variation de HEPT en fonction de la vitesse de la phase mobile, avec les valeurs $A = 1$, $B = 2$ et $C = 0,1$, est représentée en coordonnées bilogarithmiques (*Figure I.14*). Aux faibles valeurs de v , le terme B/v prédomine et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Aux grandes vitesses réduites, le terme Cv prédomine et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses. Dans la région intermédiaire, le terme $A v^{1/3}$ est prépondérant et h passe par un minimum, $h_{min} = 2,4$, pour une $v = 2,7$. Pour une vitesse réduite comprise entre 1 et 10, h varie peu.[147]

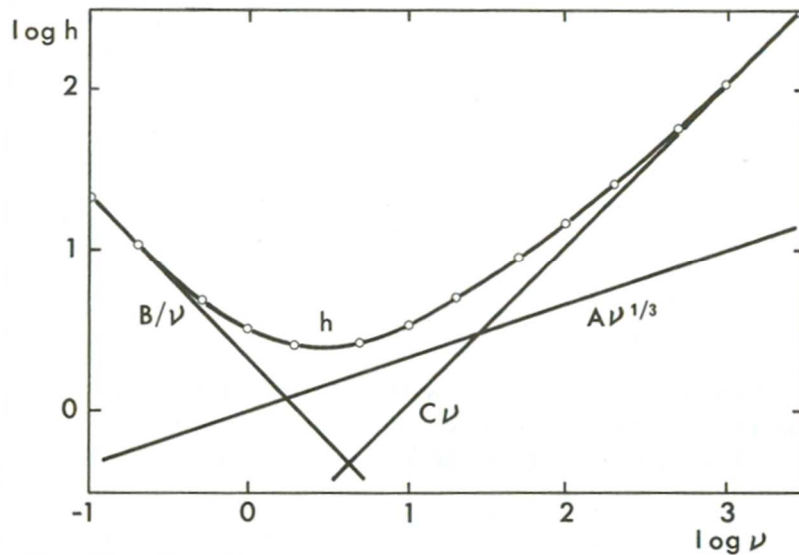


Figure I.14 : Variation de la hauteur de plateau réduite h en fonction de la vitesse réduite v avec : $A = 1$, $B = 2$, $C = 0,1$. [147]

Cependant, pour augmenter la résistance au transfert de masse qui est le facteur limitatif à la cinétique des échanges, il faut diminuer au maximum la distance que doit parcourir le soluté entre les différents sites, ce qui est possible en diminuant la taille des particules (Figure I.15).

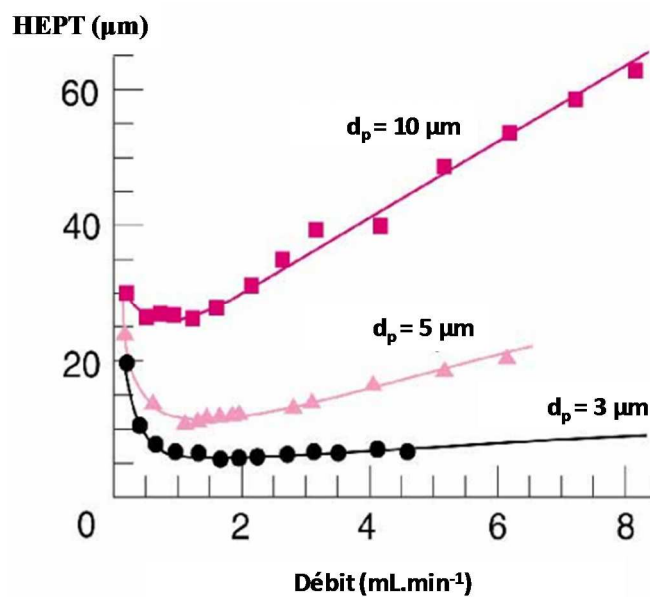


Figure I.15 : Influence du diamètre des particules sur HEPT

La figure ci-dessus illustre le gain d'efficacité quand on passe d'une silice avec $d_p = 10 \mu\text{m}$ à $d_p = 3 \mu\text{m}$. L'équation 5 montre que la mise en œuvre de fine particules permet d'utiliser des grandes vitesses de phase mobile (ce qui permet de diminuer d'autant la durée de séparation) tout en conservant une efficacité maximale.

$$v_{optimal} = \frac{3D_m}{d_p} \quad (5)$$

où :

D_m - le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile

d_p - diamètre des particules

Actuellement, les performances sont encore amplifiées avec l'apparition de la chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC) permettant des temps d'analyse encore plus courts avec des pressions élevées. Cela est dû à l'utilisation des colonnes avec des phases stationnaires de fine granulométrie (diamètres en dessous de 2 μm) qui entraînent une augmentation importante de l'efficacité, donc de la résolution.

1.2.5 Détection par spectrométrie de masse

Ce travail a été effectué en utilisant le spectromètre de masse de type QTRAP 5500 (SCIEX), composé d'une source d'ionisation de type *électrospray*, d'un premier analyseur quadripolaire et d'un deuxième analyseur de type trappe ionique linéaire, permettant de travailler en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM).

D'une manière générale, un spectromètre de masse est divisé en quatre parties distinctes qui sont :

- a) La source qui est le lieu où les ions sont générés et émis dans la phase gazeuse;
- b) L'interface qui assure la transmission et la désolvatation des ions entre la source et l'analyseur;
- c) L'analyseur qui sert à mesurer le rapport masse/charge (m/z) des ions générés;
- d) Le détecteur, qui est équipé d'un multiplicateur d'électrons pour amplifier le signal.

La MS est une méthode d'analyse destructrice qui permet d'obtenir des données structurales caractéristiques. Cette méthode mesure les rapports m/z de molécules ionisées, et fournit ainsi des informations qualitatives et quantitatives sur la composition atomique et moléculaire. Une information de structure peut également être obtenue au moyen de l'analyse d'ions fragments issus des espèces moléculaires.

En ESI, l'introduction de l'échantillon peut être effectuée *via* deux méthodes: infusion directe ou couplage avec une technique de séparation telle que l'HPLC. Typiquement, une infusion directe implique l'introduction progressive dans la source ESI d'une solution d'analyte à l'aide d'une pompe à seringue à une vitesse de 1 à 30 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$. L'échantillon doit être suffisamment concentré et pur, permettant à l'utilisateur de détecter l'ion de l'analyte en

présence éventuelle d'ions interférants. L'infusion directe est principalement utilisée pour identifier les ions précurseurs et effectuer la caractérisation des fragments de l'analyte avant la séparation. Elle est également utilisée pour optimiser l'intensité du signal et d'autres conditions opératoires.

Le processus ESI est très complexe. Les intensités du signal dépendent de la valeur de pKa des analytes, des paramètres instrumentaux de la source lors de l'infusion et de la composition de la phase mobile. La volatilité, la tension superficielle, la viscosité, la conductivité, la force ionique et le pH influencent le procédé d'ionisation. La sensibilité est également influencée par les propriétés chimiques et physiques de la substance à analyser, telles que l'hydrophobie et la capacité de la molécule à s'ioniser, ainsi que par des paramètres de fonctionnement, tels que le débit, la température et la tension appliquée sur les lentilles dans la source ESI.[150]

L'ESI est une méthode largement utilisée en spectrométrie de masse (MS) à cause de sa simplicité et de la facilité de couplage avec la LC.

I.2.5.1 Source d'ionisation electrospray (ESI)

L'ESI a été décrite pour la première fois par Dole *et al.* comme une technique d'ionisation dans les instruments d'analyse en 1968.[150] Plus tard, au début des années 80, Yamashita et Fenn ont réussi à combiner ESI et MS,[151] mais la vraie percée a eu lieu en 1988 quand Fenn et ses collègues [152] ont démontré que l'ESI est particulièrement adaptée aux macromolécules. Ce travail a été honoré par le Prix Nobel en chimie en 2002.

L'ESI est considérée comme un processus électrophorétique [153-155] qui se réalise en trois étapes distinctes (*Figure I.16*) :

- La nébulisation- production de gouttelettes chargées à partir de l'analyte en solution par l'application d'une haute tension sur un capillaire métallique.
- La désolvatation - fission des gouttelettes chargées en gouttelettes de plus en plus petites appelées gouttelettes filles par explosions coulombiennes.
- L'émission d'ions désolvatés en phase gazeuse.

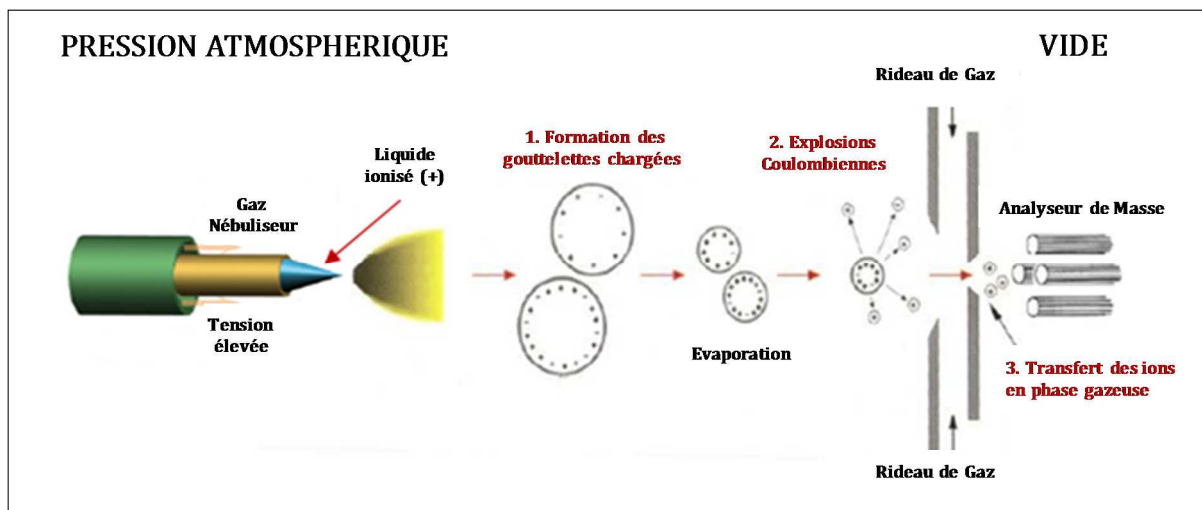


Figure I.16 : Illustration de la production des ions par le mode électrospray

I.2.5.1.a La production de gouttelettes chargées

L'ESI est produite par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire métallique avec un faible débit (d'une dizaine de nL/min à quelques centaines de $\mu\text{L}/\text{min}$). Le champ électrique est obtenu en appliquant une différence de potentiel de plusieurs kilovolts (de 3 à 6 kV) entre le capillaire et la contre-électrode. Ce champ électrique va entraîner la polarisation du liquide et la séparation des charges positives et négatives. En mode d'ionisation positive, le capillaire métallique chargé positivement joue le rôle d'anode, attire et neutralise les charges négatives par oxydation de l'électrolyte, du solvant ou du capillaire métallique. Par conséquent, les charges positives vont se concentrer à la pointe du capillaire. Le liquide va alors avoir tendance à s'allonger et former un cône appelé « le cône de Taylor ». Ce cône va s'étirer jusqu'à éclater en minces gouttelettes enrichies en ions positifs (Figure I.17).

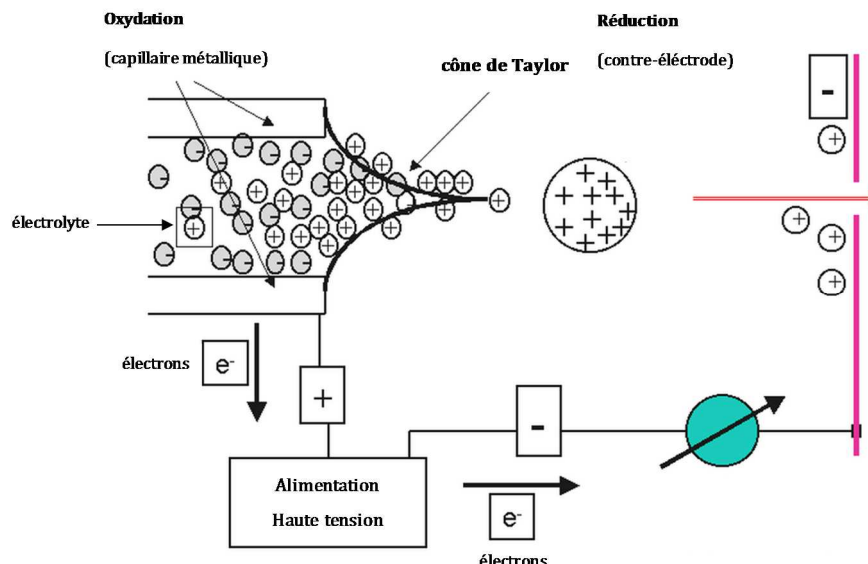


Figure I.17 : Schéma de la formation du cône de Taylor dans une source électrospray

Le procédé d'ionisation peut conduire à la formation d'ions mono-chargés protonés : $[M + H]^+$ en mode positif ou d'ions déprotonés $[M-H]^-$ en mode négatif mais également à des ions de charges multiples appelés ions multi-chargés de type $[M + nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$, en fonction de la polarité des molécules analysées. De plus, des cations tels que Na^+ et K^+ peuvent venir se substituer aux protons.

I.2.5.1.b Fission des gouttelettes chargées, l'explosion coulombienne

Le solvant contenu dans les gouttelettes chargées va progressivement s'évaporer sous l'effet de chaleur fournie dans la source (chauffage à 60°C par exemple) et du gaz de nébulisation, entraînant une diminution de la taille des gouttelettes. La densité de charge de la gouttelette va augmenter jusqu'à atteindre le rayon critique appelé le rayon de Rayleigh (Equation 6), moment où les forces de répulsion électrostatiques sont égales aux forces de tension de surface.

$$Q = 8 \pi (\epsilon_0 \gamma R_r^3)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

où :

Q - charge de la gouttelette

R_r - rayon critique de Rayleigh

ϵ_0 - permittivité du vide

γ - tension de surface

Au moment où les forces de répulsion électrostatiques deviennent supérieures aux forces de cohésion du liquide, la gouttelette, alors instable, va exploser en gouttelettes filles, qui subiront à leur tour le même processus et ceci sur plusieurs générations de gouttelettes filles qui deviendront de plus en plus petites, jusqu'à donner des ions complètement désolvatés.

I.2.5.1.c Emission des ions en phase gazeuse

Le principe du passage des ions en phase gazeuse est un processus controversé : deux théories sont proposées pour en expliquer le mécanisme. La première théorie est le modèle de la charge résiduelle proposé par Dole *et al.*[156], la deuxième est le principe de l'évaporation ionique d'Iribarne et de Thomson.[157, 158]

A. Modèle de Dole

Ce mécanisme est connu sous le nom du "modèle du résidu chargé" (CRM), il propose une succession d'explosions coulombiennes jusqu'à obtenir une gouttelette fille ultime ne contenant qu'un seul ion. Les dernières molécules de solvant comprises dans cette gouttelette s'évaporent afin d'aboutir à un ion complètement désolvaté (*Figure I.18*).

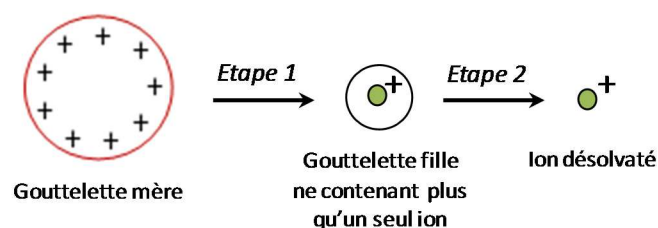


Figure I.18 : Modèle du résidu chargé (CRM)

B. Modèle d'Iribarne et de Thomson

Ce modèle propose que lors du processus d'évaporation du solvant, la densité de charge est suffisante pour émettre directement les ions en phase gazeuse (*Figure I.19*).

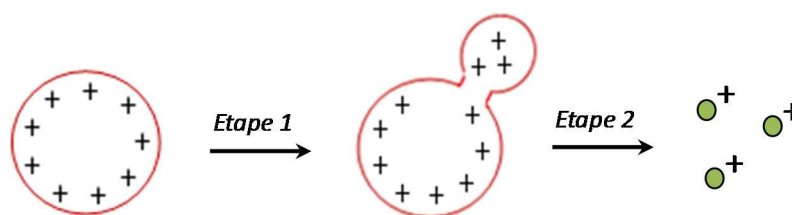


Figure I.19 : Modèle de l'évaporation des ions (IEM)

Le modèle de Dole est appliqué plutôt pour expliquer le processus de désorption des gros ions (macromolécules, protéines,...) alors que le modèle d'Iribarne et de Thomson s'appliquerait plutôt aux petites molécules.[159]

I.2.5.2 Analyseur

L'analyseur a pour rôle de mesurer un rapport m/z . Le principe physique d'une telle détermination dépend du type d'analyseur utilisé. Actuellement, de nombreux analyseurs sont disponibles : quadripolaire (Q), piège ionique (IT), électromagnétique, temps de vol (TOF), orbitrap et à résonance cyclotronique (ICR). Comme mentionné ci-dessus, ce travail a été réalisé sur un spectromètre de masse comportant un analyseur Q et un IT.

I.2.5.2.a Les analyseurs de type quadripôle

Ces types d'analyseurs ont été développés initialement par le groupe de Paul et Steinwedel au milieu des années 50. Le principe de fonctionnement décrit en 1953 [160] a été appliqué à la spectrométrie de masse quelques années plus tard.[161] La pertinence des travaux de Paul a été récompensée par le prix Nobel de Physique en 1989.[162]

Un quadripôle (*Figure I.20*) est constitué de quatre électrodes cylindriques ou elliptiques couplées deux à deux selon un potentiel électrique (Φ_0 , +/-) composé d'une tension continue (U) et d'une tension alternative (V) (*Equation 7*):

$$\Phi_0 = U + V \cos \omega t \quad (7)$$

où :

ω – fréquence angulaire

t – temps

Les ions générés en source entrent dans l'analyseur, où ils sont soumis à une force résultante de deux champs électriques, définissant des zones de stabilité (*Figure I.21*).[163]

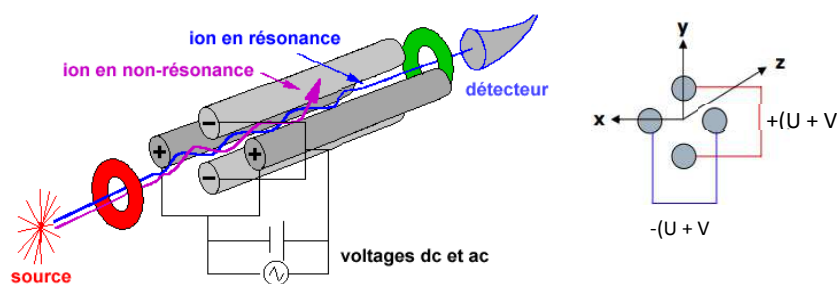


Figure I.20 : Schéma d'un analyseur de type quadripolaire

Selon les valeurs de U et de V , certains ions adoptent des trajectoires centrées au sein de l'analyseur et peuvent être détectés, alors que d'autres ions, instables pour ces valeurs de V et U , sont collectés par les barres du quadripôle et ne sont pas détectés. En effet, tant que les coordonnées x et y de l'ion, qui mesurent la distance par rapport au centre des barres, restent inférieures à r_0 (moitié de la distance entre deux barres opposées), l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres (Figure I.21). Dans le cas contraire, il s'y décharge et ne sera pas détecté.

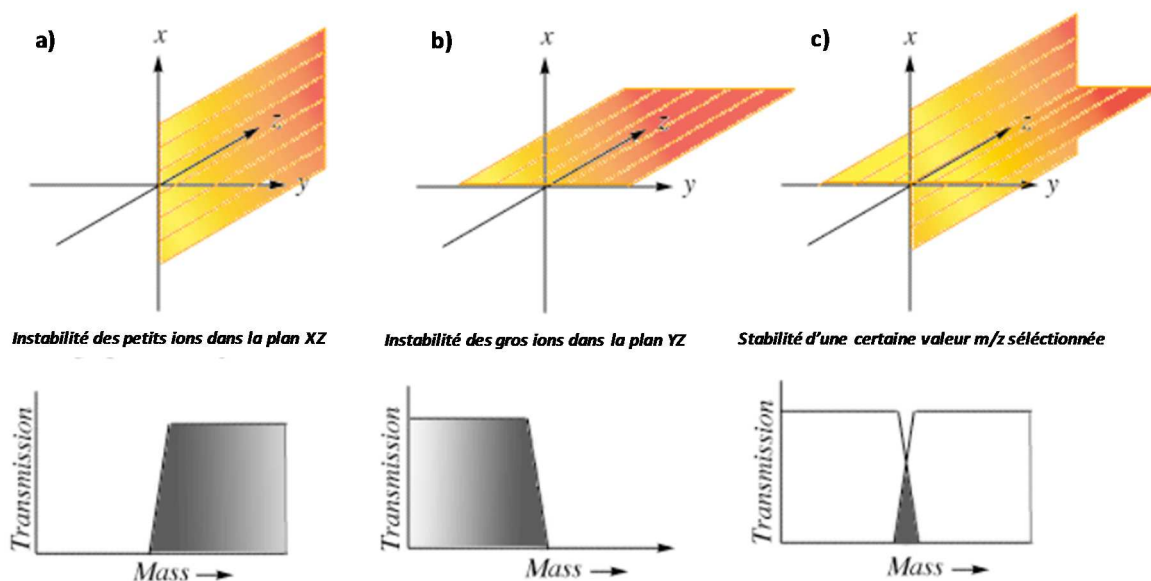


Figure I.21 : Résultante de stabilité des ions dans un analyseur quadripolaire

Ce type d'analyseur a certains avantages, comme :

- Le contrôle des tensions U et V qui est aisé et permet une grande vitesse de balayage (de l'ordre de la milliseconde) ;
- Le passage de l'ionisation positive à l'ionisation négative (ou l'inverse) qui est facile et rapide (50 ms sur le QTRAP 5500) ;

- La vitesse de balayage qui peut être très élevée.

Ces avantages font de l'analyseur quadripolaire un appareil excellent pour le couplage de la LC avec la MS et un outil très efficace pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Le principal inconvénient de l'analyseur quadripolaire est sa faible résolution (liée à sa vitesse de balayage en m/z , qui est très élevée et la résolution unitaire).

I.2.5.2.b Les analyseurs de type piège ionique linéaire (LIT)

La structure des LIT (*Figure I.22*) est basée sur celle d'un quadripôle fermé par des électrodes d'entrée et de sortie. L'application au niveau de ces électrodes d'une tension ϕ_0 , superposition d'une tension U et d'une tension V de même signe permet de piéger les ions étudiés. Plus la tension appliquée est importante, plus les ions sont comprimés au centre du piège. Les ions réalisent des allers-retours entre les électrodes terminales suivant l'axe z et, simultanément, oscillent dans le plan xy par l'application d'une radio-fréquence (RF) sur les barres du quadripôle.[164]

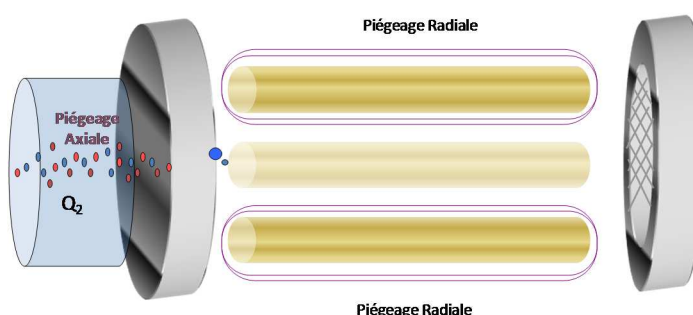


Figure I.22 : Schéma d'un analyseur de type LIT (QTRAP 5500, Sciex)

Autrement dit, les ions sont piégés dans un piège linéaire dans lequel ils circulent linéairement et sont séparés par la stabilité de leur trajectoire dans le champ de radio-fréquence. Les ions sont stables tant que les accélérations qu'ils subissent les maintiennent sur des coordonnées inférieures à r_0 en r et à z_0 en z . Les ions piégés sont ensuite libérés successivement suivant leur rapport m/z suite à leur déstabilisation.[165]

I.2.5.3 Spectromètre de masse en tandem (MS/MS)

L'ionisation electrospray produit essentiellement des ions stables (de faible énergie interne) et l'information obtenue ne peut être que celle qui est déduite de la mesure du rapport m/z d'espèces pseudo-moléculaires. Pour obtenir une information de structure d'analytes, il faut pouvoir disposer d'ions fragments, qui sont obtenus à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS). La spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner un ion par un

premier analyseur, à le dissocier par collision, puis à effectuer un balayage des ions fragments ainsi générés dans un deuxième analyseur. La popularité des spectromètres de masse en tandem s'explique principalement par leur facilité relative d'utilisation, leur spécificité et leur bonne linéarité et reproductibilité pour des applications quantitatives. Le développement des techniques de la MS/MS a permis une multiplication de ses domaines d'applications, en particulier dans les sciences du vivant.

Sur notre instrument (QTRAP 5500), le spectromètre de masse en tandem comporte un filtre quadripolaires, Q_1 et un piège ionique linéaire Q_3 (LIT), séparés par une cellule de collision, Q_2 . Cette dernière est construite initialement à partir d'un quadripôle, qui opère en radio-fréquence uniquement (*Rf only*) (Figure I.23).

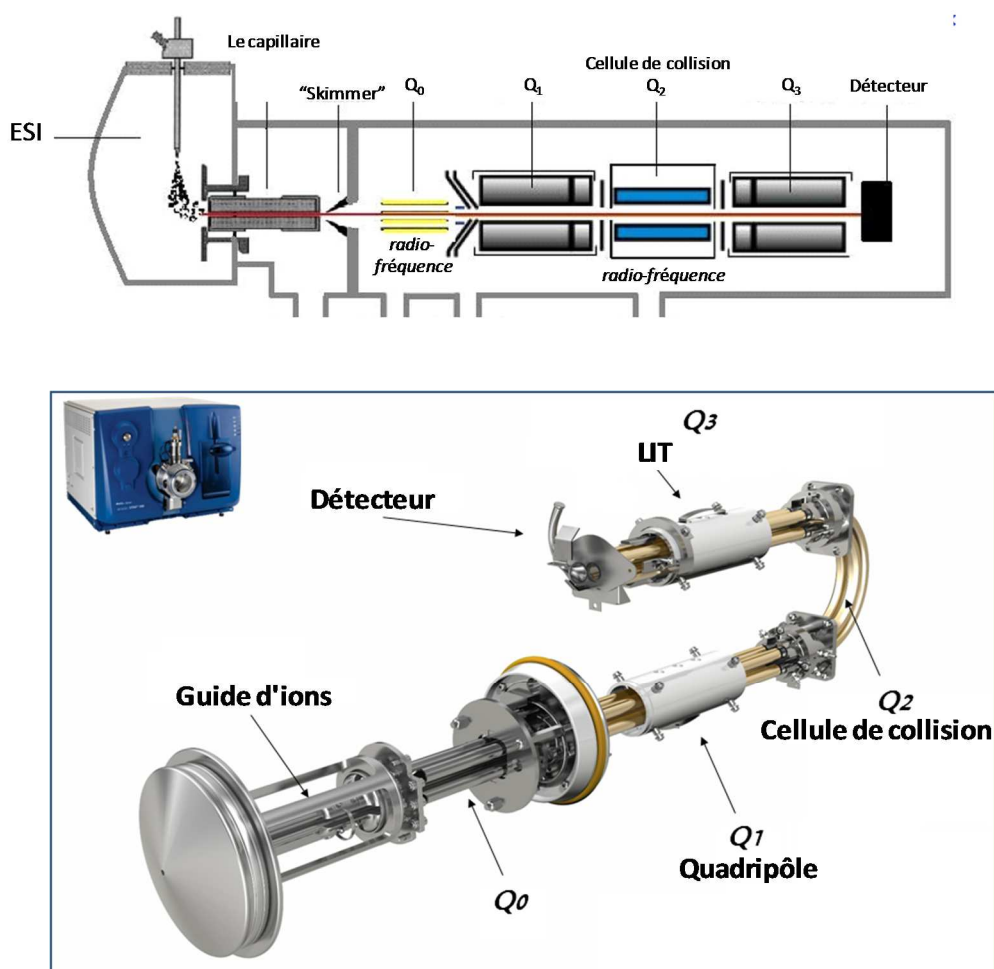


Figure I.23 : Schéma général d'un spectromètre de masse (haut) et spectromètre de masse en tandem (QTRAP 5500, Sciex) utilisé pour cette étude (bas)

Q_1 et Q_3 fonctionnent comme des filtres de masse. La cellule de collision représente une chambre où les ions isolés par Q_1 sont fragmentés par collision avec un gaz (diazote dans le cas du QTRAP). Ensuite, ces ions fragments sont analysés par Q_3 . [166]

Différentes méthodes de fragmentation existent. Pour un même échantillon, les profils de fragmentation dépendent de la méthode utilisée. Le mode le plus répandu est appelé dissociation induite par collision (CID, Collision-Induced Dissociation) car les ions parents sont activés suite à leur collision contre une ou plusieurs molécules de gaz neutre (gaz de collision). La dissociation par capture d'électrons (ECD, Electron Capture Dissociation) ainsi que la dissociation par transfert d'électrons (ETD, Electron Transfert Dissociation), reposent sur une activation des ions par la capture d'un ou de plusieurs électrons.

Par la suite, on va s'intéresser uniquement au mode CID, seul mode disponible sur l'instrument QTRAP 5500.

I.2.5.3.a La dissociation induite par collision (CID)

Cette méthode de fragmentation est basée sur une activation des ions parents par transfert d'énergie à la suite de collisions inélastiques contre un gaz neutre (Hélium, Azote, Argon...). Ce processus s'effectue en deux étapes (*Figure I.24*), la première correspond à la collision entre l'ion et le gaz cible convertissant une partie de l'énergie cinétique de l'ion en énergie interne et conduisant l'ion à un état d'excitation. La deuxième étape correspond à une décomposition unimoléculaire de l'ion activé : le chauffage vibrationnel global de la molécule induit la fragmentation de la molécule.

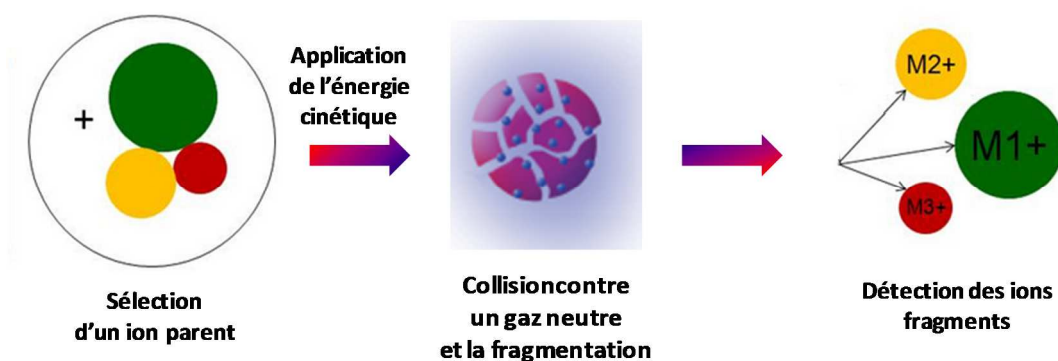


Figure I.24 : Principe du mode MS/MS de type CID

Au cours des collisions avec les molécules de gaz neutre de la molécule ionisée et sélectionnée dans le premier analyseur, une partie de l'énergie cinétique de cette molécule est convertie en énergie interne. Il s'agit de collisions inélastiques, au cours desquelles l'énergie cinétique n'est pas conservée.

Les transferts d'énergie cinétique en énergie interne sont régis par les lois des collisions d'un mobile (l'ion) contre une cible statique (le gaz de collision). Dans une collision inélastique, la conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement implique que seule une partie de

l'énergie cinétique est transformée en énergie interne. Cette fraction d'énergie E_{CoM} est donnée par l'équation suivante (*Equation 8*) :

$$E_{CoM} = E_{lab} \frac{m_2}{m_1 + m_2} \quad (8)$$

où :

m_1 - masse de l'ion

m_2 - masse du gaz cible

E_{lab} - énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire

E_{CoM} - énergie maximale qui peut être convertie en énergie interne.

Pour que l'énergie disponible à la conversion augmente, il faut soit augmenter l'énergie cinétique de l'ion sélectionné, soit utiliser un gaz cible ayant une masse plus importante.

Il existe deux types de CID, à haute et à basse énergie. Dans un triple quadripôle les ions pénètrent dans la cellule de collision avec une vitesse relativement faible, et ce type de spectromètre opère donc en mode CID à basse énergie, avec une énergie de collision correspondant à quelques dizaines d'électronvolts, fournissant à l'ion des énergies cinétiques de 10 à 100 eV.

I.2.5.3.b Paramètres de la source

L'optimisation des conditions d'ionisation demande le réglage des différents paramètres, comme:

1. *IonSpray Voltage (IS)* - la tension appliquée entre l'aiguille et l'orifice qui "ionise" et "nébulise" le flux de liquide. En mode positif elle est généralement de 4000 à 5500V ; en mode négatif de 3000 à 4000V.
2. *Ion Source Gas 1 (GS1)* - la pression du gaz de nébulisation, qui facilite la formation de gouttelettes.
3. *Ion Source Gas 2 (GS2)* - le gaz chauffant aide à l'évaporation des solvants, ce qui contribue à renforcer l'ionisation de l'échantillon.
4. *Curtain Gas (CUR)* - le gaz rideau est composé d'azote de haute pureté qui circule entre l'orifice et la « curtain plate ». Il permet d'éviter les contaminations.
5. *Temperature (TEM) et Pression* - ces deux paramètres influent sur la formation d'agrégats dans la source et, par conséquent, sur la collision et sur le taux de fragmentation. La température et la pression du gaz chauffant favorise la désolvatation. Le réglage de ces paramètres est optimisé en fonction du débit et de la composition de la phase mobile.

6. *Declustering Potential (DP)* - Des études concernant la CID dans la source ont été réalisées en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (V_c) ou sur l'orifice plate (V_{op}), équivalents du DP (*Figure I.25*).

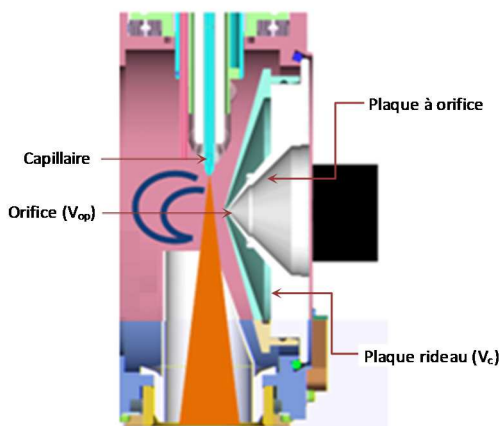


Figure I.25 : Représentation schématique de la source Turbo Ionspray du QTRAP 5500

L'augmentation de V_c ou V_{op} induit une accélération des ions dans la région de pression intermédiaire qui permet la CID au contact des molécules de gaz résiduel dans la source. Le taux de fragmentation dépend de l'énergie cinétique que les ions peuvent acquérir par collisions avec le gaz résiduel. Plus la V_c ou le V_{op} sera élevé, plus le taux de fragmentation sera important. [167, 168]

7. *Entrance Potential (EP)* - ce paramètre contrôle le potentiel d'entrée, qui guide et focalise les ions à travers la région à haute pression du Q_0 .
8. *Collision Energy (CE)* - le contrôle du potentiel d'entrée de la cellule de collision, qui est la différence de potentiel entre Q_0 et Q_2 .
9. *Collision Cell Exit Potential (CXP)* - différence de potentiel entre la sortie de la cellule de collision et Q_3 .
10. *Phase mobile* - la composition et la circulation de la phase mobile (pourcentage de solvant organique, pH) a un rôle important sur la désorption de l'ion. La composition de la phase mobile ne semble pas avoir d'influence sur le processus de fragmentation lorsqu'il s'agit de solvants classiques tels que l'acétonitrile, le méthanol ou l'eau, mais l'augmentation de la teneur en eau et du débit nécessitera des valeurs de pression, de température et de gaz plus élevées.

I.2.5.3.c Les modes de balayage disponibles en MS/MS

En plus de l'obtention de spectres d'ions fragments (« *Product Ion scan* », scan descendant), la mise en œuvre de quadripôles permet d'effectuer plusieurs modes d'acquisition supplémentaires : le mode de balayage des ions précurseurs (« *Precursor Ion scan* », scan ascendant), la perte de neutre (« *Neutral Loss* ») et le mode de balayage sélectif de plusieurs ions issus de la fragmentation (« *MRM, Multiple Reaction Monitoring* »). Ces différents modes d'acquisition sont décrits et illustrés ci-dessous.

- ♦ Le mode « *Product Ion scan* »

Le mode « *Product Ion scan* » permet l'acquisition de tous les ions de fragmentation produits (ou ions produits ou ions fils). Les ions précurseurs (ions parents) sont envoyés dans le premier quadripôle où ils sont sélectionnés puis fragmentés dans la cellule de collision. Tous les ions de fragmentation passent dans Q_3 avant d'être détectés (*Figure I.26*). Ce mode de détection est très sélectif car deux ions précurseurs ayant le même rapport m/z ne se fragmentent pas forcément de façon identique et peuvent conduire à des ions fils différents.

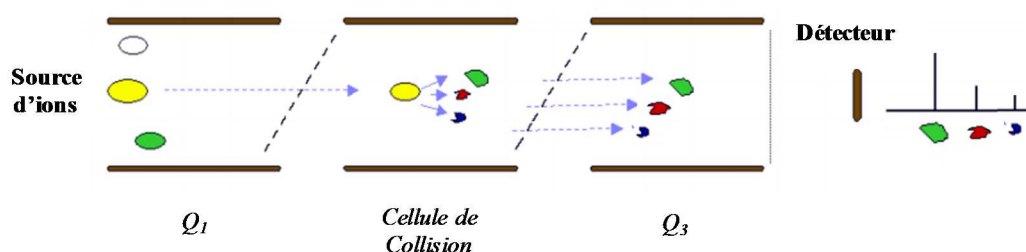


Figure I.26 : Illustration schématique du mode « *Product Ion scan* »

- ♦ Le mode « *Precursor Ion scan* »

Ce mode permet de rechercher les ions moléculaires parents capables de se fragmenter en un ion fils donné (*Figure I.27*).

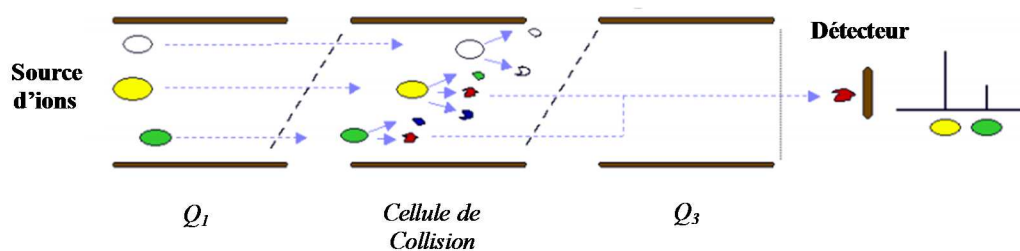


Figure I.27 : Illustration schématique du mode « *Precursor Ion scan* »

Tous les ions précurseurs sont balayés sur une gamme de masse donnée dans le premier quadripôle, et alors fragmentés dans la cellule de collision. L'ion fragment d'intérêt est sélectionné par Q_3 . Par conséquent, seuls les ions de fragmentation issus des ions précurseurs qui ont traversés le premier quadripôle seront détectés.

♦ Le mode « *Neutral Loss* »

En mode perte de neutre, les deux analyseurs Q_1 et Q_3 balayent une gamme de masse simultanément et avec un décalage de masse constant. Cette différence de masse, si elle correspond à la masse de la molécule neutre perdue lors du processus de décomposition d'un ion filtré par Q_1 , permettra à l'ion de traverser Q_3 (Figure I.28).

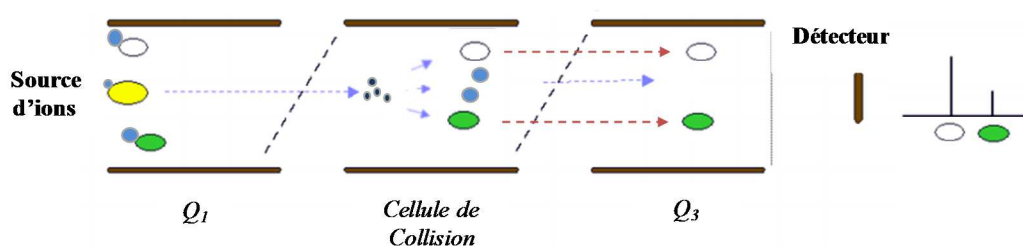


Figure I.28 : Illustration schématique du mode « Neutral Loss »

Le spectre présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage imposé. La spécificité de cette technique est que la sélection ne s'effectue pas sur une valeur de masse d'un ion parent ou fils mais sur la nature d'un processus de décomposition.

♦ Le mode « *MRM* »

Le mode MRM permet le suivi des transitions particulières entre les ions parents et leurs ions de fragmentation. L'ion précurseur est sélectionné dans le premier quadripôle, puis fragmenté dans la cellule de collision. Seuls les ions de fragmentation choisis sont sélectionnés dans le troisième quadripôle pour être détectés (Figure I.29).

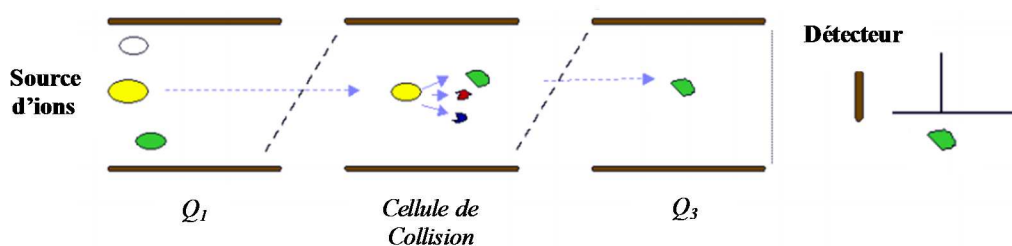


Figure I.29 : Illustration schématique du mode « MRM »

Ce mode présente donc une double sélectivité : une sélection de l'ion parent et une de l'ion fragment. La sensibilité et la spécificité se voient ainsi considérablement améliorées par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification.

1.2.6 La dérivation chimique - amélioration de la sensibilité de détection des œstrogènes

L'analyse des œstrogènes en mode ESI est rendue difficile en raison de la faible efficacité d'ionisation de ce type de molécules. La dérivation chimique permet d'améliorer la sensibilité de détection en augmentant le taux d'ionisation suite à l'introduction de groupements facilement ionisables (*Figure I.30*). De nombreux réactifs de dérivation ont été étudiés (*Tableau I.3*) pour améliorer la limite de détection des œstrogènes.[146, 169-172]

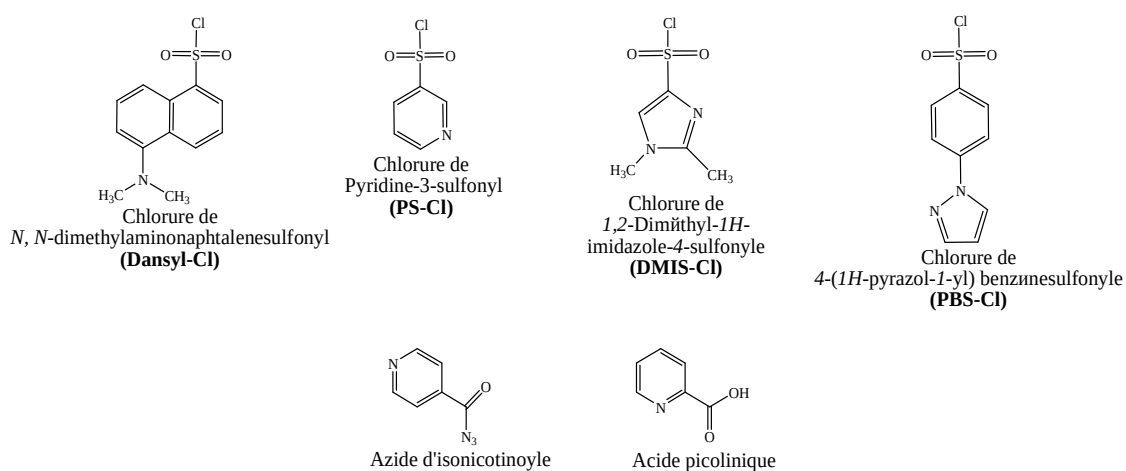


Figure I.30 : Structures chimiques des agents de dérivation

La dérivation chimique a été largement utilisée pour améliorer la réponse en MS de molécules qui contiennent des fonctions hydroxyle aliphatiques et phénoliques. Le chlorure de dansyle (Dns-Cl) contient une fonction chlorosulfonyle qui peut facilement réagir avec des phénols. De plus, la fonction amine tertiaire est essentielle dans cette structure de molécule et aide à la pré-formation d'ions dans une phase mobile acide. Le Dns-Cl est l'agent de dérivation le plus souvent utilisé pour le dosage des œstrogènes à partir des échantillons biologiques.[137, 146, 173, 174]

Toutefois, d'autres réactifs portant également une fonction chlorosulfonyle tels que les chlorures de pyridine-3-sulfonyl (PS-Cl), de 1,2-diméthyl-1H-imidazole-4-sulfonyl (DMIS-Cl), de 4-(1H-pyrazol-1-yl)-benzènesulfonyl (PBS-Cl) ont été utilisés pour la dérivation des œstrogènes.[170] Tous ces réactifs permettent de réduire la rétention en RP-LC. Xu *et al.* ont

comparé les trois chlorures cités ci-dessus au Dns-Cl en LC-ESI(+)-MS/MS.[170] Ils ont trouvé que le dérivé PS du 17 β -E₂ avait le temps de rétention le plus faible. De plus, le spectre MS/MS du dérivé PS 17 β -E₂ est riche en ions de fragmentations spécifiques à l'analyte, ce qui augmente la spécificité de l'analyse.[170]

La sensibilité peut être de l'ordre d'un fg.mL⁻¹ lorsque l'azide d'isonicotinoyle est utilisé. Ce réactif de dérivation est cependant moins sélectif que le chlorure de dansyle qui est le réactif le plus souvent utilisé. L'azide d'isonicotinoyle a été utilisé principalement pour la dérivation de dihydroxystéroïdes, car la présence de groupe pyridyle dans sa structure induit une haute affinité protonique.[175, 176]

Yamashita *et al.* ont décrit la synthèse de dérivés de type pyridine-carboxylate pour certains hydroxystéroïdes.[171, 177, 178] Ils ont constaté que la réaction de dérivation se déroule très simplement, en une seule étape pour les mono- et dihydroxystéroïdes, et que ce type de dérivé augmente la sensibilité de détection des hydroxystéroïdes.

Un autre type de réactif utilisé pour augmenter le taux d'ionisation et l'efficacité de séparation des stéroïdes isomères est le *p*-toluènesulfonyl isocyanate (pTSI).[179, 180] Les auteurs ont constaté que la dérivation a lieu sur les deux fonctions hydroxyle (aliphatique et phénolique) et que la séparation des formes isomères est améliorée.

Ayciriex *et al.* ont transformé les fonctions hydroxyle phénoliques des stérols et oxystérols en dérivés de type carbamate en utilisant le 4-(diméthylamino)-phényl isocyanate (DMAPI).[181] Le DMAPI possède deux groupements amines tertiaires qui induisent une haute affinité protonique. En présence de la triéthylamine, le DMAPI réagit facilement avec les stérols et oxystérols, et donne des dérivés carbamate stables. Comme dans le cas du 17 β -E₂, les oxystérols contiennent deux fonctions hydroxyle, mais aliphatiques (une cycle et l'autre sur la chaîne latérale). Les auteurs montrent par l'étude de spectre RMN que la dérivation est produite uniquement sur l'hydroxyle sur le cycle. Il paraît donc intéressant d'appliquer ce réactif sur les œstrogènes.

Bien que l'utilisation de la dérivation suivie par une analyse en LC-MS semble être une méthode sensible et efficace, il faut noter ses inconvénients, tels qu'une augmentation du temps de préparation d'échantillon dû à l'étape de dérivation et des effets de matrice plus importants dûs aux excès de réactifs de dérivation et des composés de la matrice pouvant être dérivés. De plus, les produits issus de la dérivation peuvent être instables et sensibles à l'humidité, ce qui peut augmenter les risques d'erreurs de mesure.

Tableau I.3 : Résumé des méthodes de dérivations chimiques impliquées dans l'analyse des oestrogens par LC-MS.

Analyte	Matrice	Type de reaction	Réactif de derivation	Mode d'ionisation	Référence
$17\beta\text{-E}_2$	Sérum humain	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[182]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Sérum humain	Dansylation	Chlorure de dansyle	APCI(+)	[183]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Plasma et cerveau de souris	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[184]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Sérum et urine humain	Esterification	4-Nitrobenzenesulfonyl chloride (4-NBSC)	APCI(-)	[185]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$, AN, $5\alpha\text{-androstane-3}\alpha, 17\beta\text{-diol}$	Solution standard	Esterification	Azide d'isonicotinoyle	ESI(+)	[186]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$, E_3 , Ethinylestradiol	Eau	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[187]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Sérum humain	Formation d'ether	1-(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-4,4-methylpiperazine	ESI(+)	[188]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Sérum humain	Esterification	Acide picolinique	ESI(+)	[171]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$, Dihydroepiandrosterone, Testosterone	Solution standard	Esterification	Acide picolinique	ESI(+)	[177]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Sérum humain	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[189]
$17\beta\text{-E}_2$	Sérum humain	Esterification	Chlorure de pyridine-3-sulfonyle	ESI(+)	[170]
$17\beta\text{-E}_2$	Sérum et cerveau de rat	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[190]
$17\beta\text{-E}_2$	Tissu prostatique	Formation d'ether	Bromure de pentafluorobenzyl et 2-fluoro-1-méthylpyridinium <i>p</i> -toluènesulfonate	ESI(+)	[191]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$, $17\alpha\text{-E}_2$	Sérum humain	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[192]
$E_{1,17\beta}\text{-E}_2$	Sérum humain	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[193]

<i>E₁</i> ,17 β - <i>E₂</i> , Testosterone, Dihydrotestosterone, Dihydroepiandrosterone, Androstenedione, 17 β -diol	Sérum humain	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[194]
<i>E₁</i> ,17 β - <i>E₂</i> , <i>E₃</i> , Bisphenol A	Plasma et fluide séminal humaine	Dansylation	Chlorure de dansyle	ESI(+)	[195]
17 β - <i>E₂</i> , 16-hydroxy (OH)- <i>E₂</i> , 4-methoxy (MeO)- <i>E₂</i> , 2- MeO- <i>E₂</i> , 4-OH- <i>E₂</i> , 2-OH- <i>E₂</i>	Sérum humain	Esterification	Chlorure de pyridine-3-sulfonyle et Iodomethane	ESI(+)	[196]

1.2.7 Validation et évaluation des résultats de mesure

Une validation de méthode analytique consiste à déterminer certains critères concernant le dosage d'une substance dans un substrat. Depuis de nombreuses années, l'approche des analystes a été de caractériser et l'évaluer les performances des méthodes d'analyse. Il existe plusieurs définitions et modes de calcul des différents paramètres liés à la validation d'une méthode.[197-199] Voici les paramètres les plus souvent cités :

- ♦ *La sélectivité* – c'est la capacité à différencier et à quantifier l'analyte-cible en présence d'interférence de la part des autres constituants de l'échantillon (par exemple, impuretés de la dégradation du produit, d'autres analytes, etc...) Elle est représentée par la pente dans la *Figure I.31*;
- ♦ *La fidélité (ou degré de dispersion des résultats)* – elle est définie comme la variation entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées. (Guide ISO/CEI 99) Selon les conditions d'exécution de l'essai, ce paramètre s'exprime sous forme de :

- × Répliquabilité – correspond à la variation entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times s_1}{\sqrt{n}}$$

où : $t_{(0,975; n-1)}$ – valeur t de Student pour un intervalle bilatéral à un niveau de confiance de 95 % pour n échantillons. Pour $n < 30$, il faut se référer à un tableau statistique de la distribution de t pour connaître la valeur de $t_{(0,975; n-1)}$
 s_1 – écart type d'une série de mesures se référant à la répliquabilité
 n – nombre de données sur lesquelles s'appuient les calculs

- × Répétabilité – correspond à la variation entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent :

l'analyste, l'appareil, le jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times s_2}{\sqrt{n}}$$

où : s_2 – écart-type d'une série de mesures se référant à la répétabilité

- ✱ Reproductibilité – correspond à la variation entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times s_3}{\sqrt{n}}$$

où : s_3 – écart type d'une série de mesures se référant à la reproductibilité

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(0,975;n-1)} \times s_3}{\sqrt{n}}$$

où : $\bar{x}$ – est la moyenne arithmétique de n mesures

- ♦ *La linéarité* – caractérise la courbe de réponse d'une méthode analytique. Le principe consiste à vérifier la linéarité d'une méthode, à valider que la fonction mathématique qui relie le signal instrumental au résultat analytique, est bien une droite pour un intervalle de valeurs définies (Graphique 1). Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.
- ♦ *La sensibilité* – est la capacité de la méthode à distinguer de petites différences dans la concentration ou la masse de la substance qui est analysée. En pratique, la sensibilité est la pente de la courbe d'étalonnage qui est obtenue en traçant la réponse de mesure en fonction de la concentration ou de la masse de l'analyte (Figure 31).

♦ *La capacité de détection* – est caractérisé par :

- ✓ La Limite de Détection (LD) – qui est le point auquel la valeur mesurée est supérieure à l'incertitude qui lui est associée. Il s'agit de la plus faible concentration d'analyte dans un échantillon qui peut être détectée, mais pas nécessairement quantifiée. La LD est souvent confondue avec la sensibilité de la méthode.

En chromatographie, la LD de la quantité injectée se traduit par un signal avec une hauteur au moins trois fois plus élevée que le niveau de bruit de la ligne de base ($S/N = 3$).

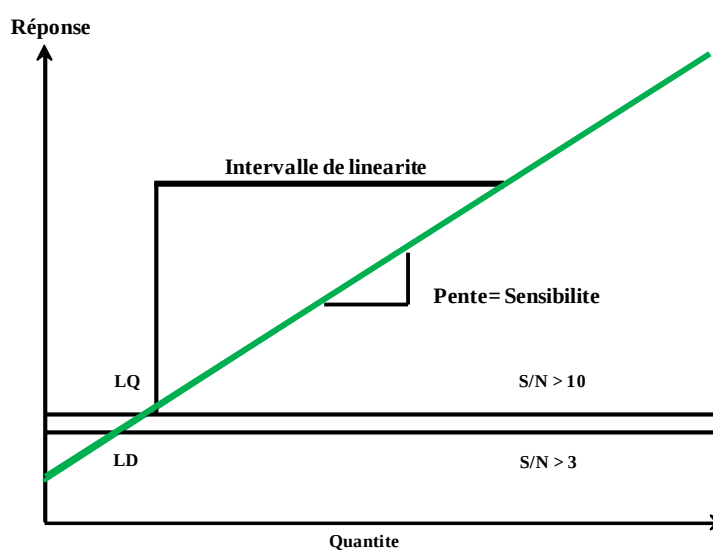


Figure I.31 : Représentation graphique

- ✓ La Limite de Quantification (LOQ) – est le plus faible niveau d'analyte qui peut être mesuré de façon exacte et précise. La LOQ est souvent reliée à la concentration de l'analyte qui donne un signal avec $S/N = 10$ (Figure I.31).

Pour les méthodes chromatographiques, la LOQ peut être également déterminée en comparant les signaux mesurés à partir des échantillons à des concentrations basses connues de l'analyte avec ceux des échantillons blancs. Ceci établit la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être quantifié de manière fiable.

- ♦ *La robustesse* - est la mesure de la capacité d'une procédure analytique de rester non affectée par de petites variations délibérées des conditions opératoires (comme la pression atmosphérique, l'humidité, etc...).

- ♦ *Le coefficient de variation (CV)*, exprimé en pourcentage - est l'écart-type divisé par la moyenne et multiplié par 100. Il permet des comparaisons lorsque les unités de mesure diffèrent. Le CV s'avère acceptable si la valeur obtenue est inférieure à 20%.

I.3 EXTRACTION DES ŒSTROGENES D'UNE MATRICE BIOLOGIQUE

L'analyse par LC-MS/MS des œstrogènes présents dans le plasma et le cerveau nécessite la mise en œuvre d'une étape d'extraction et de purification. Trois types de préparation d'échantillons sont fréquemment utilisés : la précipitation de protéines (PP), l'extraction liquide-liquide (ELL) et l'extraction en phase solide (SPE).

I.3.1 Introduction

Les stéroïdes sont essentiellement des molécules lipophiles : $\log P = 3,94$ (17β -E₂), $\log P = 3,43$ (E₁) et $\log P = 2,8$ (E₃). [200, 201] Ils sont constitués d'un noyau cyclopentanoperhydrophenanthrène, modifié sur la périphérie du noyau ou sur la chaîne latérale par l'ajout de groupes hydrophiles. Cette partie est concentrée principalement sur la méthodologie d'extraction et de purification des œstrogènes trouvés dans les échantillons biologiques.

Au cours du métabolisme, les stéroïdes deviennent généralement plus hydrophiles après réduction et après hydroxylation et estérification (conjugaison) avec l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique. L'ajout de ces groupes polaires, permet l'extraction de ces métabolites avec le milieu aqueux.

La non-polarité essentielle (hydrophobe) des stéroïdes signifie qu'ils sont tous, à des degrés divers, solubles dans des solvants organiques et peuvent donc être extraits du milieu aqueux par un solvant ou un mélange de solvants de polarité appropriée.

La préparation des échantillons biologiques est primordiale dans le cas des déterminations bioanalytiques. Les étapes typiques sont: l'homogénéisation d'échantillon, la précipitation de protéines, l'extraction et la purification de l'extrait. La précipitation des protéines vise à éliminer l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon à analyser avec des solvants organiques (éthanol, acétone, etc...). L'extraction des stéroïdes est généralement effectuée à l'aide de solvants organiques. L'étape de purification est presque toujours nécessaire, parce que les échantillons biologiques, étant des matrices complexes (notamment le cerveau), comportent un grand nombre de composés (protéines, sels, lipides, etc...) pouvant influencer la qualité de mesure. La purification qui est la plus souvent utilisée est la ELL et/ou la SPE. La ELL permet de s'affranchir des composants hydrophiles (protéines, sels, etc...). L'avantage de la ELL est sa simplicité, mais il s'agit d'un procédé de purification peu spécifique, qui est généralement utilisé pour l'isolation d'un groupe de composés similaires. La SPE permet l'isolation d'une classe particulière de composés (comme les stéroïdes) en éliminant les lipides. La SPE est la méthode la plus sélective et peut être facilement automatisée. Cependant, par

rapport à la ELL, elle demande plus de temps pour le développement. De grandes quantités de lipides dans les extraits de tissus cérébraux peuvent boucher la colonne LC et provoquer des changements au cours du temps, voire empêcher l'analyse. Certains lipides peuvent également supprimer l'ionisation des stéroïdes en LC-MS.

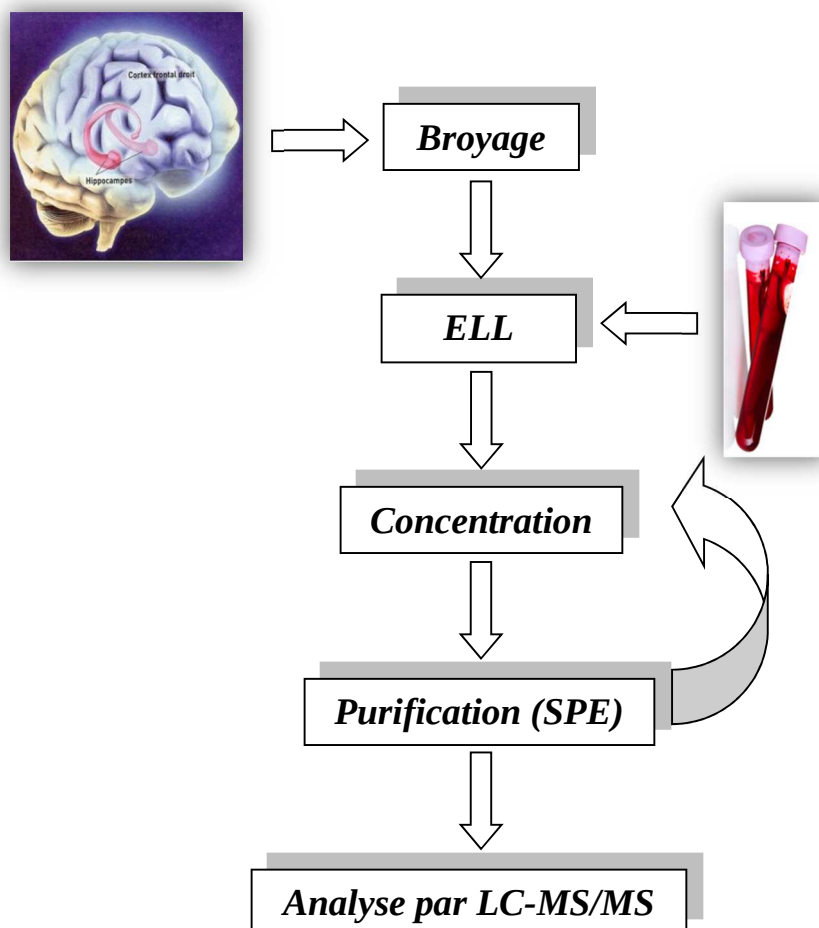


Figure I.32 : Protocole de préparation d'échantillons biologiques (cerveau et plasma)

Beaucoup de procédés actuels d'analyse de stéroïdes dans des échantillons biologiques comprennent plusieurs étapes de purification successives par SPE (combinaison des cartouches d'échange d'ions et de polarité de phase inversée) ou par LC (Tableau I.5).

I.3.2 Extraction liquide-liquide (ELL)

La ELL repose sur la différence d'affinité d'un analyte entre deux phases liquides non-miscibles. Le solvant enrichi en soluté est appelé **extrait**. Le mélange qui est appauvri en solutés est appelé **raffinat** (Figure I.33). Cette opération permet de séparer des produits ayant des propriétés physico-chimiques différentes.

Par exemple, considérons un analyte A en solution dans l'eau à extraire par une phase organique non-miscible à l'eau. Lorsque les deux phases liquides sont en contact, il s'établit l'équilibre de partage suivant pour A :

$$A_{aq} \rightleftharpoons A_{org} \quad K_p = \frac{[A_{org}]}{[A_{aq}]}$$

Cet équilibre est caractérisé par une constante thermodynamique K_p appelée coefficient de partage. L'extraction sera plus efficace avec l'augmentation du coefficient de partage.

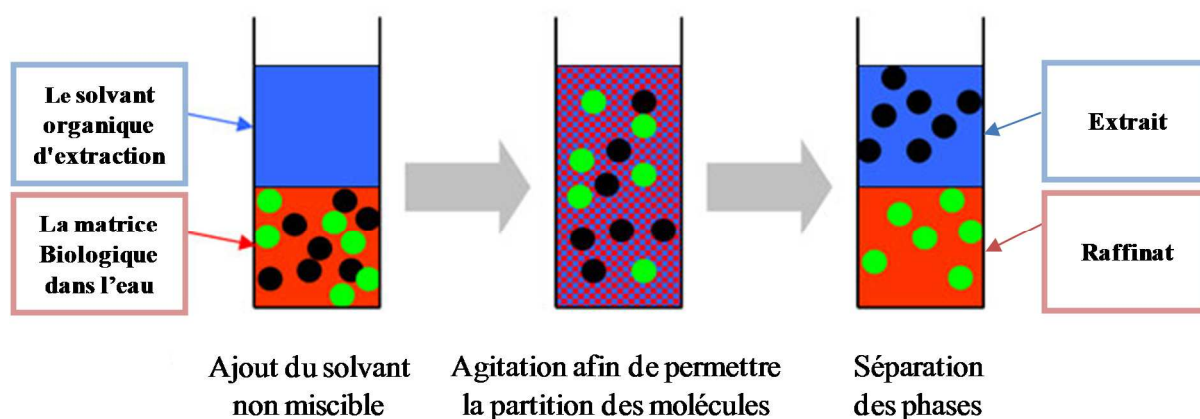


Figure I.33 : Illustration du principe de la ELL

La combinaison de la ELL avec la SPE va notamment augmenter la sélectivité de l'extraction d'un composé déterminé (Figure I.32).

I.3.3 Purification - extraction sur phase solide (SPE)

La SPE est une technique ayant un large spectre d'applications et est de plus en plus utilisée en raison de sa rapidité, de son efficacité, de sa possibilité d'automatisation et de son coût relativement faible.

Le principe de cette méthode est la séparation ou captation d'un analyte (ou d'analytes) d'un mélange de composés par une partition sélective des composés entre une phase solide (adsorbant – cartouche, Figure I.34) et une phase liquide (solvant). Une substance adsorbée peut être récupérée (désorbée) en augmentant par étapes la force d'élution. La SPE permet de prolonger la durée de vie d'un système HPLC, d'améliorer les analyses qualitatives et quantitatives.[202]

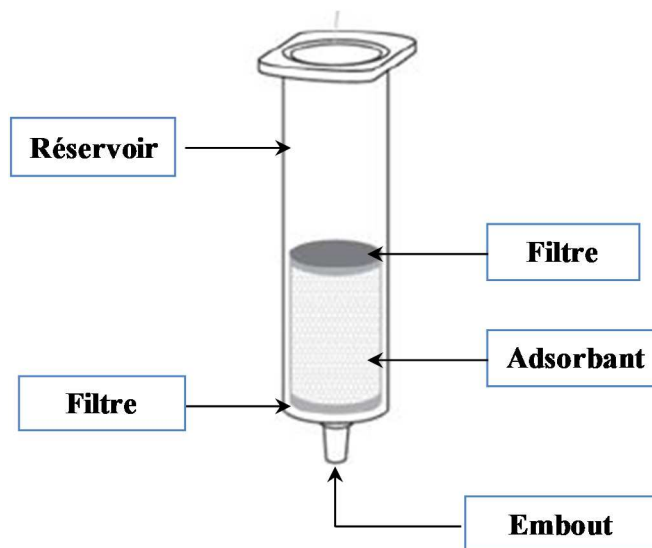


Figure I.34 : Représentation schématique d'une cartouche SPE

Les adsorbants SPE sont le plus souvent classés par la nature du mécanisme de leurs interactions primaires avec l'analyte d'intérêt. Les trois types de mécanisme les plus utilisés en SPE sont : la phase inverse (RP), la phase normale (NP) et l'échange d'ions (IEX). Les cartouches ayant des adsorbants en RP (Figure I.35) sont utilisées le plus souvent pour la purification des stéroïdes à partir des matrices complexes.[146, 203, 204] Il faut souligner que les adsorbants garnissant les cartouches sont à usage unique.

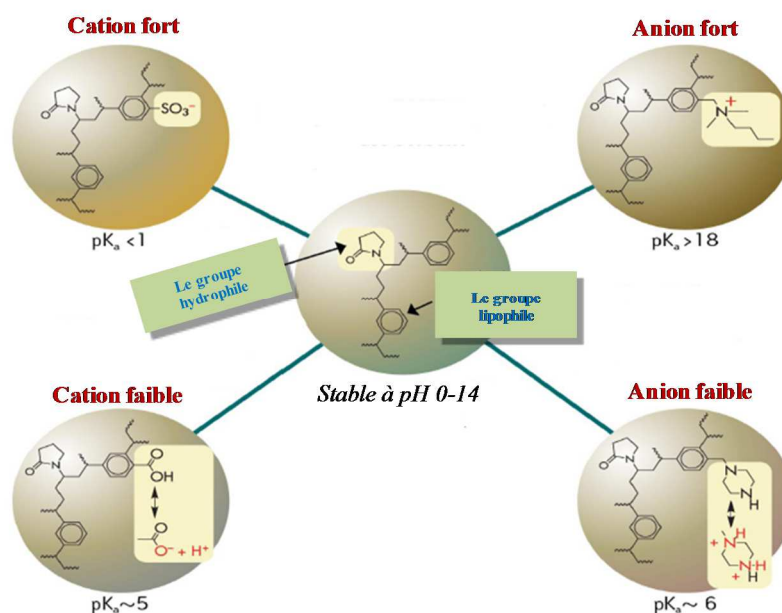


Figure I.35 : Exemple d'adsorbants RP en SPE

Les types de mécanisme de rétention en SPE sont :

- ♦ Interactions apolaires - qui sont à la base des interactions hydrophobes (C₈, C₁₈, Phenyl etc.);
- ♦ Interactions polaires - les interactions par formation de liaisons hydrogène et dipôle-dipôle (CN, NH₂, silice etc.);
- ♦ Echangeurs de cations - les interactions entre la charge de l'analyte et le groupe fonctionnel de l'échangeur de cations (cation faible WCX, cation fort MCX);
- ♦ Echangeurs d'anions - les interactions entre la charge de l'analyte et le groupe fonctionnel de l'échangeur d'anions (anions faible WAX, anions fort SAX, etc).

Cependant, il faut noter qu'en SPE les interactions décrites ci-dessus peuvent être multiples. Par exemple, les gels de silice modifiés peuvent conserver des groupements silanols libres, pouvant entraîner des interactions secondaires.

L'adsorbant choisi doit avoir une excellente affinité pour les composés cibles. Notamment, il doit présenter un minimum d'affinité avec la matrice.

Un protocole SPE est constitué de quatre étapes principales (*Figure I.36*) :

1. *Conditionnement* – l'adsorbant est activé avec un solvant organique ou un mélange de solvants pour éliminer des contaminants et favoriser les échanges dans l'adsorbant. Après l'étape de conditionnement, l'adsorbant ne doit pas dessécher sinon l'imprégnation ne serait plus garantie ;
2. *Dépôt de l'échantillon (Percolation)* – l'échantillon est déposé sur la partie supérieure de l'adsorbant. Pour apporter un maximum d'efficacité à la purification, la vitesse d'écoulement d'échantillon doit être contrôlée ;
3. *Lavage* – cette étape permet l'élimination d'impuretés possédant moins d'interactions avec l'adsorbant. Les solvants utilisés doivent avoir plus d'affinité avec les impuretés qu'avec les composés d'intérêt ;
4. *Elution* – la récupération des composés d'intérêt s'effectue avec un éluant adéquat, capable de rompre les interactions entre analyte et support adsorbant.

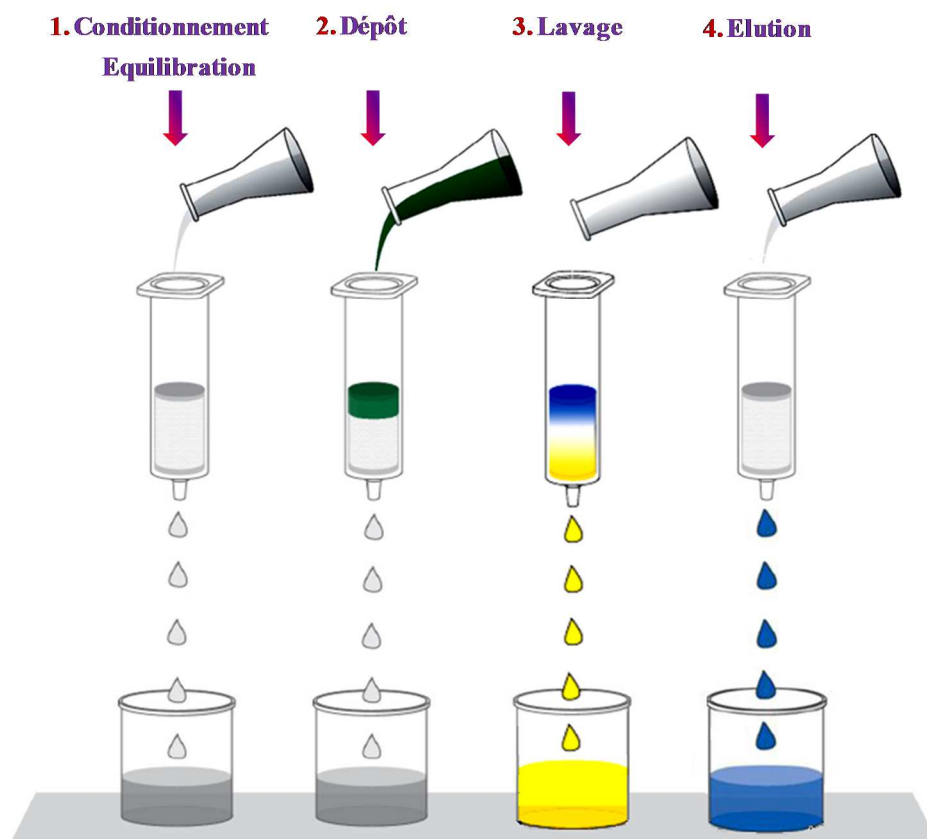


Figure I.36 : Principe de l'extraction sur phase solide

Pour toutes les étapes, le débit dépend de la dimension de la cartouche et de la quantité d'adsorbant (dans notre cas, pour des cartouches garnies de 10 à 50 mg d'adsorbant, environ $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

Il est important de noter que, pour une extraction directe par SPE, la matrice biologique doit répondre à trois critères : elle doit être liquide avec une faible viscosité, les particules solides doivent être éliminées de la matrice liquide et l'adsorbant doit permettre la rétention de l'analyte.

Les avantages d'utilisation de la SPE comme étape de purification sont :

1. La faible consommation de solvants ;
2. La possibilité d'automatisation ;
3. La haute uniformité dans le traitement des échantillons ;
4. La sélectivité élevée en raison d'un grand choix d'adsorbants et de différents mécanismes de rétention ;

5. L'optimisation de l'extraction par la possibilité de faire varier ou ajuster la phase solide et les conditions d'élution (ex : débit, différents mélanges de solvant, etc...).

L'avantage de cette méthode par rapport à la ELL est l'augmentation de l'efficacité de purification des échantillons complexes et par conséquent l'amélioration de la sélectivité du dosage.

1.3.4 Extraction sur phase solide : application à des échantillons biologiques

La purification des composés à doser est une étape particulièrement importante en analyse chimique. Dans la littérature, on peut remarquer que les méthodes de préparation d'échantillons dépendent surtout de la nature et de la quantité accessible des échantillons biologiques. Des exemples de procédés de préparation pour l'analyse des stéroïdes dans des matrices biologiques sont présentés dans le *Tableau I.5*. Traditionnellement, les phases stationnaires de polarité inverse de type polymérique ou à base de silice sont utilisées comme support SPE.

La purification des œstrogènes par SPE peut comprendre des étapes séquentielles, comme par exemple la combinaison d'échange d'anions SAX (élimination des stéroïdes neutres) avec d'échange de cations WCX, [191] ou la purification sur support en phase inverse et d'échange d'anions faible WAX avec une phase « hybride phospholipide SPE » (élimination des lipides).[203]

Les matrices biologiques les plus souvent étudiées sont le plasma et le sérum. Dans la plupart des cas, comme ce sont des matrices fluides avec une faible quantité de lipides, les œstrogènes sont séparés en utilisant uniquement l'étape de LLE. Les solvants d'extraction les plus souvent utilisés sont l'acétate d'éthyle [192], l'éther méthyle *t*-butylique [189], l'éther diéthylique [136] ou le mélange hexane / acétate d'éthyle [205].

Pour isoler les œstrogènes à partir d'échantillons plus visqueux et riches en lipides tels que les testicules, le cerveau, le foie, il est important de combiner la ELL et la SPE. L'utilisation de la ELL offre souvent une séparation partielle des composés hydrophobes (ex: les lipides) et hydrophiles (ex: les protéines). L'élimination des lipides qui sont habituellement co-extraits avec les œstrogènes reste difficile, mais il y a quelques méthodes décrites à ce sujet. Seo *et al.* ont fait une étude intéressante sur la solubilité dans des solvants organiques d'hormones stéroïdes présentes dans divers tissus musculaires de bovins.[206] Cette étude a proposé une nouvelle méthode de délipidation en utilisant un mélange méthanol-eau comme solvant d'extraction, suivie par l'élimination par filtration des lipides congelés, basée sur la différence entre les points de congélation des lipides (environ -40°C) et des hormones (environ -60°C)

dans le méthanol (-98°C). La séparation des lipides par centrifugation est simple, permettant l'élimination d'environ 90% des lipides sans perte significative d'hormones. La délipidation était ensuite finalisée grâce à une SPE de type RP. Cette méthode est efficace si on dispose de grandes quantités d'échantillons pour l'analyse.

Chao *et al.* ont évalué l'efficacité de la combinaison de la ELL et de la SPE pour la purification du 17 β -E₂ à partir de différentes zones du cerveau de Diamant mandarin.[207] Les concentrations du 17 β -E₂ dans le cerveau et le plasma de Diamant mandarin sont inférieures à 600 pg.mL⁻¹, la ELL étant effectuée avec de l'éther diéthylique, et la SPE sur des cartouches en phase inverse à base de silice C₁₈.

La sensibilité de la méthode de dosage varie d'un article à l'autre, restant dépendante du type et de la quantité de la matrice biologique et du mode de purification utilisé (PP, ELL et SPE).

1.3.5 Effets de matrice (MEs)

La LC-ESI-MS/MS est devenue une technique couramment utilisée dans l'analyse des œstrogènes (Tableau 1.5). En effet, l'analyse directe par infusion en ESI-MS des échantillons biologiques est problématique, en raison de la suppression ionique provoquée par la présence d'espèces interférentes qui proviennent de la matrice.[208, 209] Il existe deux problèmes principaux associés à ces MEs. Le premier est la variation de la composition de la matrice et le deuxième est la différence de concentration entre les interférences endogènes et les œstrogènes. La variation de la composition des matrices biologiques est liée à la complexité des échantillons, la variabilité entre les individus, et la présence des diverses classes et concentrations des espèces endogènes dans les échantillons.[189] Les échantillons biologiques contiennent généralement des quantités importantes de protéines, de glucides, lipides et sels, dont les concentrations varient en fonction du type d'échantillon. Par exemple, les protéines sont abondantes dans le sérum / plasma, tandis que des quantités considérables de lipides sont présentes dans le cerveau. Ces interférences rendent l'analyse plus difficile, en raison de la faible présence des œstrogènes (pg.mL⁻¹), et des concentrations plus élevées de différentes espèces présentes dans les matrices.

Bonfiglio *et al.* ont signalé que la nature chimique d'un composé a un effet significatif sur le degré d'effets de la matrice. Cette étude sur quatre composés de polarités différentes, dans les mêmes conditions MS, a montré que les composés plus polaires exercent une suppression du signal plus importante en ESI que les composés moins polaires.[210] Ces constatations de MEs différentielles sont importantes en particulier lors du choix d'un étalon interne approprié à des fins de quantification.

L'importance des MEs sur la fiabilité de la LC-ESI-MS/MS a été démontrée en termes d'exactitude et de précision,[211] et lorsqu'une suppression ionique se produit, la sensibilité et la LOD d'une méthode peuvent être largement affectées.[212] Ainsi, pour développer une méthode en LC-ESI-MS/MS fiable, il est nécessaire d'étudier ces MEs.

King *et al.* ont montré par une série d'expériences que les MEs sont le résultat de la compétition entre les composants de la matrice non-volatils et les ions d'analyte pour l'accès à la surface des gouttelettes et pour le transfert vers la phase gazeuse.[213] Selon l'environnement dans lequel les processus d'ionisation et d'évaporation d'ions a lieu, cette compétition peut diminuer ou augmenter l'efficacité de la formation des ions souhaités présents aux mêmes concentrations à l'interface. Ainsi l'efficacité de la formation des ions est très dépendante de la matrice qui entre dans la source ESI.

Selon Matuszewski *et al.*, l'efficacité du processus de récupération (PE) résulte de l'effet de matrice (ME) et de la récupération de la molécule à analyser après l'étape d'extraction (Ré).[214] Il pense que les standards devraient être ajoutés après l'extraction pour l'étude de l'effet de matrice et avant l'extraction pour l'étude de l'efficacité du processus. L'utilisation des standards internes deutérés peut compenser la fluctuation de la reprise au cours des étapes de préparation des échantillons; par conséquent, la contribution relative de la récupération des analytes après extraction serait négligeable par rapport à l'efficacité de récupération.

Voici un exemple de calcul de l'efficacité du processus de récupération en présence de plasma humain (*Tableau I.4*), selon Buhrman *et al.*[212] Ces données sont adaptées à l'étude des diverses quantités d'effet de matrice qui peuvent se produire en utilisant des méthodes différentes de préparation des échantillons.

Tableau I.4 : Calcul des MEs, la Ré et le PE selon Buhrman et al.

Expérience	Intensité, cps	Paramètre	Données, %
Solution Standard (SSd)	8580	ME	$ (6390-8580)/8580 \times 100 = 26$
SSd ajoutée dans plasma après la ELL	6390	Ré	$4050/6390 \times 100 = 63$
SSd ajoutée dans plasma avant la ELL	4050	PE	$4050/8580 \times 100 = 47$

L'efficacité du processus de récupération obtenu lors de cette étude est de 47%. Ainsi, 53% du signal est perdu : 26% de la perte totale est due à l'effet matrice et 27% est due aux pertes au cours de l'étape d'extraction.

Une technique plus dynamique pour déterminer les effets de matrice est l'analyse en ligne.[213] Un extrait d'échantillon (sans ajout d'analyte) est injecté dans les conditions chromatographiques souhaitées. La technique en ligne permet de suivre l'influence de la matrice sur la réponse de l'analyte pendant la totalité des analyses chromatographiques. Les résultats des expériences permettent de déterminer l'influence de différentes techniques d'extraction sur les MEs, la colonne analytique appropriée, où les MEs sont présents ou absents au cours d'une analyse chromatographique et l'influence des additifs de la phase mobile sur la réponse.

Nguyen *et al.* ont évalué et comparé différentes matrices sur la base de la pente et de la linéarité des courbes de régression de 17α - et 17β -E₂. [215] Les matrices étudiées sont de l'albumine de sérum bovin dans le tampon phosphate salin, du sérum de cheval castré, du sérum et du cerveau de souris. Lorsqu'ils ont comparé les résultats entre les matrices biologiques et la solution standard, dans le cas du tampon phosphate A et du sérum de souris, les MEs n'étaient pas significatifs. Cependant, une suppression significative du signal, en particulier dans l'analyse du 17β -E₂, avec le sérum de cheval castré et le cerveau de souris a été observée. Comme présenté dans la *Figure. I.37A*, la pente pour le cerveau de souris dopée avec 17β -E₂, ne diffèrent pas énormément de la pente obtenue pour le sérum du cheval castré, tandis que celle obtenue pour 17α -E₂ diffère significativement. Ils ont attribué ce résultat au temps de rétention de 17α -E₂ plus important par rapport à celui de 17β -E₂ et de l'utilisation de la SPE comme l'étape de préparation de l'échantillon.

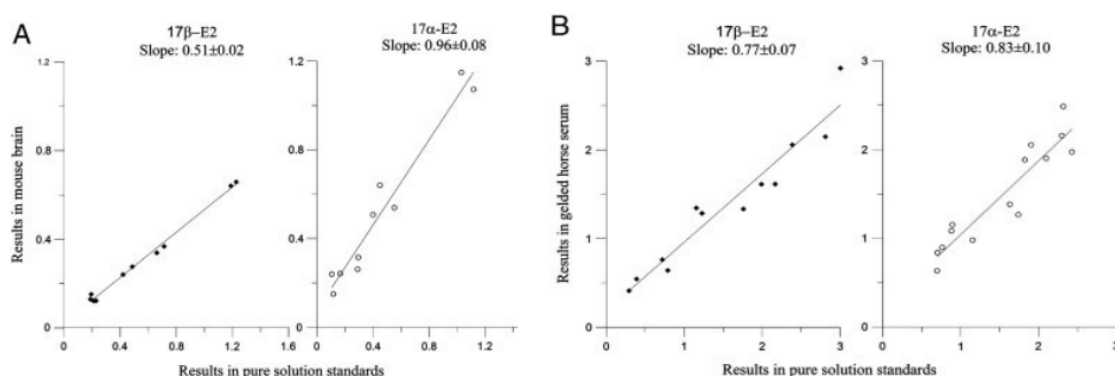


Figure I.37 : Les effets de matrice basés sur les pentes de droites de régression pour 17α - et 17β -E₂ dans (A) le cerveau de souris, (B) le sérum du cheval castré.[215]

Dans le cas du sérum de cheval castré (*Figure I.37B*), le coefficient de corrélation était significativement différent de 1 pour les deux analytes. Cela s'explique par l'utilisation de la ELL et de l'absence de l'étape de purification par SPE. Donc, l'application des étapes de prétraitement des échantillons, comme la précipitation des protéines, la ELL et la SPE, joue un rôle important dans l'élimination des MEs.

L'évaluation de l'effet de matrice devrait être un élément obligatoire de la procédure de validation de toutes les méthodes LC-MS. Le consensus sur la façon dont ces MEs devrait être évaluées est évidemment nécessaire pour la validité et l'intégrité des données quantitatives.

I.4 INTERET DE LA HPLC-MS/MS AVEC OU SANS DERIVATION POUR L'ANALYSE DES ŒSTROGENES

Au cours des dernières années, la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) est devenue une technique majeure dans les laboratoires d'analyse, en particulier dans les industries pharmaceutiques et biotechnologiques.[145, 205] Pour améliorer la sensibilité et la spécificité d'analyse, une étape de dérivation est souvent appliquée.[8]

Les œstrogènes peuvent être présents en faibles quantités dans de nombreuses matrices biologiques. Ce type de molécules ne présente pas de propriétés élevées d'absorption en UV ou d'ionisation efficace en MS qui permettent de les détecter facilement sans une forme de pré-concentration ou dérivation.[171, 207, 216] La LC couplée à la MS est souvent utilisée pour la détection des œstrogènes.[217] Par rapport à la sensibilité de la RIA et de la GC-MS pg.mL^{-1} , la LC-MS/MS peut atteindre des limites de détection de l'ordre du fg.mL^{-1} . Notamment, si la dérivation chimique est utilisée en conjonction avec l'utilisation d'une source ESI,[169, 170] et une approche par MRM, les limites de détection peuvent être améliorées malgré les étapes supplémentaires de préparation de l'échantillon. Quelques études de dosage des œstrogènes sont présentées de manière synthétique dans le *Tableau I.5*. Ce tableau met en évidence la diversité des méthodes de préparation des échantillons et la diversité des conditions analytiques qui ont été utilisées au cours des dernières années.

La GC-MS était la plus utilisée pour la quantification des œstrogènes dans le plasma et le sérum, grâce au coût relativement réduit du matériel et à la simplicité de cette méthode.[138, 140-142] Cette méthode n'est pas appliquée pour le dosage des œstrogènes dans le cerveau ou dans des zones cérébrales (ex: l'hippocampe). Cela est vraisemblablement dû à la faible masse d'échantillon disponible, à la faible concentration des œstrogènes dans une matrice d'origine cérébrale et à la nécessité de la dérivation qui représente parfois un désavantage, comme l'obtention de produits de dérivation instables et sensibles à l'humidité, ce qui peut augmenter les risques d'erreurs de mesure.

Au cours des dernières années, plusieurs méthodologies de LC-MS/MS ont été décrites dans la littérature pour la quantification des œstrogènes.[146, 191, 192] Actuellement, les œstrogènes peuvent être ionisés par différentes techniques d'ionisation. Il y a une diversité des documents décrivant l'utilisation de : l'ESI en mode positif [191, 205, 218, 219] et négatif, [145, 205]; l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en mode positif [83, 220] et

négatif [221] et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) en mode positif [222] et négatif [223, 224].

La dérivation des œstrogènes a également été décrite pour améliorer l'efficacité d'ionisation en mode positif, en utilisant le plus souvent comme agent de dérivation le chlorure de dansyle (Dns-Cl).[146, 174, 189, 192, 193, 225, 226] Cependant, de nombreux laboratoires essaient d'éviter cette étape qui risque d'affecter la robustesse du dosage.[145, 205, 224] En effet, les produits de dérivation étant pour la plupart instables et sensibles à l'humidité, des problèmes de répétabilité et reproductibilité des analyses apparaissent. Deux études indépendantes décrivent l'analyse du 17β -E₂ dans le sérum humain à l'aide d'un spectromètre de masse identique à celui que nous utilisons (AB Sciex, QTRAP 5500).[137, 205] La LOQ décrite est de 0.5 pg/mL (2 pmol/L) avec l'ESI en mode négatif sans dérivation,[205] et avec l'ESI en mode positif après dansylation.[137]

L'analyse quantitative des œstrogènes présents dans le cerveau nécessite une très grande sensibilité, largement liée au type de spectromètre, à la technique d'ionisation et à la matrice biologique. Cependant, il est difficile de comparer les mérites des différentes techniques d'ionisation disponibles. Il existe des comparaisons entre les techniques d'ionisation LC-MS pour le dosage du 17β -E₂, mais elles ont été effectuées sur des solutions standards.[227] L'application de ces méthodes à des matrices biologiques induit des effets de la matrice, ce qui conduit le plus souvent à une perte de sensibilité.

Keski-Rahkonen *et al.* ont effectué une étude de comparaison entre les techniques d'ionisation : ESI, APCI et APPI dans les deux modes d'ionisation en analysant le 17β -E₂ non dérivé dans des extraits de sérum humain et de tissu endométrial.[228] En parallèle de la comparaison de la sensibilité des techniques d'ionisation, l'effet matrice et la spécificité des transitions MRM de chaque méthode ont été également évalués. La configuration LC-MS classique, un MS triple quadripôle API 5000 (AB Sciex) à haute sensibilité et une colonne LC en phase inverse ont été utilisés. Pour des solutions standards du 17β -E₂, ils ont obtenu en ESI(+) une LOD de 0,33 pmol.mL⁻¹ (90 pg.mL⁻¹). L'ESI(-) était beaucoup plus efficace, avec un faible bruit de fond et une LOD de 0,013 pmol.mL⁻¹ (3,5 pg.mL⁻¹). L'APCI en mode positif a produit une meilleure réponse que l'ESI, mais avec un bruit de fond très élevé qui a eu un effet direct sur la sensibilité (0,03 pmol.mL⁻¹ (8,2 pg.mL⁻¹)). L'APCI en mode négatif a donné une LOD (0,013 pmol.mL⁻¹ (3,5 pg.mL⁻¹)) comparable avec l'ESI(-). Dans le cas de l'APPI en mode positif, la LOD était identique à celles obtenues en ESI et en APCI en mode négatif. Avec l'APPI(-) la réponse était plus faible, mais en raison d'un très faible bruit de fond et d'un rapport S/N élevé, une LOD de 0,007 pmol.mL⁻¹ (1,9 pg.mL⁻¹) a été obtenue. Ainsi, en l'absence de matrice biologique, l'APPI en mode négatif a donné le meilleur résultat. Dans des extraits de

sérum et homogénat de tissu endométrial, l'ESI(-) a montré une importante suppression ionique, alors que l'efficacité d'ionisation des deux autres sources, l'APPI et l'APCI, n'a pas été affectée par la présence de la matrice biologique. Keski-Rahkonen *et al.* ont affirmé que l'APPI a plus de potentiel et peut être utilisée avec succès dans les deux modes d'ionisation pour le dosage du 17β -E₂ dans des matrices biologiques.

La sensibilité d'analyse des œstrogènes diffère d'un article à l'autre. Par exemple, dans le cas du dosage des œstrogènes présents dans le sérum humain, la sensibilité varie selon les quantités d'échantillon de départ, la méthode de purification et la dérivation chimique. La LOD obtenue pour 200 μ L de sérum, avec un LC-ESI(-)-MS/MS sans dérivation, est de 2 pg.mL^{-1} (0,007 pmol.mL^{-1}) (Guo *et al.*) [145] et 50 pg.mL^{-1} (0,2 pmol.mL^{-1}) (Keski-Rahkonen *et al.*) [228]. En utilisant la dérivation avec le Dns-Cl (sur la même quantité de sérum), Kushnir *et al.* ont obtenu une LOD de 0.5 pg.mL^{-1} (0,002 pmol.mL^{-1}), tandis que Szarka *et al.* 2 pg.mL^{-1} (0,007 pmol.mL^{-1}). Par conséquent, il apparaît bien que la dansylation peut être utilisée pour augmenter l'efficacité d'ionisation du 17β -E₂ quand on dispose de petites quantités d'échantillon. Sur 500 μ L de sérum, avec une source ESI et la dansylation, Xu *et al.* ont obtenu une sensibilité de 8 pg.mL^{-1} (0,03 pmol.mL^{-1}), Jasuja *et al.* 2 pg.mL^{-1} (0,007 pmol.mL^{-1}) alors que Zhao *et al.* / Ke *et al.* présentent une valeur de 1 pg.mL^{-1} (0,004 pmol.mL^{-1}). Parfois, la quantité de sérum n'est pas notée, [170] il est alors difficile de faire une comparaison avec d'autres méthodes.

Concernant le dosage des œstrogènes dans le cerveau, il n'y a pas beaucoup d'exemples dans la littérature. En 2002, Miramura *et al.* sont arrivés à doser les œstrogènes dans le cerveau du rat par GC-MS/MS, mais sans indiquer la sensibilité de la méthode. [229] Plus tard, Caruso *et al.* ont dosé 17α - et 17β -E₂ dans le cerveau du rat. [83, 220] En utilisant la technique LC-MS/MS avec une source APCI, et sans dérivation chimique, ils ont obtenu une LOQ de 0.02 pg.mg^{-1} (0.8 pg.mL^{-1} ou 0,003 pmol.mL^{-1}).

Malgré une grande diversité des dimensions de colonnes analytiques utilisées, l'utilisation de phase stationnaire inverse (C8 ou C18) reste prépondérante. Les phases mobiles utilisées pour l'analyse chromatographique sont diverses. Les phases mobiles les plus utilisées sont le méthanol et l'acétonitrile combinées à une solution aqueuse. Selon le mode d'ionisation, différents additifs, tels que l'acide formique, l'acide acétique, l'acétate d'ammonium ou le formate d'ammonium, peuvent être ajoutés à la phase mobile. Le *Tableau I.5* montre que la source d'ionisation ESI est la plus souvent utilisée pour l'analyse des œstrogènes.

Tableau I.5 : Exemples d'analyses des œstrogènes et de ses conjugués dans des tissus et les liquides biologiques

Analytes	Type d'échantillon (quantité)	Préparations des échantillons	Technique de separation	Dérivation	Colonne chromatographique	Récupération (%)	LOD/LOQ	Réf.
Les œstrogènes, catecholestradiol et methoxyestradiol	Plasma de rat (non indique)	Homogénéisation, PP (acétone), Evaporation, Dérivation (anhydride pentafluoropropionique/ACN)	GC-CI(-)MS	Oui	ZB5 MS : 30m × 0.25 mm	-	LOD 0,25 ng.mL ⁻¹	[142]
Les œstrogènes libres et conjugués	Sang, testicules et foie de rat (500 µL et 1g)	Homogénéisation (ACN), ELL (ACN/Hexane), SPE Oasis WAX (CH ₃ OH) et hybride phospholipide SPE (ACN/2% Ac. Citrique), Evaporation	LC-ESI(+) et ESI(-)-MS/MS et LC-ESI(+)-QTOF	Non	L-C18 2.1 × 150 mm, 2µm L-C18 2.1 × 150 mm 5, 3µm	99-112	LOD 24,2 fmol.g ⁻¹ (0,2 fg.mL ⁻¹)	[203]
Les œstrogènes	Cerveau de Diamant mandarin (non indique)	Homogénéisation (solution tampon phosphate), ELL (Et ₂ O), SPE C18-SD (CH ₃ OH/H ₂ O), Evaporation	EIA	Sans objet	-	-	-	[207]
17β-E ₂ , E ₁ et E ₁ S	Plasma humain (1 mL)	ELL (Et ₂ O), Purification sur immunosorbents, Evaporation	HPLC-ESI(-)-MS/MS avec RIA	Non	XTerraPhenyl - 2.1 × 150 mm, 5µm Symmetry C18 2.1 × 10 mm, 3.5µm	47-69	LOD 0,23 ng.mL ⁻¹	[136]
17β-E ₂ , PREG et DHEA	Hippocampes, cerveau et plasma de rat (non indique)	Homogénéisation (solution tampon : PK/EDTA/PhMSF), ELL (EtOAc/Hexane), Evaporation	HPLC-RIA	Non	Silica gel – 0.46 × 15 cm, 0.45µm	50	LOD 0,68-1,35 fmol.mg ⁻¹	[230]
Les œstrogènes libres et conjugués	Sérum et urine humains (500 µL)	Dilution (H ₂ O/HCOOH), SPE Oasis HLB SPE (CH ₃ OH/H ₂ O/HCOOH/EtOAc), Evaporation, Dérivation (Dns-Cl)	LC-ESI(+)-MS/MS LC-ESI(-)-MS/MS	Oui	Phase inverse, Luna C18 – 2.0 × 100 mm, 3µm	-	LOD 1 pg.mL ⁻¹	[146]
17β-E ₂ , 17α-E ₂ et E ₁	Sérum humain (non indique)	ELL (EtOAc), Evaporation, Dérivation : [N-(trimethylsilyl)imidazole]	GC-EI-MS/MS	Oui	50% phenylpolysilphenylene-siloxane	80-90	LOQ 11 – 21 pg.mL ⁻¹	[140]
Les œstrogènes (E ₁ , 17β-E ₂ , E ₃), les progestagènes (PREG, PROG, 17-OH-Preg), les	Urine humain (2.5 mL)	125 mg de NaHCO ₃ / K ₂ CO ₃ (2:1)-pour ajuster le pH à 8 ; ELL (4 mL de diethyl éther et 1,5 g de sulfate de sodium anhydre) ; Evaporation	GC-APPI(+)-MS/MS	Oui	TR-5MS (25 × 0.25 m, 0.25 mm), TR-50MS (15 × 0.25 m, 0.25 mm)	58-70	LOD 0,02–0.1 ng.mL ⁻¹	[138]

androgènes (DHEA, AN, T, DHT)		Dérivation : <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA)					LOQ 0,2–0,5 ng.mL ⁻¹	
17β-E ₂ , T, DHT, 3α-Diol	Fluide testiculaire de rat (10 µL)	Homogénéisation (standard interne), Dérivation (picolinoylchloridehydrochloride), SPE Bond-Elut LRC C18 (ACN, CH ₃ OH, H ₂ O), Evaporation	HPLC-ESI(+)-MS/MS	Oui	X-Terra C18 – 1 × 150mm, 3µm	-	LOD 0,2 pg.mL ⁻¹	[204]
17β-E ₂	Tissus prostatiques (50-100 mg d'homogenate)	Homogénéisation (standard interne), ELL (EtOAc) et SPE Oasis MAX (CH ₃ OH, H ₂ O) ; Dérivation (PFB) – extraction InertSep SI cartridge, ajouter du 2-fluoro-1-méthylpyridinium p-tolensulfonate dans 1 ml de dichloromethane; SPE Oasis WCX (ACN, CH ₃ OH, H ₂ O, HCOOH)	LC-ESI(+)-MS/MS	Oui	Xterra MS-C18 – 2.1 × 100 mm, 3.5 µm	88-110	LOD 0,15 pg.tube ⁻¹	[191]
17β-E ₂ , 17α-E ₂ et E ₁	Sérum humain (200µL)	ELL (EtOAc), Evaporation, Dérivation (Dns-Cl/ACN/NaHCO ₃)	HPLC-ESI(+)-MS/MS	Oui	Synergi Max-RP (PSM-RP) – 2.1 × 150mm, 4µm Kinetex Phenyl-Hexyl (PK-PH) – 2.1 × 50mm , 2.6 µm	-	LOD 2 pg.mL ⁻¹	[192]
17β-E ₂ et E ₁	Sérum humain (200 µL)	ELL (éther méthyle t-butylique), Evaporation, Dérivation (Dns-Cl/ACN/NaHCO ₃)	LC-ESI(+)-MS/MS	Oui	GerminiPhenyl – 2.0 × 100mm, 3µm	95	LOD 0.5-1 pg.mL ⁻¹	[189]
12 stéroïdes	Sérum humain (760 µL)	Extraction (ACN)	LC-APPI-MS/MS	Non	Phase inverse C8 (Supelco LC-8-DB) - 3.0mm × 3.3cm, 3µm	-	LOD 10 pg.mL ⁻¹	[222]
17β-E ₂ , E ₃ , E ₁ et 16-Hydrohyestrone	Sérum humain (200 µL)	Extraction (ACN)	LC-ESI-MS/MS	Non	Phase inverse C8 (Supelco LC-8-DB) - 3.0mm × 3.3cm, 3µm	88-108	LOD 2 pg.mL ⁻¹	[145]
PREG, PROG, DHP, THP, T, DHT, 17β-E ₂ et 17α-E ₂	Cerveau de rat (100 mg)	Homogénéisation, ELL (CH ₃ OH/ Acide acétique), Evaporation, SPE (CH ₃ OH/H ₂ O)	LC-APCI(+) et APCI(-)-MS/MS	Non	Inertsil ODS-2 RP-C18 – 4.6mm × 150cm, 5µm	100-105	LOD 0,02 pg.mg ⁻¹	[83]
T, DHT, 17β-E ₂ et E ₁	Sérum et tissus reproductifs de souris	Homogénéisation (EDTA/ tampon phosphate), ELL, on-line SPE	LC-APPI(+)MS/MS	Non	Supelcosil LC-8-DB	95-120	LOQ 5 pg.mL ⁻¹	[223]

	(100 µL et 200 µL d'homogenate),							
E ₁ , 17β-E ₂ , E ₁ -3G, E ₁ -17G, E ₁ -3S, 17β-E ₂ -3G, 17β-E ₂ -17G	Sérum humain (2 mL)	Homogénéisation (tampon phosphate), ELL, SPE StratX (CH ₃ OH/ tampon phosphate / H ₂ O/NH ₄ OH), Evaporation	LC-ESI(-)-MS/MS	Non	Luna-Phenyl-Hexyl 4.6mm × 75cm, 3µm	90-111	LOD 5 pg,mL ⁻¹	[231]
17β- E ₂ Comparaison entre différents agents de dérivation : Dns-Cl, PBS-Cl, DMIS-Cl et PS-Cl	Sérum humain (non indique)	Homogénéisation, ELL, Evaporation ; Dérivation (PS-Cl/Acétone/NaHCO ₃)	LC-ESI(+)-MS/MS	Oui	Luna-Phenyl-Hexyl 2mm × 150cm, 3µm	-	LOD 10 pg,mL ⁻¹	[170]
17β- E ₂ et PREG, PROG, DHP, THP, Iso-PREG, DHEA, T, DHT, 17α-diol,	Cerveau, moelle épinière et nerfs périphériques de rat (non indique)	Homogénéisation, ELL (CH ₃ OH/Acide acétique), Evaporation, SPE (CH ₃ OH/H ₂ O)	LC-APCI(+)-MS/MS	Non	Hypersil Gold 3mm × 100cm, 3µm	-	LOD 0.02 pg,mg ⁻¹	[220]
17β- E ₂ , 17α-E ₂ et E ₁	Sérum humain (non indique)	Hydrolyse (β-glucuronidase/tampon acétate pH=5,2), ELL (Et ₂ O), Evaporation, 1) SPE ChromP (CH ₃ OH/EtOAc/ H ₂ O/Hexane/Et ₂ O), Evaporation; 2) SPE SiOH (DCM/Hexane/ EtOAc), HPLC separation (alkylamino-silica gel); Dérivation : (Alkylation et silylation avec PFBBBr et BSTFA)	GC-CI(-)-MS/MS	Oui	ZB-5MS	25	LOQ 2 pg,mL ⁻¹	[143]
17β- E ₂ , E ₁ et Guaiacol-E ₁	Cerveau de rat (600 mg)	Homogénéisation (EtOH 10%), ELL (EtOAc), Evaporation, SPE : ISOLUTE C18 (EC) (Hexane/ EtOAc) Dérivation (dimethylethylsilylimidazole-DMESI)	GC-EI(+)-MS/MS	Oui	Mini-colonne de silica-gel	65	-	[229]
17β-E ₂ et E ₁	Sérum humain (0,25 – 1 mL)	ELL (Et ₂ O), Evaporation, Dérivation (acide Picolinique)	HPLC-ESI(+)-MS/MS	Oui	Cadenza CD-C18 2 mm × 50 mm, 3µm	-	LOQ 0.5 pg,mL ⁻¹	[171]
17β-E ₂ et E ₁	Sérum humain (450 µL)	PP et ELL (Hexane/EtOAc), online SPE (C8)	HPLC-ESI(-)-MS/MS	Non	Phase inverse C8 2.1 mm × 3.3cm, 3µm	95-105	LOQ 1 pmol.L ⁻¹ (3,7 pg,mL ⁻¹)	[205]

17β-E ₂ et E ₁	Sérum humain (200 µL)	ELL (éther méthyle <i>t</i> -butylique (MTBE)), Evaporation, online SPE (C1), Dérivation (Dns-Cl/ ACN/NaHCO ₃)	HPLC-ESI(+)-MS/MS	Oui	GerminiPhenyl C6 2.0 mm × 100mm, 3µm	-	LOD 2 pg.mL ⁻¹	[193]
Les œstrogènes libres et conjugués	Sérum humain (500 µL)	ELL (DCM), Dérivation (Dns-Cl)	HPLC-ESI(+)-MS/MS	Oui	Phase inverse C18 2.0 mm × 150mm, 4µm	-	LOD 8 pg.mL ⁻¹	[232]
Les œstrogènes libres et ses métabolites	Sérum humain (1 mL)	Hydrolyse, ELL (DCM), Dérivation (Dns-Cl)	HPLC-ESI(+)-MS/MS	Oui	C18	-	LOQ 1–2 pmol.L ⁻¹ (3,7–7,3 pg.mL ⁻¹)	[226]
Les œstrogènes et androgènes	Sérum humain (2 mL)	Hydrolyse et SPE (ChromP et Silica), ELL (Et ₂ O/ <i>n</i> -pentane), HPLC séparation (alkylamino-silica gel); Dérivation (Alkylation et silylation avec PFBBBr et BSTFA-œstrogènes ; MSTFA, TMIS et DTE - androgènes)	GC-Cl(+) et Cl(-)-MS/MS	Oui	ZB-5MS	-	LOD 1 pg.mL ⁻¹	[141]
Les œstrogènes et androgènes	Sérum humain (200 µL)	PP ou ELL (EtOAc/Hexane), online SPE (C8)	HPLC-APPI(+) et APPI(-)-MS/MS	Non	Supelcosil LC-8-DB 3.0 mm × 7.5cm, 3µm	-	LOQ 2,5 pg.mL ⁻¹	[224]
17β-E ₂ , PROG et T	Plasma humain (500 µL)	PP (ACN)	HPLC-ESI(-)-MS/MS	Non	Xterra C18 2.1mm × 100mm, 3.5µm	98	LOD 0,1 pg.mL ⁻¹	[225]
E ₁ , 17β-E ₂ et 17α-E ₂ , E ₃	Liquide cérébrospinal humain (1 mL)	ELL (EtOAc), Evaporation, Dérivation (Dns-Cl/ Acétone/NaHCO ₃)	LC-ESI(+)-MS/MS	Oui	Polaris amide C18 Shim-pack C18 XR-ODS	91 - 104	LOD 26 pg.mL ⁻¹	[174]
17α-E ₂	Sérum humain, tissu endométrial (150 µL)	Homogénéisation (solution tampon phosphate), ELL (éther méthyle <i>t</i> -butylique), Evaporation	LC-MS/MS Comparaisons entre différentes techniques d'ionisation : ESI(+/-), APCI(+/-) et APPI(+/-)	Non	AgilentPoroshell 120 SB-C18 2.1 × 50mm, 2.7µm	91 - 120	LOD : ESI(+) 1,1 pg.mL ⁻¹ ESI(-) 0,05 pg.mL ⁻¹ APCI(+) 0,11 pg.mL ⁻¹ APCI(-) 0,05 pg.mL ⁻¹ APPI(+) 0,05 pg.mL ⁻¹ APPI(+) 0,03 pg.mL ⁻¹	[228]

PREG, PROG, DHP, THP, T, DHT, 17β-E ₂ , 17α-E ₂ , etc.	Sérum humain (500 µL)	plaque SPE (96) DCM, CH ₃ OH/H ₂ O	HPLC-ESI(+)- MS/MS	Non	Chromolith RP-18e 100 mm × 3.0 mm	88 - 90	LOD 0,01 – 32 ng.mL ⁻¹ LOQ 5 – 8000 ng.mL ⁻¹	[219]
α-zearalanol, β-zearalanol, α-trenbolone, β-trenbolone, methyltestostero-ne, 17α-E ₂ , 17β-E ₂ , ethynylestradiol, α-boldenone, β-boldenone, α-nortestosterone et β -nortestosterone	Sérum de bovin (5 mL)	Homogénéisation : Tampon Acétate 2M (pH = 5,2), ELL (CH ₃ OH), SPE Oasis HLB (60 mg, 3 ml) (CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₄ OH/ Acétone), Evaporation	LC-APCI(+) et APCI(-)-MS/MS	Non	Hypersil ODS 150 mm × 4.6 mm, 5 mm	78 -88	LOD 0,02 – 12 ng.mL ⁻¹	[221]
17β-E ₂ , E ₁ , T, DHT, androst-5-ene-3β, 17β-diol (5-diol), DHEA and androstenedione	Sérum humain (500 µL)	Homogénéisation (Tampon acétate d'ammonium 0,2M), ELL (1- chlorobutane), Evaporation Dérivation (Dns-Cl/acétone/0.2M NaHCO ₃) On-line SPE	UPLC-ESI(+)- MS/MS (Qtrap 6500)	Oui	Poroshell 120 SB-C18 2.1 × 30 mm, 2.7 mm Poroshell 120 EC-C18 3.0 × 50 mm, 2.7 mm Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD 2.1 × 50 mm, 1.8 mm	72.1-84.7	LOD 1 pg.mL ⁻¹	[194]
17β-E ₂	Sérum humain (150 µL)	Homogénéisation (tampon de dialyse, pH=7,28±0,01), ELL (éther méthyle t-butylque), Dérivation (Dns-Cl)	HPLC-ESI(+)- MS/MS (Qtrap 5500)	Oui	Phenyl C6 100 mm × 2.1 mm, 3 µm	-	LOQ 0,5pg.mL ⁻¹	[137]
E ₁ , E ₂ , E ₃ et Bisphenol A (BPA)	Plasma et liquide séminal (500 µL et 1 mL)	Homogénéisation (solution physiologique-NaCl), ELL (éther méthyle t-butylque), Dérivation (Dns-Cl)	UHPLC-ESI(+)- MS/MS	Oui	Kinetex C18 100mm × 3.0 mm, 1.7 mm	96-104	LOD 3,4 – 12,7 pg.mL ⁻¹	[195]

AED	androstènedione	APCI	ionisation chimique à pression atmosphérique	BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
3α et 17β-Diol	5α-Androstane-3α,17β-diol	APPI	photoionisation à pression atmosphérique	CI	ionisation chimique
DHEA	dehydroepiandrosterone	Dns-Cl	chlorure de dansyle	DCM	dichlorométhane
DHP	dihydroprogesterone	DMIS-Cl	chlorure de 1,2-diméthyl-1H-imidazole-4-sulfonyl	EI	impact électronique
DHT	dihydrotestostérone	ESI	electrospray	EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
E ₁	estrone	LOD	limite de détection	PFBBr	pentafluorobromobenzène
17α et β-E ₂	estradiol	ELL	extraction liquide-liquide	RIA	analyse radio-immunologique
E ₃	estriol	LOQ	limite de quantification		
PREG	prégnénolone	PBS-Cl	chlorure de 4-(1H-pyrazol-1-yl)-benzènesulfonyl		
PG	progesterone	PP	precipitation des protéines		
T	testostérone	PS-Cl	chlorure de pyridine-3-sulfonyl		
THP	tétrahydroprogesterone	SPE	extraction sur phase solide		

Comme c'est illustré dans le tableau, les volumes initiaux d'échantillon sont très supérieurs à la quantité dont nous disposons (10 mg d'hippocampe de souris). Dans certains cas, les volumes d'échantillon ne sont pas indiqués. D'autre part, tous les paramètres permettant de reproduire les expériences ne sont pas toujours bien décrits. En effet, souvent soit la LOD soit la LOQ est indiquée, ces valeurs étant exprimées dans des unités différentes en fonction des auteurs. Tous ces paramètres rendent ainsi très difficile la comparaison des différentes méthodes utilisées.

CHAPITRE II:
LES ŒSTROGENES DANS LE CERVEAU ET LE PLASMA :
PREPARATION DES ECHANTILLONS ET ELABORATION DE LA
METHODE D'ANALYSE PAR LC-MS/MS

II.1 INTRODUCTION

La molécule cible de notre étude est le 17β -E₂. Toutefois, pour évaluer les concentrations du 17β -E₂ biodisponible dans différentes régions cérébrales, il faut se rappeler qu'il peut non seulement être synthétisé localement (le 17β -E₂ endogène) ou être apporté par le sang (le 17β -E₂ exogène) mais peut aussi être facilement métabolisé en E₁ et E₃ dans la cellule. De plus, le 17β -E₂ peut être stocké sous forme d'E₁, et, en cas de besoin, rapidement reconverti en 17β -E₂. [7] Lorsque les neuroscientifiques cherchent à comprendre les mécanismes d'action du 17β -E₂ dans le cerveau, il devient essentiel de pouvoir mesurer les variations locales de tous les œstrogènes présents. Ceci peut les aider à définir le rôle du 17β -E₂ dans les processus cérébraux : sa fonction d'hormone ou de neurotransmetteur serait dépendante de son lieu de production et/ou d'action, de la concentration locale dans une zone particulière (à laquelle ses effets sont observés) et des éventuels mécanismes compensatoires. Ces derniers pourraient être compris en considérant l'équilibre entre tous les œstrogènes présents. Afin de comparer les concentrations circulantes, biodisponibles et bioactives, il est également très important de pouvoir doser les molécules d'intérêt dans le plasma et les tissus cérébraux (dans notre cas l'hippocampe et le cerveau entier (sans hippocampe)).

D'autre part, il ne faut pas oublier une autre forme de l'Estradiol fabriquée naturellement dans le cerveau de la femme et de l'homme, le 17α -Estradiol (17α -E₂). Il est moins actif vis-à-vis des récepteurs nucléaires que la forme habituelle, mais peut également être à l'origine de certains effets neuroprotecteurs. [55] De plus, peu de données sur sa concentration dans le plasma et différents tissus et sur les voies de sa biosynthèse existent dans la littérature (*Figure II.1*). [56] Sa synthèse à partir de l'épitéstostérone a été mise en évidence [233] et un certain nombre de données font penser que l'E₁ peut être également considéré comme un éventuel précurseur du 17α -E₂. [192] C'est un isomère optique du 17β -E₂, et, par conséquent, la différence entre les deux Estradiols ne peut pas se faire par des spectres MS et MS/MS (mêmes fragmentations, intensités, transitions de quantification et de validation). Seules les conditions chromatographiques et l'utilisation des standards commerciaux pourront nous aider à les différencier selon leur temps de rétention.

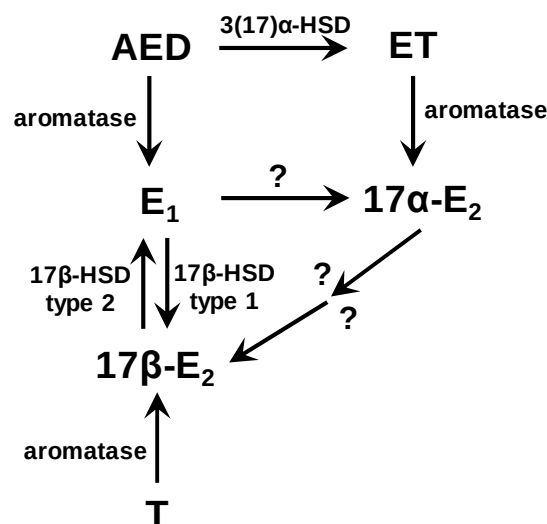
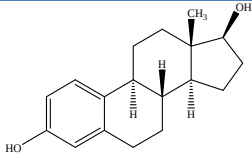
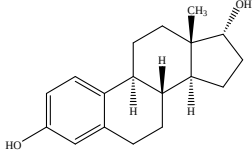
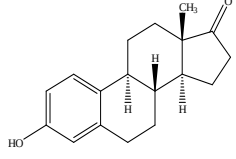
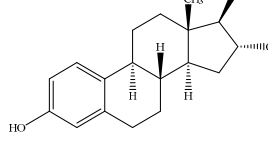
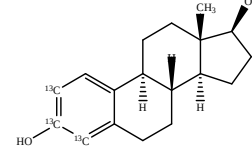
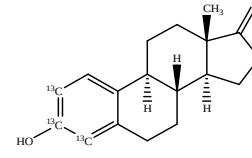


Figure II.1 : Les voies de biosynthèse du 17 α -E₂ sont complexes et incomplètement caractérisées [56]

C'est pourquoi nous avons décidé de développer une méthode d'analyse simultanée de ces quatre œstrogènes : 17 β - et 17 α - Estradiol, Estrone et Estriol. Pour évaluer la perte de substance à analyser au cours de la préparation de l'échantillon plusieurs standards internes (SI) ont été testés : 17 β -E₂-d₂, 17 β -E₂-d₅ et 17 β -E₂-¹³C₃. Nous avons remarqué un échange isotopique important pour les standards 17 β -E₂-d₂ et 17 β -E₂-d₅. Pour cette raison, ce sont les 17 β -E₂-¹³C₃ et E₁-¹³C₃ qui ont été utilisés comme standards internes. Les structures et les propriétés physico-chimiques de ces œstrogènes et des SI sont indiquées dans le *Tableau II.1*.

La spécificité analytique de la méthode est validée selon quatre critères : le temps de rétention chromatographique, la valeur de m/z de l'ion pseudo-moléculaire de la molécule à doser (ion précurseur) et deux transitions MRM correspondant aux m/z des deux fragments les plus intenses. L'ion fragment le plus abondant est utilisé pour la quantification et l'autre pour la validation.

Tableau II.1 : Structures et propriétés physico-chimiques des œstrogènes et des Standard Interne (SI)

Composé	Structure	Formule moléculaire	Synonymes	Masse molaire, g/mol	Propriétés physico-chimiques		
					T _b , °C	λ _{max} , nm	pK _a
17β-Estradiol (17β-E ₂)		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	17β-Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol;	272,39	178-179	280	10,71
17α-Estradiol (17α-E ₂)		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	17α-Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol;	272,39	178-179	280	10,71
Estrone (E ₁)		C ₁₈ H ₂₂ O ₂	1,3,5-Estratriene-3-ol-17-one ;	270,37	254-256	283-285	10,77
Estriol (E ₃)		C ₁₈ H ₂₄ O ₃	1,3,5-Estratriene-3β,16α,17β-triol;	288,39	282	280	10,46
17β-E₂-¹³C₃		¹³ C ₃ C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1,3,5-Estratriene-3-17β-diol- ¹³ C ₃	275,36	178-179	-	10,71
E₁-¹³C₃		¹³ C ₃ C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one- ¹³ C ₃	273,34	258-260	-	10,77

* Valeurs de pK_a d'après Lewis et Archer [234]

II.2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION PAR MS/MS

L'un des principaux objectifs de ce travail consiste à optimiser les conditions de dosage de certains œstrogènes (17 β - et 17 α - Estradiol, Estrone et Estriol) par MS en tandem. Il ressort de l'étude bibliographique (chapitre I) que les meilleures sources d'ionisation pour ce type de molécules, peu volatiles et thermiquement labiles, sont les sources ESI, APPI et APCI. Ces analyses ont été effectuées en mode ESI, en utilisant une chaîne HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher) couplée à un spectromètre QTrap 5500 (Sciex).

II.2.1 Optimisation des paramètres MS : le mode d'ionisation et l'augmentation de l'intensité du signal

En ESI, l'état d'ionisation et de solvation des analytes est fortement influencé par le pK_a des analytes, le pH de la phase mobile, la force ionique et la composition du solvant. Puisque la plupart des composés analysés contiennent un ou plusieurs groupes fonctionnels acides ou basiques, la plupart des phases mobiles nécessitent un contrôle du pH. La composition de la phase mobile présente des effets notables sur la formation d'espèces ioniques en phase gazeuse. Une phase mobile aqueuse avec un additif bien choisi doit avoir un pH tamponné entre 2 et 8 et le potentiel pour masquer tous les groupes silanols résiduels de la surface de l'adsorbant. Le choix d'un pH de phase mobile est notamment dicté par le fait qu'un acide en solution à 2 unités de pH en dessous de son pK_a n'est ionisé qu'à raison de 1% (les bases ont le comportement opposé).

Enke *et al.* ont proposé le modèle de partition d'équilibre qui permet de comparer l'effet de la concentration de tampon sur la réponse de l'analyte en ESI-MS à une valeur prédite. Le modèle prédit que la réponse de l'analyte est proportionnelle à la concentration, et que le facteur de réponse diminue avec l'augmentation de la concentration d'additif.[235, 236] Les auteurs ont montré que la plupart des écarts de la valeur prédite sont dus au fait que la désolvatation et/ou la transmission des ions sont significativement diminuées avec les plus fortes concentrations de tampon. Les auteurs ont également observé des changements dans la forme et le diamètre du *spray* en fonction de la concentration du tampon. Ce phénomène a été attribué au fait que l'augmentation de la densité de charge à des concentrations élevées de tampon conduit à des forces de répulsion qui provoquent une dispersion plus abondante des ions. L'augmentation du diamètre du *spray* réduit la densité des ions en son centre et, par conséquent, moins d'ions arrivent jusqu'au détecteur, provoquant une diminution de la réponse. Ainsi, la diminution de la réponse indique une perte de l'efficacité de transfert des ions ou une perte de l'efficacité de désolvatation (ou les deux en même temps).

Mirza et Chait ont étudié les effets de différents additifs acides sur l'efficacité d'ionisation d'un peptide en mode ESI.[237] Trois solutions acidifiées (acides acétique, trifluoroacétique ou trichloroacétique) dans 50% de méthanol ont été testées à un pH ajusté à 2,2.

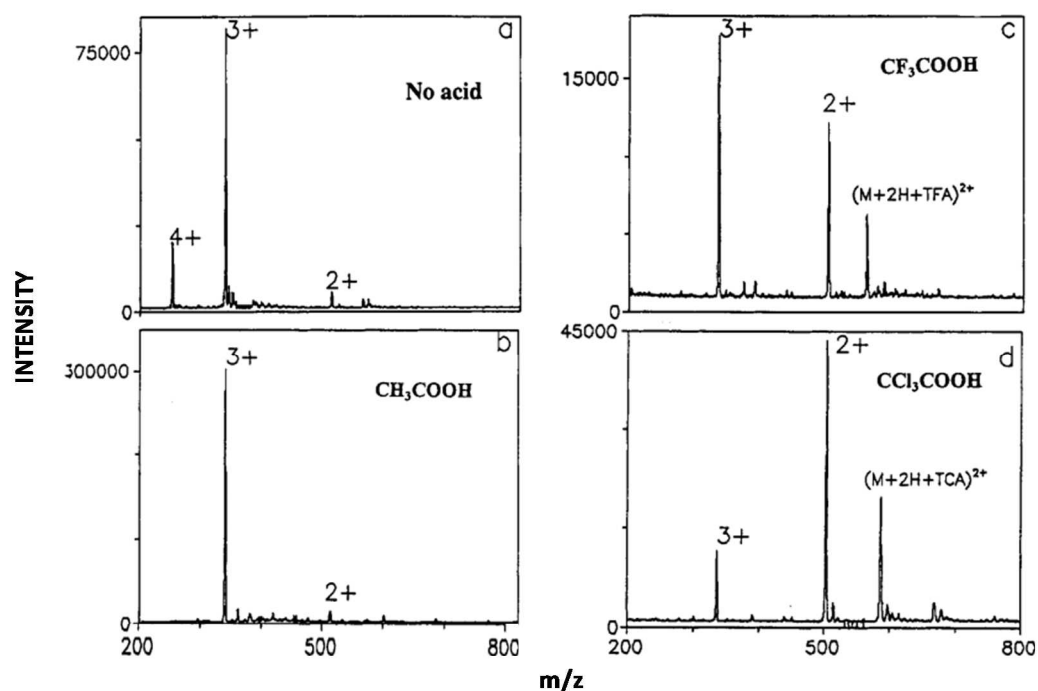


Figure II.2 : Effet des différents additifs acides sur la formation d'ions en ESI(+) [237]

La comparaison des spectres enregistrés a révélé que l'état de charge le plus élevé est obtenue à partir de la solution sans ajout d'acide (Figure II.2a), puis en présence de l'acide acétique (Figure II.2b), de l'acide trifluoroacétique (Figure II.2c) et trichloroacétique (Figure II.2d). Les pics supplémentaires dans la Figure II.2c et II.2d proviennent de la fixation des anions carboxylates sur le peptide. Ces données indiquent que les changements de l'état de charge de l'ion sont principalement le résultat de changement dans les principales espèces anioniques présentes dans les différentes solutions. Dans la même étude, les auteurs ont montré que lors de l'addition de sel de sodium (pH 6,3) aux acides correspondants (CH_3COONa , CF_3COONa et CCl_3COONa), la réponse ESI diminue également. La diminution de la réponse en ESI s'est révélée être dépendante uniquement de la basicité de l'espèce anionique et indépendante de la source d'anion (le sel ou l'acide).

Voyksner *et al.* ont étudié l'influence du pK_a de l'analyte et le transfert de protons en phase gazeuse en ESI sur la sensibilité d'ionisation des nucléotides et nucléosides.[238] En particulier, les auteurs ont étudié l'influence de l'acétate d'ammonium et de la tripropylamine sur l'intensité du signal des ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la thymine, la guanine et l'adénine. Ils ont observé la même chose que Tang et Kebarle, c'est-à-dire qu'avec l'augmentation de la concentration d'acétate d'ammonium, l'intensité des ions moléculaires protonés $[\text{M} + \text{H}]^+$ présente une

décroissance linéaire. Pour les composés ayant un $pK_a < 3$, l'addition de l'acétate d'ammonium (0,5 mM) peut favoriser les réactions de transfert de protons en phase gazeuse et augmenter l'intensité des ions $[M + H]^+$. D'autres auteurs ont observé le même effet de diminution de l'intensité et l'influence de la distribution de l'état de charge avec l'augmentation de la concentration d'additifs.[239, 240]

Les œstrogènes ne sont pas chargés dans des solutions aqueuses à proximité du pH neutre en raison de leur pK_a élevé et de leur pK_b faible. Cole et Rannulu ont effectué une étude sur différents anions et leurs capacités à former des adduits ioniques avec les stéroïdes contenant deux groupes fonctionnels afin d'améliorer la réponse en ESI(-)-MS/MS (*Tableau II.2*).[241] Le 17β -E₂ est faiblement ionisé en ESI-MS en mode négatif, induisant une faible abondance des ions pseudo-moléculaires $[M - H]^-$. Comme 17β -E₂ possède un hydrogène phénolique, il peut avoir une acidité élevée par rapport à d'autres stéroïdes. L'ajout d'acétate d'ammonium ou de fluorure d'ammonium génère facilement des ions $[M+A]^-$, permet d'augmenter le taux d'ionisation du 17β -E₂ et produit des spectres riches en ions fragments en MS/MS.[241]

Tableau II.2 : Intensité des signaux des stéroïdes comportant des adduits avec les anions inorganiques $[M+A]^-$ et des ions moléculaires $[M-H]^-$, selon Cole et Rannulu.[241]

Steroid	F ⁻		HCO ₃ ⁻		CH ₃ COO ⁻		Cl ⁻	
	GB* = 1530 ^{54,56}		GB = 1458 ⁵⁷		GB = 1429 ^{54,55}		GB = 1373 ⁵⁵	
	$[M-H]^-$ ^b	$[M+A]^-$ ^c	$[M-H]^-$ ^b	$[M+A]^-$ ^c	$[M-H]^-$ ^b	$[M+A]^-$ ^c	$[M-H]^-$ ^b	$[M+A]^-$ ^c
5 α -pregnane	+++	+++	+++	+++	+	+++	nd	++++
Estradiol	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Progesterone	+++	++++	++	+++	++	+++	nd	+++
Lupeol	+++	++++	++	+++	++	+++	nd	+++
Pregnenolone	++++	++++	+++	+++	+++	+++	nd	++++
Pregnenolone acetate	+++	++++	+++	+++	+++	++++	nd	+++

* Valeurs de la basicité en phase gazeuse (GB) des bases conjuguées donnés en kJ/mol

^a Sels d'ammonium sont utilisés comme source d'anions

^b Intensité du pic [stéroïde-H]⁻

^c Intensité du pic [stéroïde+anion]⁻

⁺ Intensité absolue > 10⁵, ⁺⁺ intensité absolue > 10⁶, ⁺⁺⁺ intensité absolue > 10⁷, ⁺⁺⁺⁺ intensité absolue > 10⁸, nd = non-détecté

Sur la base des publications citées plus haut [237, 241], nous avons décidé d'étudier les effets de divers additifs de la phase mobile sur le taux d'ionisation des œstrogènes dans la source ESI. A cette fin, une solution de 100 fmoles. μ L⁻¹ de 17β -E₂ dans un mélange acétonitrile : eau (80/20, v/v) a été utilisée avec un ajout de divers additifs à différentes concentrations. Les additifs sont l'acétate d'ammonium (CH₃COONH₄), le fluorure d'ammonium (NH₄F), le chlorure d'ammonium (NH₄Cl), le formiate d'ammonium (HCOONH₄), la triéthylamine (TEA, (C₂H₅)₃N), l'acide formique (HCOOH) et l'acétate de lithium (CH₃COOLi), à des concentrations de 0,1, 0,5 et 1%. L'analyse a été effectuée par infusion directe dans la source ESI dans les modes d'ionisation positive et négative. Les intensités observées sont illustrées sur les *Figures II.3* et *II.4*.

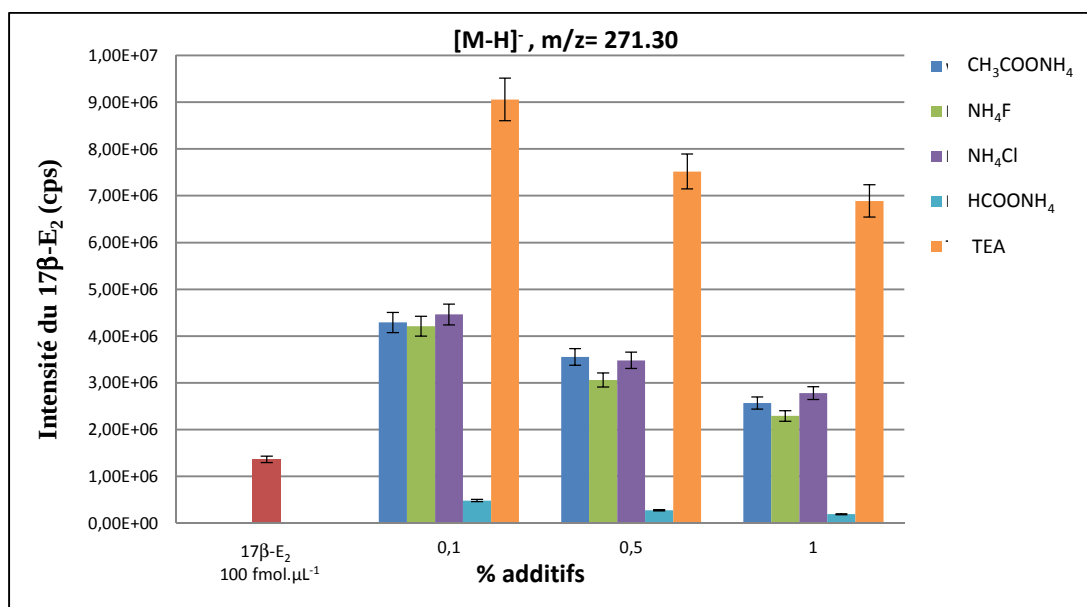


Figure II.3 : Signal du 17β-E₂ en fonction de l'additif dans la phase mobile lors de l'infusion d'une solution à 100 fmoles.μL⁻¹, en ESI(-)-MS ; L'ajout de HCOOH et CH₃COOLi n'ont pas d'influence sur l'intensité du signal.

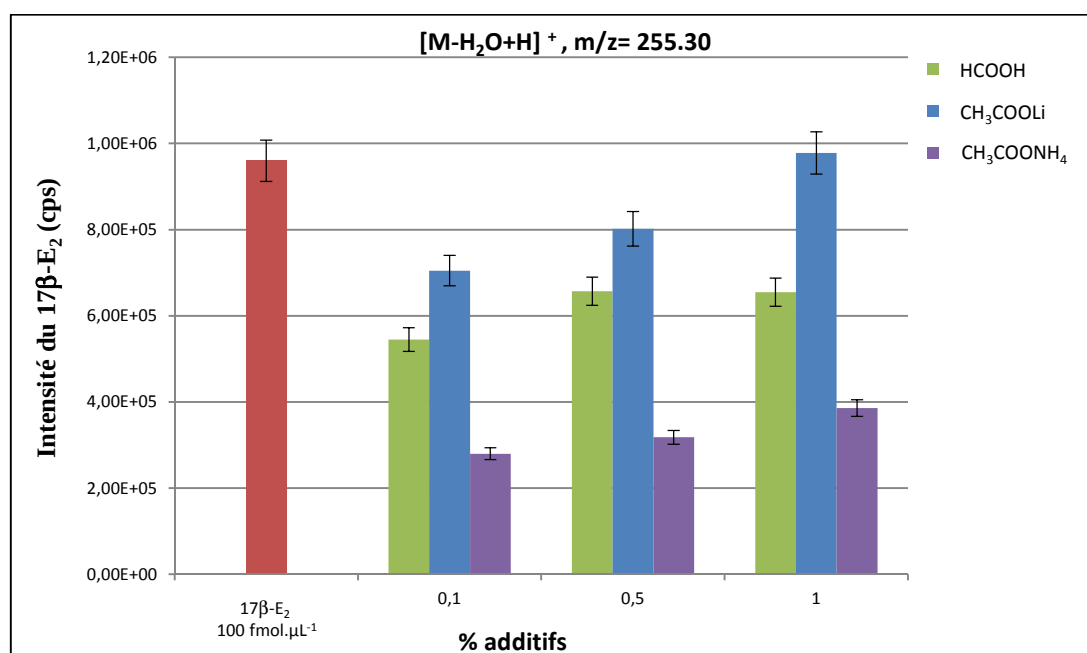


Figure II.4 : Signal du 17β-E₂ en fonction de l'additif dans la phase mobile lors de l'infusion d'une solution à 100 fmoles.μL⁻¹, en ESI(+)-MS ; L'ajout des sels d'ammonium et de la TEA n'ont pas d'influence sur l'intensité du signal.

La variation de l'intensité observée souligne l'influence significative de la composition de la phase mobile sur l'ionisation du 17β-E₂. Nous avons observé en ESI(-) le même effet que les auteurs cités précédemment : avec l'augmentation de la concentration de TEA, CH₃COONH₄, NH₄F et NH₄Cl, l'intensité des ions moléculaires déprotonés [M-H]⁻ présente une décroissance linéaire. La même tendance a été observée pour le formiate d'ammonium, mais l'ajout de cet additif ne permet pas d'augmenter le signal du 17β-E₂. La phase mobile avec

0,1% de TEA augmente d'un facteur six le taux d'ionisation du 17 β -E₂ par rapport au 17 β -E₂ sans ajout d'additif. En analysant les pH des solutions, le pK_a de l'analyte (*Tableau II.1*) et les pK_a des additifs testés (*Tableau II.3*), on peut expliquer ce résultat par le fait que le pK_a de la TEA (10,72) est proche du pK_a du 17 β -E₂ (10,71). L'intensité du signal est maximale dans le cas où le pH de la solution est le plus proche du pK_a (à 0,1% TEA, pH = 11,2). En raison de leur pK_a élevé, les œstrogènes ne sont pas chargés dans des solutions aqueuses à proximité du pH neutre. Or, les solutions d'autres additifs ont un pH compris entre 6,2 et 8, ce qui explique une augmentation modérée du signal.

Tableau II.3 : Propriétés physico-chimiques des additifs

Additif (A)	Formule moléculaire	Masse molaire, g/mol	Propriétés physico-chimiques			
			% A dans 80% ACN	pH	pK _a	Solubilité
Acétate d'ammonium	CH ₃ COONH ₄	77,08	0,1	8	4,76 pK _{a1} 9,2 pK _{a2}	eau et solvants organiques
			0,5	7,3		
			1	6,8		
Fluorure d'ammonium	NH ₄ F	37,04	0,01	6,6	9,2 pK _{a1} 10,8 pK _{a2}	eau et peu dans solvants organiques
			0,05	6,5		
			0,1	6,4		
			0,5	6,3		
			1	6,2		
Chlorure d'ammonium	NH ₄ Cl	53,49	0,1	6,5	9,24	eau et alcool
			0,5	6,4		
			1	6,3		
Formiate d'ammonium	HCOONH ₄	63,06	0,1	6,4	3,8 pK _{a1} 9,2 pK _{a2}	Solvants organiques et eau
			0,5	6,3		
			1	6,2		
Triéthylamine (TEA)	(C ₂ H ₅) ₃ N	101,19	0,01	10,6	10,72	Solvants organiques et eau
			0,05	11,0		
			0,1	11,2		
			0,5	11,6		
			1	11,9		
Acide formique	HCOOH	46,03	0,1	2,6	3,8	Solvants organiques et eau
			0,5	2,2		
			1	2		
Acétate de lithium	CH ₃ COOLi	65,98	0,1	6,2	4,8	eau et alcool
			0,5	6,4		
			1	6,5		

* Valeurs de pK_a d'après [242]

En ESI(+), on observe une légère tendance de croissance de l'intensité du signal avec l'augmentation de la concentration d'acétate d'ammonium et d'acétate de lithium dans la phase mobile (*Figure II.4*), tandis que le signal obtenu avec de l'acide formique reste assez stable et

n'améliore pas le signal du 17 β -E₂ obtenu sans ajout d'additif (cela peut être expliqué par le fait que le 17 β -E₂ n'est pas chargé dans des solutions aux pH neutre et acide).

En ESI(-), notamment pour la TEA, il est intéressant de voir si la diminution de la concentration d'additif augmente ou diminue le taux d'ionisation du 17 β -E₂. En comparaison, un des sels d'ammonium, le NH₄F, a été également évalué. Une solution de 100 fmoles. μ L⁻¹ de 17 β -E₂ a été infusée dans l'acétonitrile : eau (80/20, v/v) avec l'ajout de différentes concentrations de ces deux additifs (0,01, 0,05, 0,1, 0,5 et 1%).

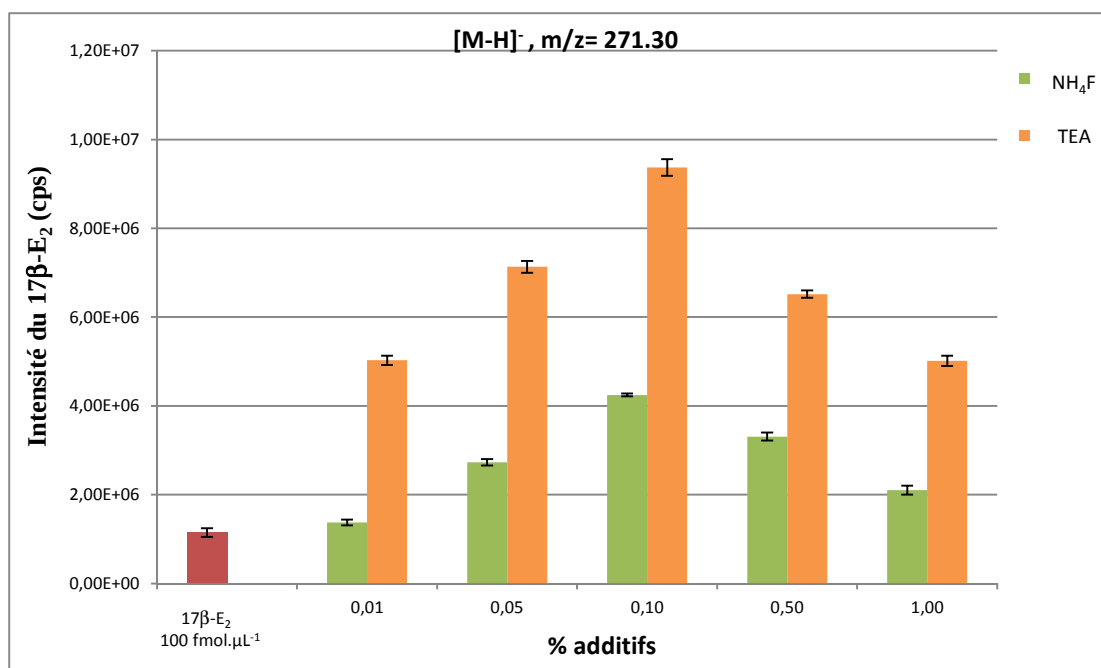


Figure II.5 : Signal ESI(-)-MS du 17 β -E₂ en fonction de la nature d'additif, TEA ou NH₄F, ajouté dans la phase mobile lors de l'infusion d'une solution à 100 fmoles. μ L⁻¹.

La Figure II.5 montre que l'intensité d'ion déprotonés [M-H]⁻ augmente légèrement jusqu'à la concentration des additifs égale à 0,1%, puis une décroissance linéaire a été observée. L'intensité du signal du 17 β -E₂ est maximale dans le cas où le pH de la solution est égal à 11,2.

En conclusion, le meilleur taux d'ionisation du 17 β -E₂ est obtenu avec 0,1% TEA, cet additif a été choisi pour le développement de la méthode LC-MS/MS en mode négatif.

II.2.2 Détermination des ions précurseurs et des ions fragments

Le choix des transitions entre ions précurseurs et ions fragments est déterminant pour la suite des études car il affecte à la fois la qualité de l'analyse, notamment la sensibilité, mais aussi la fiabilité des résultats. La détermination des ions précurseurs se fait par infusion directe dans la source ESI via un pousse-seringue, d'une solution du mélange de 17 β -E₂, 17 α -E₂, E₁ et E₃ à 100 fmoles. μ L⁻¹ (débit de 7 μ L.min⁻¹) pour permettre un dosage de ces quatre œstrogènes

dans la suite de notre étude, même si le 17β -E₂ est l'espèce qui nous intéresse le plus dans un premier temps.

En mode positif, les 17β -E₂, 17α -E₂, E₁ et E₃ donnent des signaux correspondant à un ion précurseur sous forme protonée $[M+H]^+$ et à un ion qui a perdu une molécule d'eau $[M+H-H_2O]^+$ (*Figure II.6*). En mode négatif, le signal correspond à un ion précurseur sous forme déprotonée $[M-H]^-$ (*Figure II.8*). Les ions fragments issus de ces ions pseudo-moléculaires et les paramètres instrumentaux permettant la MRM sont répertoriés dans le *Tableau II.4*. Comme l'isomère 17α -E₂ donne le même ion pseudo-moléculaire et les mêmes ions de fragmentation que le 17β -E₂, ses spectres ESI-MS et ESI-MS/MS ne seront pas présentés.

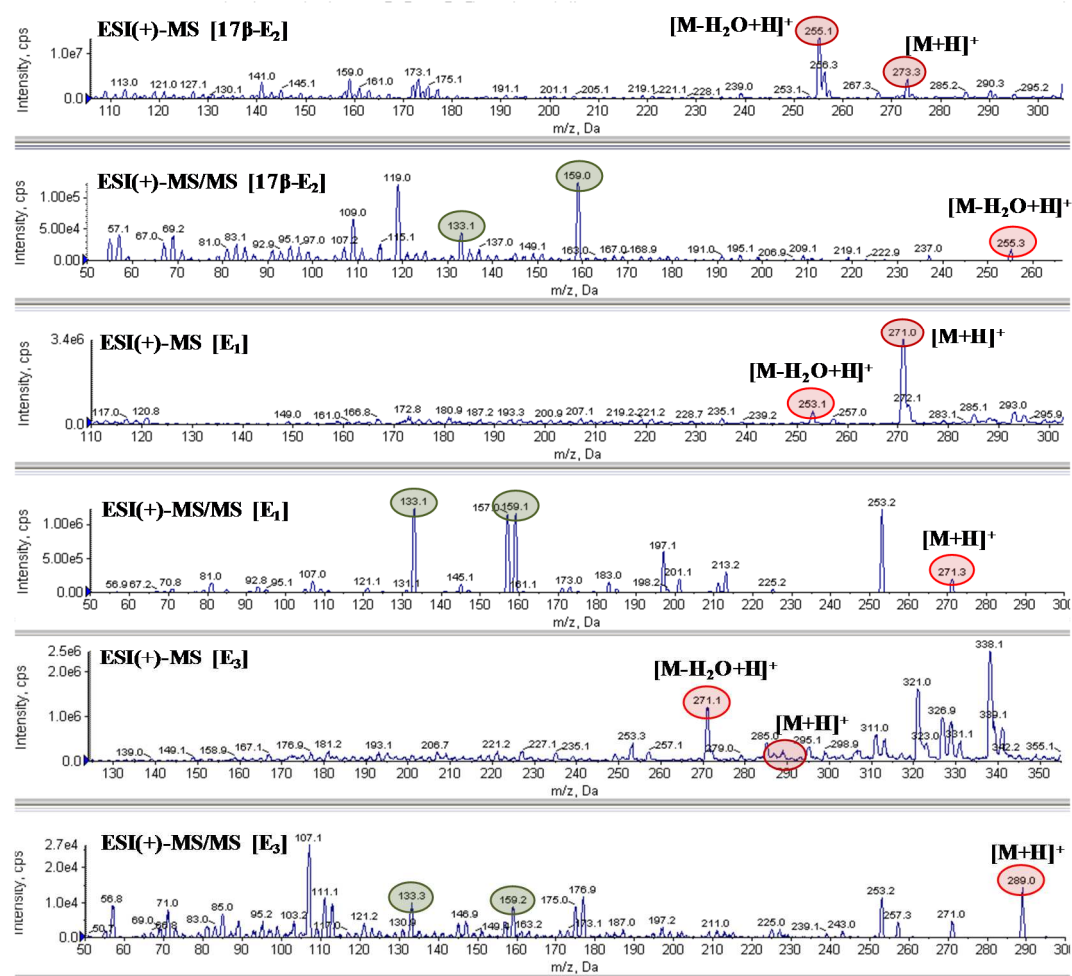


Figure II.6 : Les spectres ESI(+)-MS et MS/MS des œstrogènes 17β-E₂, E₁ et E₃

En mode positif, la dissociation induite par collision (CID) de l'ion $[M+H]^+$ du 17β -E₂ conduit à un ion fragment abondant à m/z 159 et un fragment moins abondant à m/z 133. Pour les standards internes, ces ions se retrouvent à : m/z 135 et 161 pour 17β -E₂-d₂, m/z 138 et 164 pour 17β -E₂-d₅ et m/z 136 et 162 pour 17β -E₂-¹³C₃. Comme le montre la *Figure II.6*, ces ions fragments sont communs à tous les œstrogènes étudiés. Dans la voie de dissociation du 17β -E₂, une perte d'eau (m/z 255), résultat de la protonation sur le groupe hydroxyle de la position C₁₇, a été observée (*Figure II.7*).

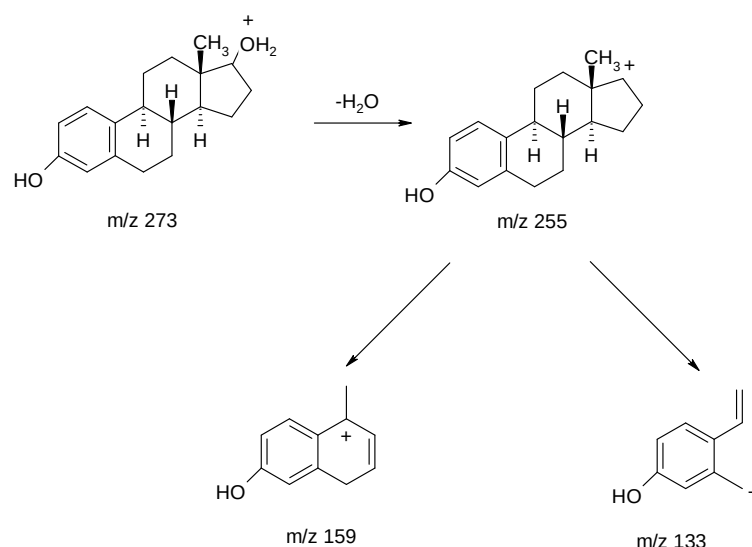
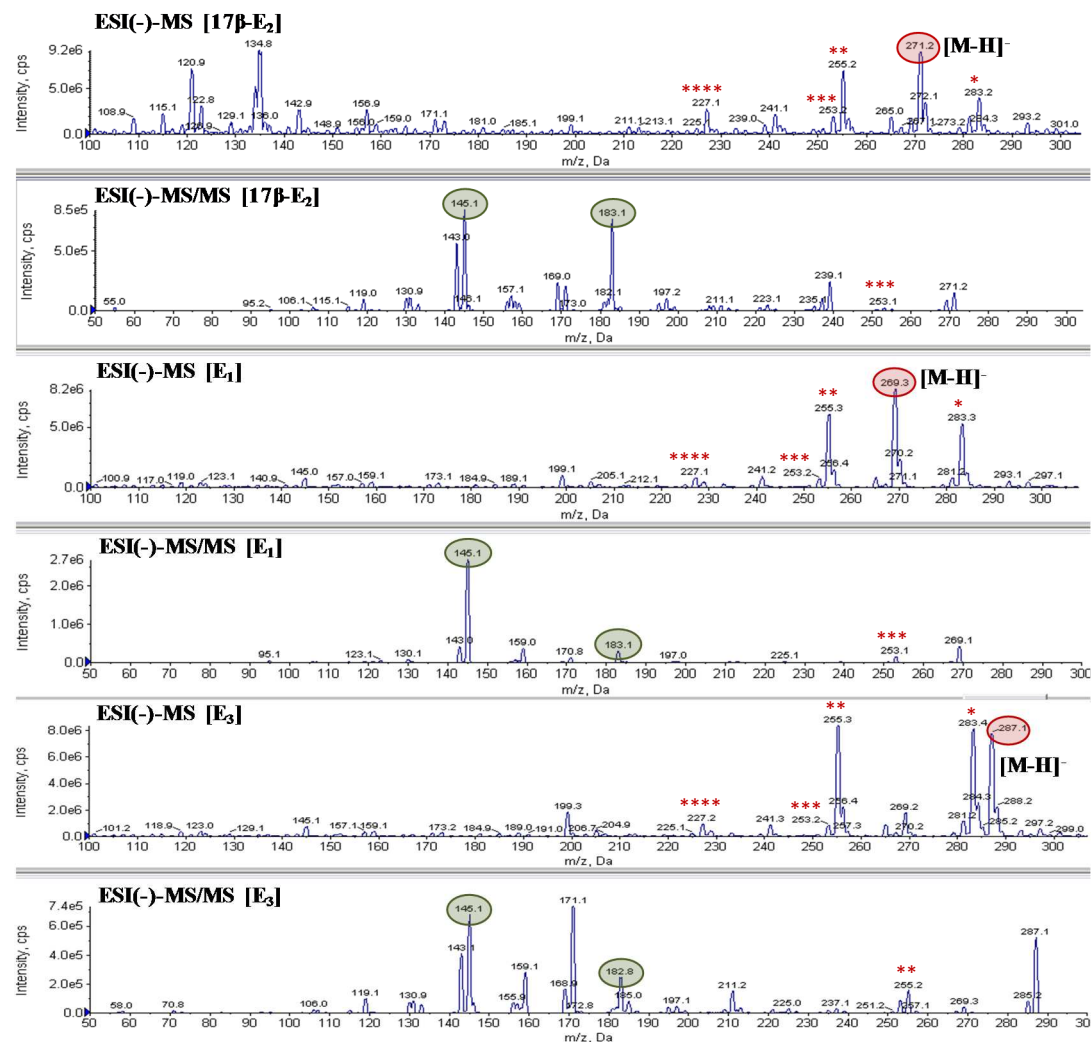


Figure II.7 : Fragmentation de la molécule protonée $[M+H]^+$ du 17β -E₂

La formation de l'ion à m/z 159 à partir de m/z 255 correspond à une perte de C₇H₁₀. L'ion à m/z 133 se formerait par élimination d'acétylène à partir de l'ion à m/z 159. Il ne s'agit que d'hypothèses ; aucune description dans la littérature n'a été trouvée à l'appui de ce schéma.



* m/z 283 – acide stéarique ; ** m/z 255 – acide palmitique ; *** Contamination de la source ; **** m/z 227 – acide myristique

Figure II.8 : Les spectres ESI(-)-MS et MS/MS des œstrogènes 17β-E₂, E₁ et E₃

En mode négatif, la CID sur l'ion $[M-H]^-$ du 17β -E₂ conduit à un ion fragment abondant à m/z 145 et à deux autres ions fragments moins abondants à m/z 143 et 183 (respectivement décalés à m/z 146, 148 et 186 pour 17β -E₂-¹³C₃) (Figure II.9). Ces ions fragments sont communs à tous les œstrogènes étudiés (voir Tableau II.4).

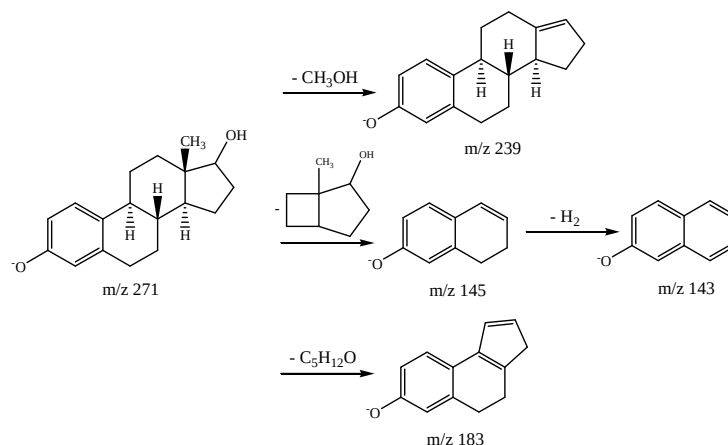


Figure II.9 : Fragmentation de la molécule déprotonée $[M-H]^-$ du 17β -E₂ proposée par Sun *et al.*[243]

La formation de ces ions fragments est induite par l'hétérocyclisation, combinée avec une perte de H₂. L'ensemble de ces ions est stabilisé par des doubles liaisons conjuguées et un cycle aromatique.

Tableau II.4 : Les ions précurseurs, les ions fragments correspondants aux œstrogènes et les paramètres instrumentaux utilisés en MRM

Composés	Mode d'ionisation	Ion précurseur (m/z)	Transition MRM (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
17β -E ₂	ESI(+)	255,30 $[M+H-H_2O]^+$	133,00 159,10	76 76	25 25	10 10
	ESI(-)	271,30 $[M-H]^-$	145,10 183,10	-190 -190	-55 -55	-15 -15
17α -E ₂	ESI(-)	271,30 $[M-H]^-$	145,10 183,10	-190 -190	-55 -55	-15 -15
E ₁	ESI(-)	269,30 $[M-H]^-$	143,00 145,00	-160 -160	-70 -70	-10 -10
E ₃	ESI(-)	287,30 $[M-H]^-$	143,00 145,00	-190 -190	-70 -55	-10 -10
17β -E ₂ - ¹³ C ₃	ESI(+)	258,1 $[M+H-H_2O]^+$	136,00	76	25	10

			162,10	76	25	10
	ESI(-)	274,3 [M-H] ⁻	146,00 148,00 186,10	-170 -170 -170	-50 -50 -50	-10 -10 -10
17β-E ₂ -d ₅	ESI(+)	260,10 [M+H-H ₂ O] ⁺	138,10 164,10	75 75	30 30	10 10
	ESI(-)	276,30 [M-H] ⁻	145,10 147,10 187,20	- 150 - 150 - 150	-55 -55 -55	-15 -15 -15
17β-E ₂ -d ₂	ESI(+)	257,20 [M+H-H ₂ O] ⁺	135,10 161,10	76 76	25 25	10 10
	ESI(-)	273,30 [M-H] ⁻	145,00 147,00 185,10	-155 -155 -155	-55 -55 -55	-15 -15 -15
E ₁ - ¹³ C ₃	ESI(-)	272,30 [M+H] ⁺	146,10 148,10	-160 -160	-71 -53	-10 -10

Les ions fragments les plus abondants sont les ions primaires, et la transition « ion précurseur → ion primaire » est utilisée lors de la quantification. Les ions secondaires, moins abondants, permettent de définir une transition de validation.

II.3 MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE PAR LC-MS/MS

Les additifs qui ont donné les meilleurs résultats en ESI(-)MS (0,1% de TEA, CH₃COONH₄, NH₄F et NH₄Cl), et ESI(+)MS (0,1% HCOOH et CH₃COOLi), ont été testés en chromatographie liquide à polarité de phase inversée, pour évaluer la sensibilité de détection MS/MS après le couplage avec la LC-MS. Trois types de colonne en phase-inverse ont été testées : Gemini C6 Phenyl (50 × 1,00 mm d.i., 3 µm, Phenomenex), Gemini C18 (100 × 1,00 mm d.i., 3 µm, Phenomenex) et Luna Phenyl-Hexyl (150 × 1,00 mm d.i., 3 µm, Phenomenex). Après avoir fait le choix de la colonne chromatographique et de la composition de la phase mobiles sur une solution de 17β-E₂, l'étude a été poursuivie par l'élaboration d'une méthode de séparation en HPLC-ESI-MS/MS commune pour tous les œstrogènes.

II.3.1 Conditions analytiques

Les analyses ont été réalisées en appliquant les conditions opératoires mentionnées dans le *Tableau II.5* (pour le mode positif) et le *Tableau II.6* (pour le mode négatif) pour des paramètres fixes du spectromètre de masse (paramètres instrumentaux en MRM rapportés dans le *Tableau II.4*).

Tableau II.5 : Paramètres instrumentaux en ESI(+)-MS/MS

Phase mobile	H ₂ O et Acétonitrile, acidifiés à 0,1 % d'acide formique
Débit de phase mobile	50 µL.min ⁻¹
Source d'ionisation	ESI
Tension	5500 V
Gaz séchant	25 u.a.
Gaz auxiliaire	20 u.a.
Température Capillaire	100°C
Pression du gaz de collision	Medium

u.a.: unité arbitraire

Tableau II.6 : Paramètres instrumentaux en ESI(-)-MS/MS

Phase mobile	H ₂ O et Acétonitrile, avec 0,1 % de TEA
Débit de phase mobile	50 µL.min ⁻¹
Source d'ionisation	ESI
Tension	-4500 V
Gaz séchant	25 u.a.
Gaz auxiliaire	20 u.a.
Température Capillaire	100°C
Pression du gaz de collision	Medium

u.a.: unité arbitraire

Les premières analyses ont été effectuées avec une solution standard du 17 β -E₂ (avec la même concentration qu'en infusion, soit 100 fmoles. μ L⁻¹). Le volume injecté est de 3 μ L. Le gradient d'élution qui a été retenu dans cette étude est détaillé dans le *Tableau II.7*.

Tableau II.7 : Gradient d'élution appliqué lors de l'analyse du 17 β -E₂ par HPLC-ESI-MS/MS

Colonne analytique	Phase mobile	Gradient d'élution	
		Temps (min)	%B
Gemini C6 Phenyl (50 $\times$ 1,00 mm d.i., 3 μ m)	Eluant A : 0.1% X dans H ₂ O	0	35
		0	35
		3	35
		9	50
		15	60
Gemini C18 (100 $\times$ 1,00 mm d.i., 3 μ m)	Eluant B : 0.1% X dans Acétonitrile	17	100
		19	100
		20	35
		30	35
Luna Phenyl-Hexyl (150 $\times$ 1.0 mm d.i., 3 μ m)			
X-additive			

L'analyse dure vingt minutes, suivie par une mise à l'équilibre de la colonne analytique d'une durée de dix minutes. Celle-ci est nécessaire pour revenir aux conditions initiales d'analyse et reste indispensable pour une bonne reproductibilité des résultats.

Les conditions chromatographiques sont représentées dans le *Tableau II.8*: la colonne et le temps de rétention (t_r), dépendant du type d'additif. En mode négatif, le t_r du 17 β -E₂ n'est pas influencé par la nature des additifs (t_r =8,00 min dans le cas de la colonne Gemini C18 et t_r =3,31 min pour la colonne Gemini Phenyl). Par contre, l'utilisation de la TEA comme additif dans la phase mobile diminue le temps de rétention du 17 β -E₂ : t_r =6,00 min pour la colonne Gemini C18 et t_r =2,28 min pour la Gemini Phenyl. En mode positif, le même temps de rétention (t_r =13.67 min) a été observé pour le 17 β -E₂ avec la colonne Phenyl-Hexyl quelque soit l'additif : acide formique ou acétate de lithium.

En conclusion, en HPLC-ESI(-)-MS/MS, les meilleurs rapports signal sur bruit (S/N) ont été obtenus avec la colonne Gemini C18 et avec la TEA dans la phase mobile, mais également avec la colonne Gemini Phenyl et avec le NH₄F dans la phase mobile. En HPLC-ESI(+)-MS/MS, les meilleures conditions sont obtenues avec la colonne Phenyl-Hexyl et avec un ajout de HCOOH dans la phase mobile. Pour ces trois conditions chromatographiques, des courbes d'étalonnage ont été établies.

II.3.2 Principe des courbes d'étalonnage en HPLC-MS/MS

Une courbe d'étalonnage en LC-MS/MS s'effectue en injectant plusieurs solutions contenant la molécule étudiée à une concentration variable et un étalon interne (souvent nommé *Homologue marqué* ou *SI*) à une concentration fixe. L'étalon interne à concentration fixe, qui est de manière idéale la molécule d'intérêt marquée au Deutérium ou au Carbone 13, permet de corriger la perte de substance à analyser au cours de l'analyse. En général, en chimie analytique, le modèle d'étalonnage recherché est linéaire. Une étude de linéarité vérifie que les solutions d'échantillon sont dans un intervalle de concentrations d'analyte où la réponse est linéairement proportionnelle à la concentration. Pour les méthodes de dosage, cette étude est généralement réalisée en préparant des solutions standards à cinq niveaux de concentration. Les normes sont évaluées en utilisant les conditions chromatographiques déterminées au cours des études de la spécificité. Les standards doivent être préparés et analysés au moins trois fois. Dans la procédure finale, une gamme plus étroite et une concentration de l'étalon unique sont généralement utilisées.

L'acceptabilité des données de linéarité est souvent jugée en examinant le coefficient de corrélation, qui est un indice statistique permettant d'expliquer le sens (positif ou négatif) de la relation linéaire entre deux variables quantitatives. La valeur du coefficient de corrélation de 0,999 est généralement considérée comme une preuve d'acceptabilité pour la droite de régression. Cependant, il est nécessaire d'utiliser d'autres indicateurs ou tests statistiques pour valider le modèle d'étalonnage.

II.3.3 Gamme d'étalonnage sur la solution standard du 17 β -E₂

Le modèle d'étalonnage a été étudié sur une gamme de huit concentrations du 17 β -E₂, comprises entre 0,5 et 100 fmoles. μ L⁻¹ (0,5 / 1,0 / 2,5 / 5,0 / 10,0 / 25,0 / 50,0 / 100,0), pour l'HPLC-ESI(-)-MS/MS. Pour l'HPLC-ESI(+)-MS/MS, la gamme était comprise entre 10 et 3000 fmoles. μ L⁻¹ (10 / 25 / 50 / 100 / 500 / 1000 / 2000 / 3000). Quelle que soit la solution d'étalon considérée, la concentration de la molécule marquée 17 β -E₂-¹³C₃ est fixée à 100 fmoles. μ L⁻¹. Les graphes d'étalonnage pour l'HPLC-ESI(-)-MS/MS avec 0,1% de TEA dans la phase mobile et avec la colonne RP Gemini C18, ainsi que 0,1% NH₄F et la colonne RP Gemini Phenyl sont représentés dans la *Figure II.10*. Le graphe d'étalonnage pour l'HPLC-ESI(+)-MS/MS avec 0,1% de HCOOH dans la phase mobile et la colonne RP Phenyl-Hexyl est montré dans la *Figure II.11*.

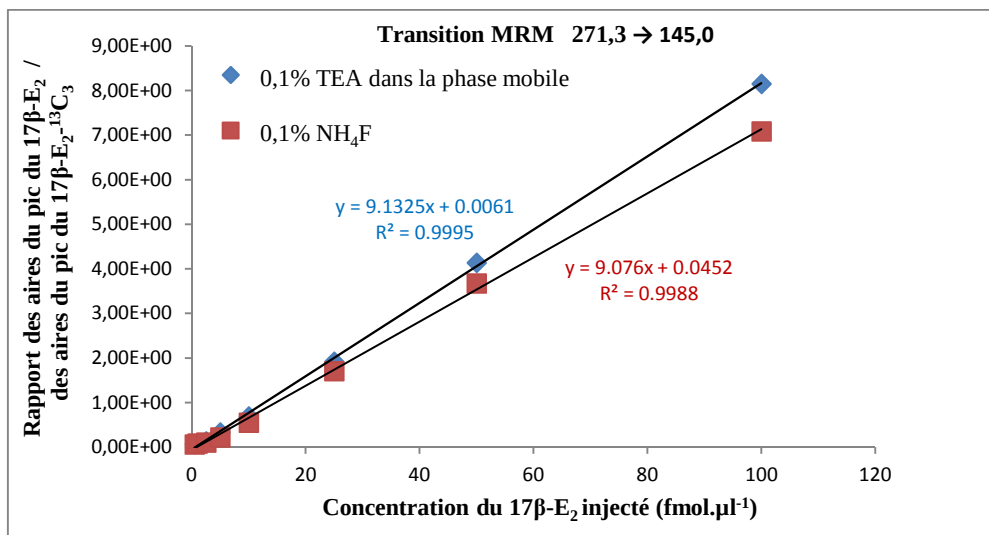


Figure II.10 : Rapport des intensités du 17β-E₂ et du 17β-E₂-¹³C₃ en fonction de la concentration du 17β-E₂ injecté, en HPLC- ESI(-)-MS/MS, n = 3

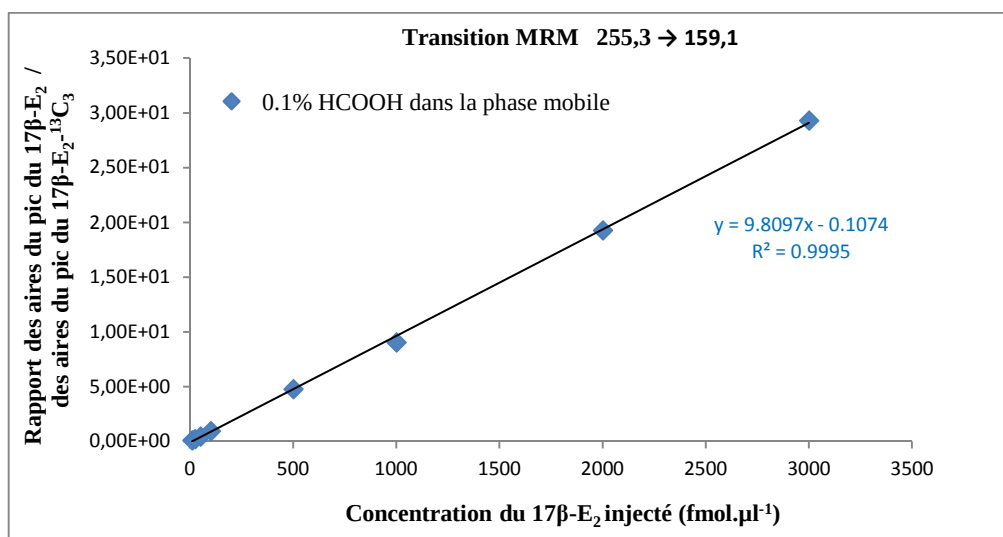


Figure II.11 : Rapport des intensités du 17β-E₂ et du 17β-E₂-¹³C₃ en fonction de la concentration du 17β-E₂ injecté, en HPLC- ESI(+)-MS/MS, n = 3

Les modèles d'étalonnage ont été caractérisés par l'équation de la régression linéaire et le coefficient de corrélation, qui sont présentés dans le *Tableau II.8*. Concernant la sensibilité de la méthode, la méthode avec la phase mobile contenant la TEA et la colonne Gemini C18 donne le meilleur résultat avec une LOD de 2.5 fmoles.μL⁻¹ et une LOQ de 10 fmol.μL⁻¹. Par la suite, ces conditions chromatographiques ont été utilisées pour optimiser certains paramètres en HPLC-ESI(-)-MS/MS.

Tableau II.8 : Conditions chromatographiques et les paramètres de validation du modèle d'étalonnage du 17 β -E₂

* le temps de rétention pour 0.1% d'additif - CH₃COONH₄, NH₄F, NH₄Cl, HCOOH, et CH₃COOLi

Mode	Transition MRM (m/z)	Colonnes RPLC	t _r *	t _r **	Le modèle d'étalonnage pour la solution standard du 17 β -E ₂			
					Équation de la régression linéaire	Coefficient de corrélation (R ²)	LOD (fmoles.µL ⁻¹)	LOQ (fmoles.µL ⁻¹)
ESI(-) 271,3 →	145.10 183.10	C18	8.00	6.9	y = 9.1325x + 0.0061	0,9995	2.5 (TEA)	10
		Phenyl	3.31	2.28	y = 9.076x + 0.0452	0.9988	5 (NH ₄ F)	25
ESI(+) 255,3 →	159.10 133.10	Phenyl-Hexyl	13.67		y = 9.8097x - 0.1074	0.9995	10(HCOOH)	50

** temps de rétention pour 0.1% TEA

II.3.4 Etude de l'influence des paramètres en HPLC-ESI(-)MS/MS sur la réponse du 17 β -E₂ : le volume d'échantillon injecté et le «Dwell time»

Au cours du développement de la méthode d'analyse en HPLC-ESI-MS/MS, l'influence du volume d'échantillon injecté et du temps dévolu à la mesure de chaque transition de MRM (*dwell time*, *T*) sur la réponse du 17 β -E₂ a été étudiée (le terme *dwell time* sera utilisé par la suite). Les tests ont été menés avec une solution à 100 fmoles. μ L⁻¹ dans CH₃OH : H₂O (50:50 v/v). L'évolution de la réponse du 17 β -E₂ en fonction du volume de l'échantillon injecté et de *T* est représentée dans la Figure II.12. La meilleure réponse est obtenue avec un volume d'injection de 20 μ L et un *T* de 600 millisecondes (en raison du diamètre intérieur des colonnes utilisées (1 mm), un volume d'injection supérieur à 20 μ L conduit à un élargissement de pic).

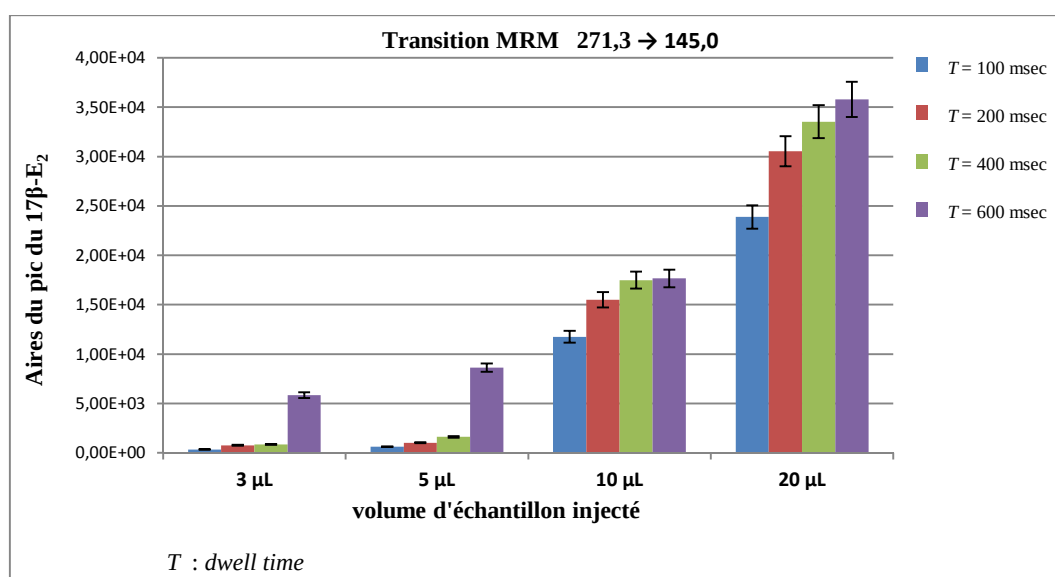


Figure II.12 : Réponse du 17 β -E₂ en fonction du volume injecté et du *T* en HPLC-ESI(-)MS/MS, concentration de 0,01 pmol. μ L⁻¹, n = 3.

HPLC-

Cependant, il faut souligner que le pic chromatographique doit représenter un nombre de points définissant le pic qui ne doit pas être inférieur à dix. Le pic n'est défini que par quatre points pour un *T* de 400 et 600 msec (Figures II.13C et II.13D), ce qui n'est pas admissible. Le pic est défini avec un peu plus de points (six) sur la Figure II.13B, avec un *T* de 200 msec. Le pic obtenu avec un *T* de 100 msec est le plus représentatif avec un nombre de treize points (Figure II.13A).

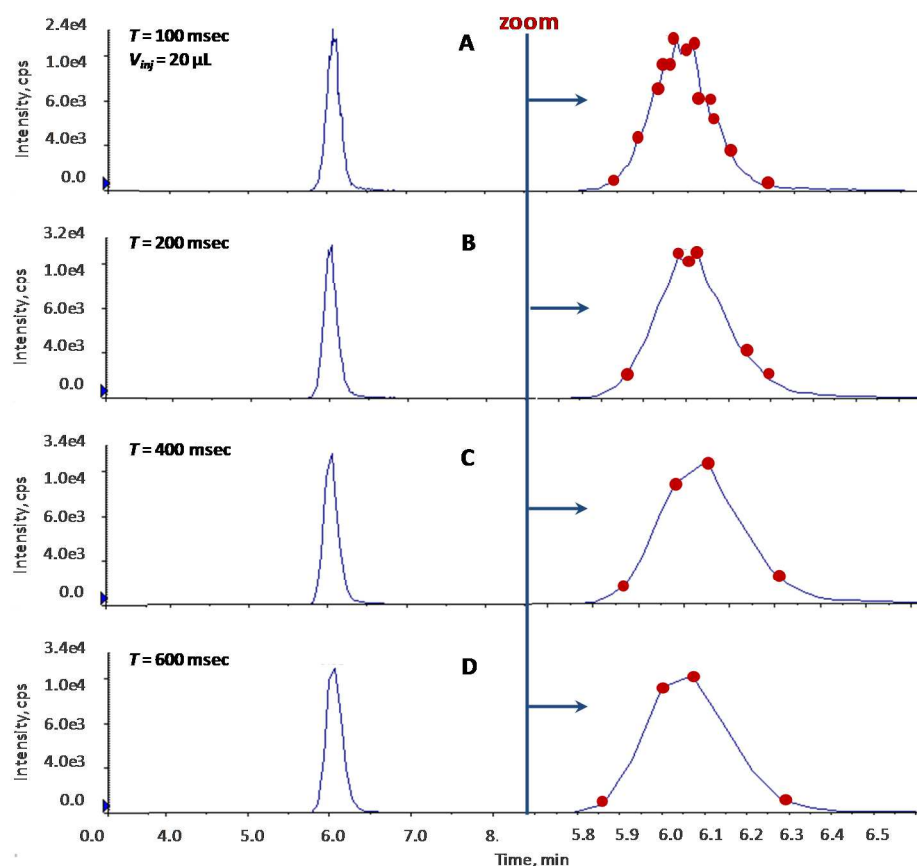


Figure II.13 : Chromatogrammes correspondants à la transition MRM 271,3 $\rightarrow$ 145,0 du 17 β -E₂ avec un volume d'injection constant V_{inj} de 20 μ L : **A** – T = 100 msec ; **B** – T = 200 msec ; **C** – T = 400 msec et **D** – T = 600 msec.

Pour le développement de la méthode en HPLC-ESI(-)-MS/MS commune à tous les œstrogènes et utilisée par la suite pour le dosage dans des échantillons biologiques, un volume d'injection de 20 μ L et un T de 100 msec ont été choisis.

II.3.5 Conditions analytiques et gamme d'étalonnage sur les solutions standards des œstrogènes

Les analyses ont été réalisées en appliquant les conditions chromatographiques et instrumentales mentionnées dans le *Tableau II.6* et les paramètres en MRM rapportés dans le *Tableau II.4*. Le gradient d'élution qui a été retenu pour cette méthode est détaillé dans le *Tableau II.7*. La séparation des œstrogènes en HPLC- ESI(-)-MS/MS est représentée dans la *Figure II.14*.

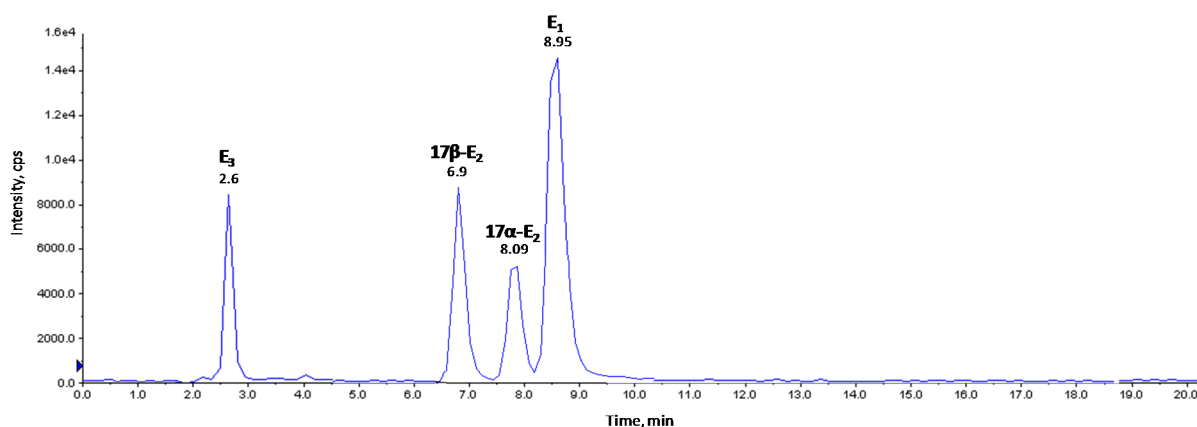


Figure II.14 : Chromatogramme obtenu par HPLC- ESI(-)-MS/MS avec une solution composée d'un mélange des œstrogènes à $1 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

Le modèle d'étalonnage a été étudié sur une gamme de neuf concentrations de quatre œstrogènes ($17\alpha\text{-E}_2$, $17\beta\text{-E}_2$, E_1 et E_3), comprises entre 0,01 et 5 $\text{fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (0,01 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1,0 / 2,5 / 5,0) en solution dans $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (60:40 v/v). Quelle que soit la solution d'étalon considérée, les concentrations des molécules marquées $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ et $\text{E}_1\text{-}^{13}\text{C}_3$ sont constantes et fixées à 6 $\text{fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (0,3 pmole). Les modèles d'étalonnage étaient établis en utilisant une phase mobile **A** constituée d'eau avec 0,1% de TEA et une phase mobile **B** constituée d'acétonitrile avec 0,1% de TEA. La colonne chromatographique retenue pour cette analyse était une Gemini C18.

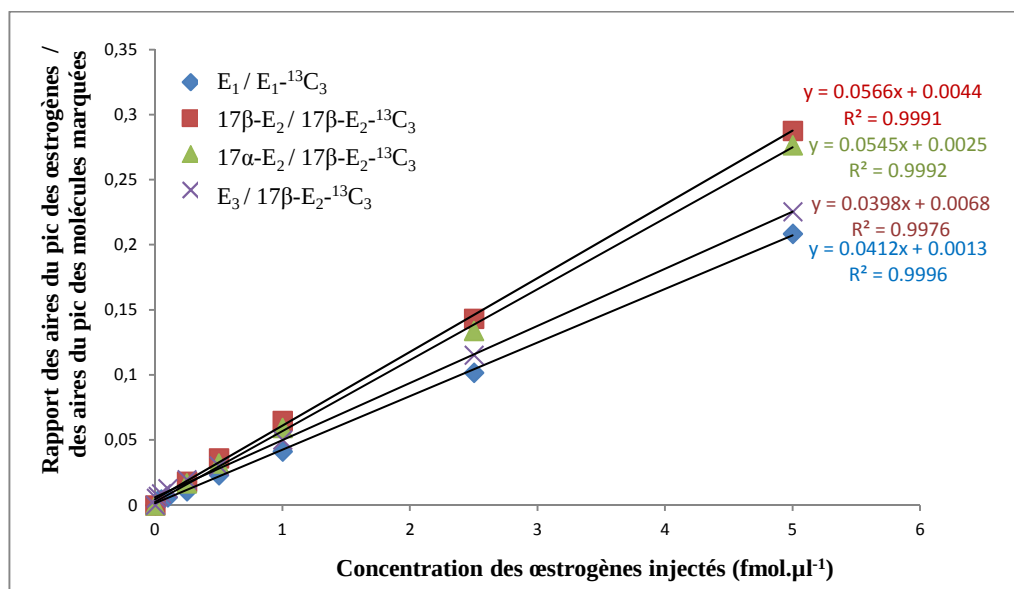


Figure II.15 : Rapport des intensités des œstrogènes et des molécules marquées en fonction de la concentration injectée en HPLC- ESI(-)MS/MS, $n = 3$

Les droites d'étalonnage obtenues en mode MRM ESI(-) correspondant au suivi des transitions ions précurseurs $\rightarrow$ ions de fragmentation pour chaque œstrogène sont présentées sur la Figure II.15. Visuellement, la droite passe au plus près des points expérimentaux. Les

valeurs des coefficients de corrélation sont très proches de 1. Afin de confirmer cette observation, des tests de validation du modèle d'étalonnage ont été effectués (voir paragraphe II.3.7).

II.3.6 Gamme d'étalonnage sur la matrice biologique

Le 17β -E₂ endogène étant présent dans les matrices biologiques, nous avons choisi d'emblée d'utiliser la méthode des ajouts dosés. Comme les œstrogènes ont des structures assez proches les uns des autres, on peut supposer qu'ils vont se comporter de la même façon dans les échantillons biologiques dans le cas d'ajouts dosés. Pour cette raison, le modèle d'étalonnage n'a été représenté que pour le 17β -E₂. Les droites d'étalonnage ont été préparées avec l'ajout dosé d'une gamme de concentration du 17β -E₂ dans deux cas d'échantillons biologiques, le plasma et le cerveau de souris placebo. Pour contrôler toutes les pertes qui ont lieu pendant les étapes de préparation des échantillons (ELL et SPE décrites dans le paragraphe 2.3), le 17β -E₂ et le 17β -E₂-¹³C₃ sont ajoutés dès le début des analyses. L'ajout dosé permet aussi d'estimer la sensibilité de la méthode analytique dans le cas des échantillons biologiques, d'estimer le taux de récupération et d'étudier l'effet matrice.

Le graphe d'étalonnage a été réalisé en utilisant les conditions analytiques indiquées dans la partie II.3.5. Les échantillons, 10 mg de cerveaux ou 100 μ L de plasma de souris mâle, ont été dopés avec une gamme de cinq concentrations comprises entre 0,5 et 10 fmoles. μ L⁻¹ (0,5 / 1,0 / 2,5 / 5,0 / 10,0). La concentration de la molécule marquée 17β -E₂-¹³C₃ était fixée à 6 fmoles. μ L⁻¹ (0.3 pmole). Les solutions mères de 17β -E₂ et de 17β -E₂-¹³C₃ ont été stockées dans l'éthanol.

La droite d'étalonnage obtenue en mode ESI(-)MRM correspondant à la méthode de l'ajout dosé dans le plasma est représentée sur la *Figure II.16*, et la droite pour le cerveau est illustrée dans la *Figure 2.17*, ainsi que leurs équations et leurs coefficients de corrélation (R²). Comme on peut le constater, les valeurs de R² sont supérieures à 0,99, démontrant ainsi une bonne linéarité de réponse entre le rapport des aires des pics chromatographiques et la concentration de 17β -E₂.

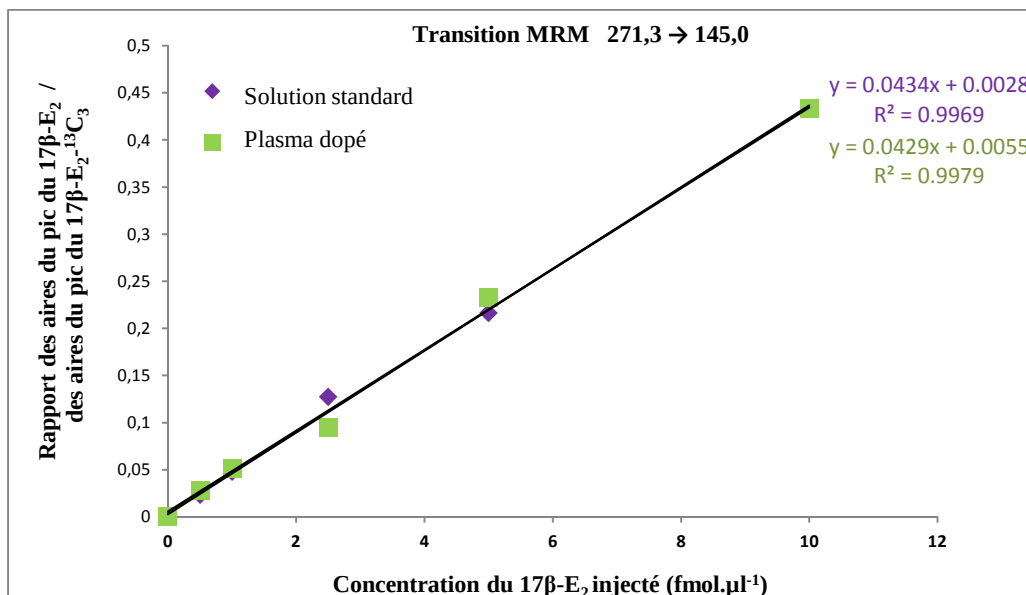


Figure II.16 : Rapport des intensités du $17\beta\text{-E}_2$ et du $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ dans la solution standard et dans le plasma dopé en fonction de la concentration injectée, en HPLC- ESI(-)-MS/MS, $n = 3$

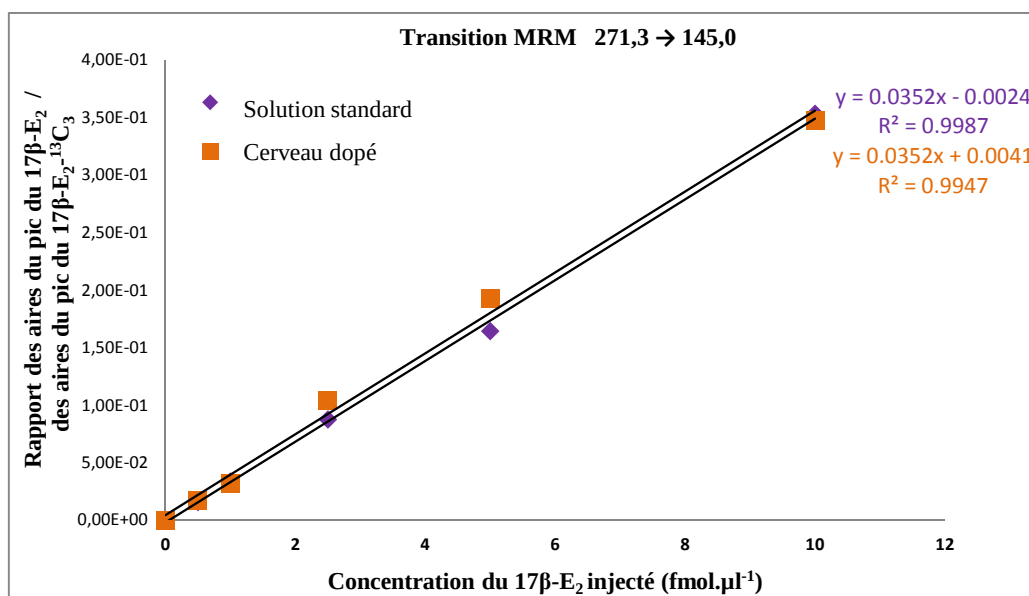


Figure II.17 : Rapport des intensités du $17\beta\text{-E}_2$ et du $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ dans la solution standard et dans le cerveau dopé en fonction de la concentration injectée, en HPLC- ESI(-)-MS/MS, $n = 3$

Sur la Figure II.16, on peut constater qu'une bonne valeur de R^2 a été obtenue pour le $17\beta\text{-E}_2$ dopé dans le plasma (0,9979), et que les droites correspondantes à des solutions standards et au plasma dopé avec $17\beta\text{-E}_2$ sont presque superposées. Dans ces conditions, le dosage pourra être réalisé en utilisant des droites d'étalonnage préparées à partir des solutions standards de l'analyte. Cependant, dans le cas du cerveau, la valeur de R^2 est moins bonne (0,9947), et les droites qui correspondent à des solutions standards et au cerveau dopé avec $17\beta\text{-E}_2$ (Figure II.17) sont parallèles. Dans ce cas, une légère surestimation a été observée. Cela peut être expliqué par le fait que le cerveau est une matrice plus complexe que le plasma, ce qui met

en évidence, encore une fois, l'importance de l'effet matrice. Dans le cas où une surestimation ou une sous-estimation au niveau des droites d'étalonnage est observée, le dosage ne pourra pas être réalisé en utilisant la droite établie à partir des solutions standards de l'analyte. Le dosage pourra être réalisé en utilisant la droite d'étalonnage établie à partir des échantillons dopés.

Il est important de noter que la limite de détection (LOD) de la méthode n'est pas affectée en présence de la matrice biologique. L'influence de l'effet matrice sera discutée dans la partie Préparation des échantillons (chapitre II.4).

Les taux de récupération (Ré) sont montrés dans le *Tableau II.9* et représentent le rapport, exprimé en pourcentage, des réponses ($17\beta\text{-E}_2/17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$) obtenues pour le plasma ou le cerveau dopé sur les réponses obtenues pour la solution standard. La fiabilité de la méthode est mise en évidence par les bonnes valeurs de récupération, 107 ± 11 % dans le cas du plasma et 109 ± 12 % pour le cerveau, avec des coefficients de variation ayant des valeurs admissibles, comprises entre 3,2 et 9 %.

Tableau II.9 : Le taux de récupération (Ré) du $17\beta\text{-E}_2$ après l'ajout dosé dans le plasma et le cerveau des souris placebo.

Echantillon biologique (Eb)	C, fmoles. μL^{-1}	Moyenne Aire du pic Solution standard (n=3)	Moyenne Aire du pic Eb dopé (n=3)	Ré, %	CV, %
Plasma	0.5	2.35E-02	2.81E-02	119,6	3,6
	1	4.79E-02	5.16E-02	107,7	3,2
	2.5	1.27E-01	9.52E-02	74,7	9,0
	5	2.16E-01	2.33E-01	107,6	8,4
	10	4.33E-01	4.43E-01	102,4	5,2
Cerveau	0.5	1.56E-02	1.78E-02	107,8	6,4
	1	3.35E-02	3.27E-02	94,8	4,6
	2.5	8.73E-02	1.05E-01	119,3	5,6
	5	1.64E-01	1.94E-01	117,4	6,3
	10	3.53E-01	3.37E-01	98,4	6,1

II.3.7 Validation de la méthode HPLC-ESI(-)-MS/MS

La validation d'une méthode d'analyse est une étape obligatoire qui confirme les caractéristiques de la méthode pour satisfaire les exigences du domaine d'application. Elle entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la limite de détection (LOD), la limite de quantification (LOQ), la linéarité, la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la justesse, la sensibilité et la récupération.

Dans un premier temps, nous avons regroupé les résultats d'analyse obtenus avec les solutions standards, sur lesquels nous avons procédé aux différents tests de validation de la

méthode. Une fois la méthode validée, nous avons procédé à l'évaluation des résultats des analyses des échantillons biologiques.

Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

La connaissance des valeurs LOD et LOQ est nécessaire afin d'évaluer les performances d'une méthode analytique et de vérifier sa capacité à quantifier les analytes présents en faible concentration dans le plasma et le cerveau de souris. Ces valeurs obtenues à partir des solutions standards sont représentées dans le *Tableau II.10*.

Tableau II.10 : LOD et LOQ obtenues à partir des solutions standards, en HPLC- ESI(-)-MS/MS

Solution Standard	LOD, fmol.µL ⁻¹	LOQ, fmol.µL ⁻¹
<i>E</i> ₁	0,01	0,05
<i>17β-E</i> ₂	0,5	2,5
<i>17α-E</i> ₂	0,5	2,5
<i>E</i> ₃	0,025	0,1

D'après le *Tableau II.10*, le *17β-E*₂ et *17α-E*₂ ont une limite de détection de 0,5 fmol.µL⁻¹ et une limite de quantification de 2,5 fmoles.µL⁻¹ la limite la plus basse étant observée pour l'*E*₁ (LOQ de 0,05 fmole.µL⁻¹). Comme mentionné ci-dessus, la présence de la matrice biologique n'affecte pas la LOD et la LOQ de la méthode analytique pour les analytes considérés.

Linéarité

Comme définie dans le Chapitre I, la linéarité caractérise le graphe des valeurs du signal analytique en fonction de la concentration de la substance à analyser. Le critère de linéarité est la validation de la fonction mathématique qui doit être une droite pour un intervalle de valeurs définies. Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.

Pour représenter la linéarité, le jeu de données expérimentales a été constitué avec 9 concentrations pour l'*E*₁ et l'*E*₃ (n = 3 pour chaque), et 6 concentrations pour le *17β-* et le *17α-E*₂. La gamme d'étalonnage a été analysée trois fois à trois jours différents.

Tableau II.11 : Modèle d'étalonnage pour les solutions standard de l'E₁, du 17β- et 17α-E₂, et l'E₃, en HPLC-ESI(-)-MS/MS, réalisées durant trois jours différents.

Analytes	Équation de la régression linéaire			Coefficient de corrélation (R ²)		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
E ₁	y = 0.0412x + 0.0013	y = 0,041x + 0,001	y = 0,053x - 0,001	0,9996	0,9990	0,9980
17β-E ₂	y = 0.0566x + 0.0044	y = 0,053x + 0,003	y = 0,035x - 0,002	0,9991	0,9975	0,9986
17α-E ₂	y = 0.0545x + 0.0025	y = 0,063x + 0,003	y = 0,040x - 0,001	0,9992	0,9980	0,9982
E ₃	y = 0.0398x + 0.0068	y = 0,037x + 0,008	y = 0,041x + 0,008	0,9976	0,9970	0,9978

La majorité des coefficients de corrélation est supérieure à 0,99 mettant ainsi en évidence une relation linéaire entre les aires relatives des pics chromatographiques et la concentration des œstrogènes (Tableau II.11). Pour confirmer cette observation, des tests de validation du modèle d'étalonnage ont été effectués, et plus précisément, l'évaluation des paramètres qui caractérise la précision et la fidélité des analyses effectuées.

Précision

Les paramètres qui caractérisent la précision d'une série d'analyse sont : le coefficient de variation (CV), la déviation standard (SD), la déviation standard relative (RSD), ainsi que l'intervalle de confiance. Sur les analyses effectuées pendant trois jours différents, les précisions intra- et inter-jours ont été établies (Tableau A1). Les données obtenues se retrouvent dans l'intervalle de confiance calculé pour un degré de liberté de 95%. Les CV se retrouvent dans un intervalle de 0,4 – 15,8% en intra-jour et de 1,2 – 20% en inter-jours. Cela nous indique qu'il y a des variations significatives entre les analyses inter-jours. La même observation peut être réalisée pour les SD et RSD qui montrent des valeurs acceptables intra-journalières et qui sont à la limite de la valeur acceptée pour les analyses inter-jours. Ces paramètres nous indiquent qu'on a une bonne précision intra-jours et que la précision inter-jours est à la limite de l'acceptation.

Fidélité

La fidélité des analyses est exprimée par l'écart-type (s), la variance (s₂) ou le CV. Elle mesure l'erreur aléatoire liée à une procédure analytique, c'est-à-dire la dispersion des résultats autour de leur valeur moyenne. Le test consiste à vérifier si la part de la variance due à l'erreur de modèle n'est pas supérieure à la variance de l'erreur expérimentale.

L'analyse de la variance effectuée par ANOVA permet de tester l'influence d'une ou plusieurs variables qualitatives sur une variable quantitative, à un risque donné, et d'observer

la répétabilité ou la fidélité des analyses réalisées. Par la suite, les calculs de différents paramètres nécessaires à l'analyse de la variance sont présentés dans le *Tableau II.12*, où le p est le nombre de niveaux du facteur de variabilité et le n est le nombre total des niveaux :

- ◆ Degré de liberté (DDL)

$$DDL_{facteur} = \sum_{i=1}^{p-1} 1 = n - 1$$

$$DDL_{residu} = \sum_{i=1}^p (n_i - 1) = n - p$$

- ◆ Sommes des carrés des écarts (SCE)

$$SCE_{facteur} = \sum_{i=1}^p n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2$$

$$SCE_{residu} = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

- ◆ Les variances s'obtiennent en faisant le rapport de la somme des carrés des écarts sur le nombre de degrés de liberté:

$$S_{facteur}^2 = \frac{SCE_{facteur}}{DDL_{facteur}}$$

$$S_{residu}^2 = \frac{SCE_{residu}}{DDL_{residu}}$$

- ◆ Le test de Fisher étant défini comme le rapport de deux variances :

$$F_{obs} = \frac{S_{facteur}^2}{S_{residu}^2}$$

Tableau II.12 : Analyse de la variance pour le modèle d'étalonnage

Sources de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Variance	F
Inter groupes	$DDL_{facteur}$	$SCE_{facteur}$	$S_{facteur}^2$	F_{obs}
Intra groupes	DDL_{residu}	SCE_{residu}	S_{residu}^2	
Totale	DDL_{total}	SCE_{total}		

Les règles de décision sont effectuées en deux étapes qui consistent à vérifier la conformité du test de Fisher (F), qui montre l'importance de la variance inter-série en comparaison avec la variance de répétabilité :

- $F_{\text{obs}} < F_{(95\%)}$ indique que les variances sont identiques et que le modèle est linéaire ;
- $F_{\text{obs}} > F_{(95\%)}$ indique que les variances sont différentes (le rapport ne suit pas la loi de Fisher-Snedecor).

Si F_{obs} est plus grand que la valeur théorique, on peut conclure à un problème de variabilité de la procédure analytique dont les résultats peuvent varier d'une série à une autre, amenant ainsi à revoir l'optimisation de la méthode.

Le *Tableau II.13* présente les résultats obtenus pour les modèles d'étalonnage des œstrogènes. Il n'existe pas de différence significative inter- et intra-groupes, et les valeurs du F_{obs} sont inférieures au $F_{(95\%)}$, ce qui confirme la linéarité du modèle.

Tableau II.13 : Analyse des variances pour les modèles d'étalonnage établis

Sources de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Variance	F_{obs}	$F_{(95\%)}$
$E_1/E_1-^{13}C_3$					
Inter-groupes	8	1,32E-05	1,65E-06	0,01	2,115
Intra-groupes	54	1,19E-02	2,21E-04		
Total	62	0,1193			
$17\beta\text{-}E_2/17\beta\text{-}E_2-^{13}C_3$					
Inter-groupes	8	4,05E-02	5,06E-03	0,02	2,152
Intra-groupes	45	11,55	2,57E-01		
Total	53	11,59			
$17\alpha\text{-}E_2/17\beta\text{-}E_2-^{13}C_3$					
Inter-groupes	8	1,35E-03	1,68E-04	0,0014	2,152
Intra-groupes	45	5,494	1,22E-01		
Total	53	5,495			
$E_3/17\beta\text{-}E_2-^{13}C_3$					
Inter-groupes	8	1,51E-05	1,88E-06	0,01	2,115
Intra-groupes	54	1,54E-02	2,85E-04		
Total	62	0,0154			

Des graphiques "BoxPlot" (aussi appelés "Boîte à Moustaches") viennent automatiquement illustrer ces résultats. Les "BoxPlot" sont surtout utiles pour indiquer si une distribution est asymétrique et s'il y a des observations inhabituelles dans l'ensemble des données. Ce type de diagramme sert à montrer la forme de la distribution, sa valeur centrale (médiane) et sa variabilité (*Figure II.18*).

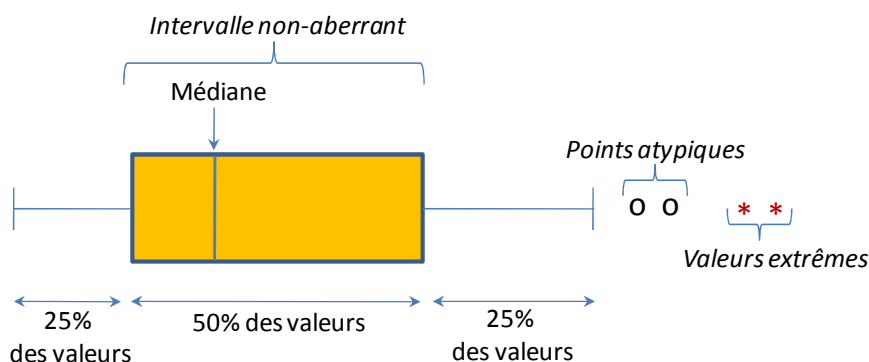


Figure II.18 : Les composants du "BoxPlot"

Ces diagrammes permettent de comparer objectivement les neuf séries de statistiques. La *Figure II.19* représente les valeurs obtenues pour les gammes d'étalonnage des œstrogènes, constituées de trois réplicas durant trois jours différents. On voit clairement que la dispersion des neuf groupes pour les quatre analytes diffère un peu. Les médianes sont assez proches dans les "BoxPlot" *a*, *b* et *c*, une dispersion légèrement augmentée est observée dans le cas *d*.

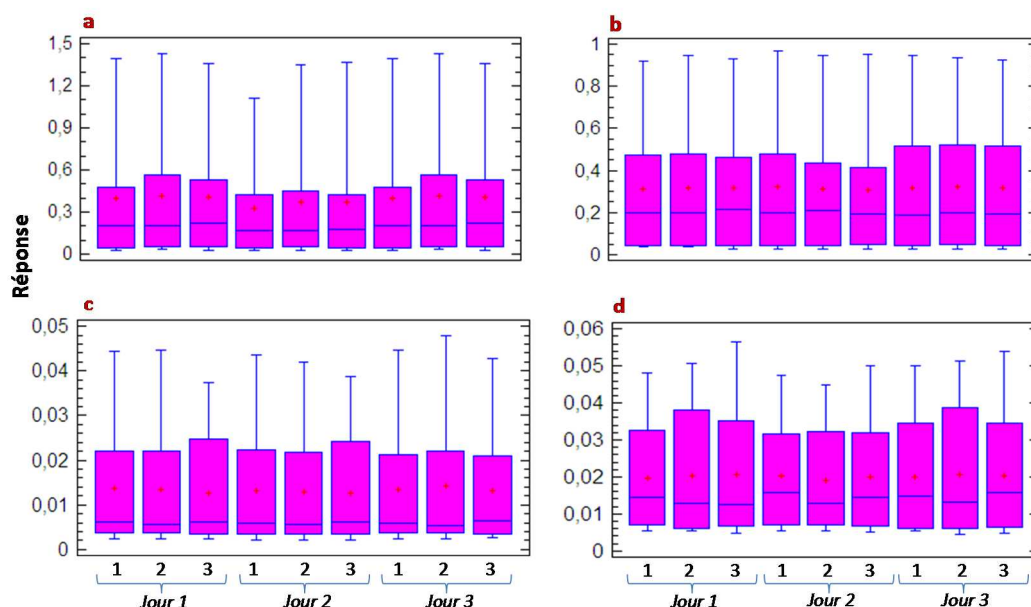


Figure II.19 : "BoxPlot" sur les mesures réalisées après l'analyse sur trois jours différents, **a)** $17\beta\text{-E}_2/17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$; **b)** $17\alpha\text{-E}_2/17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$; **c)** $\text{E}_1/\text{E}_1\text{-}^{13}\text{C}_3$; **d)** $\text{E}_3/17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$

Mais dans ce cas *b*, la place de la médiane est plus proche du centre, ce qui rapproche le modèle de la symétrie. Dans la *Figure II.19d*, la dispersion des valeurs est prononcée, avec des médianes variables. Pour les quatre modèles, nous avons observé une distribution asymétrique, mais sans la présence de valeurs atypiques et extrêmes.

II.4 PREPARATION D'ECHANTILLON : OPTIMISATION DE LA METHODE SPE

Les techniques de préparation des échantillons biologiques retenues lors de cette étude sont la ELL et la SPE. La SPE est une étape supplémentaire de purification et de pré-concentration. La purification de l'échantillon permet, d'une part, de protéger les colonnes chromatographiques et ainsi de prolonger leur durée de vie et, d'autre part, de protéger le détecteur MS en limitant son encrassement.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux méthodes présentées dans la littérature se rapportant à l'analyse des œstrogènes, méthodes que nous avons résumées dans le premier chapitre (*Tableau I.5*). Vu la diversité des méthodes existantes souvent décrites avec l'omission de précisions sur le choix de la méthodologie et de la nature des phases utilisées et sans caractérisation complète de taux de récupération, nous avons décidé d'élaborer notre propre méthode de purification avec le contrôle de taux de récupération des œstrogènes à toutes les étapes.

Dans cette partie, nous avons essayé de mettre au point une méthode simple et rapide pour l'extraction des œstrogènes par SPE. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un Automate SPE GILSON GX 271 ASPECTM. Dans ce but, nous avons testé plusieurs cartouches SPE commercialement disponibles : des supports échangeurs d'ions, des supports à caractère mixte hydrophile-lipophile et des supports greffés C18. Une fois les conditions d'extractions fixées et le support choisi, les essais ont été transposés sur les matrices biologiques : le plasma, le cerveau et l'hippocampe de souris.

II.4.1 Choix du support d'extraction et du solvant d'élution

Le choix d'un support SPE est une étape clef dans l'élaboration du procédé d'extraction ; ce choix est évidemment orienté suivant le type de matrice à analyser et la nature des analytes à extraire. Pour l'optimisation de la méthode d'extraction des œstrogènes, nous avons testé différents types de cartouches SPE, avec des capacités de l'adsorbant polymérique différentes :

- des supports avec des phases polymériques à base de divinylbenzène et *N*-vinylpyrrolidone, soit hydrophile-lipophile, tels que les cartouches Oasis®HLB de 10 et 30 mg (Waters) ainsi que Strata X de 30 mg et 10 mg (Phenomenex).
- le support de silice greffée par du C18, Strata-E C18 de 50 mg.
- des supports échangeurs de cation faible Oasis®WCX de 10 mg (Waters) à base de silice, et de cation fort Oasis®MCX de 10 et 30 mg (Waters) constitués du même

squelette que celui de la cartouche Oasis®HLB avec en plus des groupements sulfonates greffés.

Des tests ont été menés sur une solution standard de 17β -E₂ à $1 \text{ pmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, en utilisant deux solvants à différents pourcentage, l'acétonitrile (ACN) et le méthanol (CH₃OH) dans l'eau. La première étape est de déterminer le pourcentage de solvant organique dans l'eau qui permet une élution totale de l'analyte et le pourcentage à utiliser lors de l'étape de lavage (qui ne doit pas éliminer l'analyte). Pour cela, après le dépôt de 0,5 mL de solution standard du 17β -E₂, chaque cartouche SPE a été percolée par un mélange eau/solvant organique en augmentant le pourcentage de solvant organique par pas de 10%. Le volume de chaque solution d'élution est égal à 1 mL, cette fraction étant ensuite évaporée à sec, reprise dans la solution d'injection et analysée par LC-MS/MS (Figure II.20 et II.21). Pour l'ACN et pour toutes les cartouches testées, nous avons retenu 50% ACN dans l'eau pour l'étape d'élution et 20% ACN pour l'étape de lavage. Dans le cas du méthanol, les solutions contenant 70% pour l'étape d'élution et 30% pour l'étape de lavage ont été choisies.

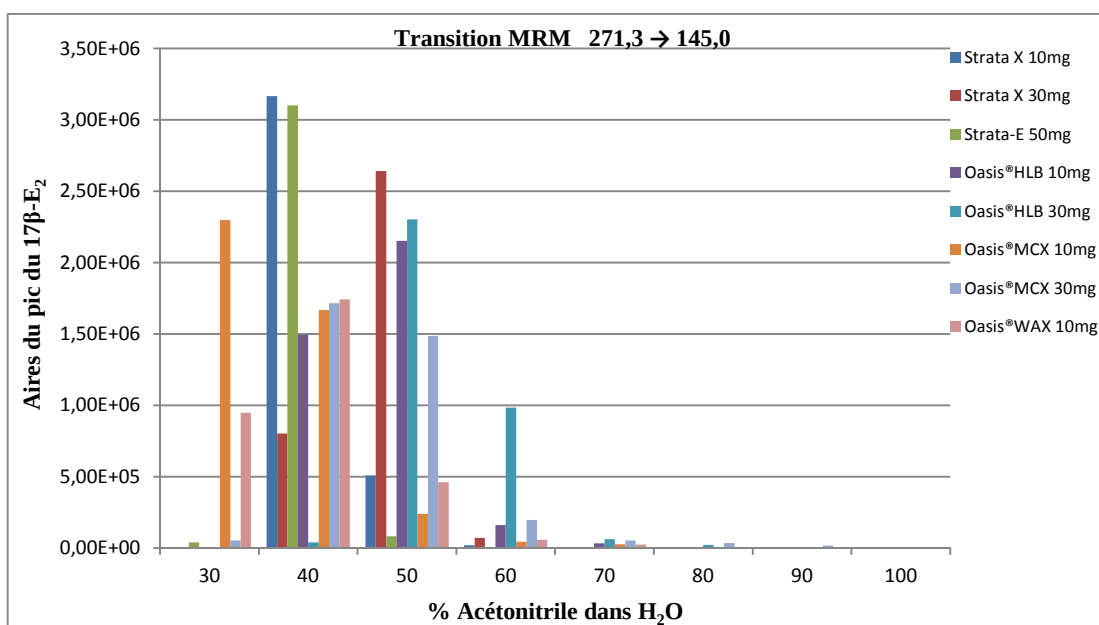


Figure II.20 : Aire du pic du 17β -E₂ en fonction du pourcentage d'ACN utilisé lors de l'étape d'élution SPE, en HPLC- ESI(-)-MS/MS, n = 3

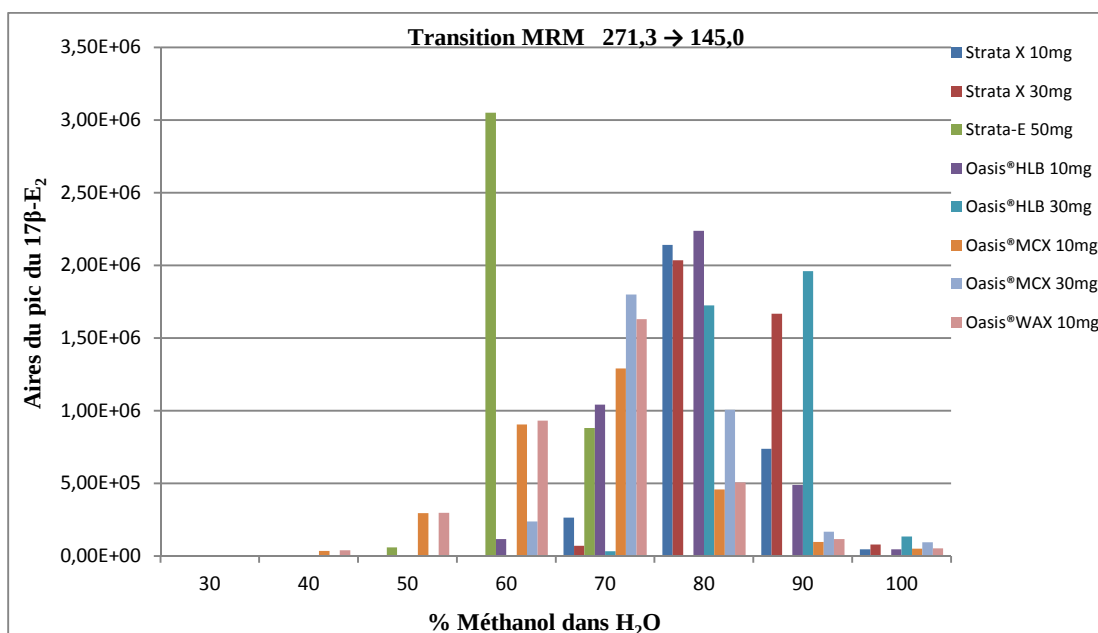


Figure II.21 : Aire du pic du 17β-E₂ en fonction du pourcentage de Méthanol utilisé lors de l'étape d'élution SPE, en HPLC-ESI(-)-MS/MS, n = 3

Les protocoles que nous allons appeler par la suite Protocole I et II sont les suivants:

Protocole I :

- *conditionnement*: 2 mL ACN suivis par 2 mL H₂O ;
- *dépôt*: 0,5 mL solution standard préparée à 1 pmole.μL⁻¹ dans 10% ACN ;
- *lavage*: 2mL 20% ACN dans H₂O;
- *élution* : 2mL 50% ACN dans H₂O (pH = 6,2).

Protocole II :

- *conditionnement*: 2 mL CH₃OH suivis par 2 mL H₂O ;
- *dépôt*: 0,5 mL solution standard préparée à 1 pmole.μL⁻¹ dans 10% CH₃OH ;
- *lavage*: 2 mL 30% CH₃OH dans H₂O;
- *élution* : 2 mL 70% CH₃OH dans H₂O (pH = 6,5).

Le débit lors de toutes les étapes de SPE a été ajusté à 1 mL.min⁻¹. La fraction récupérée après l'élution est évaporée à sec (Speedvac à 30°C), puis reprise dans 0,1 mL de méthanol à 60% et injectée dans le système chromatographique.

Une fois le choix des pourcentages fait pour chaque solvant, les deux protocoles sont appliqués pour définir le solvant qui permet d'avoir un meilleur taux de récupération. Les essais ont continué sur la solution standard de 17β-E₂ de 1 pmol.μL⁻¹. Afin d'évaluer les taux de récupération, les signaux obtenus en LC-MS/MS ont été comparés avec le signal de la solution standard qui n'a pas subi l'étape de SPE (Figure II.22).

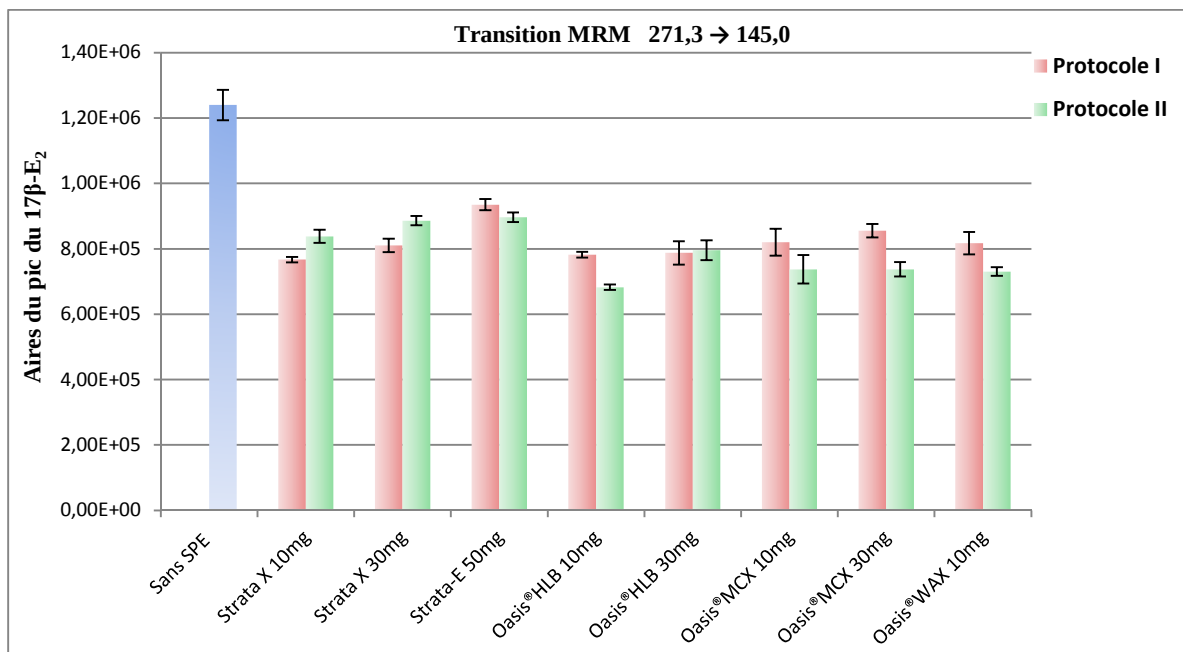


Figure II.22 : Aire du pic du 17β-E₂ en fonction des cartouches SPE pour les deux solvants organiques, ACN et CH₃OH, en HPLC- ESI(-)-MS/MS, n = 3

Pour les huit cartouches SPE, nous avons réalisé une étude de répétabilité des taux de récupération, l'extraction étant effectuée trois fois sur chaque type de cartouche. Dans le cas du Protocole I, les taux de récupération obtenus pour la majorité des cartouches sont entre 60 et 70%, avec les écart-types et les coefficients de variation inférieurs et égaux à 5 % pour les cartouches Strata X et Oasis®HLB 10mg et Oasis®MCX 30mg. Pour les cartouches Oasis®HLB 30mg, Oasis®MCX 10mg et Oasis®WAX 10mg, les écart-types et les CV sont supérieurs à 5 %. Cependant, avec le même protocole d'extraction, le taux de récupération pour la cartouche Strata-E 50mg est de 75% avec un écart-type et un CV inférieurs à 5 %.

En analysant les résultats obtenus avec le deuxième protocole, nous avons observé que les taux de récupération sont moins bons. Pour toutes les cartouches Oasis® (Oasis®HLB 30mg et Oasis®MCX 10mg), la récupération est inférieure ou égale à 60%, avec des CV supérieurs à 5 %. Dans le cas des cartouches Strata, les taux de récupération sont de 70%, avec des CV inférieurs à 5 %. Après l'analyse de ces résultats, nous avons décidé de développer d'autres protocoles SPE en n'utilisant que des cartouches de type Strata afin de trouver les causes de la perte d'analyte et d'améliorer le taux de récupération.

II.4.2 Choix du pH d'extraction

Dans cette partie, nous avons comparé les protocoles I et II avec d'autres protocoles d'extraction menés à des pH différents. Dans cette optique, nous avons essayé, dans un premier temps, de faire varier le pH des solutions et d'évaluer la variation du taux de récupération. De plus, un protocole SPE trouvé dans la littérature implique l'utilisation de l'hexane lors de l'étape

de lavage et de l'acétate d'éthyle lors de l'étape d'élution [143, 206]. Vu la faible quantité des œstrogènes dans les matrices biologiques, nous avons continué les tests sur une solution standard de $17\beta\text{-E}_2$ de $0,1 \text{ pmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Les essais ont été effectués en utilisant les protocoles décrits dans le *Tableau II.14*.

Tableau II.14 : Description des protocoles SPE

Étapes SPE	Protocoles						
	P-III	P-IV	P-V	P-VI	P-VII	P-VIII	P-IX
Conditionnement Équilibration	2 mL CH ₃ OH suivis par 2 mL H ₂ O, 2 mL 0,1% HCOOH dans H ₂ O	2 mL CH ₃ OH suivis par 2 mL H ₂ O, 2 mL 0,1% NH ₄ OH dans H ₂ O	2 mL ACN suivis par 2 mL H ₂ O, 2 mL 0,1% HCOOH dans H ₂ O	2 mL ACN suivis par 2 mL H ₂ O, 2 mL 0,1% NH ₄ OH dans H ₂ O	2 mL CH ₃ OH suivis par 2 mL H ₂ O	2 mL CH ₃ OH suivis par 2 mL H ₂ O, 2 mL 0,1% HCOOH dans H ₂ O	2 mL CH ₃ OH suivis par 2 mL H ₂ O, 2 mL 0,1% NH ₄ OH dans H ₂ O
Dépôt	0,5 mL solution - dans 10% CH ₃ OH avec 0,1% HCOOH	0,5 mL solution - dans 10% CH ₃ OH avec 0,1% NH ₄ OH	0,5 mL solution - dans 10% ACN avec 0,1% HCOOH	0,5 mL solution - dans 10% ACN avec 0,1% NH ₄ OH	0,5 mL solution - dans 10% CH ₃ OH	0,5 mL solution - dans 10% CH ₃ OH avec 0,1% HCOOH	0,5 mL solution - dans 10% CH ₃ OH avec 0,1% NH ₄ OH
Lavage	2 mL 0,1% HCOOH dans 30% CH ₃ OH	2 mL 0,1% NH ₄ OH dans 30% CH ₃ OH	2 mL 0,1% HCOOH dans 20% ACN	2 mL 0,1% NH ₄ OH dans 20% ACN	1 mL H ₂ O et 1 mL Hexane	1 mL 0,1% HCOOH dans H ₂ O et 1 mL Hexane	1 mL 0,1% NH ₄ OH dans H ₂ O et 1 mL Hexane
Élution	2 mL 0,1% HCOOH dans 70% CH ₃ OH pH = 2,5	2 mL 0,1% NH ₄ OH dans 70% CH ₃ OH pH = 10,8	2 mL 0,1% HCOOH dans 50% ACN pH = 2,2	2 mL 0,1% NH ₄ OH dans 50% ACN pH = 11,0	2 mL Acétate d'éthyle	2 mL 0,1% HCOOH dans Acétate d'éthyle	2 mL 0,1% NH ₄ OH dans Acétate d'éthyle

Le débit lors des étapes de conditionnement/équilibration et lavage a été ajusté à $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, tandis que pour le dépôt et l'élution, le débit était de $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La fraction récupérée après l'élution est évaporée à sec au Speedvac, puis reprise dans 0,1 mL de méthanol à 60% et analysée. Les taux de récupération sont calculés en rapportant l'aire du pic chromatographique obtenue pour la solution reconstituée à l'aire du pic obtenu pour la solution standard avant le dépôt. Les résultats d'analyse mettent en évidence la variation des taux de récupération : très mauvais pour les supports Strata X (seulement entre 20 et 60%) et bien meilleur pour le Strata C18 (83% P-III, 90% P-IV, 77% P-V, 82% P-VII). En revanche, si les calculs de récupération sont faits par rapport à une solution standard, et ayant subi une étape d'évaporation puis une reconstitution dans 0,1 mL de méthanol à 60%, de meilleurs rendements d'extraction sont obtenus (supérieurs à 95% pour le Strata C18 P-III, P-IV et P-VII) (*Figure II.23*). En tenant compte de ces résultats, nous avons conclu qu'une perte importante des solutés avait lieu pendant l'étape d'évaporation. Par conséquent, pour la suite de notre étude, tous les rendements d'extraction ont été calculés par rapport aux solutions standards évaporées et reconstituées.

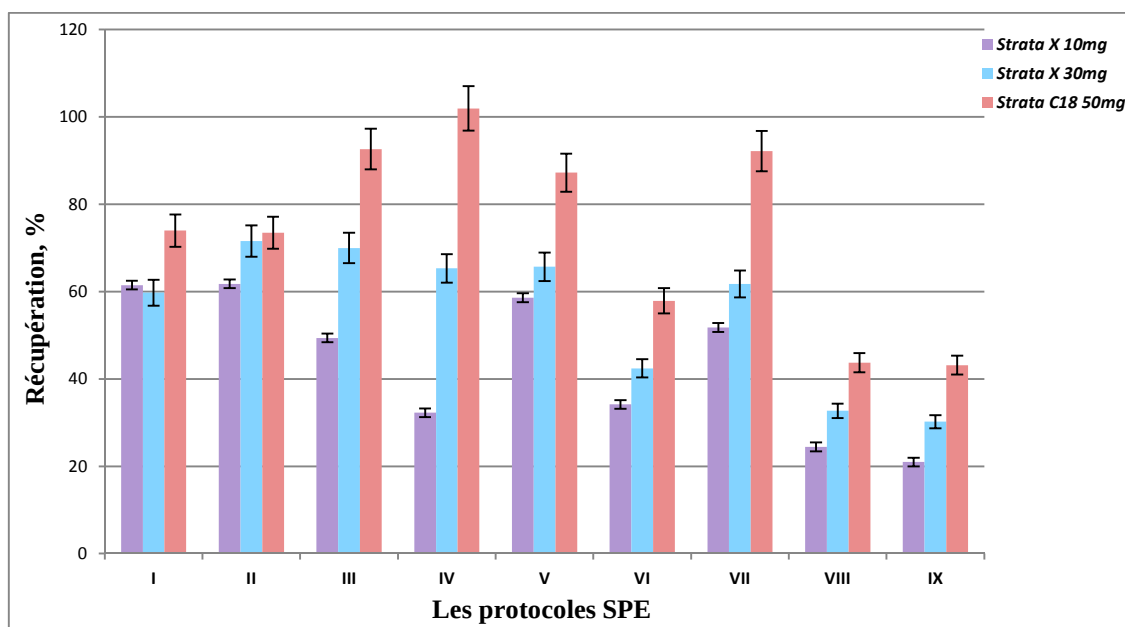


Figure II.23 : Taux de récupération du $17\beta\text{-E}_2$ sur les trois supports SPE, pour les neuf protocoles, $n = 3$

Les tests effectués sur les supports Strata X ne présentent pas d'aussi bons résultats que ceux fournis par les cartouches Strata-E. Cela peut être dû à la petite capacité de l'adsorbant qui n'est pas suffisante pour retenir l'analyte et induit des pertes au cours des étapes du dépôt et de lavage.

La composition du solvant d'élution influence fortement l'efficacité de récupération d'analyte. Nous avons observé l'effet déjà évoqué dans le paragraphe II.2.1. de ce chapitre. En raison de leur pK_a élevé, les œstrogènes ne sont pas totalement élués avec une solution ayant un pH neutre ou acide (P-I pH = 6,2, P-II pH = 6,5, P-III pH = 2,5, P-V pH = 2,2), tandis qu'avec une solution d'un pH proche du pK_a de l'analyte, une récupération presque totale du $17\beta\text{-E}_2$ (P-IV pH = 10,8) a été obtenue. C'est donc le support Strata-E avec le P-IV qui sera utilisé par la suite pour réaliser les extractions sur phase solide à partir des échantillons biologiques.

II.4.3 Influence de l'étape d'évaporation sur le taux de récupération

Vu les pertes importantes du composé constatées lors de l'évaporation, l'influence de cette étape sur le taux de récupération a également été évaluée. Les essais ont été menés sur une gamme de concentrations comprise entre 5 et 100 fmoles. μL^{-1} (5, 10, 25, 50 et 100), en utilisant les P-I et P-VII. Ces deux protocoles ont été choisis pour évaluer l'influence de la nature du solvant sur le temps d'évaporation et sur l'efficacité de récupération. Dans le cas du protocole I, l'étape d'évaporation dure longtemps (12 h) en raison de la quantité importante d'eau (50%). De plus, pour assurer l'évaporation complète, l'échantillon est chauffé à 40°C, ce qui peut induire des pertes supplémentaires. Pour le P-VII, la durée de cette étape est réduite à

une demi-heure et le chauffage n'est pas nécessaire. Les solutions sont évaporées à sec au Speedvac, puis reprises dans 0,1 mL de méthanol à 60% et injectées dans le système chromatographique.

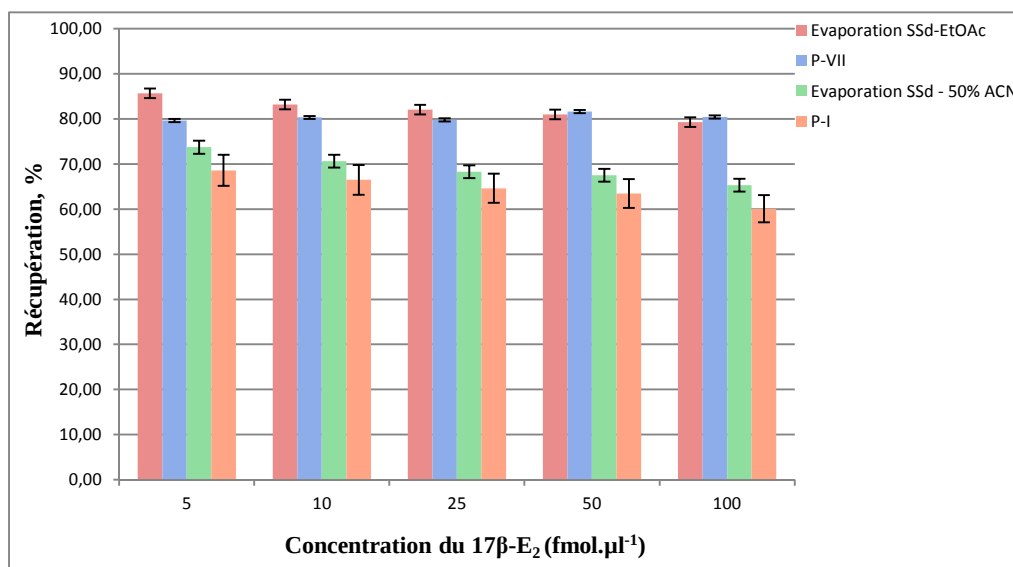


Figure II.24 : Comparaison des taux de récupération du 17β-E₂ obtenus à différents niveaux de concentration, pour les deux protocoles (P-I et P-VII) avec des solutions standards (SSd) du 17β-E₂ et les SSd préparées dans les solvants utilisés lors de l'étape d'élution et évaporée, n = 3

En analysant les résultats obtenus pour le P-VII (*Figure II.24*), une perte de 18% après l'évaporation de la solution standard de 25 fmoles.μL⁻¹ de 17β-E₂ préparée dans le solvant utilisé lors de l'étape d'élution (EtOAc) est observée ; en revanche, seulement 2% de l'analyte sont perdus lors de l'étape de SPE. Dans le cas du protocole P-I, la perte est plus significative : 32% pour la SSd de 25 fmoles.μL⁻¹ de 17β-E₂ préparée dans le solvant d'élution (50% ACN) et 4% lors de l'étape SPE. Ces pertes importantes pourraient provenir du système d'évaporation, ce qui nous a amené à comparer l'évaporation au Speedvac avec l'évaporation sous flux d'azote (*Figure II.25*) en utilisant les mêmes conditions (température d'évaporation de 40°C pour le P-I et température ambiante pour le P-VII). Au cours de l'étape d'évaporation sous flux d'azote, le taux de récupération s'améliore considérablement, s'approchant de 100% pour les deux types de solvants utilisés lors de l'étape d'élution (50% ACN pour le P-I et EtOAc pour le P-VII). Néanmoins, l'évaporation sous flux d'azote est beaucoup plus longue (24 h) que l'évaporation au Speedvac.

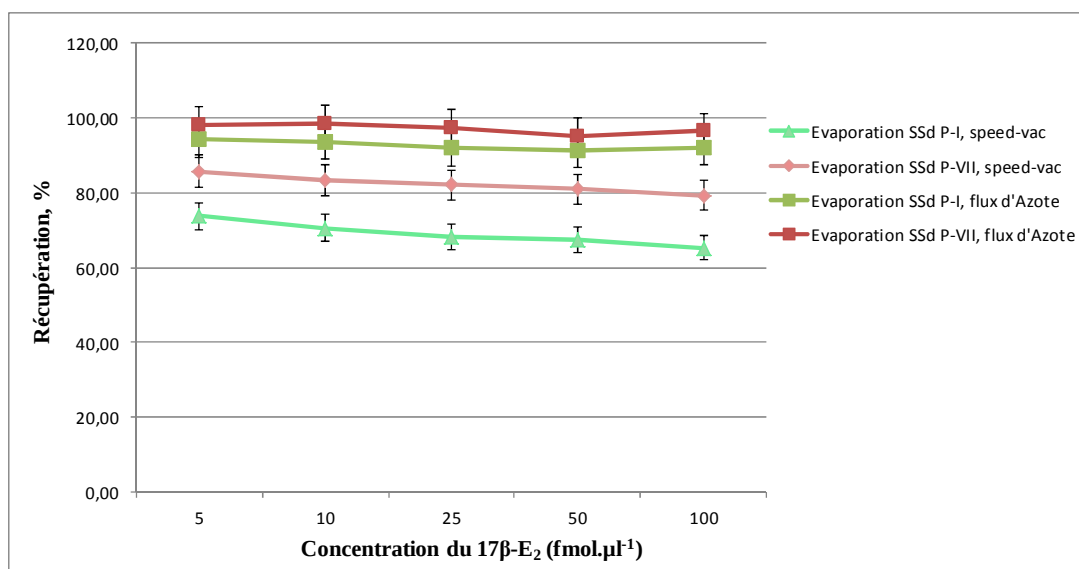


Figure II.25 : Comparaison des taux de récupération du 17β-E₂ obtenus à différents niveaux de concentration, pour les SSd préparées dans les solvants utilisés lors de l'étape d'élution (P-I et P-VII) avec l'évaporation au Speedvac et sous flux d'azote, n = 3

Comme l'évaporation sous flux d'azote est plus longue qu'au Speedvac, nous avons convenu pour la suite de notre étude de calculer tous les rendements d'extraction par rapport aux solutions standards évaporées au Speedvac et reconstituées dans le solvant chromatographique.

II.4.4 Le prétraitement des échantillons biologiques : homogénéisation et ELL

Pour la préparation des échantillons biologiques par SPE, le support Strata-E C18 (50 mg) utilisé avec le P-IV a été retenu : cette combinaison présente le meilleur taux de récupération du 17β-E₂ (Figure II.23). Cependant, vu la complexité de la matrice biologique à analyser, des étapes supplémentaires de prétraitement s'avèrent nécessaire. Dans le cas des échantillons de tissus, tout d'abord il s'agit d'une étape d'homogénéisation. Plusieurs types de dispositifs peuvent servir à briser les cellules pour libérer leur contenu. Pour assurer l'homogénéisation normalisée, uniforme et cohérente de tissu nous avons choisi d'utiliser le dispositif Precellys® qui broie, lyse et homogénéise jusqu'aux 24 échantillons biologiques simultanément par un mouvement spécifique, dit précession. Habituellement, cette opération s'effectue dans un milieu liquide dans lequel le tissu baigne. Les composantes cellulaires se retrouvent donc libérées dans un solvant et le taux de récupération des analytes d'intérêt dépendra de sa composition et de sa nature. Une attention particulière devra être apportée à sa composition, pH, etc. Compte tenu du caractère hydrophobe des œstrogènes, une fois l'homogénéisation réalisée, une étape d'extraction liquide-liquide (ELL) avec le mélange cyclohexane / acétate d'éthyle (50/50, v/v) est effectuée avant l'étape de SPE.[205, 224, 230]

Nous avons d'abord étudié l'influence du tampon d'homogénéisation sur le taux de récupération. Dans un premier temps, les extractions ont été réalisées à partir des échantillons d'extrait de cerveau (10 mg) et de plasma (100 μL) provenant de souris placebo et dopée (avec 10 $\text{fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (0,0002 pmole) de $17\beta\text{-E}_2$ et le SI $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ fixé à 0,3 pmole) afin de vérifier, d'une part, l'influence de la matrice sur les taux de récupération et, d'autre part, l'efficacité de la SPE pour éliminer les interférences.

Le rôle d'une solution tampon est de limiter les variations de pH. Beaucoup de bactéries sont sensibles aux variations de pH ce qui peut conduire à la dégradation des échantillons biologiques. Il est bien connu que le tampon phosphate salin (di-hydrogénophosphate de potassium / di-sodium hydrogénophosphate à 0,1M) est la solution tampon qui a la concentration en sels la plus proche de celle du corps humain. Ainsi, le tampon phosphate peut être utilisé comme diluant pour assurer le stockage des échantillons. Cependant, nous avons décidé de faire varier le pH du tampon pour voir son influence sur les taux de récupération.

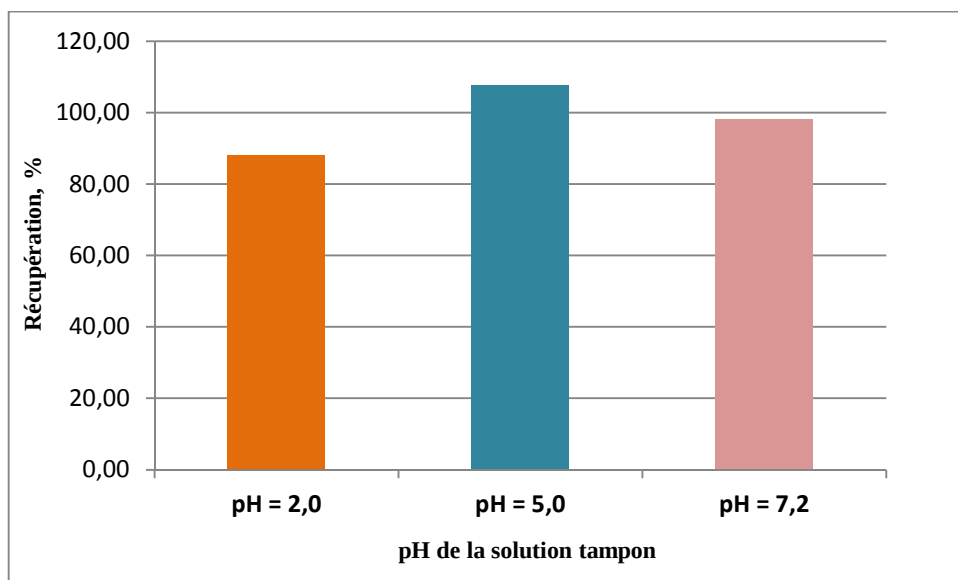


Figure II.26: Variation des taux de récupération du $17\beta\text{-E}_2$ obtenus à différents pH des tampons : Citrate de phosphate pH = 2, Citrate de phosphate pH = 5 et le Phosphate pH = 7,2 ; pour une concentration de 10 $\text{fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (0,0002 pmole) du $17\beta\text{-E}_2$ dopé dans 10 mg de cerveau provenant de souris placebo

Les tests ont été effectués en utilisant trois tampons à des pH différents : le tampon le phosphate à pH 7,2, le tampon citrate de phosphate (citrate de sodium) à pH 5, et le citrate de phosphate à pH 2 (*Figure II.26*). Dans le cas du pH 2, une perte de 12 % d'analyte a été observée, tandis que le tampon citrate de phosphate à pH 5 conduit à une récupération totale. Néanmoins, pour le tampon phosphate, une petite perte (2%) est observée. En analysant les résultats, nous avons décidé d'utiliser pour la suite de l'étude le tampon citrate de phosphate à pH 5 comme tampon d'extraction. Cependant, on peut noter que le tampon phosphate, en raison de son

isotonicité, a été choisi comme tampon pour permettre le stockage des aliquots du cerveau entier après broyage dans des conditions biologiques.

L'analyse des chromatogrammes obtenus pour le cerveau et le plasma dopé avec l'analyte (*Figure II.27*) a démontré que le Protocole SPE P-IV n'est pas efficace pour sa purification à partir du cerveau. Comme le cerveau est une matrice complexe, visqueuse et riche en lipides, le P-IV ne permet pas l'élimination totale des lipides, qui sont co-extraits avec l'analyte. La présence de ces constituants dans la matrice peut rendre difficile la quantification et conduire rapidement à la perte de l'efficacité de la colonne chromatographique et à l'encrassement du spectromètre de masse.

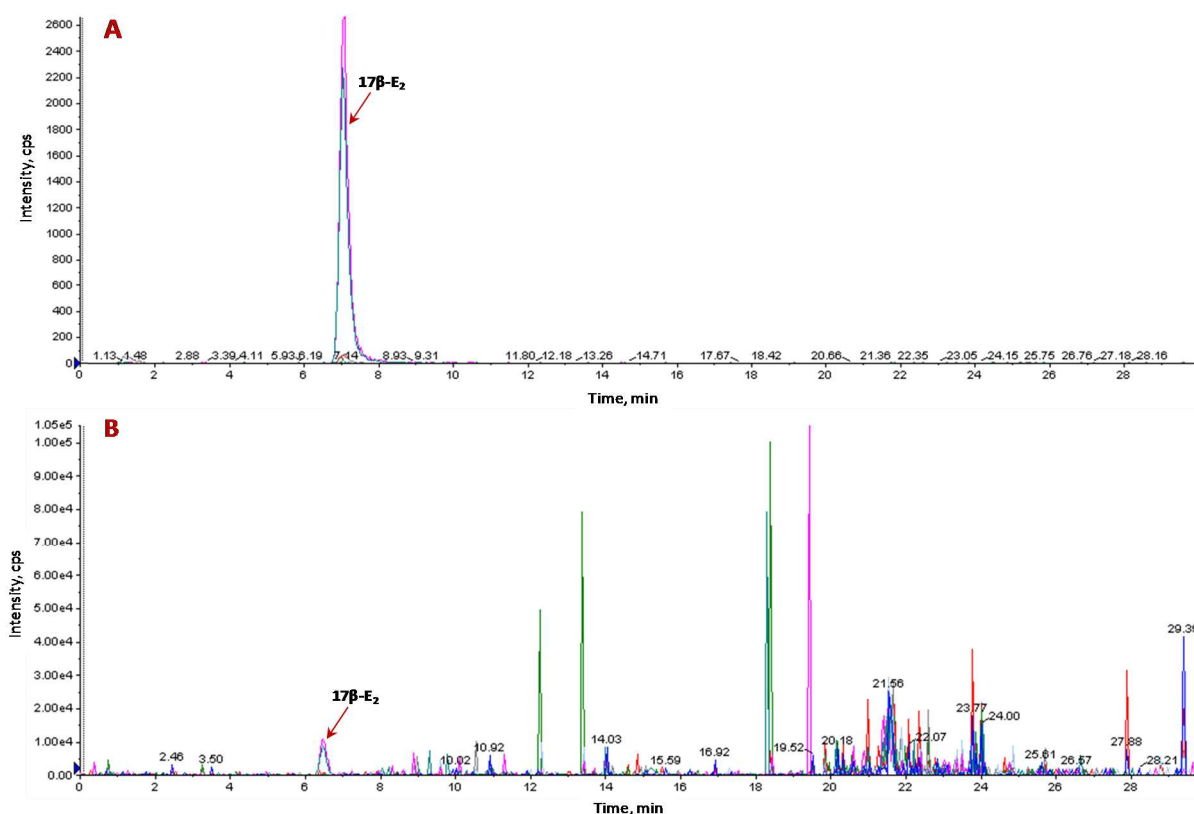


Figure II.27 : Chromatogrammes pour les échantillons biologiques dopés avec $10 \text{ fmoles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (0,0002 pmole) de $17\beta\text{-E}_2$ purifié avec le protocole SPE P-IV: **A.** 100 μL de plasma ; **B.** 10 mg de cerveau de souris placebo.

Une alternative possible est l'utilisation du protocole SPE P-VII qui implique un lavage intermédiaire avec de l'hexane. Grâce à son caractère apolaire, l'hexane possède une grande affinité pour les lipides.

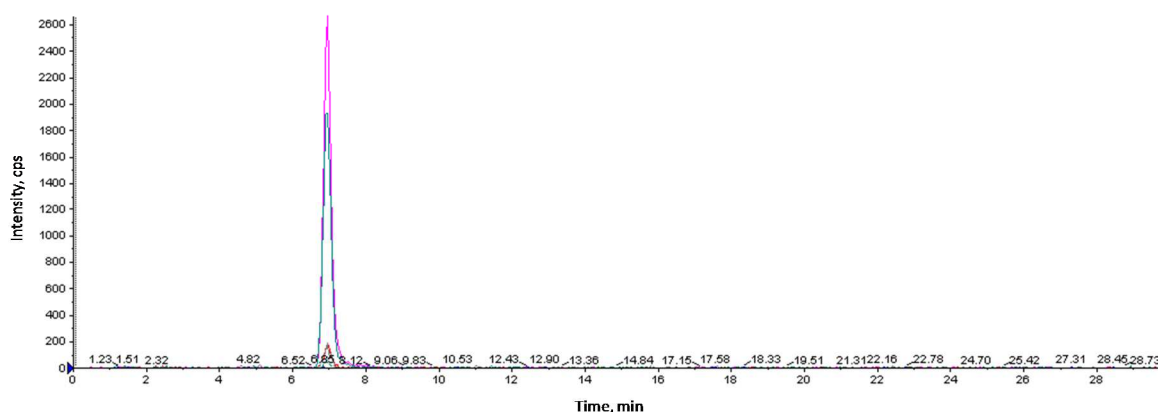


Figure II.28 : Chromatogramme pour le cerveau de souris placebo dopé avec 10 fmoles. μL^{-1} (0,0002 pmole) de $17\beta\text{-E}_2$, en utilisant le protocole SPE P-VII.

Dans le cas du cerveau, le protocole le plus performant en terme de purification est le Protocole P-VII, incluant une étape de lavage à l'hexane. En effet, la quasi-totalité des interférences est éliminée lors de l'étape de lavage (Figure II.28) démontrant ainsi l'efficacité du système SPE en ce qui concerne la purification de l'échantillon.

Ainsi, pour la suite de l'étude, le P-IV a été choisi pour la purification de $17\beta\text{-E}_2$ à partir du plasma et le P-VII pour la purification à partir du cerveau et de l'hippocampe.

II.4.5 Effet matrice

L'analyse des échantillons biologiques est rendue délicate en raison de la suppression ionique provoquée par des espèces interférentes qui proviennent de la matrice. Dans les échantillons biologiques, il y a généralement des quantités de protéines, de glucides, de lipides et de sels, dont les concentrations varient en fonction du type d'échantillon. Dans cette partie, nous avons tenté d'évaluer l'efficacité du processus de récupération (PE), de l'effet matrice (ME) et de la récupération de la molécule à analyser après l'étape d'extraction (RÉ).

Tableau II.15 : Calcul des ME, Ré et PE

Cajouté, fmoles. μL^{-1}	Aire moyenne du pic, (n=3)			Paramètre, %		
	Solution Standard (SSd)	SSd ajouté dans le plasma après la ELL et la SPE	SSd ajouté dans le plasma avant la ELL et la SPE	ME	Ré	PE
1,0	4,52E-03	5,03E-03	4,75E-03	11,4	94,3	105,0
1,5	5,60E-03	6,45E-03	6,38E-03	15,2	98,9	114,0
2,5	1,13E-02	8,66E-03	9,44E-03	23,5	109,0	83,4
5,0	1,55E-02	1,87E-02	1,86E-02	20,7	99,4	119,9
10,0	3,66E-02	3,41E-02	3,29E-02	6,8	96,6	90,0
25,0	7,05E-02	8,46E-02	7,91E-02	20,0	93,5	112,2

Les tests ont été effectués sur une gamme d'étalonnage du $17\beta\text{-E}_2$ dopé dans le plasma provenant de souris placebo. L'évaluation se fait à partir de la réponse obtenue pour la solution standard, la solution standard ajoutée dans le plasma après toutes les étapes de purification et

avant toutes ces étapes (*Tableau II.15*).[212] L'efficacité du processus de récupération obtenu lors de cette étude est de 83-120%, soit un très bon résultat. Ainsi, une petite perte de signal est observé, due aux pertes induites par l'effet matrice (7-21%) et aux pertes au cours de l'étape d'extraction (94-109%).

II.4.6 Application biologique : hippocampe, cerveau et plasma de souris

La méthode développée a été appliquée sur des échantillons de plasma, de cerveau et d'hippocampe prélevés sur des animaux (souris mâles de 14 semaines) traités avec des quantités connues de 17β -E₂ (5 animaux par conditions). Deux procédures d'administration ont été comparées : l'administration par voie sous-cutanée et l'administration *via* l'eau de boisson. Dans le cas d'administration par voie sous-cutanée, les animaux placebos ont été comparés aux souris auxquelles 3, 10 et 150 μ g de 17β -E₂ ont été injectés et qui ont été sacrifiées une heure après injection. Avec l'augmentation de la quantité injectée, une augmentation de la concentration du 17β -E₂ a été observée dans l'hippocampe et le cerveau entier (*Figure II.29*). La concentration du 17β -E₂ dans l'hippocampe était de $0,003 \pm 0,001$; $0,034 \pm 0,012$; $0,084 \pm 0,029$ et $0,927 \pm 0,416$ pmole.mg⁻¹ après l'injection respective de 0, 3, 10 et 150 μ g de 17β -E₂; elle est comparable à celle observée dans le cerveau. De même, une augmentation de la concentration de l'E₁ (dans l'hippocampe placebo $0,003 \pm 0,001$ pmole.mg⁻¹ et $0,021 \pm 0,018$ pmol.mg⁻¹ pour le traitement avec 3 μ g de 17β -E₂) et de l'E₃ (dans l'hippocampe placebo $0,004 \pm 0,002$ pmole.mg⁻¹ et $0,007 \pm 0,002$ pmole.mg⁻¹ avec 3 μ g de 17β -E₂) a été observée, tandis que le 17α -E₂ n'était pas détecté (Annexe III). De la même façon, la concentration plasmatique du 17β -E₂ était de $0,0112 \pm 0,0006$; $0,037 \pm 0,002$; $0,131 \pm 0,003$ et $1,39 \pm 0,15$ pmole. μ L⁻¹ après l'injection respective de 0, 3, 10 et 150 μ g de 17β -E₂. Dans le cas de l'E₁, une légère augmentation de la concentration plasmatique a été observée, tandis que l'E₃ n'était pas détecté dans le plasma des souris placebos et des souris ayant reçu une injection de 3 μ g de 17β -E₂ (*Figures AIII.4 et AIII.5*). En effet, dans tous les tissus une grande variabilité inter-individuelle a été observé. Contrairement à ce qui a été rapporté par Mukai *et al.*[244] pour des rats mâles, la concentration plasmatique du 17β -E₂ était proche des concentrations du 17β -E₂ dans l'hippocampe. Ceci peut être expliqué par le fait que les animaux ont été placés dans des conditions pharmacologiques (150 μ g de 17β -E₂). Les résultats d'analyse montrent que le 17β -E₂ périphérique peut pénétrer dans le cerveau en passant la barrière hémato-encéphalique en quantités significatives. Grâce à la grande sensibilité de la méthode, il a été possible de doser le 17β -E₂ chez les mâles du groupe placebo (par exemple $0,003 \pm 0,001$ pmole.mg⁻¹ dans l'hippocampe).

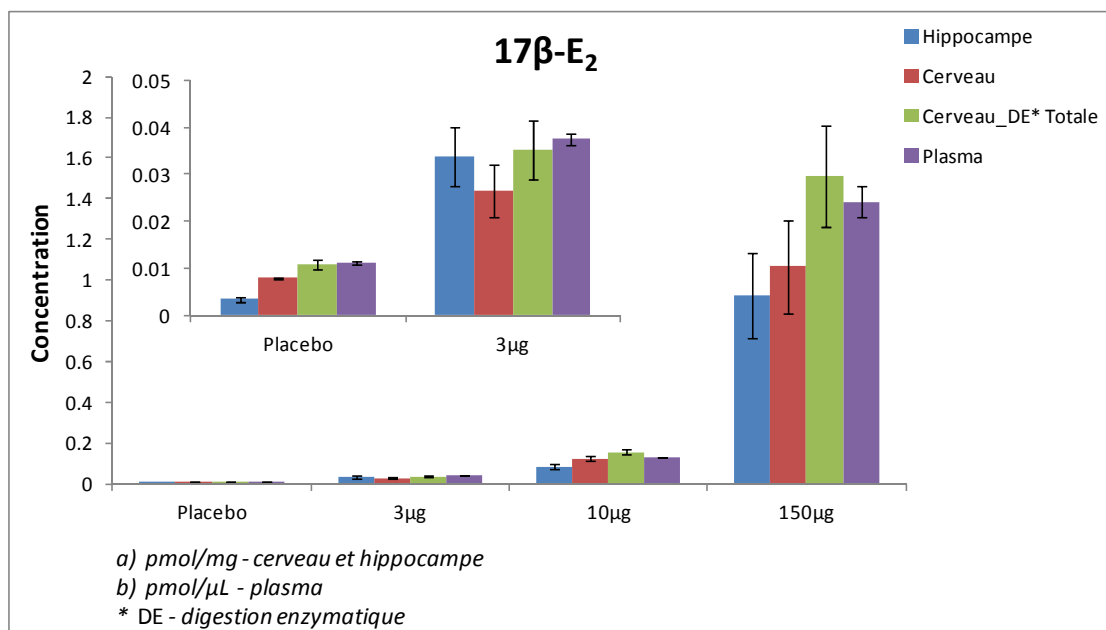


Figure II.29 : Concentration du 17β-E₂ dans les tissus de jeunes souris après injection par voie sous-cutanée de différentes concentrations du 17β-E₂. Souris de 4 mois : Placebo (n=5) – jeunes souris placebos, 3 μg (n=5), 10 μg (n=5) et 150 μg (n=5) – jeunes souris ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3, 10 et 150 μg du 17β-E₂; 5 analyses HPLC-ESI(-)-MS/MS pour chaque souris ; Les barres d'erreurs reflètent la variabilité inter-individuelle

Dans le cas d'animaux ayant reçus une injection de 150 μg de 17β-E₂, deux types de résultats sont apparus. Tout d'abord, des niveaux très variables entre les souris de concentration du 17β-E₂ dans le cerveau entier ont été trouvés. Cette variabilité peut être expliquée par la forte hétérogénéité de cet organe, avec différents domaines, y compris les ventricules, contenant un liquide céphalo-rachidien. En outre, lors du prélèvement du cerveau, les ventricules et leur contenu liquide en 17β-E₂ peut être perdu. De plus, d'un individu à l'autre, certaines différences anatomiques et physiologiques peuvent également être observées. D'autres différences inter-individuelles peuvent être observées au niveau de l'efficacité des transporteurs de la barrière hémato-encéphalique. Par contre, les concentrations mesurées dans l'hippocampe et le plasma sont beaucoup moins variables. Encore une fois, ce résultat reflète une situation d'administration de type pharmacologique.

La méthode LC-MS/MS mise au point ne permet de doser que les formes libres des œstrogènes. Comme cela a déjà été mentionné, tous ces composés existent également dans le cerveau et le plasma sous la forme de conjugués hydrosolubles (glucuronides et sulfates). L'introduction d'une étape supplémentaire de digestion enzymatique (DE), *i.e.* une réaction de déconjugaison avec l'enzyme β-glucuronidase / arylsulfatase (incubation pendant une nuit à 37°C de l'échantillon biologique), permettra d'évaluer la contribution des formes conjuguées.

On peut remarquer que la concentration du 17β -E₂ n'augmente pas après l'hydrolyse des conjugués glucuronides et sulfates. Cela suggère fortement que le 17β -E₂ est principalement présent dans le cerveau sous forme libre, à la différence d'autres tissus.

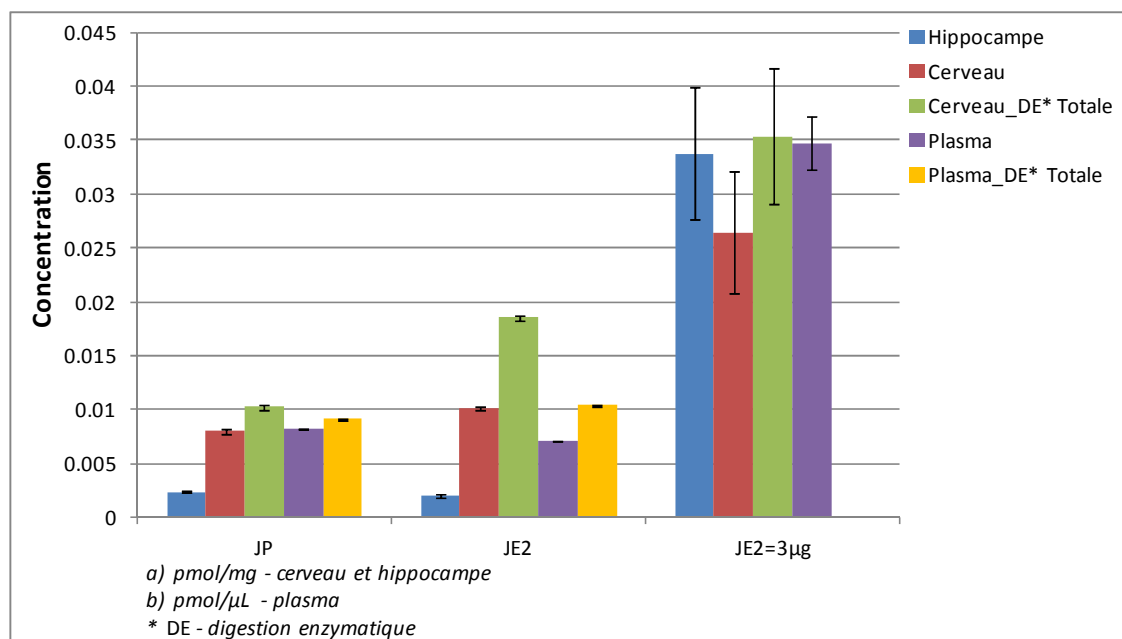


Figure II.30 : Comparaison entre les souris jeunes ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3μg du 17β -E₂, et les souris jeunes traitées avec une eau de boisson contenant 1 μM 17β -E₂. JP (n=5) – jeune placebo, JE2 (n=6) – jeunes souris traitées avec du 17β -E₂ dans leur eau de boisson, JE2=3μg (n=5) – jeunes souris ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3 μg du 17β -E₂; 5 analyses HPLC-ESI(-)-MS/MS pour chaque souris ; Les barres d'erreurs reflètent la variabilité inter-individuelle

Avec le protocole d'administration dans l'eau de boisson (*Figure II.30*), une faible augmentation du 17β -E₂ (et de l'E₁) a été observée dans tous les tissus de souris ayant reçu ce traitement. L'augmentation n'est pas significative dans le cas de l'E₃ (*Figure AIII.8*). Les niveaux atteints après administration dans l'eau de boisson (par exemple, dans le cerveau $0,0101 \pm 0,0004$ pmole.μL⁻¹ pour 17β -E₂) sont inférieurs aux niveaux obtenus avec les doses les plus basses injectées (dans le cerveau, $0,026 \pm 0,011$ pmole.μL⁻¹ pour 3μg du 17β -E₂ injecté). Dans tous les cas, l'augmentation reste faible et probablement dans une gamme physiologique.

II.5 CONCLUSIONS

Au cours de ce chapitre, le développement d'une méthode LC-MS/MS des œstrogènes a été entrepris, de la recherche des conditions optimales de détection MS/MS à la préparation des échantillons biologiques. L'importance du pH de la phase mobile sur la sélectivité de la séparation et la qualité de la détection par LC-MS/MS a été mise en évidence. Les résultats obtenus ont montré l'influence des additifs à des teneurs très faibles et l'amélioration du signal pour les solutions à un pH proche du pKa des analytes (0,1% TEA, pH = 11,2). Le développement d'une méthode d'analyse implique aussi le choix des transitions pour la quantification et la validation, et l'optimisation des paramètres instrumentaux pour chaque transition MRM (DP, CE et CXP). Il apparaît clairement qu'il est également nécessaire d'optimiser différents paramètres tels que le volume d'échantillon injecté et le *dwell time* qui ont une influence sur les intensités et l'allure des pics.

La méthode HPLC-ESI(-)-MS/MS a été validée selon quatre critères :

- le choix de l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ qui est spécifique aux molécules à analyser (m/z 271,3 pour 17β - et 17α -E₂, m/z 269,3 pour E₁ et m/z 287,3 pour E₃) ;
- une transition pour la quantification (271,3 $\rightarrow$ 145,1 pour 17β -E₂). L'ion fragment choisi pour cette transition provient de l'ion pseudo-moléculaire (dans notre cas, cet ion fragment est commun à tous les œstrogènes étudiés),
- une autre transition pour la validation (271,3 $\rightarrow$ 183,1 pour 17β - et 17α -E₂, 269,3 $\rightarrow$ 143,0 pour E₁ et 287,3 $\rightarrow$ 143,0 pour E₃);
- le temps de rétention des analytes : dans nos conditions, t_r = 8,95 min pour E₁, t_r = 6,9 min pour 17β -E₂, t_r = 8,09 min pour 17α -E₂ et t_r = 2,6 min pour E₃.

D'autre part, le système chromatographique a été optimisé. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Gemini C18 en phase inverse. L'élution étant réalisée par gradient, en utilisant l'eau + 0,1% TEA comme éluant A et l'acétonitrile + 0,1% TEA comme éluant B. Afin de valider la méthode, le système a été évalué en termes de LOD (0,5 fmole. μ L⁻¹ pour 17β -E₂ et 17α -E₂; 0,01 fmole. μ L⁻¹ pour E₁; 0,025 fmole. μ L⁻¹ pour E₃) et LOQ (2,5 fmole. μ L⁻¹ pour 17β -E₂ et 17α -E₂; 0,05 fmole. μ L⁻¹ pour E₁; 0,1 fmole. μ L⁻¹ pour E₃), linéarité de réponse (> 0,99) et reproductibilité (CV = 0,4 – 15,8% en intra-jour et de 1,2 – 20% en inter-jours). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles recensées dans la littérature pour d'autres dosages des stéroïdes en HPLC-MS/MS.

La dernière partie de ce chapitre présente la mise au point d'une méthode d'extraction des œstrogènes. Dans le but de réaliser l'extraction des analytes en utilisant une seule cartouche SPE, plusieurs types de support ont été testés, notamment les supports échangeurs de cations, les supports hydrophiles-lipophiles et le support hydrophobe C18. Comme malheureusement aucun des supports testés ne nous a offert la possibilité de réaliser l'extraction totale des œstrogènes, nous avons choisi les cartouches Strata C18 et Strata X qui offrent une récupération légèrement meilleure que les autres cartouches. En conditions optimales, les meilleurs résultats sont obtenus sur le support C18. Cependant, nous avons remarqué que l'étape d'évaporation était une cause majeure de perte de l'analyte et nous avons essayé d'améliorer cette étape en comparant deux types d'évaporation. Finalement, nous avons décidé d'évaluer les taux de récupération ($109 \pm 12\%$) à partir de solutions standards après leur évaporation.

La cartouche sélectionnée a été testée avec succès pour l'extraction d'un échantillon de cerveau souris dopé avec le 17β -E₂ et de plasma de souris placebo. La méthode SPE mise au point permet une bonne purification à partir du plasma. Cette méthode n'est pas valable pour le cerveau, qui est une matrice plus visqueuse et riche en lipides. L'alternative a été l'utilisation de l'hexane lors de l'étape de lavage qui permet une élimination plus rigoureuse des interférences.

La méthode a été validée sur des échantillons de plasma, de cerveau et d'hippocampe prélevés sur des animaux traités avec des quantités connues de 17β -E₂. Deux procédures d'administration ont été comparées : l'administration par voie sous-cutanée et l'administration *via* l'eau de boisson. Les résultats d'analyse ont montré que le 17β -E₂ périphérique peut pénétrer dans le cerveau, en passant en quantités significatives la barrière hémato-encéphalique. Grâce à la grande sensibilité de la méthode, il a même été possible de doser le 17β -E₂ chez les mâles du groupe placebo ($0,003 \pm 0,001$ pmole.mg⁻¹ dans l'hippocampe).

CHAPITRE III:
ANALYSE DE L'ESTRADIOL PAR LC-MS/MS APRÈS
DÉRIVATION CHIMIQUE

III.1 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DU 17 β -E₂

Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre, les œstrogènes ne présentent pas de fortes propriétés d'absorption dans l'UV ou d'ionisation efficace en spectrométrie de masse. Pour cette raison, de nombreux laboratoires utilisent la dérivation chimique afin d'améliorer la sensibilité de détection et d'augmenter le taux d'ionisation suite à l'introduction de groupements facilement ionisables. La dérivation implique la modification définitive de la structure de la molécule, ce qui peut également changer sa polarité et faciliter son isolement/séparation par chromatographie de type phase inverse.

Nous avons cherché à élaborer une méthode de dérivation chimique applicable au 17 β -E₂ et à déterminer le choix du meilleur agent de dérivation pour sa quantification par spectrométrie de masse dans des échantillons biologiques. Le produit résultant de cette dérivation doit avoir des caractéristiques fiables en LC-ESI-MS/MS (signal intense et ions fragments spécifiques). Une fois l'agent de dérivation choisi et la méthode mise au point, nous pourrions comparer les deux analyses LC-ESI-MS/MS, avec ou sans dérivation, sur les mêmes standards et échantillons biologiques. Il nous sera alors possible de faire un choix entre les deux méthodes afin de n'utiliser, dans nos applications futures, que la méthode la plus adaptée à la sensibilité requise.

Les principaux agents de dérivation utilisés pour la dérivation des œstrogènes ont été présentés dans le Chapitre I de ce manuscrit (paragraphe I.2.6.). Le 17 β -E₂ possède à la fois un groupement hydroxyle phénolique et un groupement hydroxyle aliphatique. Dans ce cas, il est possible d'appliquer une dérivation des deux groupements ou spécifiquement de l'un d'eux. Pour les composés phénoliques tels le 17 β -E₂, la réaction d'estérification est en général la plus utilisée. A ce jour, un nombre restreint d'agents de dérivation a été décrit dans la littérature.[170, 171, 182, 186, 188, 191, 196] Un seul parmi eux a trouvé une application relativement large dans le dosage des échantillons biologiques. Il s'agit du chlorure de dansyle (Dns-Cl) (*Figure III.1*). Ainsi, dans le cas du 17 β -E₂, la sensibilité de l'instrument pour le dérivé dansylé s'est avérée 8 fois supérieure que pour la molécule non dérivée.[245] Le Dns-Cl est un agent de dérivation intéressant car il contient une fonction chlorosulfonyle qui peut facilement réagir avec des phénols. De plus, la présence de la fonction amine tertiaire facilite la préformation d'ions dans une phase mobile acide et le motif diméthylamino-naphtyle fournit un ion de fragmentation (m/z 171) très intense souvent utilisé pour la quantification. Cependant, l'analyse MS/MS du dérivé 17 β -E₂-Dns fournit surtout des ions fragments principalement caractéristiques du motif structural du chlorure de dansyle. De plus, le chlorure de dansyle étant hautement réactif vis-à-vis des composés comportant des groupements hydroxyle et amine,

d'autres composés présents dans l'échantillon pourraient être modifiés et interférer avec la détection de 17β -E₂. Ceci impose la mise en place d'une méthodologie de préparation d'échantillon bien spécifique.

Le début de ce travail a été inspiré par les travaux de Xu *et al.* sur l'utilisation d'autres agents chlorosulfonylés, tels que les réactifs DMSI-Cl (1,2-diméthylimidazole-4-sulfonyl chloride), PBS-Cl (4-(1H-pyrazol-1-yl) benzenesulfonylchloride) et PS-Cl (pyridine-3-sulfonyl chloride) (*Figure III.1*).[170] Après comparaison des trois agents de dérivation, les auteurs ont déterminé que le PS-Cl était le plus approprié : le 17β -E₂-PS a montré un taux d'ionisation supérieur aux autres dérivés en ESI et a présenté des fragments spécifiques en MS/MS. Il a été ensuite utilisé pour l'analyse de 17β -E₂ dans le sérum humain par LC-MS/MS en mode MRM.

Nous avons donc décidé de réaliser des tests de dérivation de 17β -E₂ avec les quatre agents chlorosulfonylés connus, ainsi qu'avec le chlorure de quinoline-8-sulfonyl (Q8S-Cl) qui n'avait jamais été testé auparavant dans ce rôle. Nous avons également recherché de nouveaux agents de dérivation potentiellement applicables au dosage des œstrogènes. Notre choix s'est arrêté sur six composés de plus qui sont tous des réactifs commercialement disponibles et bon marché (*Figure III.1*). Ils appartiennent à d'autres classes chimiques et peuvent fonctionnaliser le 17β -E₂ de façon différente. Il s'agit d'un sulfonylisocyanate (*p*-Toluènesulfonylisocyanate (*p*TSI)), de quatre isocyanates (4-Nitrophényl isocyanate (NO₂PhI), Phenylisocyanate (PhI), 4-(Diméthylamino)phenylisocyanate (DMAPI) et 4-Fluorophényl isocyanate (FPhI) et d'un chlorure d'acide (chlorure de (4-diméthylamino)-benzoyl (DMABC)). Certains d'entre eux ont déjà été décrits dans la littérature pour la dérivation d'autres stéroïdes.[180, 181, 246]

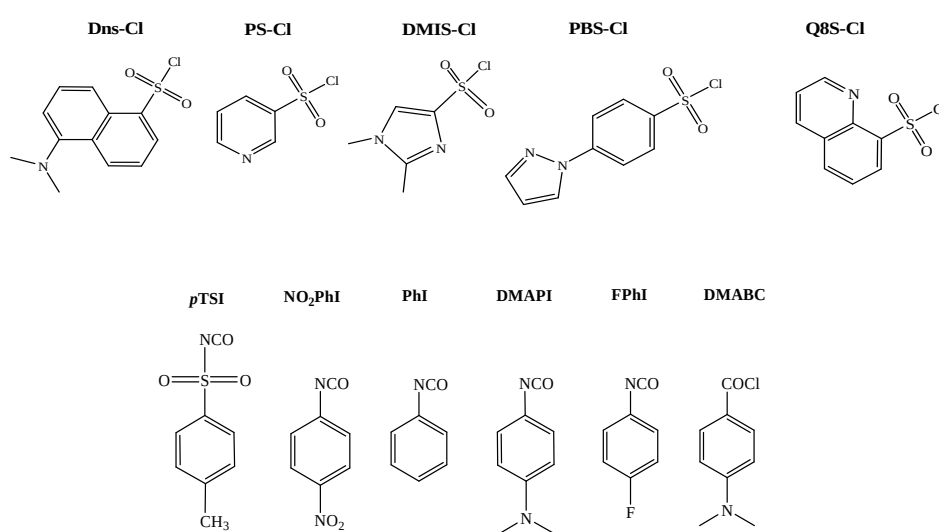


Figure III.1 : Structure des agents de dérivation utilisés dans cette étude

Tout d'abord, les conditions optimales de dérivation ont été recherchées à partir de 17 β -E₂ en solutions modèles. Il est bien connu que le rendement de réaction chimique dépend de plusieurs paramètres tels que la nature de solvant et le catalyseur choisis, le nombre d'équivalent d'agent de dérivation ou encore le temps et la température de réaction. Ici, il ne s'agit pas forcément des conditions optimales pour le traitement des échantillons biologiques, l'objectif premier était la rapide obtention de tous les dérivés cibles avec un minimum de purification. Après la réaction, les produits de synthèse ont été isolés et purifiés si nécessaire, puis caractérisés par des méthodes d'analyse structurale (Annexe IV). Le but final de ce travail en synthèse chimique était d'avoir des dérivés de 17 β -E₂ purs (+95%) et en quantité suffisante pour pouvoir évaluer leurs propriétés en spectrométrie de masse et leur stabilité en solution non anhydre.

Finalement, la synthèse des dérivés du 17 β -E₂ a été réalisée en utilisant trois protocoles, développés à partir des données de la littérature et récapitulés dans le *Tableau III.1*:

Protocole A [170]: La quantité de stéroïde choisie est diluée dans le solvant (acétone pour les chlorures de sulfonyl et acétonitrile pour les isocyanates) puis introduit dans un bicol. Le même processus de dissolution est répété avec l'agent de dérivation dans le même solvant. La deuxième solution est ajoutée à la première, puis le mélange est mis sous agitation. Une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃ 2M) est ajoutée jusqu'à l'obtention du pH = 10. Pour le PS-Cl, la base triéthylamine a été utilisée. La réaction est réalisée à 60°C sous agitation pendant 40 min. Une fois ce temps écoulé, une solution à 0,1 % d'ammoniaque (NH₄OH) est ajoutée dans le ballon uniquement pour les isocyanates. Le solvant organique est évaporé sous pression réduite, puis le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (EtOAc). Les phases organiques sont rassemblées, puis lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu récupéré est séché sous vide.

Protocole B [247]: La quantité de stéroïde choisie est introduite dans un ballon à fond rond avec du dioxane. La solution est placée sous agitation et refroidie à 10-15°C. Une fois cette température atteinte et la dissolution complète du stéroïde observée, 2-3 gouttes de TEA sont ajoutées. Après 5-10 min, l'isocyanate, préalablement dissout dans un mélange dioxane anhydre et toluène anhydre (1:1), est introduit dans le ballon. L'agitation est maintenue deux/trois heures à 10-15°C, puis une nuit à température ambiante. La solution est évaporée et le résidu récupéré est séché sous vide. Le solide obtenu est alors dissout dans la quantité minimale de méthanol puis de l'eau est ajoutée par petites portions pour faire précipiter le réactif.

Le produit solide est alors récupéré par filtration et séché dans un dessiccateur sous vide.

Protocole C [246, 248]: La quantité de stéroïde choisie est introduite dans un tube Eppendorf et dissoute dans de l'acétone. Le même processus de dissolution est répété avec l'agent de dérivation (DMABC) dans le même solvant. La réaction est effectuée à 55-60°C sous agitation pendant 10 min. L'ajustement du pH n'est pas nécessaire. La solution est ensuite évaporée et séchée.

♦ Synthèse des dérivés de type ester sulfonique

Les chlorures de sulfonyle ($\text{RSO}_2\text{-Cl}$) réagissent rapidement avec le $17\beta\text{-E}_2$; la réaction est conduite à 60°C dans un mélange acétone/eau (50/50, v/v) en présence de bicarbonate de sodium (2M, pH=10).

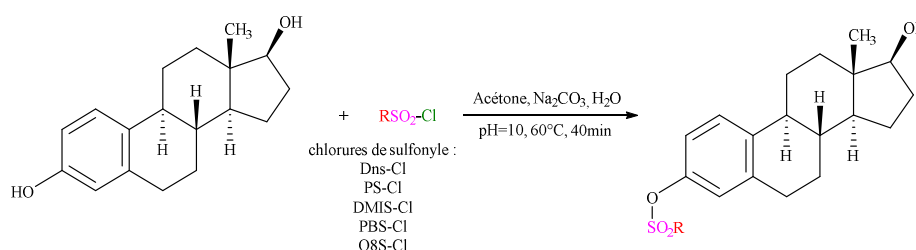


Figure III.2 : Synthèse des sulfonates du $17\beta\text{-E}_2$

Dans ce cas, la dérivation se fait préférentiellement sur le groupement hydroxyle phénolique (Figure III.2). Aucune purification n'a été nécessaire pour les dérivés $17\beta\text{-E}_2\text{-DMIS}$ et $17\beta\text{-E}_2\text{-Q8S}$ compte tenu de la pureté des produits brut obtenus (vérifiée par RMN). Pour les trois autres dérivés ($17\beta\text{-E}_2\text{-Dns}$, $17\beta\text{-E}_2\text{-PS}$ et $17\beta\text{-E}_2\text{-PBS}$) la réaction n'était pas totale dans ces conditions et une purification par chromatographie sur silice a été nécessaire pour isoler les dérivés purs.

♦ Synthèse du dérivé tosyl carbamate

Les sulfonylisocyanates ($\text{R-SO}_2\text{-NCO}$) sont des composés avec une très forte activité nucléophile. Avec des alcools et des phénols, ils réagissent de manière similaire aux isocyanates pour donner des dérivés uréthane. En général, la réaction est instantanée et ne nécessite pas de catalyseur.[249] Le sulfonylisocyanate peut réagir facilement avec l'eau et générer le sulfamide. Ainsi, l'excès de réactif est éliminé par hydrolyse.[180]

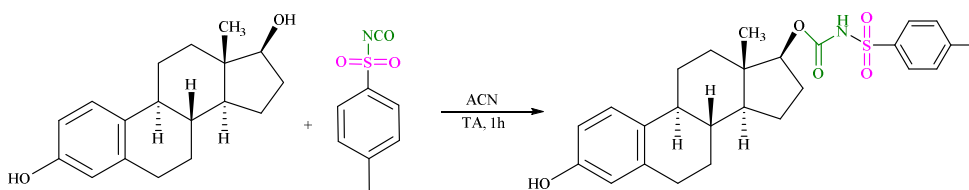


Figure III.3 : Synthèse du dérivé tosyl carbamate

Contrairement à la dérivation avec les chlorures de sulfonyle, la synthèse se fait sur le groupement hydroxyle aliphatique (Figure III.3). Dans nos conditions, la réaction n'était pas totale et une purification par chromatographie sur silice a été nécessaire pour isoler le dérivé pur.

♦ Synthèse des dérivés carbamate

L'utilisation des isocyanates (R-NCO) pour la dérivation des stéroïdes a été décrite dans la littérature pour la première fois en 2012. [181] Ayciriex *et al.* ont employé le DMAPI pour la quantification du cholestérol et d'autres oxystérols dans le cerveau du rat. Dans le dichlorométhane et en présence de la TEA (2h à 65°C), la dérivation s'effectue uniquement sur une fonction hydroxyle aliphatique. Il n'était pas possible d'appliquer le même protocole pour la dérivation du 17 β -E₂ à cause de sa faible solubilité dans le solvant utilisé.[250] Pour trouver les conditions adaptées au 17 β -E₂, les premiers tests ont été menés avec le NO₂PhI. Les protocoles A et B ont été appliqués. Pour le protocole A, l'acétonitrile (ACN) a été choisi pour sa miscibilité avec l'eau qui est forcément présente dans les échantillons biologiques et pour améliorer la solubilisation des réactifs. Dans le protocole B, trouvé dans la littérature, la combinaison de deux solvants de polarité distinctes (dioxane/toluène) a été utilisée pour assurer la solubilisation totale de différents mélanges isocyanate/phénol [247].

Comme le 17 β -E₂ a deux fonctions hydroxyle, une phénolique et une aliphatique, l'isocyanate peut agir avec l'une et l'autre, et donner un mélange de plusieurs produits d'addition (positions 3- et/ou 17-). L'utilisation de la TEA comme base favorise la substitution de l'hydroxyle phénolique du 17 β -E₂. En l'absence de catalyseur (TEA), l'addition sur l'hydroxyle aliphatique est plus présente, ce qui a bien été observé avec le protocole A. Dans les deux protocoles (A et B), la synthèse se fait préférentiellement sur l'hydroxyle phénolique.

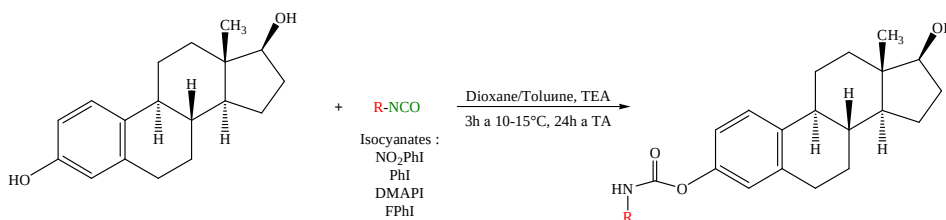


Figure III.4 : Synthèse des dérivés carbamate du 17 β -E₂

Pour les autres isocyanates, PhI, DMAPI et FPhI, seules les dérivations dans les conditions B ont pu être réalisées. Tous les produits isolés ont été substitués en position 3-,

(Figure III.4). Comme la réaction n'était pas complète dans les conditions utilisées (qui peuvent être améliorées par exemple par utilisation d'un excès d'isocyanate), une purification par chromatographie sur colonne ou par recristallisation a été nécessaire pour isoler le dérivé pur.

♦ **Synthèse du dérivé benzoylé**

Dans ce cas, le 17β -E₂ réagit rapidement (10 min) et dans des conditions modérées avec le groupe chlorure d'acide DMABC (Protocole C). [246, 248] Cette réaction a été réalisée dans les conditions de dérivation d'échantillon biologique, le produit de synthèse n'a pas été isolé pour la caractérisation structurale plus détaillée. Le produit brut de la réaction a été directement utilisé pour les analyses MS et MS/MS en infusion.

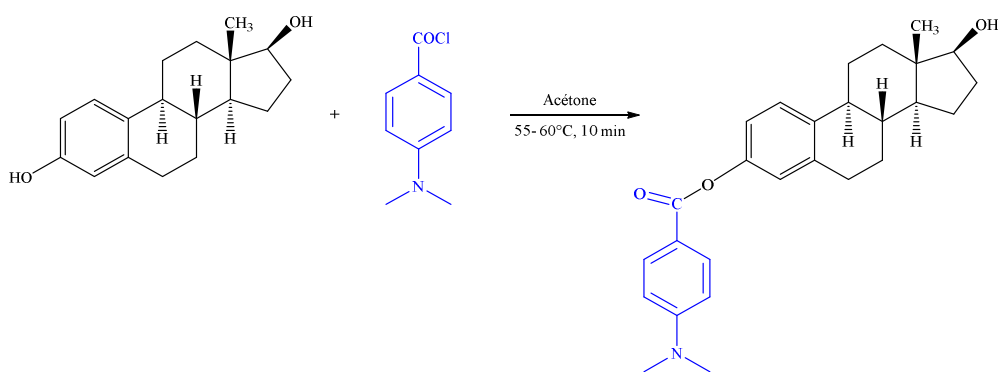


Figure III.5 : Synthèse du dérivé benzoylé

Tableau III.1 : Conditions des synthèses et caractéristiques des produits obtenus

Agent de dérivation	PS-Cl×HCl	Dns-Cl	DMIS-Cl	PBS-Cl	Q8S-Cl	pTSI	NO ₂ PhI		PhI	DMAPI	FPhI	DMABC
<i>M (g.mol⁻¹)</i>	214,07	269,64	194,64	242,69	227,67	197,21	164,22		119,12	162,19	137,11	183 ,63
<i>Protocole</i>	A	A	A	A	A	A	A et B		B	B	B	C
<i>Quantité du 17β-E₂</i>	0,5 mmoles											2 μmoles
<i>Nb d'éq d'agent de dérivation</i>	5 éq	5 éq	5 éq	5 éq	5 éq	1,5 éq	1,5 éq	1,5 éq	1,5 éq	1,5 éq	1,5 éq	1 éq
<i>Base</i>	TEA	Na ₂ CO ₃	Na ₂ CO ₃	Na ₂ CO ₃	Na ₂ CO ₃	-	-	TEA	TEA	TEA	TEA	-
<i>Solvant</i>	Acétone	Acétone / H ₂ O	Acétone / H ₂ O	Acétone / H ₂ O	Acétone / H ₂ O	ACN	ACN	Dioxane / Toluène	Dioxane / Toluène	Dioxane / Toluène	Dioxane / Toluène	Acétone
<i>Conditions de réaction</i>	3h à 60°C	40 min à 60°C	3h à 60°C	4h à 60°C	40 min à 60°C	1h à TA	1h à TA	2/3h à 10-15°C puis 24h à TA	2/3h à 10-15°C puis 24h à TA	2/3h à 10-15°C puis 24h à TA	2/3h à 10-15°C puis 24h à TA	10 min à 55-60°C
<i>Purification</i>	C (dépôt solide) DCM /MeOH 98:2	C (dépôt solide) DCM /MeOH 98:2	–	C (dépôt solide) DCM /MeOH 98:2	–	C EtOAc/P 70:30	C Et ₂ O/P 70:30	R MeOH/H ₂ O	R MeOH/H ₂ O	C DCM / MeOH 98:2	R MeOH / H ₂ O	–
	Caractéristiques des produits obtenus											
<i>M (g.mol⁻¹)</i>	413,20	505,50	430,50	478,50	463,64	469,32	436,51		391,50	434,58	409,40	419,40
<i>Aspect</i>	Solide jaune pâle	Solide jaune pâle	Solide jaune pâle	Solide jaune pâle	Solide jaune pâle	Solide jaune pâle	Solide jaune vif		Solide blanc	Solide blanc	Solide blanc	Solide Jaune
<i>R-tion sur le 17β-E₂</i>	3	3	3	3	3	17	3		3	3 et 17	3	-
<i>Rdt, %</i>	66	76	72	62	88	98	66	72	74	62	66	ND

TA : Température Ambiante, M: Masse molaire, C: Chromatographie sur colonne, R: Recristallisation, Rdt : Rendement après la purification, ND : Non Déterminé.

III.2 CHOIX DE L'AGENT DE DERIVATION

Comme mentionné dans le Chapitre II, la détermination des ions précurseurs et des ions fragments reste déterminante pour le développement d'une méthode LC-MS/MS, car elle affecte la spécificité et la sensibilité de l'analyse. De ce fait, le travail de synthèse des dérivés du 17 β -E₂ se poursuit par l'analyse en MS et MS/MS en infusion, dont le but est de trouver le produit de dérivation qui augmente le plus le taux d'ionisation du 17 β -E₂. L'autre critère de sélection est la génération des ions fragments spécifiques à la molécule dérivée entière et non seulement aux motifs présents sur les réactifs de départ (le 17 β -E₂ ou l'agent de dérivation uniquement).

III.2.1 Détermination des ions précurseurs

La première étape est la détermination des ions précurseurs spécifiques à chaque composé selon le mode d'ionisation. L'analyse a été effectuée sur des solutions de produits dérivés dissouts dans acétonitrile : eau (80/20, v/v) à concentration de 100 fmoles. μ L⁻¹. Les tests ont été réalisés dans les deux modes d'ionisation avec ajout de 0,1 % d'acide formique (HCOOH) en mode positif et de 0,1 % de triéthylamine (TEA) en mode négatif. L'analyse a été effectuée par infusion directe dans la source ESI via un pousse-seringue, à un débit de 7 μ L.min⁻¹. Les intensités des ions des dérivés obtenus sont illustrées sur la *Figure III.6*.

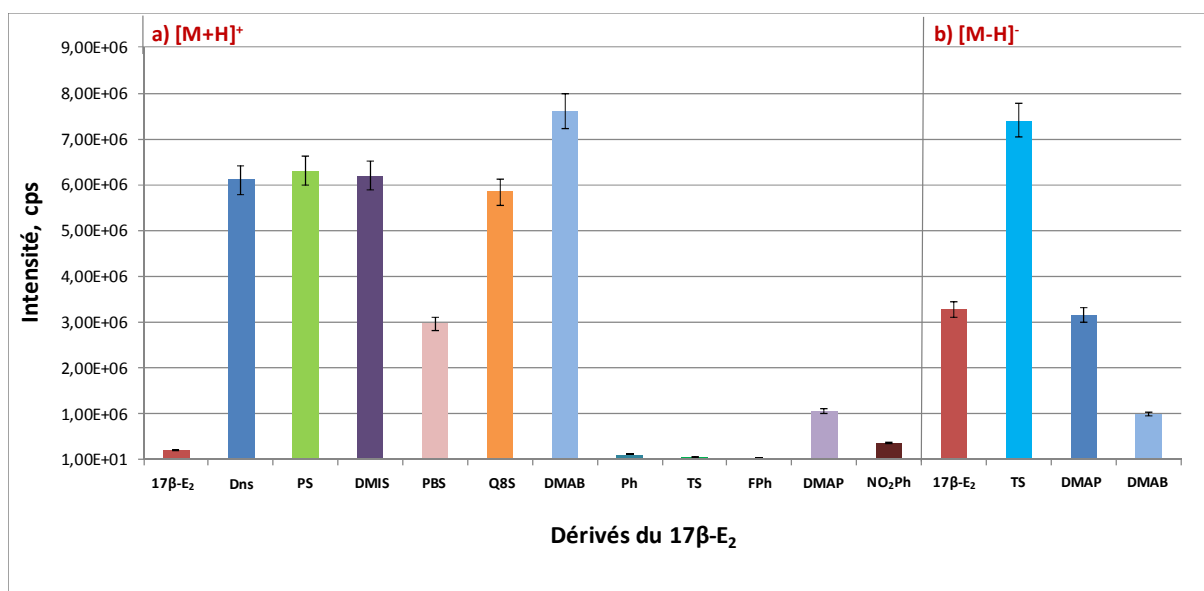


Figure III.6 : Capacité d'ionisation des dérivés du 17 β -E₂ par rapport à 17 β -E₂ non-dérivé, en **a)** ESI(+)-MS et **b)** ESI(-)-MS

La majorité des dérivés sont facilement ionisés en mode positif et conduisent à un ion précurseur sous forme protonée [M+H]⁺. Les dérivés avec Dns, PS, DMIS, Q8S et DMAB

augmentent considérablement l'intensité du signal en mode positif (environ un facteur 30) par rapport au signal du 17 β -E₂ sans dérivation. L'intensité a été également améliorée en mode positif après la dérivation avec les agents PBS-Cl, DMAPI et NO₂PhI, mais dans une moindre mesure. En mode négatif, l'analyte génère un ion précurseur sous forme déprotonée [M-H]⁻. Seuls les dérivés 17 β -E₂-TS, 17 β -E₂-DMAP et 17 β -E₂-DMAB sont ionisés, le 17 β -E₂-TS étant l'unique dérivé qui augmente l'intensité de signal par rapport à celui du 17 β -E₂ non-dérivé. Comme le 17 β -E₂-Q8S n'a jamais été testé auparavant (contrairement aux autres dérivés 17 β -E₂-Dns, 17 β -E₂-PS, 17 β -E₂-DMIS et 17 β -E₂-DMAB) et qu'il augmente considérablement le signal de l'Estradiol, il semble être le dérivé le plus intéressant à étudier par la suite.

III.2.2 Détermination des ions fragments

Les 11 dérivés synthétisés précédemment ont été ensuite étudiés par MS/MS. En analysant tous les ions fragments générés par chaque ion précurseur, il est possible de sélectionner le dérivé qui a produit des ions fragments spécifiques et de forte abondance. Comme la fragmentation des ions précurseurs donne des ions fils dont l'abondance dépend de l'énergie de collision appliquée, nous avons recherché d'abord à optimiser les paramètres instrumentaux. Les spectres de fragmentation des dérivés du 17 β -E₂ sont représentés dans la *Figure III.7* pour le mode positif et dans la *Figure III.8* pour le mode négatif. Les ions précurseurs, leurs ions fragments et l'énergie de collision appliquée sont répertoriés en *Annexe V*. Ensuite nous tenterons d'expliquer les ions fragments issus de la dissociation induite par collision (CID) sur les ions protonés et déprotonés de chaque dérivé.

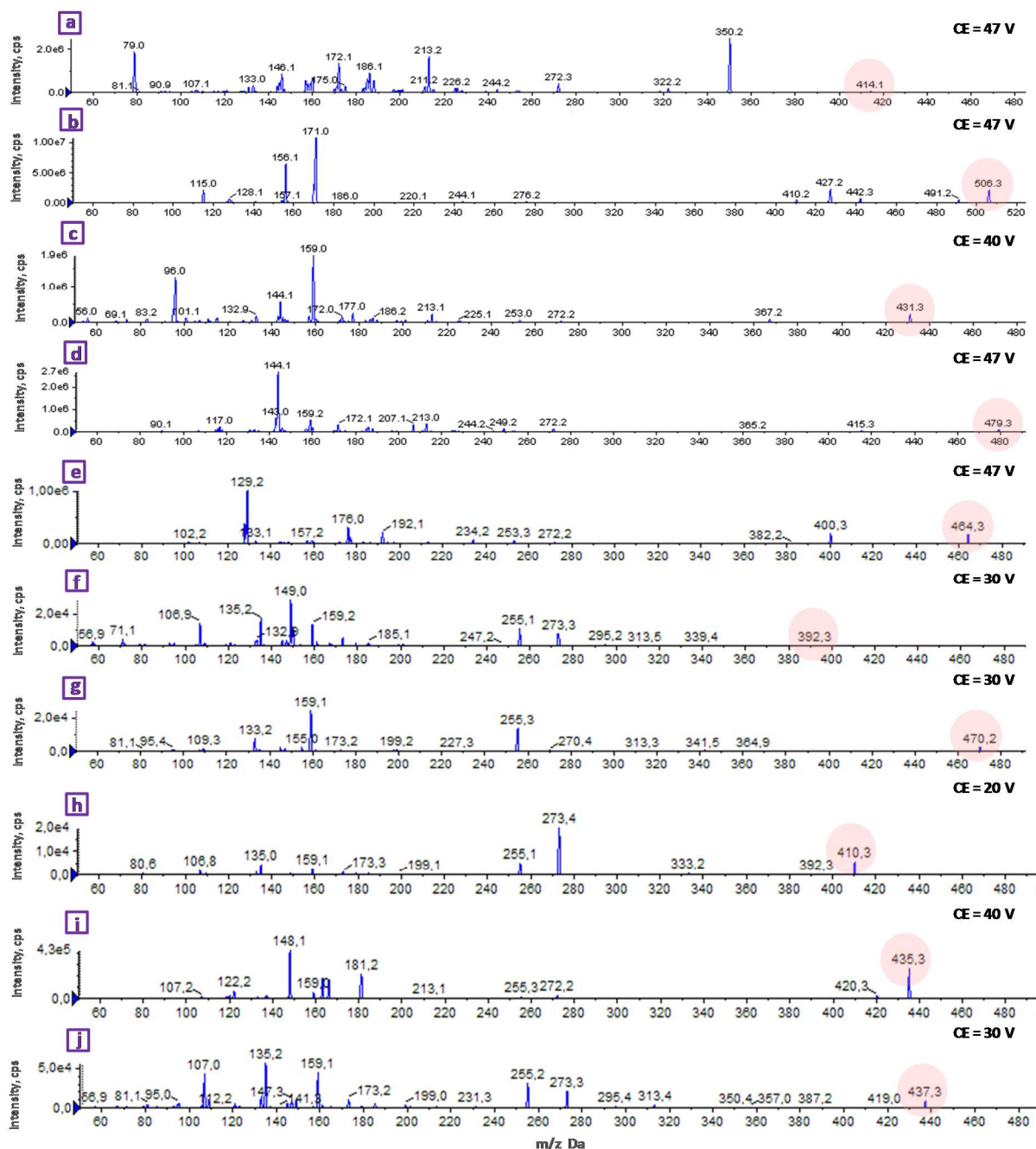


Figure III.7 : Spectres ESI(+)-MS/MS des dérivés du 17 β -E₂, **a)** PS, **b)** Dns, **c)** DMIS, **d)** PBS, **e)** Q8S, **f)** Ph, **g)** TS, **h)** FPh, **i)** DMAP et **j)** NO₂Ph

* Les ions moléculaires [M+H]⁺ sont différenciés par le fond rose

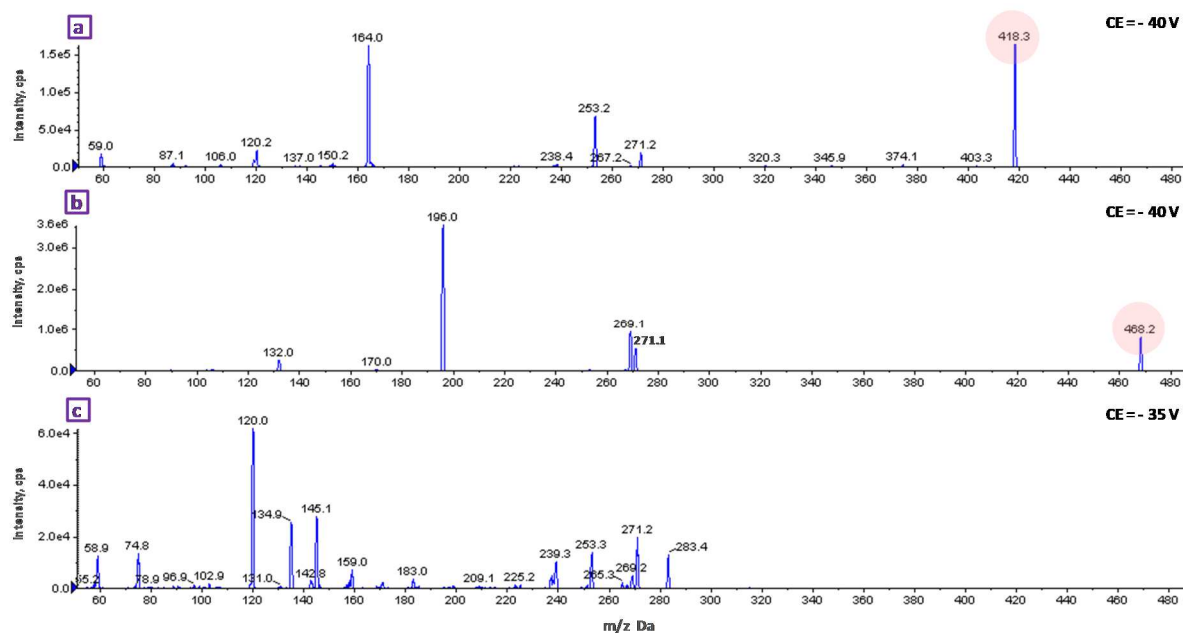


Figure III.8 : Spectres ESI(-)MS/MS des dérivés du 17 β -E₂ : **a)** DMAB, **b)** pTS et **c)** DMAP

* Les ions moléculaires [M-H]⁻ sont différenciés par le fond rose

En mode positif, la CID sur l'ion protoné [M+H]⁺ du 17 β -E₂-Dns (Figure III.9) conduit à un ion fragment significatif abondant à m/z 171, représentant le groupement 5-(diméthylamino)naphtyle, formé après la coupure homolytique de la liaison C-S entre le naphtalène et le groupe sulfonyle.[251, 252]

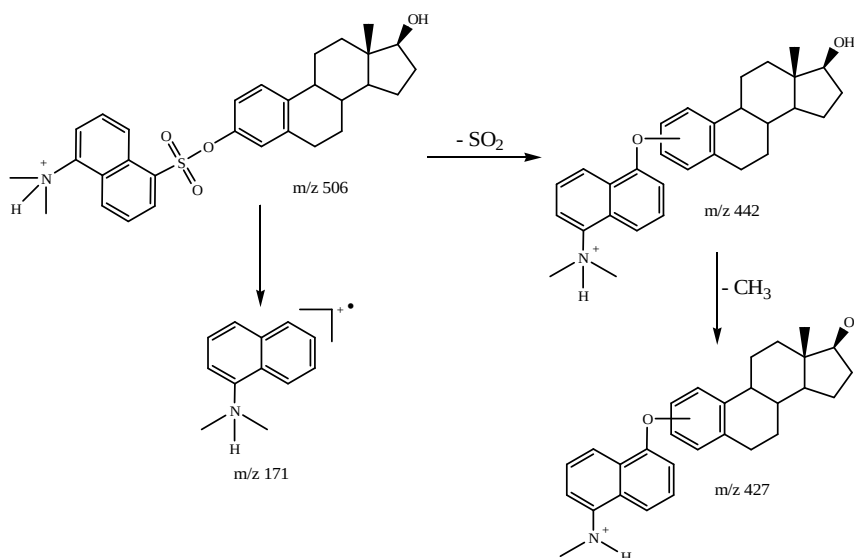


Figure II.9 : Fragmentation de la molécule protonée du 17 β -E₂-Dns [251]

Un autre fragment spécifique de la molécule dérivée à m/z 442 résulte de la perte de SO₂ suivie d'un réarrangement. Cette perte a été observée dans les spectres MS/MS des dérivés dansyle de certains composés phénoliques [252, 253]. Cette perte de SO₂ est caractéristique de la majorité des dérivés sulfonates. Un autre ion à m/z 427 a été observé, provenant certainement

de la perte d'un groupement méthyle lié à l'amine tertiaire du dérivé.

La CID en mode positif sur la molécule protonée $[M+H]^+$ du dérivé 17 β -E₂-PS (*Figure III.10*) donne un fragment abondant à m/z 350 qui est spécifique de la molécule dérivée et qui provient de la perte de SO₂ suivie d'un réarrangement. Un fragment moins intense, à m/z 272, correspondant au 17 β -E₂, est le résultat de la perte du groupe PS, générant l'ion $[M + H - C_5H_4NSO_2]^+$. Un autre fragment assez abondant dans notre cas, à m/z 79, est attribué à l'ion radical pyridinium formé par clivage homolytique de la liaison entre le cycle pyridine protoné et le groupe sulfonyle. D'autres ions fragments moins abondants sont observés, notamment ceux à m/z 244, 213, 186, 172 et 146, provenant de la molécule du 17 β -E₂ et issus de clivages du noyau stéroïde.

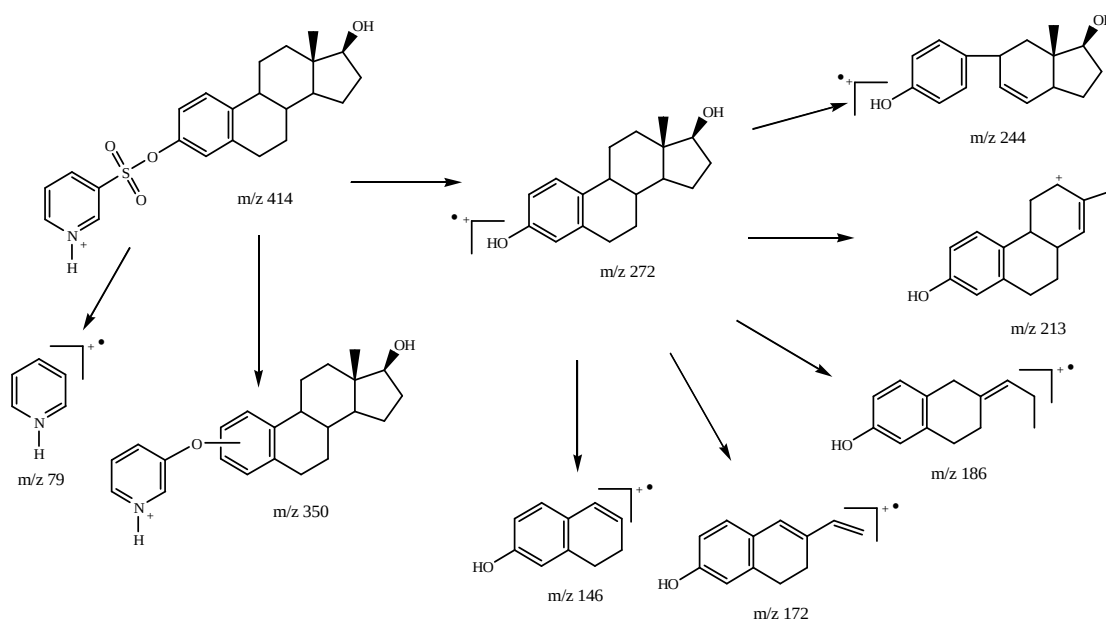


Figure III.10 : Fragmentation de la molécule protonée du 17 β -E₂-PS proposée par Xu *et al.* [170]

Le spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M + H]^+$ du dérivé 17 β -E₂-DMIS (m/z 431) est dominé par les ions fragments à m/z 159, 144 et 96, qui proviennent du motif DMIS, diméthylimidazole et méthylimidazolesulfonyle (*Figure III.11*). Comme cela a été démontré par Xu *et al.*[170, 254], ces ions sont formés par clivage hétérolytique de la liaison S-O entre le DMIS et le 17 β -E₂, et le clivage homolytique de la liaison C-S entre le cycle imidazole et le groupe sulfonyle. D'autres fragments moins abondants ont également été observés : un à m/z 367 (perte du SO₂ suivie d'un réarrangement) et d'autres à m/z 272 et m/z 213 spécifiques du 17 β -E₂.

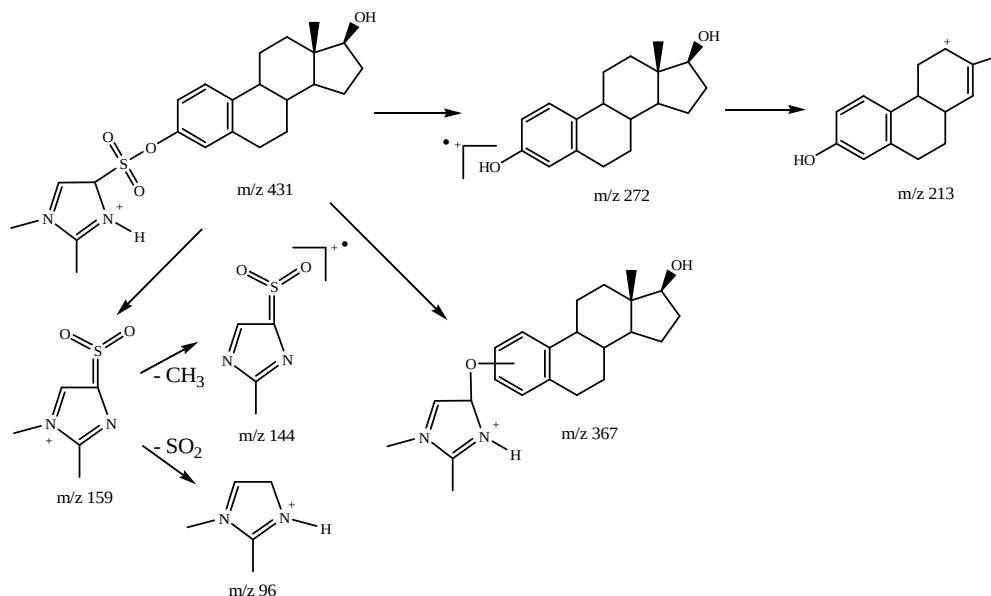


Figure III.11 : Fragmentation de la molécule protonée du 17β-E₂-DMIS [170, 254]

La CID en mode positif de l'ion $[M+H]^+$ du dérivé 17β-E₂-PBS (Figure III.12) donne des fragments abondants à m/z 159 et m/z 144 ainsi qu'un fragment moins abondant à m/z 207 ; ils sont tous spécifiques de la partie PBS de la molécule dérivée. Xu *et al.* ont proposé que le fragment à m/z 207 se forme par clivage hétérolytique de la liaison S-O entre les groupes PBS et le 17β-E₂. L'ion à m/z 159 se forme après le clivage de la liaison S-O et le réarrangement du groupe sulfonyle.

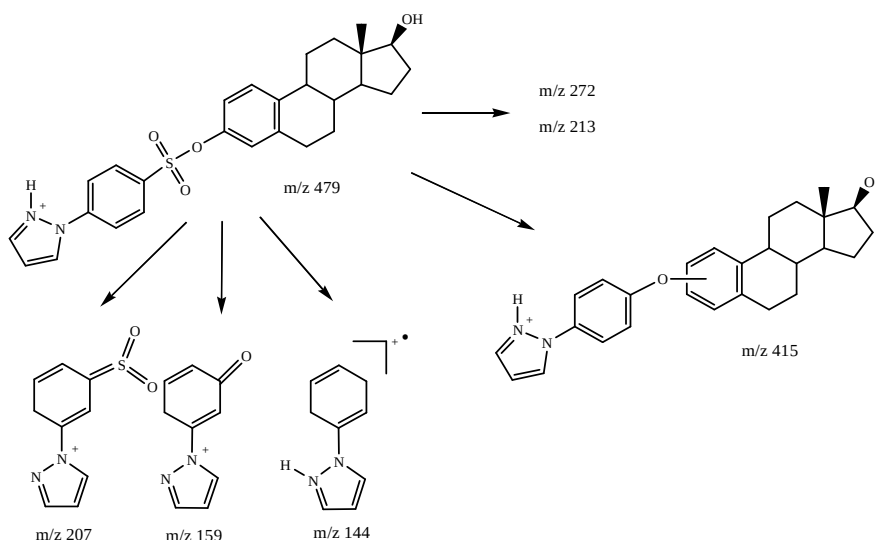


Figure III.12 : Fragmentation de la molécule protonée du 17β-E₂-PBS [170]

Xu *et al.* ont également proposé que l'ion à m/z 144 soit un ion radical pyrazolylbenzyle, résultant du clivage homolytique de la liaison C-S entre le fragment pyrazolylbenzène protoné et le groupe sulfonyle. Les autres fragments moins abondants qui ont été observés sont à m/z 415 (perte du SO₂ et réarrangement) et à m/z 272 et m/z 213, spécifiques du 17β-E₂.

Dans le cas du dérivé 17β-E₂-Q8S (Figure III.13), la CID sur l'ion $[M+H]^+$ donne un

ion fragment abondant à m/z 129 qui représente la quinoléine, formé après la coupure homolytique de la liaison C-S entre la quinoléine et le sulfonyle. L'autre ion fragment abondant à m/z 400 est spécifique de la molécule dérivée et provient d'une perte de SO_2 suivie d'un réarrangement. L'ion fragment à m/z 382 qui provient de la perte d'une molécule d'eau a été également observé. Les autres fragments moins abondants à m/z 272 et m/z 213 sont spécifiques du $17\beta\text{-E}_2$.

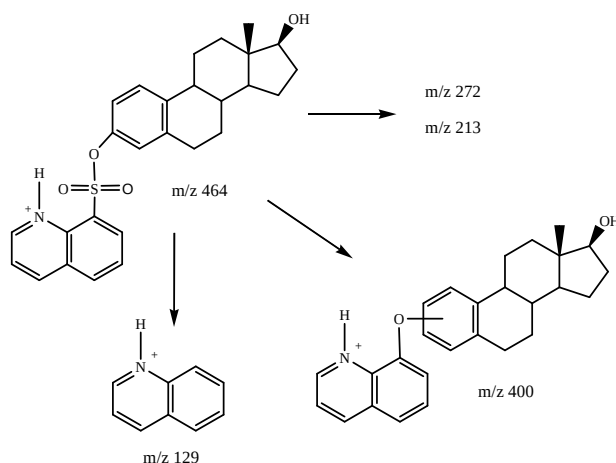


Figure III.13 : Fragmentation de la molécule protonée du $17\beta\text{-E}_2\text{-Q8S}$

La CID en mode positif du $[\text{M}+\text{H}]^+$ du dérivé $17\beta\text{-E}_2\text{-TS}$ génère des ions fragments abondants à m/z 255, m/z 159 et m/z 133, spécifiques du $17\beta\text{-E}_2$ (Figure III.14). L'ion à m/z 159 se forme à partir de l'ion à m/z 255 et peut être expliqué par l'élimination de C_7H_{10} . L'autre ion fragment à m/z 133 se forme grâce à un réarrangement qui mène à l'élimination de l'acétylène à partir de l'ion à m/z 159. Pour ce composé, on n'a pas observé d'ions fragments spécifiques de la molécule dérivée.

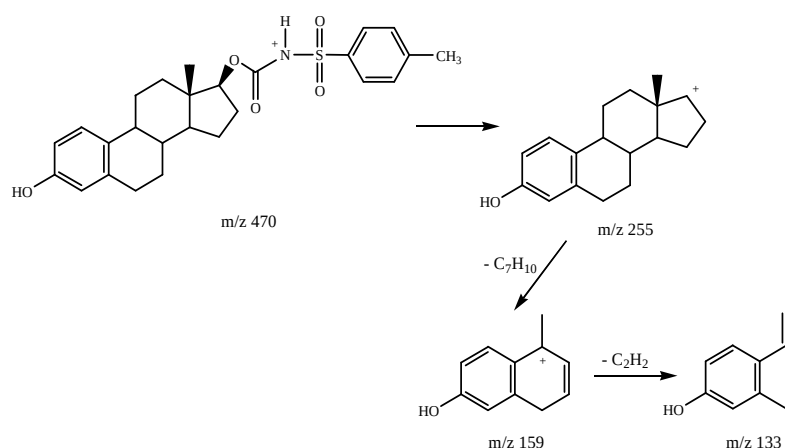


Figure III.14 : Fragmentation de la molécule protonée du $17\beta\text{-E}_2\text{-TS}$

De façon identique au dérivé $17\beta\text{-E}_2\text{-TS}$, la CID sur la molécule protonée du dérivé $17\beta\text{-E}_2\text{-Ph}$ (Figure III.15) ne génère pas d'ions fragments spécifiques. Mais, les ions fragments à m/z 273, m/z 255 et m/z 159 qui proviennent du $17\beta\text{-E}_2$ sont observés.

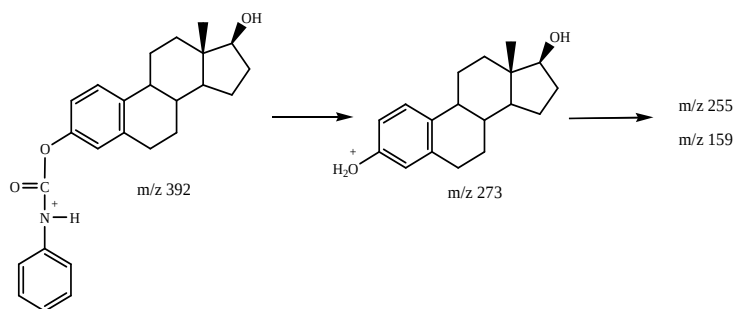


Figure III.15 : Fragmentation de la molécule protonée du 17β-E₂-Ph

La CID en mode positif sur l'ion $[M+H]^+$ du dérivé 17β-E₂-FPh (Figure III.16) donne un ion fragment abondant à m/z 273 qui est caractéristique du 17β-E₂, ainsi que les ions fragments à m/z 255 et m/z 159. L'ion fragment de plus faible intensité à m/z 392 est spécifique à l'analyte et provient de la perte d'une molécule d'eau.

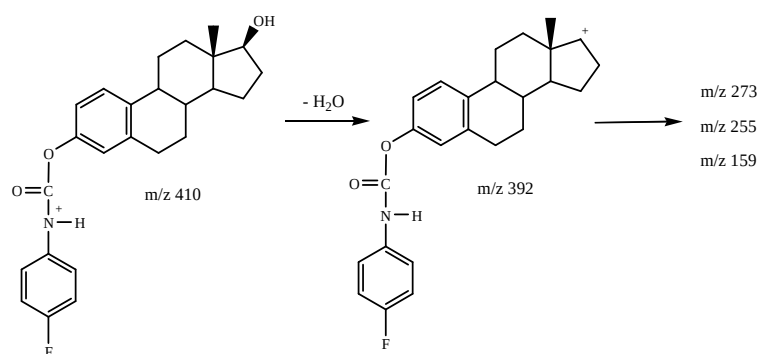


Figure III.16 : Fragmentation de la molécule protonée du 17β-E₂-FPh

Dans le cas du dérivé 17β-E₂-DMAP (Figure III.17), la CID sur l'ion $[M+H]^+$ donne un ion fragment abondant à m/z 148 qui représente le groupement DMAP, formé après la perte d'un méthyle. Un autre ion fragment moins abondant, mais spécifique au produit de dérivation, à m/z 420 provient certainement de la perte d'un méthyle du groupe DMAP. Comme pour les autres dérivés, les ions fragments moins abondants à m/z 272, m/z 255 et m/z 213, spécifiques du 17β-E₂ sont observés.

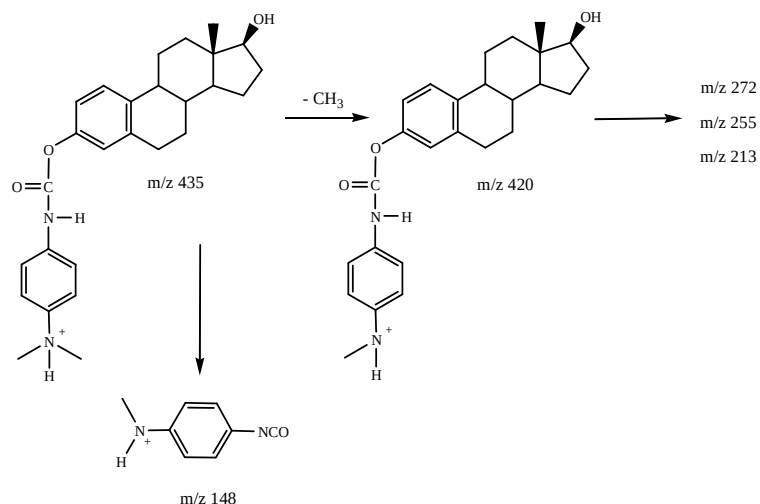


Figure III.17 : Fragmentation de la molécule protonée du 17β-E₂-DMAP

La CID en mode positif de l'ion $[M+H]^+$ du dérivé 17β-E₂-NO₂Ph génère des ions fragments à m/z 273, m/z 255 et m/z 159, spécifiques du 17β-E₂ (Figure III.18). De plus, un ion fragment spécifique à m/z 419 est bien détecté malgré sa faible intensité ; il provient de la perte d'une molécule d'eau par le produit dérivé.

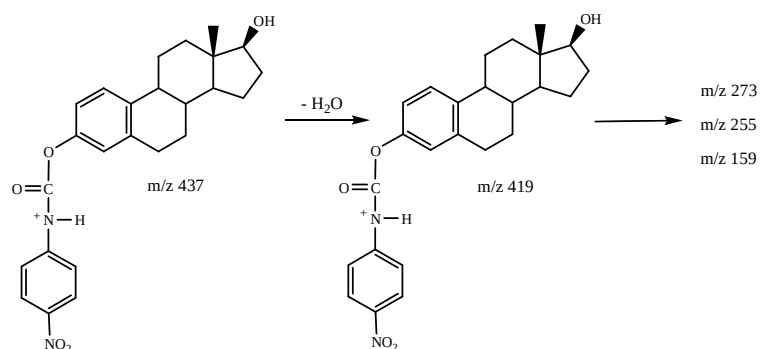


Figure III.18 : Fragmentation de la molécule protonée du 17β-E₂-NO₂Ph

Concernant le dérivé 17β-E₂-DMAB, le spectre MS/MS ne fournit pas d'ions fragments dans la gamme de m/z 350-400 qui soient spécifiques de l'analyte (Figure III.19A), et ceci quelle que soit l'énergie de collision appliquée. Nos résultats sont en désaccord avec ceux décrits par Köhling [246] qui a obtenu en ESI(+)MS/MS pour le même dérivé quatre ions fragments assez abondants dans cette gamme de masse (Figure III.19B). Comme l'analyse est faite dans les mêmes conditions, il est difficile de comprendre la raison de cette variation.

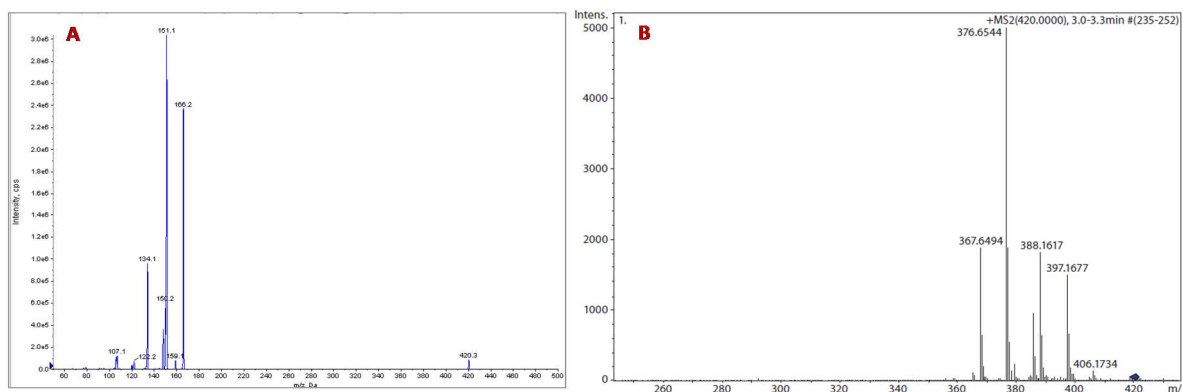


Figure III.19 : Spectres ESI(+)-MS/MS du dérivé 17β-E₂-DMAB **A.** dans notre cas et **B.** présenté par Köhling [246]

En mode négatif, seuls les dérivés 17β-E₂-TS, 17β-E₂-DMAP et 17β-E₂-DMAB sont ionisés. Dans le cas du dérivé 17β-E₂-TS (Figure III.20), la CID sur l'ion précurseur déprotoné [M-H]⁻ génère un ion fragment abondant à *m/z* 196 qui provient du motif introduit par le TSI.

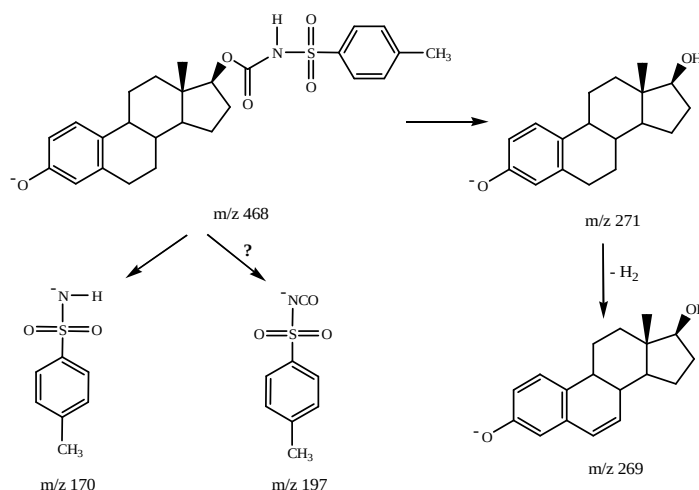


Figure III.20 : Fragmentation de la molécule déprotonée du 17β-E₂-TS

Un ion fragment moins intense à *m/z* 271 correspond à l'ion [M-H-C₈H₇NSO₃]⁻ qui résulte de la perte du groupe TS. Un ion fragment à *m/z* 269 correspond certainement à une perte de deux hydrogènes, conduisant à la formation d'un cycle insaturé (équivalent d'une double liaison conjuguée avec le cycle aromatique).

La CID sur l'ion [M-H]⁻ du dérivé 17β-E₂-DMAP conduit à un ion fragment abondant à *m/z* 120, formé après la coupure de la liaison C-N entre le diméthylamino-phényl et le groupe cyano (Figure III.21). Un autre ion fragment moins intense à *m/z* 271 qui correspond à 17β-E₂, résulte de la perte du groupe DMAP.

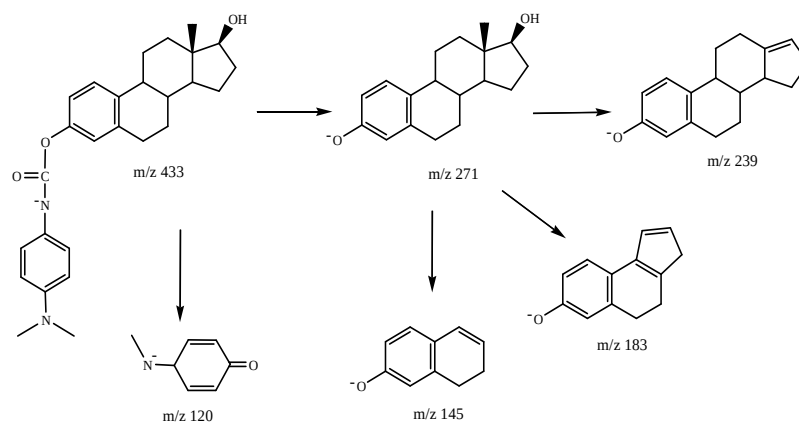


Figure III.21 : Fragmentation de la molécule déprotonée du 17β-E₂-DMAP

Les autres ions fragments moins abondants sont les ions à m/z 239 résultant de la perte des groupes méthyle et hydroxyle suivie par la formation d'une double liaison entre les carbones 13 et 17 de la molécule du 17β-E₂, et les ions à m/z 183 et m/z 145 provenant de l'hétérocyclisation.

Dans le cas du dérivé 17β-E₂-DMAB, la CID sur l'ion déprotoné [M-H]⁻ (Figure III.22) conduit à des ions fragments moins abondants à m/z 403 et m/z 374. Ces ions proviennent certainement de la perte d'un groupe méthyle et de la perte totale du groupe diméthylamino.

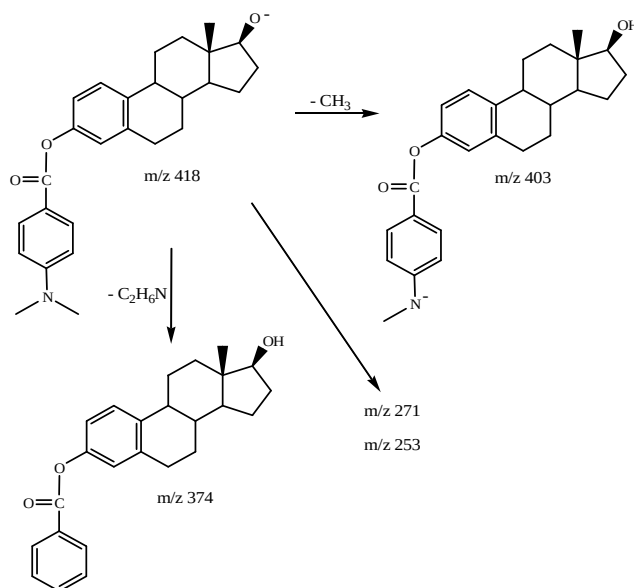


Figure III.22 : Fragmentation de la molécule deprotonée du 17β-E₂-DMAB

Des ions fragments plus abondants ont été observés à m/z 271 et m/z 255, spécifiques du 17β-E₂. Cependant, un ion fragment abondant à m/z 164 a été observé, mais non expliqué.

Après l'analyse des ions fragments de tous les composés, uniquement trois dérivés, 17β-E₂-Q8S, 17β-E₂-Dns et 17β-E₂-DMIS ont été sélectionnés pour la suite de notre étude. Ils génèrent tous un ion fragment spécifique de la molécule dérivée pouvant être utilisé pour la la

transition de validation, et un autre ion fragment abondant provenant du motif de l'agent de dérivation pouvant être utilisé pour la transition de quantification. Pour ces dérivés, les paramètres instrumentaux utilisés en MRM ont été optimisés (*Tableau III.2*).

Tableau III.2 : Ions parents, ions fragments correspondants aux dérivés 17 β -E₂-Q8S, 17 β -E₂-Dns, 17 β -E₂-DMIS et paramètres instrumentaux utilisés en MRM

Composés	Mode d'ionisation	Ion parent (m/z)	Transition MRM (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
17 β -E ₂ -Q8S	ESI(+)	464.30 [M+H] ⁺	129.00 213.20 272.20 400.20	120 120 120 120	76 45 43 47	7 15 15 20
17 β -E ₂ -Dns	ESI(+)	506.30 [M+H] ⁺	171.00 427.20 442.30	120 120 120	46 44 37	9 10 10
17 β -E ₂ -DMIS	ESI(+)	430.30 [M+H] ⁺	159.00 213.00 272.30 367.30	120 120 120 120	40 50 37 44	7 15 15 15

III.3 MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE PAR LC-MS/MS

Suite aux résultats obtenus en MS/MS, nous avons choisi les dérivés 17 β -E₂-Dns, 17 β -E₂-DMIS et 17 β -E₂-Q8S pour le développement de la méthode LC-MS/MS. L'analyse a été réalisée en appliquant les conditions opératoires mentionnées dans le *Tableau III.3*. Les paramètres instrumentaux en MRM sont rapportés dans le *Tableau III.2*.

Tableau III.3 : Conditions chromatographiques et paramètres instrumentaux en ESI(+)-MS/MS

Phase mobile	H ₂ O et Acétonitrile acidifiés à 0,1 % d'acide formique
Débit de phase mobile	50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$
Source d'ionisation	ESI
Tension	5500 V
Gaz séchant	25 u.a.
Gaz auxiliaire	20 u.a.
Température Capillaire	100°C
Pression du gaz de collision	Medium

u.a.: unité arbitraire

Les conditions chromatographiques ont été établies selon Xu *et al.* [170] (*Tableau III.4*). L'analyse LC-MS/MS a été effectuée en utilisant une colonne Luna Phenyl-Hexyl (150 $\times$ 1.0 mm d.i., 3 μm ; Phenomenex). Le volume d'injection était de 20 μL . Le débit de la phase mobile était de 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ et la colonne était à température ambiante. La durée de l'analyse était de vingt-cinq minutes.

Tableau III.4 : Gradient d'élution appliqué lors de l'analyse du dérivé par HPLC-ESI(+)-MS/MS

Colonne analytique	Phase mobile	Gradient d'élution	
		Temps (min)	%B
Luna Phenyl-Hexyl (150 $\times$ 1.0 mm d.i., 3 μm)	<i>Eluant A</i> : 0.1% HCOOH dans H ₂ O	0	50
		1	50
		9	50
		15	90
	<i>Eluant B</i> : 0.1% HCOOH dans 95% Acétonitrile et 5% H ₂ O	22	90
		25	50
		45	50

La séparation des dérivés en HPLC-ESI(+)-MS/MS est représentée sur la *Figure II.23*. Le 17 β -E₂-DMIS est élué en premier à t_r = 7,99 min, suivi par le dérivé 17 β -E₂-Q8S à t_r = 13,86 min, et en dernier le 17 β -E₂-Dns à t_r = 23,65 min.

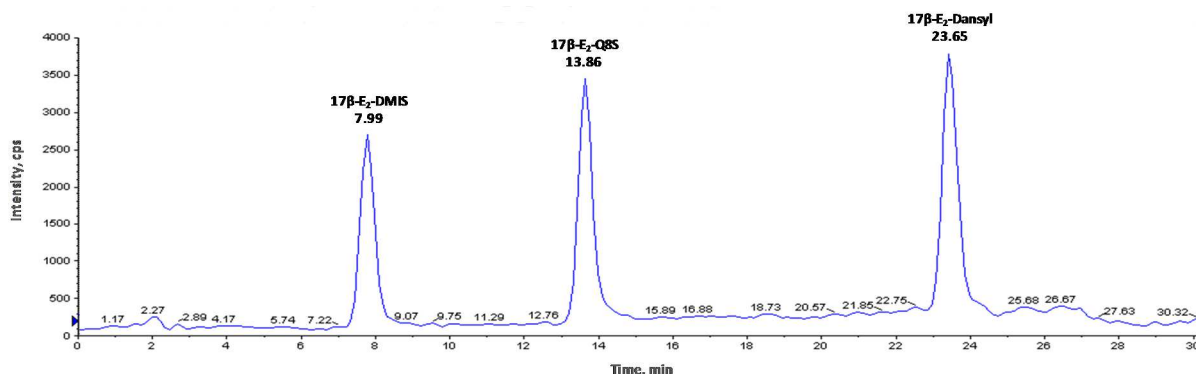


Figure III.23 : Chromatogramme obtenu par HPLC-ESI(+)-MS/MS avec une solution composée d'un mélange des dérivés à 10 fmoles. μL^{-1}

Des courbes d'étalonnage (*Figure AVII*) ont été réalisées pour ces trois dérivés grâce à une gamme de huit concentrations, comprises entre 0,025 et 5 fmoles. μL^{-1} (0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2,5 / 5,0) dans $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (60:40 v/v). Dans un premier temps, les limites de détection et de quantification de chaque dérivé à de faibles concentrations ont été établies sans standard interne. Puis, dans un second temps, pour le dérivé qui a donné la meilleure sensibilité, le standard interne marqué correspondant a été synthétisé à partir du 17 β -E₂-¹³C₃.

Comme les homologues marqués des dérivés n'ont pas été utilisés, les coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage se situent entre 0,997 et 0,991. Malgré ces valeurs quelque peu éloignées de la valeur acceptée (0,999), les LOD et les LOQ ont tout de même été estimées pour chaque dérivé. La LOD est de 0,1 fmoles. μL^{-1} pour la transition de quantification (430,3 $\rightarrow$ 159,0) du dérivé DMIS et 0,25 fmoles. μL^{-1} pour celle utilisée lors de la validation (430,3 $\rightarrow$ 367,3), avec une LOQ de 0,5 fmoles. μL^{-1} (quantification) et de 2,5 fmoles. μL^{-1} (validation). Dans le cas du dérivé dansyle, la LOD est de 0,05 fmoles. μL^{-1} pour la transition de quantification (506,3 $\rightarrow$ 171,0) et 0,1 fmoles. μL^{-1} pour celle utilisée lors de la validation (506,3 $\rightarrow$ 442,3) et la LOQ est de 0,25 fmoles. μL^{-1} (quantification) et 1,0 fmoles. μL^{-1} (validation). Pour le dérivé Q8S, la LOD est de 0,025 fmoles. μL^{-1} pour les deux transitions (464,3 $\rightarrow$ 129,0 ; 464,3 $\rightarrow$ 400,3) et la LOQ de 0,05 fmoles. μL^{-1} pour les deux transitions également. Les chromatogrammes représentés dans la *Figure III.24* ont été obtenus pour un mélange des dérivés à 0,05 fmoles. μL^{-1} ; ils montrent que les transitions spécifiques choisies pour la validation ne sont pas exploitables dans le cas des dérivés DMIS et dansyle.

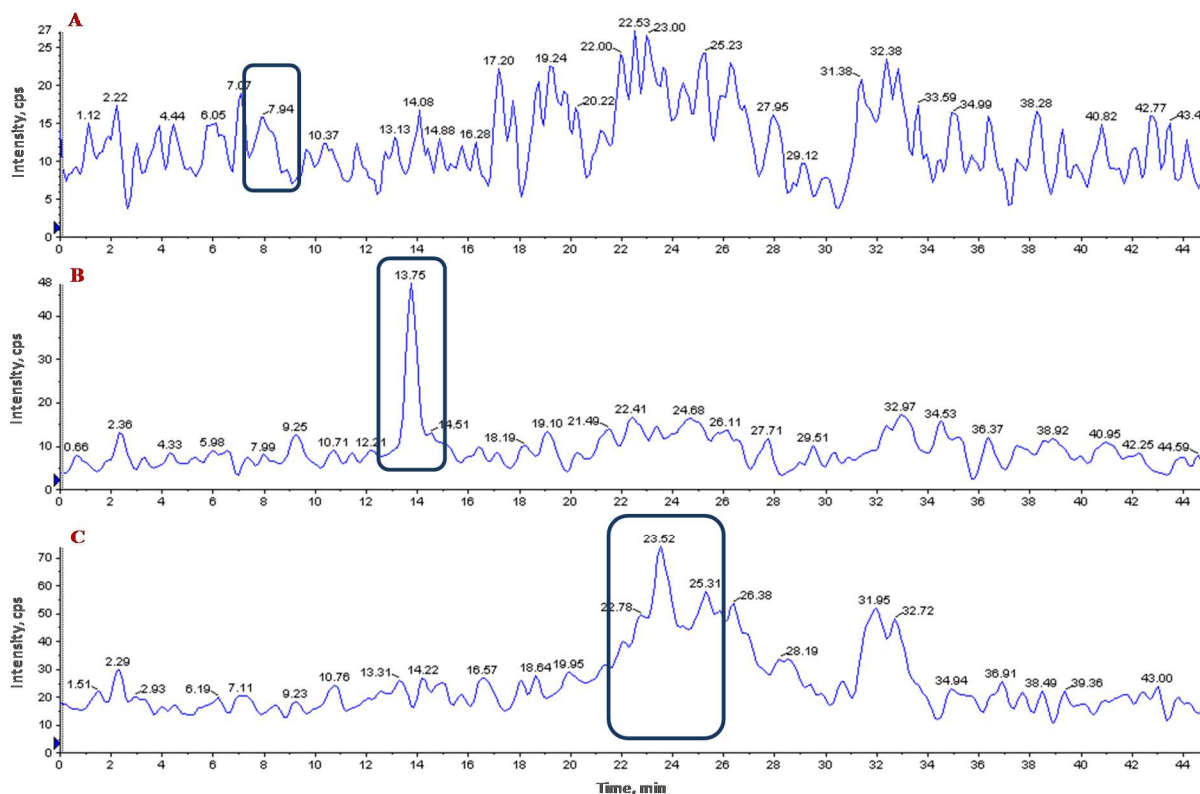


Figure III.24 : Chromatogrammes obtenus par HPLC-ESI(+)-MS/MS avec une solution composée d'un mélange des dérivés à 0,05 fmole.μL⁻¹: **A.** Transition 430,3 → 367,3 (17β-E₂-DMIS), **B.** Transition 464,3 → 400,3 (17β-E₂-Q8S), **C.** Transition 506,3 → 442,3 (17β-E₂-Dns)

Suite à l'analyse de ces résultats, notre choix s'est porté sur la dérivation du 17β-E₂ avec le Q8S-Cl qui semble produire la meilleure LOD avec les deux transits.

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II, une courbe d'étalonnage en LC-MS/MS s'effectue en injectant au moins trois fois des solutions contenant la molécule étudiée à des concentrations variables et un étalon interne (*Standard Interne* - SI) à une concentration fixe. Pour l'analyse du 17β-E₂ avec dérivation, le SI 17β-E₂-¹³C₃-Q8S a été synthétisé selon le Protocole A avec une quantité de 2 μmoles du 17β-E₂-¹³C₃ et 10 μmoles de Q8S-Cl. L'ion précurseur et les ions fragments de ce SI sont présentés dans les *Tableaux III.2 et III.5*.

Tableau III.5 : Ion parent, ions fragments correspondants au dérivés SI 17β-E₂-¹³C₃-Q8S, et paramètres instrumentaux utilisés en MRM

SI	Mode d'ionisation	Ion parent (m/z)	Transition MRM (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
17β-E ₂ - ¹³ C ₃ - Q8S	ESI(+)	467.30 [M+H] ⁺	129.20	120	76	7
			216.20	120	45	15
			275.20	120	43	15
			403.20	120	47	20

La courbe d'étalonnage a été réalisée sur une gamme de six concentrations du dérivé 17 β -E₂-Q8S, comprises entre 0,025 et 1 fmole. μ L⁻¹ (0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1) en solution dans CH₃OH : H₂O (60:40 v/v). Quelle que soit la solution d'étalon considérée, la concentration de SI est constante et fixée à 1 fmole. μ L⁻¹ (0,05 pmole).

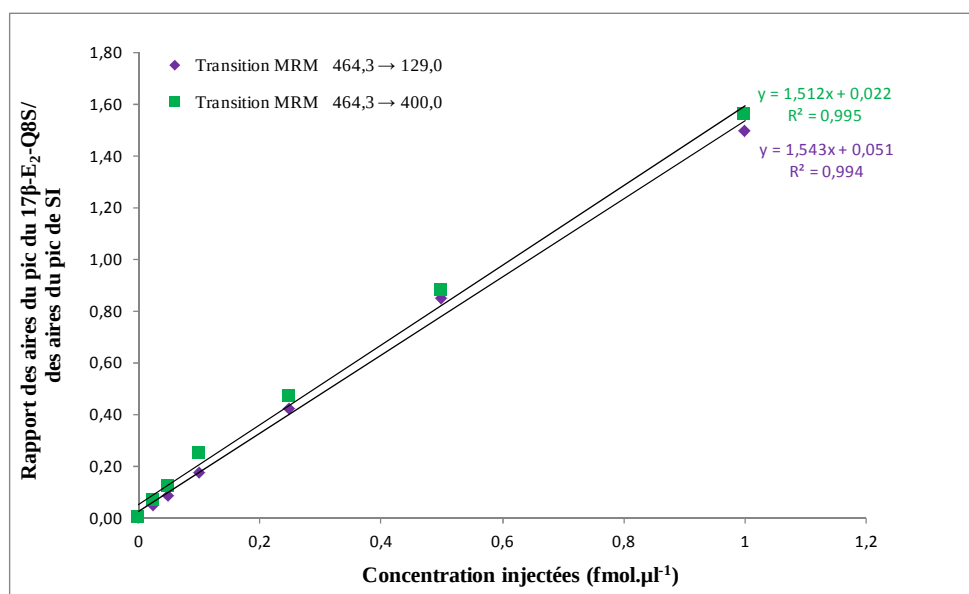


Figure III.25 : Rapport des intensités du 17 β -E₂-Q8S et de SI en fonction de la concentration injectée en HPLC-ESI(+)-MS/MS, n = 3

Les droites d'étalonnage, obtenues en mode ESI(+) MRM, correspondent au suivi des deux transitions (Figure III.25). Les valeurs des coefficients de corrélation sont très proches de 1. Les coefficients de variation pour ces valeurs sont entre 3 et 15% et donc situés dans le domaine d'acceptation. La LOD est estimée à 0,025 fmole. μ L⁻¹ pour les deux transitions (464,3 $\rightarrow$ 129,0 et 464,3 $\rightarrow$ 400,3) et la LOQ de 0,05 fmole. μ L⁻¹.

Nous avons ensuite utilisé la méthode des ajouts dosés pour établir une courbe d'étalonnage à partir d'un extrait de cerveau de souris placebo. Cette méthode est réalisée par l'ajout de quantités connues de 17 β -E₂ (et de SI 17 β -E₂-¹³C₃) directement dans l'échantillon à analyser, ce qui permet de prendre en compte l'effet matrice. La dérivation est réalisée directement dans l'extrait de cerveau, en utilisant le Protocole A de synthèse. Les échantillons (10 mg de cerveau) ont été dopés avec la même gamme de concentrations utilisée précédemment, c'est-à-dire avec six concentrations de 17 β -E₂, comprises entre 0,025 et 1 fmole. μ L⁻¹ (0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1). Les échantillons biologiques pouvant contenir des composés susceptibles de réagir avec l'agent de dérivation (comme par exemple les autres stéroïdes), un excès de 1000 équivalents d'agent de dérivation par rapport à la concentration estimée de 17 β -E₂ a été utilisés.

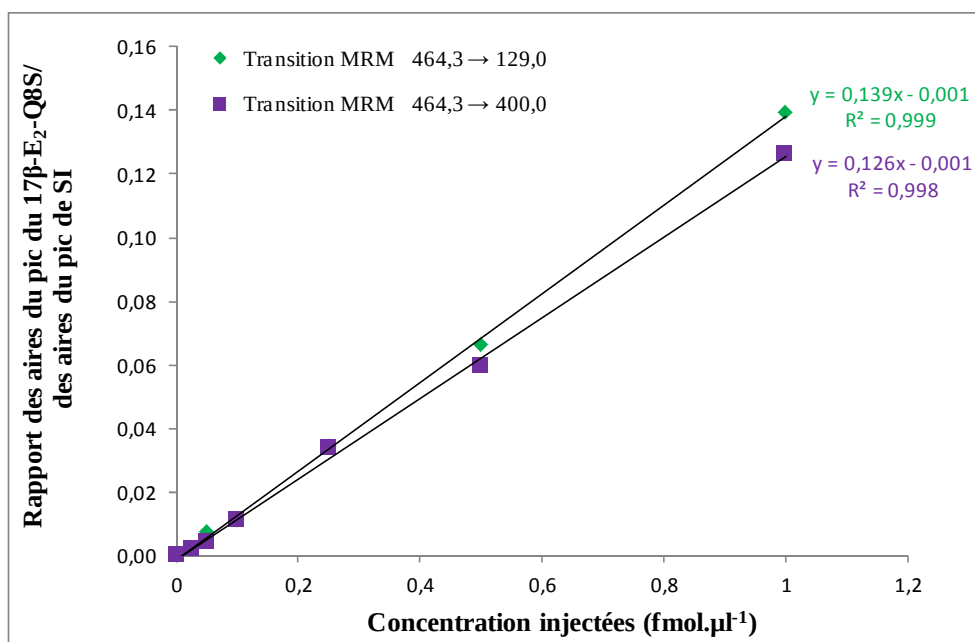


Figure III.26 : Rapport des intensités obtenu pour les échantillons de cerveau dopé avec du 17β-E₂-Q8S et de SI en fonction de la concentration injectée en HPLC-ESI(+)-MS/MS, n = 3 ; La droite d'étalonnage correspondant à la dérivation effectuée directement dans l'extrait de cerveau après ELL

Les valeurs des coefficients de corrélation (R) sont supérieures à 0,99, démontrant ainsi une bonne linéarité de réponse entre le rapport des aires des pics chromatographiques et la concentration de 17β-E₂-Q8S. Dans ce cas, la LOD est estimée à 0,05 fmole.μL⁻¹ pour les deux transitions (464,3 → 129,0 et 464,3 → 400,3) et la LOQ de 0,25 fmole.μL⁻¹, ce qui indique qu'il y a un important effet matrice.

Tableau III.6 : Récupération du 17β-E₂-Q8S après dérivation dans l'extrait de cerveau des souris placebo.

Echantillon biologique (Eb)	C, fmole.μL ⁻¹	Moyenne Aire du pic Solution standard (n=3)	Moyenne Aire du pic Eb dopé (n=3)	Ré, %	CV, %
Cerveau	0,025	2.72E-03	2.14E-03	78,8	8,3
	0,05	7.60E-03	7.36E-03	96,9	12,0
	0,1	1.11E-02	1.08E-02	97,2	11,0
	0,25	3.29E-02	3.40E-02	103	5,7
	0,5	6.81E-02	6.62E-02	97,2	6,4
	1	1.53E-01	1.39E-01	90,8	6,2

* Les CV ont été calculés pour n = 3 analyses des solutions préparées différemment

Les taux de récupération sont montrés dans le Tableau III.6 et représentent le rapport des réponses (17β-E₂-Q8S/17β-E₂-¹³C₃-Q8S) obtenues pour le cerveau dopé (correspondant à la Figure III.26) sur les réponses obtenues pour la solution standard (correspondant à la Figure III.25), exprimé en pourcentage. La récupération est de 94 ± 8 %, et les coefficients de variation sont à des valeurs admissibles. En comparant ces valeurs avec celles obtenues pour la méthode

sans dérivation, on constate qu'ils sont moins bons. Cela peut être expliqué par la complexité d'un extrait de cerveau et par le fait que l'agent de dérivation est relativement instable, car capable de s'hydrolyser rapidement.

III.4 PREPARATION D'ECHANTILLON : SPE

Dans cette partie, nous avons essayé de mettre au point une méthode rapide de purification de 17β -E₂ extrait du cerveau après la dérivation chimique, par un seul passage sur cartouche SPE.

Pour cela, nous nous sommes basés sur les tests effectués sur le 17β -E₂ présentés dans le deuxième chapitre. Comme les meilleurs résultats ont été obtenus sur la cartouche Strata C18, nous avons appliqué certains protocoles SPE, déjà décrits dans le chapitre II pour cette cartouche, et estimé le taux de récupération à partir de solutions standards du 17β -E₂-Q8S. Puis, le protocole qui permet d'obtenir la meilleure récupération a été appliqué pour effectuer les analyses sur le cerveau.

Les résultats d'analyse (*Figure III.27*) mettent en évidence la variation des taux de récupération selon le protocole SPE appliqué. Les taux de récupération sont calculés en rapportant l'aire du pic chromatographique obtenue pour la solution reconstituée à l'aire du pic obtenu pour la solution standard avant le dépôt. Tous les protocoles SPE sont décrits dans le chapitre II paragraphe II.4.1 et II.4.2.

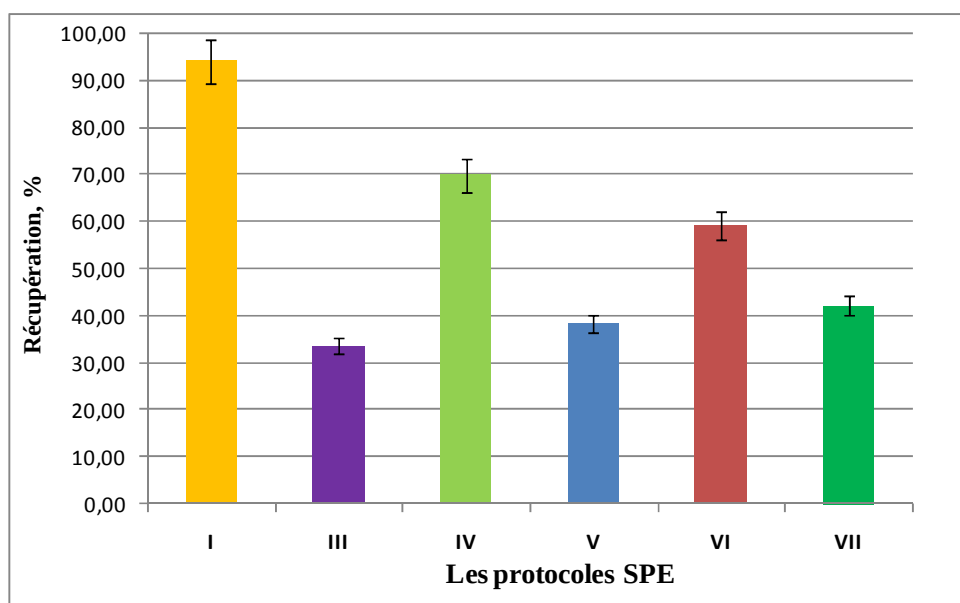


Figure III.27 : Taux de récupération du 17β -E₂-Q8S à 0,1 pmol.μL⁻¹ sur le support SPE Strata C18 (50 mg, 1 mL), pour les différents protocoles SPE, n = 3

De mauvais taux de récupération sont obtenus avec les protocoles P-III (seulement 34 ± 3%), P-V (38 ± 5%) et P-VII (42 ± 2%). La récupération du dérivé 17β -E₂-Q8S est meilleure, mais pas suffisante, avec le P-VI (59 ± 6%) et le P-IV (70 ± 4%). Seul le P-I permet d'obtenir le taux de récupération satisfaisant (94 ± 3%). Le P-I (conditionnement avec 2 ml ACN suivi par 2 mL d'eau / chargement de 500 μL dans 10% ACN / lavage avec 2 ml de 20% ACN /

élution avec 2 ml de 50% ACN) sera utilisé par la suite pour réaliser les extractions à partir des échantillons biologiques.

III.5 APPLICATION DE LA DERIVATION CHIMIQUE A L'ANALYSE D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

La méthode d'analyse du 17β -E₂ avec dérivation a été testée sur les échantillons de cerveaux prélevés sur des animaux traités par voie sous-cutanée avec des quantités connues de 17β -E₂ (3, 10 et 150 μ g). Il s'agit des prélèvements déjà utilisés pour l'analyse sans dérivation, développée dans le chapitre II. Les cerveaux (séparés des hippocampes) ont subi l'étape de pré-purification (homogénéisation, ELL) dont les conditions sont les mêmes que pour l'analyse sans dérivation (paragraphe III.1). La dérivation est ensuite réalisée en adaptant les conditions expérimentales du protocole A utilisé précédemment pour la synthèse des dérivés sulfonates, à l'exception du nombre d'équivalents d'agent de dérivation par rapport à la concentration de 17β -E₂ (1000 équiv. au lieu de 5).

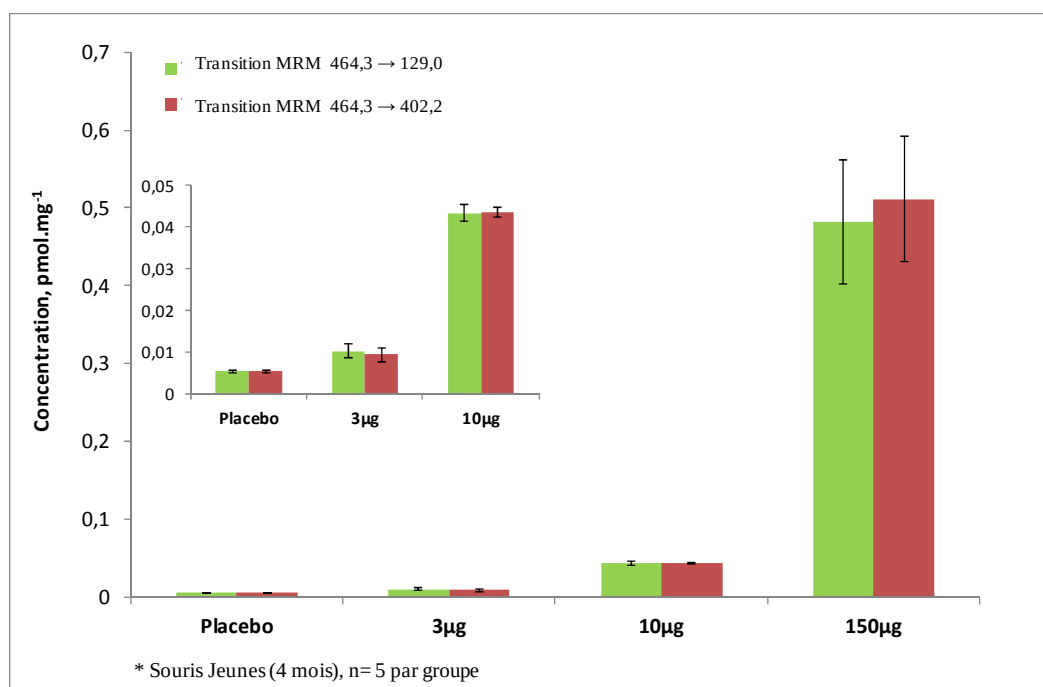


Figure III.28 : Concentration du 17β -E₂ dans les cerveaux de jeunes souris après injection par voie sous-cutanée des différentes concentrations du 17β -E₂ ; Souris de 4 mois : *Placebo* (n=5) – jeunes souris placebos, 3 μ g (n=5), 10 μ g (n=5) et 150 μ g (n=5) – jeunes souris ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3, 10 et 150 μ g du 17β -E₂ ; 2 analyses HPLC-ESI(-)-MS/MS avec dérivation au Q8S-C1 pour chaque souris ; Les barres d'erreurs reflètent la variabilité inter-individuelle

Les résultats d'analyse LC-MS/MS de ces échantillons sont présentés dans la *Figure III.28*. Les animaux placebos ont été comparés aux souris ayant reçu une injection par voie sous-cutanée de 3, 10 et 150 μ g de 17β -E₂ et sacrifiées une heure après. De façon identique au dosage du 17β -E₂ sans dérivation (chapitre II, paragraphe II.4.6.), une augmentation de la concentration du 17β -E₂ a été observée dans le cerveau avec l'augmentation de la quantité injectée. La concentration du 17β -E₂ dans le cerveau placebo était de $5,2 \pm 0,5$ fmoles.mg⁻¹ et

passé à $10,2 \pm 3,5$ après l'injection de $3\mu\text{g}$ de $17\beta\text{-E}_2$; cette concentration était de $43,4 \pm 4,3$ et $482,3 \pm 159,4 \text{ fmoles.mg}^{-1}$ après l'injection respective de 10 et 150 μg de $17\beta\text{-E}_2$. Il est important de noter que les concentrations du $17\beta\text{-E}_2$ calculées à partir des deux droites de calibration basées sur deux transitions différentes sont comparables. Les données ci-dessus ont été calculées à partir de la courbe de calibration obtenue pour la transition MRM 464,3 $\rightarrow$ 129,0 utilisée pour la quantification. Dans le cas de cerveau placebo, la concentration du $17\beta\text{-E}_2$ était de $5,3 \pm 0,5$ et $9,3 \pm 3,4 \text{ fmoles.mg}^{-1}$ après l'injection de $3\mu\text{g}$ de $17\beta\text{-E}_2$ puis $43,5 \pm 2,4$ pour 10 μg et de $511,3 \pm 160,0 \text{ fmoles.mg}^{-1}$ pour 150 μg injectés. Dans ce cas, les valeurs de concentration ont été calculées à partir de la courbe de calibration obtenue pour la transition MRM 464,3 $\rightarrow$ 400,2 utilisée pour la validation. Pour l'injection de 150 μg de $17\beta\text{-E}_2$, des niveaux très variables de $17\beta\text{-E}_2$ ont été observés dans les deux cas, ce qui est illustré par les barres d'erreur plus importantes.

III.6 DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DU 17β -E₂ DANS LE CERVEAU DE SOURIS – REALISEE AVEC ET SANS DERIVATION CHIMIQUE

Dans cette partie, nous allons comparer les résultats de dosage du 17β -E₂ dans les mêmes échantillons biologiques, obtenus avec et sans dérivation chimique. Nous allons également essayer d'estimer les avantages et les inconvénients d'utilisation de la dérivation chimique. La méthode avec dérivation a permis d'améliorer la LOQ ($0,25 \text{ fmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) par rapport à la méthode sans dérivation ($2,5 \text{ fmoles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), mais elle inclut une étape supplémentaire de manipulation qui peut affecter la qualité d'analyse.

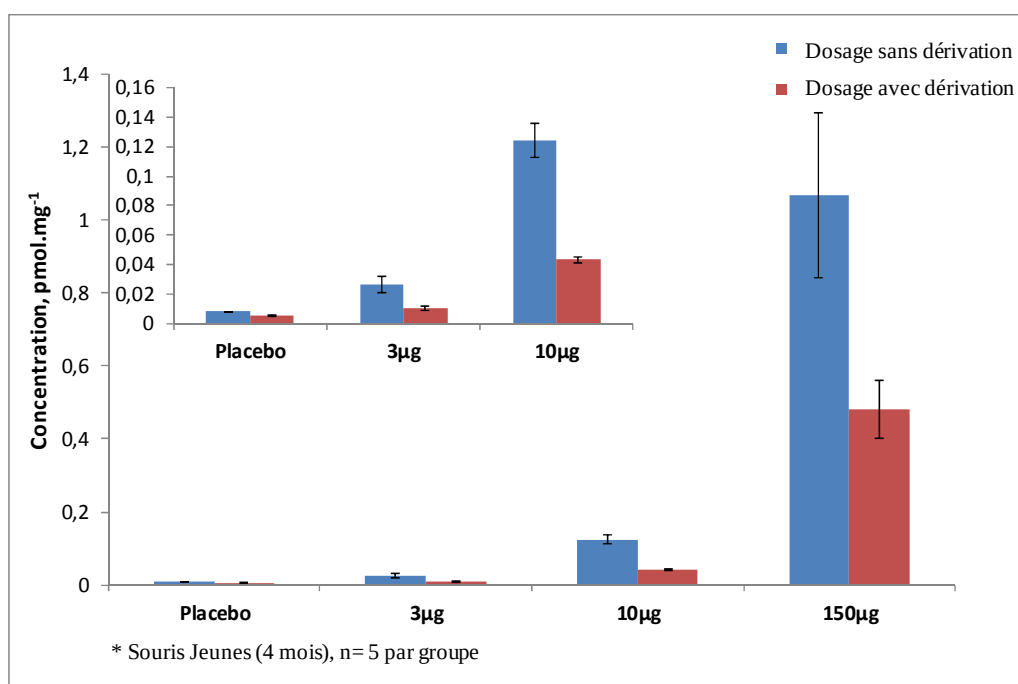


Figure III.29 : Comparaison des dosages du 17β -E₂ réalisés avec et sans dérivation chimique, dans les mêmes échantillons de cerveaux de jeunes souris après injection par voie sous-cutanée des différentes concentrations du 17β -E₂ ; Les barres d'erreurs reflètent la variabilité inter-individuelle

En comparant les concentrations du 17β -E₂ déterminées à l'aide des deux méthodes, sans et avec dérivation (Figure III.29), sur les échantillons de cerveaux prélevés sur des animaux traités par voie sous-cutanée avec des quantités connues de 17β -E₂ (échantillons identiques pour les deux méthodes), on observe une très grande variation. Les concentrations dosées dans tous les échantillons de cerveau avec la méthode qui implique la, sont plus faibles qu'avec la méthode sans dérivation. Dans le cas des cerveaux de souris placebo (faible taux de 17β -E₂), une chute de 35% de valeur de concentration du 17β -E₂ a été observée pour le dosage réalisé avec la dérivation en comparaison avec le dosage direct. Tandis que pour les cerveaux de souris traités par voie sous-cutanée avec 3, 10 et 150 μg de 17β -E₂, la différence entre les deux dosages

est plus marquante : elle augmente avec la concentration et est de l'ordre de 60% pour l'échantillon le plus concentré.

Cette perte peut être influencée par plusieurs facteurs, comme :

- ♦ l'instabilité de l'agent de dérivation. En effet, nous avons remarqué lors de précédentes expériences que les chlorures de sulfonyle, une fois mis en solution, se dégradent très vite au cours de la journée. Malgré l'emploi de diverses précautions (utilisation d'un flacon neuf d'agent de dérivation pour chaque expérience, ou bien utilisation de hotte en pression négative et stockage de l'agent de dérivation sous un gaz inerte, manipulation rapide de l'agent de dérivation), il se peut que l'agent de dérivation se dégrade en cours d'expérience. Ceci est en accord avec la tendance observée : la perte entre les deux dosages est moindre pour les placébos (35%) comparées aux injections de 3 μg , 10 μg et 150 μg (55-65%) ;
- ♦ le temps de réaction qui n'était pas suffisamment long (actuellement 40 min) pour que la réaction soit complète, ce qui impliquerait qu'une grande quantité du $17\beta\text{-E}_2$ présent dans l'échantillon de cerveau reste sous forme non-dérivée ;
- ♦ le nombre d'équivalents d'agent de dérivation qui n'était pas suffisant (1000 équivalents) pour couvrir la quantité totale du $17\beta\text{-E}_2$ même si l'excès la quantité de réactif paraît importante ;
- ♦ la présence d'interférences (lipides, autres stéroïdes...) qui peuvent réagir facilement avec l'agent de dérivation, induisant une consommation rapide, indésirable et peut-être totale de celui-ci.

Après analyse de ces résultats, le seul avantage de la méthode qui utilise la dérivation chimique en comparaison à la méthode sans dérivation, est sa sensibilité. Avec la dérivation, on gagne un facteur dix pour la LOD ($0,05 \text{ fmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et la LOQ ($0,25 \text{ fmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Pour rappel, sans dérivation, la LOD est de $0,5 \text{ fmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ et la LOQ de $2,5 \text{ fmoles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Dans tous les cas, la comparaison des valeurs de taux de $17\beta\text{-E}_2$ obtenus pour chaque échantillon par les deux dosages met en évidence la perte d'analyte lors de l'étape de dérivation, qui est certainement liée au mauvais rendement de la réaction et/ou à la présence d'interférents. De plus, comme les réactifs de dérivation se sont avérés être instables et sensibles à l'humidité, nous avons également rencontré des problèmes de répétabilité et de reproductibilité des analyses. Il faut noter aussi qu'il s'agit ici de résultats préliminaires, car la mise au point du dosage avec dérivation demande encore des améliorations des performances de la méthode, dont plusieurs possibilités n'ont pas encore été explorées (purification plus avancée de

l'échantillon avant la dérivation, optimisation et standardisation de la réaction-même de dérivation, préparation des solutions de réactifs etc...).

L'inconvénient majeur de la dérivation chimique est l'ajout d'une étape supplémentaire, ce qui augmente la durée de l'analyse et qui, dans son format actuel, apporte également un paramètre aléatoire en fonction de l'échantillon biologique analysé même si les échantillons proviennent de matrices similaires. En effet, si on analyse des échantillons provenant de cerveaux des différentes expériences biologiques, on ne peut savoir à l'avance la quantité de 17β -E₂ à doser. Néanmoins, même s'il ne sera pas possible dans le futur d'optimiser la réaction de dérivation jusqu'à la conversion complète de l'analyte en produit dérivé, la méthode avec dérivation restera toujours plus sensible en comparaison avec le dosage direct. Le paramètre à contrôler et à standardiser est le rendement de la réaction de dérivation, qui peut être inclus par la suite dans les calculs des concentrations du 17β -E₂.

III.7 CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons présenté la synthèse et la caractérisation structurale de dérivés 17 β -E₂-Dns, 17 β -E₂-PS, 17 β -E₂-DMIS, 17 β -E₂-PBS, 17 β -E₂-Q8S, 17 β -E₂-TS, 17 β -E₂-Ph, 17 β -E₂-DMAP, 17 β -E₂-FPh, 17 β -E₂-NO₂Ph et 17 β -E₂-DMAB. Certains dérivés ont déjà été décrits dans la littérature et utilisés pour le dosage du 17 β -E₂, tandis que les autres sont nouveaux. Les produits dérivés obtenus ont été testés en ESI-MS dans les deux modes d'ionisation, et les signaux obtenus ont été comparés avec le signal donné par le 17 β -E₂ sans dérivation. La majorité des produits de dérivation sont facilement ionisés en mode positif : la dérivation avec les agents DMABC, Dns-Cl, PS-Cl, DMIS-Cl et Q8S-Cl a augmenté considérablement l'intensité du signal du 17 β -E₂ par rapport à son signal sans dérivation. En mode négatif, seuls les dérivés 17 β -E₂-TS, 17 β -E₂-DMAP et 17 β -E₂-DMAB ont été ionisés et le 17 β -E₂-TS est l'unique dérivé qui a permis d'augmenter l'intensité du signal du 17 β -E₂ par rapport au 17 β -E₂ non-dérivé. Après l'analyse des spectres MS/MS de tous les composés, nous avons sélectionné trois dérivés qui génèrent des fragments spécifiques : les dérivés 17 β -E₂-Dns et 17 β -E₂-DMIS, déjà décrits dans la littérature, et le dérivé 17 β -E₂-Q8S qui n'a jamais été testé auparavant. Nous avons donc choisi de nous intéresser plus particulièrement au dérivé 17 β -E₂-Q8S. La meilleure LOD a été obtenue avec ce dérivé 17 β -E₂-Q8S, elle est de 0,025 fmole. μ L⁻¹, et la LOQ est de 0,05 fmole. μ L⁻¹.

La dernière partie de ce chapitre présente les essais de mise au point de l'étape de purification par SPE pour l'application au dosage avec dérivation au Q8S-Cl. Une cartouche Strata C18 a été utilisée comme support SPE, ainsi que le P-I pour la purification par SPE, ce qui assure une bonne récupération d'analyte (94 $\pm$ 8%) pour la solution standard de 17 β -E₂-Q8S.

Finalement, la dérivation a été appliquée pour le dosage du 17 β -E₂ dans le cerveau de souris traitées par voie sous-cutanée avec des quantités connues de 17 β -E₂. Les deux méthodes d'analyse par LC-ESI-MS/MS, sans et avec dérivation chimique, ont été comparées. Les résultats ont montré une perte de 35 à 60% de la concentration du 17 β -E₂ après le dosage réalisé avec la dérivation. À ce stade de développement de dosage du 17 β -E₂ avec dérivation, la méthode LC-MS/MS sans dérivation reste plus précise et robuste pour le dosage du 17 β -E₂ dans des matrices biologiques en routine. Cependant, les résultats préliminaires de dosage avec dérivation sont tout à fait encourageants, une attention particulière devant être portée à l'optimisation et la standardisation de l'étape de dérivation.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons rappelé le rôle important des œstrogènes (Estrone, Estradiol et Estriol) dans le cerveau, et notamment, dans la préservation de la mémoire et des fonctions cognitives dans le cas des maladies neurodégénératives. Nous avons également présenté le spectromètre de masse utilisée lors de nos études. Enfin, nous avons fait un récapitulatif des différentes méthodes de dosage des œstrogènes existantes. Lors de cette partie introductive, nous avons aussi essayé de souligner les différents problèmes posés par l'étude des œstrogènes (la faible capacité de ces molécules à s'ioniser et la difficulté d'extraire les œstrogènes présents dans des échantillons biologiques). Puis, nous avons présenté l'utilisation de la dérivation chimique afin d'améliorer la sensibilité de détection et d'augmenter le taux d'ionisation suite à l'introduction de groupements facilement ionisables.

La seconde partie de ce manuscrit est consacrée à la présentation des résultats obtenus lors de ce travail sous forme de deux chapitres.

Le premier point abordé concerne la quantification des œstrogènes sans dérivation chimique. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'influence du pH de la phase mobile sur la sélectivité de la séparation et la qualité de la détection par LC-MS/MS. Les résultats obtenus ont montré l'influence des additifs à des teneurs très faibles et l'amélioration du signal pour les solutions à un pH proche du pKa des analytes (0,1% TEA, pH = 11,2). Nous avons mis en évidence l'importance de différents paramètres techniques tels que le volume d'échantillon injecté et le «Dwell time». La spécificité analytique de la méthode a été validée selon quatre critères : le temps de rétention chromatographique des œstrogènes, la valeur de m/z de l'ion pseudo-moléculaire de la molécule à doser et deux transitions MRM correspondant aux m/z des deux ions fragments les plus intenses. Une des transitions est utilisée pour la quantification et l'autre pour la validation, les paramètres instrumentaux ayant été déterminés pour chaque transition MRM (DP, CE et CXP).

Le système chromatographique composé de la colonne à polarité de phases inversée (Gemini C18) couplé au spectromètre de masse (Sciex QTrap 5500) a été optimisé et validé par la détermination des limites de détection (0,01 à 0,5 fmole.μL⁻¹ en fonction de l'œstrogène dosé) et des limites de quantification (0,05 à 2,5 fmole.μL⁻¹), par la linéarité de réponse (> 0,99) et la reproductibilité (CV = 0,4 – 15,8% en intra-jour et de 1,2 – 20% en inter-jours).

Compte tenu de la complexité des matrices analysées, la purification des échantillons biologiques a demandé une attention particulière. Nous avons mis au point une méthode de purification par extraction liquide-liquide suivie d'une extraction sur phase solide. Plusieurs types de support d'extraction sur phase solide ont été testés, tels que les supports échangeurs

de cations, les supports hydrophiles-lipophiles et le support hydrophobe C18. Le meilleur résultat a été obtenu sur la cartouche C18. Cependant, nous avons remarqué que l'étape d'évaporation entraînait une grande perte de l'analyte. Nous avons essayé d'améliorer cette procédure en comparant deux types d'évaporation, mais en fin compte, le processus le mieux adapté était plus long. En revenant à l'évaporation classique (sous pression réduite au speed-vac) la solution d'ajout de standard interne dès le début de préparation a été adoptée pour corriger les pertes des analytes lors de cette étape.

La méthode RPLC-ESI(-)-MS/MS (après l'extraction LL et la SPE) a été validée sur des échantillons de plasma, de cerveau et d'hippocampe prélevés sur des animaux traités avec des quantités connues de 17β -E₂. Deux procédures d'administration ont été comparées : l'administration par voie sous-cutanée et l'administration dans l'eau de boisson. Grâce à la grande sensibilité de la méthode, il a même été possible de doser du 17β -E₂ chez les mâles du groupe placebo ($0,003 \pm 0,001$ pmole.mg⁻¹ dans l'hippocampe).

Le deuxième point de ce travail de thèse a été la mise en place d'une nouvelle méthode qui implique la dérivation chimique, afin d'estimer s'il y a une influence sur la sensibilité de détection du 17β -E₂.

Nous avons commencé par synthétiser et caractériser par RMN les composés purs afin de déterminer sur le quel groupement hydroxyle, aliphatique ou phénolique, la dérivation a lieu. Onze dérivés ont été synthétisés: 17β -E₂-Dns, 17β -E₂-PS, 17β -E₂-DMIS, 17β -E₂-PBS, 17β -E₂-TS, 17β -E₂-DMAP, 17β -E₂-DMAB, 17β -E₂-Q8S, 17β -E₂-Ph, 17β -E₂-FPh et 17β -E₂-NO₂Ph, les quatre derniers n'ayant jamais été testés auparavant. La majorité des produits de dérivation ont été facilement ionisés en mode positif. Le taux d'ionisation du 17β -E₂ a été considérablement amélioré par rapport au signal obtenu sans dérivation dans le cas des dérivés : DMAB, Dns, PS, DMIS et Q8S. En mode négatif, seuls les dérivés 17β -E₂-TS, 17β -E₂-DMAP et 17β -E₂-DMAB ont été ionisés et le 17β -E₂-TS a été l'unique dérivé qui a permis d'augmenter l'intensité du signal du 17β -E₂ (par rapport au signal obtenu sans dérivation). Après l'analyse des spectres MS/MS de tous les composés, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au dérivé 17β -E₂-Q8S.

Pour ce dernier, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Luna Phenyl-Hexyl en phase inverse. La méthode a été validée par la limite de détection ($0,025$ fmole.μL⁻¹) et de quantification ($0,05$ fmole.μL⁻¹) pour 17β -E₂ uniquement.

Nous avons poursuivi la mise au point de dosage du 17β -E₂ avec cette nouvelle dérivation par des essais de purification par SPE. La cartouche Strata C18 a été utilisée comme support SPE, ainsi que le P-I employé dans la première partie de ce travail. Dans ces conditions, une bonne récupération d'analyte ($94 \pm 8\%$) a été obtenue pour la solution standard de 17β -E₂-

Q8S.

La méthode a été appliquée pour la quantification du 17β -E₂ dans les échantillons déjà utilisé pour le dosage direct étudié en première partie de ce travail. En comparant les deux méthodes d'analyse, sans et avec dérivation chimique, nous avons observé une perte de 35 à 60% du 17β -E₂ après le dosage réalisé avec la dérivation. L'inconvénient majeur de la méthode qui implique la dérivation est l'ajout de cette étape supplémentaire, ce qui augmente la durée et le coût de l'analyse, implique l'utilisation d'un agent de dérivation pas toujours stable et donne, des rendements de synthèse du dérivé dépendants de l'échantillon biologique et pas toujours reproductibles. D'après ces résultats, nous avons estimé que la méthode LC-MS/MS sans dérivation reste plus précise et robuste pour le dosage du 17β -E₂ dans des matrices biologiques. Le dosage avec dérivation chimique présente toujours une alternative intéressante, mais des efforts supplémentaires sur l'optimisation des conditions de réaction de dérivation sur l'extrait d'échantillon biologique et sur la standardisation sont encore nécessaires.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de réaliser la mise au point d'une nouvelle méthode de préparation d'échantillons biologiques et d'une nouvelle méthode de dosage des œstrogènes avec HPLC-ESI(-)-MS/MS.

Les résultats de cette thèse permettent aussi d'ouvrir de nouvelles perspectives, comme :

- a) la validation de la méthode en vue d'une utilisation en routine pour le dosage des œstrogènes. En effet, l'équipe Physiopathologie de la mémoire déclarative du Neurocentre Magendie, dirigée par Dr. Aline Marighetto, est demandeuse d'un tel dosage pour étudier l'effet mnésique lié à l'âge à travers le dosage de l'Estradiol ;
- b) le test du dérivé 17β -E₂-TS en HPLC-ESI(-)-MS/MS. Le travail a déjà commencé (après les premiers essais, une LOD de 0,005 fmole.μL⁻¹ et LOQ de 0,05 fmole.μL⁻¹ ont été obtenus), mais il reste à valider la LOD et la LOQ sur des solutions standards, et à appliquer la dérivation sur des échantillons biologiques ;
- c) l'étude de la localisation des œstrogènes avec l'imagerie par spectrométrie de masse. Cela permettrait d'observer la distribution de ces molécules dans chaque région du tissu cérébral et de comparer les profils moléculaires (images) entre les tissus normaux et pathologiques de différentes structures cérébrales. Par la suite, cela pourrait aider à localiser la région cérébrale la plus affectée dans le cas des maladies neurodégénératives.

ANNEXES

- Annexe I** **La précision du dosage des stéroïdes E₁, 17β-E₂, 17α-E₂, E₃ sans dérivation**
- Annexe II** **Protocole de préparation des échantillons.**
- Annexe III** **Application du dosage LC-MS/MS des œstrogènes (sans dérivation) aux échantillons biologiques**
- Annexe IV** **Caractérisation des molécules obtenues (RMN)**
- Annexe V** **Les ions précurseurs et les ions fragments les plus abondants et spécifiques des dérivés synthétisés**
- Annexe VI** **Gamme d'étalonnage sur les solutions standard des dérivés 17β-E₂-Dns, 17β-E₂-DMIS et 17β-E₂-Q8S**
- Annexe VII.** **Communications écrites et orales réalisées durant la thèse**

Annexe I. La précision du dosage des stéroïdes E₁, 17β-E₂, 17α-E₂, E₃ sans dérivation

Les paramètres qui caractérisent la précision d'une série d'analyse, à savoir le coefficient de variation (CV), la déviation standard (SD), la déviation standard relative (RSD) et l'intervalle de confiance, sont calculés pour les quatre œstrogènes.

Les précisions intra- et inter-jours ont été établies sur les analyses effectuées pendant trois jours différents sur les solutions standards des analytes de neuf concentrations différentes (Tableau AI).

En résumé, les données obtenues se retrouvent dans l'intervalle de confiance calculé pour un degré de liberté de 95%. Les CV se retrouvent dans un intervalle de 0,4 – 15,8% en intra-jour et de 1,2 – 20% en inter-jours. Pour les SD et RSD des valeurs intra-journalières sont acceptables et sont à la limite d'acceptation pour les analyses inter-jours.

Tableau AI : Précision des analyses intra- et inter-jour

Precision intra-day																					
Jour	C, fmol.µL ⁻¹	Moyenne Aire de pic (n=3)				CV, %				SD, %				RSD, %				Intervalle de confiance, degré de liberté de 95%			
		E ₁	17β-E ₂	17α-E ₂	E ₃	E ₁	17β-E ₂	17α-E ₂	E ₃	E ₁	17β-E ₂	17α-E ₂	E ₃	E ₁	17β-E ₂	17α-E ₂	E ₃	E ₁	17β-E ₂	17α-E ₂	E ₃
1	0,01	2.33E-03	-	-	5.35E-03	1,3	-	-	7,0	0,002	-	-	0,02	0,8	-	-	4,1	2.28E-03 2.38E-03	-	-	4.71E-03 5.98E-03
	0,025	3.54E-03	-	-	6.69E-03	5,5	-	-	6,5	0,01	-	-	0,02	3,2	-	-	3,7	3.21E-03 3.87E-03	-	-	5.97E-03 7.42E-03
	0,05	4.45E-03	-	-	8.71E-03	4,3	-	-	5,5	0,01	-	-	0,03	2,5	-	-	3,0	4.13E-03 4.77E-03	-	-	7.94E-03 9.48E-03
	0,1	6.00E-03	2.35E-02	2.70E-02	1.32E-02	6,0	7,9	7,7	7,6	0,02	0,1	0,12	0,06	3,4	4,6	4,4	4,4	5.40E-03 6.60E-03	2.04E-02 2.66E-02	2.35E-02 3.05E-02	1.15E-02 1.49E-02
	0,25	1.07E-02	4.79E-02	4.21E-02	2.03E-02	11,5	4,2	1,4	7,1	0,07	0,1	0,03	0,08	6,6	2,4	0,8	4,1	8.63E-03 1.28E-02	4.78E-02 4.79E-02	4.11E-02 4.31E-02	1.79E-02 2.28E-02
	0,5	2.29E-02	1.27E-01	1.34E-01	3.52E-02	7,1	6,0	15,8	7,9	0,09	0,5	1,22	0,16	4,1	3,5	9,1	4,5	2.02E-02 2.57E-02	1.27E-01 1.28E-01	9.84E-02 1.70E-01	3.06E-02 3.99E-02
	1,0	4.22E-02	2.16E-01	2.77E-01	5.18E-02	10,0	4,0	0,8	8,1	0,24	0,5	0,12	0,24	5,8	2,4	0,5	4,7	3.51E-02 4.93E-02	2.16E-01 2.17E-01	2.73E-01 2.80E-01	4.47E-02 5.89E-02
	2,5	1.02E-01	4.33E-01	4.70E-01	1.08E-01	6,7	3,4	1,9	9,4	0,39	0,8	0,50	0,59	3,9	1,9	1,1	5,4	9.03E-02 1.13E-01	4.31E-01 4.35E-01	4.55E-01 4.85E-01	9.13E-02 1.26E-01
	5,0	2.09E-01	9.53E-01	9.34E-01	1.92E-01	7,8	0,4	1,5	7,2	0,94	0,2	0,80	0,80	4,5	0,2	0,9	4,2	1.81E-01 2.36E-01	9.52E-01 9.54E-01	9.11E-01 9.57E-01	1.69E-01 2.16E-01
2	0,01	2.12E-03	-	-	5.40E-03	4,8	-	-	3,2	0,006	-	-	0,01	2,8	-	-	1,9	1.95E-03 2.29E-03	-	-	5.11E-03 5.69E-03
	0,025	3.48E-03	-	-	6.94E-03	1,9	-	-	3,2	0,004	-	-	0,01	1,1	-	-	1,8	3.37E-03 3.59E-03	-	-	6.56E-03 7.31E-03
	0,05	4.24E-03	-	-	8.13E-03	2,0	-	-	1,0	0,005	-	-	0,01	1,2	-	-	0,6	4.09E-03 4.38E-03	-	-	7.99E-03 8.27E-03
	0,1	5.87E-03	3.57E-02	2.57E-02	1.43E02	5,6	10,0	3,8	9,5	0,02	0,2	0,06	0,08	3,3	5,7	2,2	5,5	5.31E-03 6.43E-03	2.98E-02 4.17E-02	2.41E-02 2.74E-02	1.20E-02 1.66E-02
	0,25	1.04E-02	5.23E-02	4.34E-02	2.33E02	7,0	10,3	4,0	9,5	0,04	0,3	0,10	0,13	4,1	6,0	2,3	5,5	9.21E-03 1.17E-02	5.22E-02 5.24E-02	4.04E-02 4.63E-02	1.96E-02 2.70E-02
	0,5	2.27E-02	1.17E-01	1.64E-01	3.19E02	5,3	2,6	2,1	1,2	0,07	0,2	0,20	0,02	3,1	1,5	1,2	0,7	2.07E-02 2.48E-02	1.17E-01 1.22E-01	1.58E-01 1.70E-01	3.13E-02 3.25E-02
	1,0	4.14E-02	3.05E-01	2.37E-01	4.75E02	5,8	3,0	4,9	5,5	0,14	0,5	0,66	0,15	3,3	1,7	2,8	3,2	3.74E-02 4.55E-02	3.05E-01 3.06E-01	2.17E-01 2.56E-01	4.31E-02 5.19E-02
	2,5	1.02E-01	5.74E-01	4.43E-01	1.20E-01	2,0	6,1	7,1	3,1	0,14	2,0	1,82	0,22	1,2	3,5	4,1	1,8	9.85E-02 1.06E-01	5.67E-01 5.81E-01	3.90E-01 4.96E-01	1.14E-01 1.26E-01
	5,0	2.29E-01	1.35E+00	9.57E-01	2.06E-01	7,2	2,3	1,2	6,6	0,94	1,8	0,68	0,78	4,1	1,3	0,7	3,8	2.01E-01 2.57E-01	1.33E+00 1.36E+00	9.37E-01 9.77E-01	1.83E-01 2.29E-01
3	0,01	2.45E-03	-	-	4.93E-03	4,6	-	-	11,3	0,007	-	-	0,03	2,7	-	-	6,6	2.26E-03 2.64E-03	-	-	3.99E-03 5.88E-03
	0,025	3.62E-03	-	-	6.33E-03	3,1	-	-	3,1	0,007	-	-	0,01	1,8	-	-	1,8	3.43E-03 3.81E-03	-	-	6.00E-03 6.66E-03
	0,05	4.48E-03	-	-	8.86E-03	3,2	-	-	3,7	0,008	-	-	0,02	1,8	-	-	2,1	4.24E-03 4.72E-03	-	-	8.32E-03 9.41E-03
	0,1	5.90E-03	3.03E-02	2.74E-02	1.46E-02	8,6	5,6	4,4	8,6	0,03	0,1	0,07	0,07	5,0	3,3	2,5	4,9	5.05E-03 6.75E-03	2.74E-02 3.32E-02	2.53E-02 2.94E-02	1.25E-02 1.68E-02
	0,25	1.24E-02	5.18E-02	4.54E-02	1.94E-02	5,3	8,0	4,3	7,6	0,04	0,2	0,11	0,09	3,0	4,6	2,5	4,4	1.13E-02 1.35E-02	5.17E-02 5.19E-02	4.22E-02 4.87E-02	1.69E-02 2.19E-02
	0,5	2.14E-02	1.31E-01	1.29E-01	3.59E-02	2,7	8,4	6,3	6,7	0,03	0,6	0,47	0,14	1,6	4,9	3,6	3,9	2.04E-02 2.24E-02	1.31E-01 1.32E-01	1.15E-01 1.43E-01	3.18E-02 3.99E-02

1,0	4.51E-02	2.88E-01	2.57E-01	5.17E-02	5,8	10,4	2,6	4,0	0,15	1,7	0,40	0,12	3,4	6,0	1,5	2,3	4.07E-02 4.96E-02	2.86E-01 2.91E-01	2.45E-01 2.68E-01	4.82E-02 5.53E-02
2,5	1.36E-01	5.24E-01	5.17E-01	1.25E-01	6,6	9,0	1,0	9,8	0,52	2,7	0,28	0,71	3,8	5,2	0,6	5,7	1.21E-01 1.51E-01	5.15E-01 5.33E-01	5.08E-01 5.25E-01	1.05E-01 1.46E-01
5,0	2.70E-01	1.40E+00	9.83E-01	2.07E-01	6,6	2,3	0,4	11,3	1,00	1,9	0,22	1,35	3,8	1,3	0,2	6,5	2.39E-01 3.00E-01	1.38E+00 1.41E+00	9.76E-01 9.89E-01	1.68E-01 2.47E-01
Précision inter-day																				
0,01	2.30E-03	-	-	5.23E-03	7,3	-	-	4,9	0,01	-	-	0,01	4,2	-	-	2,8	2.02E-03 2.58E-03	-	-	4.80E-03 5.66E-03
0,025	3.55E-03	-	-	6.65E-03	2,0	-	-	4,6	0,004	-	-	0,02	1,2	-	-	2,7	3.43E-03 3.58E-03	-	-	6.14E-03 7.17E-03
0,05	4.39E-03	-	-	8.57E-03	3,0	-	-	4,5	0,008	-	-	0,02	1,8	-	-	2,6	4.17E-03 4.61E-03	-	-	7.92E-03 9.22E-03
0,1	5.92E-03	2.98E-02	2.67E-02	1.40E-02	1,2	20,0	3,2	5,5	0,004	0,4	0,001	0,04	0,7	11,9	1,8	3,2	5.81E-03 6.04E-03	1.95E-02 4.01E-02	2.53E-02 2.81E-02	1.28E-02 1.53E-02
0,25	1.12E-02	5.07E-02	4.36E-02	2.10E-02	9,3	4,8	3,9	9,7	0,06	0,1	0,001	0,12	5,4	2,8	2,2	5,6	9.41E-03 1.29E-02	4.66E-02 5.47E-02	4.08E-02 4.65E-02	1.76E-02 2.44E-02
0,5	2.24E-02	1.25E-01	1.42E-01	3.43E-02	3,7	6,0	13,2	6,2	0,05	0,4	0,01	0,12	2,2	3,4	7,6	3,6	2.10E-02 2.38E-02	1.13E-01 1.38E-01	1.11E-01 1.74E-01	3.08E-02 3.79E-02
1,0	4.29E-02	2.70E-01	2.57E-01	5.03E-02	4,6	17,5	7,7	4,9	0,11	2,7	0,01	0,14	2,6	10,1	4,5	2,8	3.96E-02 4.62E-02	1.90E-01 3.50E-01	2.23E-01 2.90E-01	4.62E-02 5.45E-02
2,5	1.13E-01	5.10E-01	4.77E-01	1.18E-01	17,4	14,0	7,8	7,2	1,14	4,2	0,02	0,49	10,1	8,1	4,5	4,2	8.00E-02 1.47E-01	3.89E-01 6.32E-01	4.14E-01 5.39E-01	1.04E-01 1.32E-01
5,0	2.36E-01	1.23E+00	9.58E-01	2.02E-01	13,2	19,7	2,5	4,1	1,80	14,0	0,01	0,48	7,6	11,4	1,5	2,4	1.83E-01 2.88E-01	8.23E-01 1.64E+00	9.17E-01 9.99E-01	1.88E-01 2.16E-01

Annexe II. Protocole de préparation des échantillons.

AII.1. Protocole de préparation des solutions standards

Divers mélanges d'œstrogènes ont été préparés pour l'optimisation des paramètres MS et la construction des droites d'étalonnage:

- (1) *Optimisation des paramètres MS.* La solution de 100 fmol. μL^{-1} de $17\beta\text{-E}_2$ dans acétonitrile : eau (80/20, v/v) a été utilisée telle quelle ou avec un ajout de divers additifs à différentes concentrations. Les concentrations testées correspondent à 0,1, 0,5 et 1% d'additifs, provenant des solutions mères d'additifs (dans le même mélange de solvants) ayant des concentrations de 1mM pour le $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NH_4F , NH_4Cl , HCOONH_4 et CH_3COOLi , 7,2M pour la TEA et 26,5M pour le HCOOH . L'analyse a été effectuée par infusion directe dans la source ESI dans les deux modes d'ionisation, positif et négatif (en utilisant un pousse-seringue à un débit de 7 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$).
- (2) *Préparation des solutions standards pour les droites d'étalonnage.* Pour chacun des 9 points de gamme, 50 μL de mélange des œstrogènes ont été préparés dans CH_3OH : H_2O (60:40 v/v). Les concentrations de quatre œstrogènes ($17\alpha\text{-E}_2$, $17\beta\text{-E}_2$, E_1 et E_3), ont été comprises entre 0,01 et 5 fmoles. μL^{-1} (0,01/ 0,025/ 0,05/ 0,1/ 0,25/ 0,5/1,0/ 2,5/ 5,0). Quelle que soit la solution d'étalon considéré, les concentrations des standards internes $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ et $\text{E}_1\text{-}^{13}\text{C}_3$ étaient constantes et fixées à 6 fmoles. μL^{-1} (0,3 pmole au total dans la solution d'injection de 50 μL).
- (3) *Préparation des solutions pour établir les droites d'étalonnage à partir de l'extrait de cerveau et de plasma dopé.* Les échantillons, 10 mg de cerveaux ou 100 μL de plasma de souris mâle, ont été dopés avec une gamme de cinq concentrations comprises entre 0,5 et 10 fmoles. μL^{-1} (0,5/ 1,0/ 2,5/ 5,0/ 10,0). La concentration des molécules marquées $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ et $\text{E}_1\text{-}^{13}\text{C}_3$ était fixée à 6 fmoles. μL^{-1} (0.3 pmole dans la solution d'injection, $V=50\mu\text{L}$). Les solutions mères de tous les œstrogènes et de $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ ont été stockées dans l'éthanol à -20°C . Le dopage est réalisé avant l'étape d'extraction liquide-liquide et de purification par SPE.

AII.2. Protocole de préparation des échantillons biologiques pour le dosage direct des œstrogènes (sans dérivation)

Les hippocampes ont été séparés des cerveaux. Les échantillons cérébraux ont été pesés (précision de 0,01 mg), placé dans les flacons (tubes spéciaux pour Precellys, CK14 - 2 mL avec des billes de 1,4 mm de diamètre en céramique (oxyde de zirconium), référence : KT03961-1-003.2, Bertin Technologies, Ozyme - France) pour être broyés et homogénéisés dans 600 µL de tampon phosphate (pH 7,2) à l'aide d'un homogénéisateur Precellys 24. Le temps d'homogénéisation est d'une minute au total (deux cycles de 30s avec un intervalle de 30s entre les deux pour limiter la surchauffe de l'échantillon), à 2800G et à température ambiante. Les tubes sont immédiatement refroidis et stockés dans une boîte à glace. Les volumes d'homogénat correspondant à 10 mg de tissu (cerveau ou hippocampe) ou 100 µL de plasma sont prélevés dans les Eppendorfs de 1,5 mL où les standards internes $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ et $\text{E}_1\text{-}^{13}\text{C}_3$ (0,3 pmol par échantillon) sont ajoutés. Après l'addition de 200 µL de tampon citrate phosphate (pH = 5), les échantillons sont vortexés pendant 30s et ensuite stockés pendant 15 minutes à 4°C. Les œstrogènes sont extraits avec 500 µL d'un mélange acétate d'éthyle: cyclohexane (50/50, v/v). Après centrifugation à 4800G pendant 3 min à 4°C, les surnageants sont récupérés et l'extraction est répétée encore deux fois. Les phases organiques réunies sont séchées au Speedvac à température ambiante et stocké à -80°C jusqu'à l'étape SPE.

Si nécessaire, la digestion enzymatique (DE) totale peut être réalisée. Cette étape intervient après l'ajout du standard interne. Les échantillons sont homogénéisés dans 300 µL de tampon acétate (pH = 5). A cette solution, 5 µL d'enzyme de déconjugaison (β -glucuronidase / arylsulfatase, Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant une nuit à 37°C, puis le même procédé d'extraction liquide-liquide est appliqué.

La purification par SPE des extraits séchés est réalisée à l'aide d'un extracteur automatisé (Gilson GX-271 ASPEC™), avec les cartouches Strata C18-E (50 mg, 1 mL, Phenomenex). Les échantillons sont dissouts dans 0,5 mL d'eau contenant 10% de méthanol (v/v). Les cartouches SPE sont ensuite lavées avec 2 mL (débit 1 mL.min⁻¹) de méthanol, et équilibrées avec de l'eau dans les mêmes conditions. Après chargement de la totalité d'échantillon 500 µL (débit 0,1 mL.min⁻¹), les cartouches SPE sont lavées avec 1 mL d'eau, puis avec 1 mL d'hexane (débit 1 mL.min⁻¹). Les œstrogènes sont élués avec 2 mL d'acétate d'éthyle (débit 0.1 mL.min⁻¹), puis les cartouches sont séchées. La dernière solution récupérée est évaporée à sec au Speedvac à température ambiante.

AII.3. Protocole de préparation des échantillons biologiques pour le dosage du $17\beta\text{-E}_2$ avec dérivation au Q8S-Cl

Les cerveaux (séparés des hippocampes) ont été pesés (précision de 0,01 mg), broyés et homogénéisés dans 600 μL de tampon phosphate (pH 7,2) dans les conditions décrites dans la partie AII.2. Les volumes d'homogénat correspondant à 10 mg de cerveau sont prélevés dans les Eppendorfs de 1,5 mL où le standard interne $17\beta\text{-E}_2\text{-}^{13}\text{C}_3$ (0,3 pmol par échantillon) est ajouté. Après l'addition de 200 μL du tampon citrate phosphate (pH = 5), les échantillons sont vortexés pendant 30 s et ensuite stockés pendant 15 minutes à 4 °C. Le $17\beta\text{-E}_2$ est extrait avec 500 μL d'un mélange acétate d'éthyle : cyclohexane (50/50, v/v). Après centrifugation à 4800G pendant 3 min à 4°C, les surnageants sont récupérés et l'extraction se répète deux fois. Les phases organiques réunies sont séchées au Speedvac à température ambiante et stocké à -80°C jusqu'à l'étape de dérivation.

Ensuite, 200 μL de solution de chlorure de quinoline-8-sulfonyle (Q8S-Cl) (100 fmoles. μL^{-1} dans l'acétone) ont été ajoutés dans chaque échantillon. La quantité de Q8S-Cl utilisée pour chaque réaction correspond approximativement à 1000 équivalents par rapport à la quantité de $17\beta\text{-E}_2$ (estimée par le dosage sans dérivation). Le mélange est mis sous agitation pendant deux minutes. Puis, 200 μL de Na_2CO_3 à 100 pmol. μL^{-1} ont été ajoutés pour ajuster le pH à 10. La réaction est réalisée à 60°C sous agitation pendant 40 min. Une fois ce temps écoulé, les solutions sont refroidies à -20°C pendant 3 min, ensuite évaporées à sec au Speedvac à température ambiante. Par la suite, elles sont resolubilisées dans 0,5 mL d'eau contenant 10% d'acétonitrile (v/v).

La purification par SPE a été réalisée à l'aide d'un extracteur automatisé (Gilson GX-271 ASPEC™), avec les cartouches Strata C18-E (50 mg, 1 mL, Phenomenex). Les cartouches SPE sont lavées avec 2 mL (débit 1 mL.min⁻¹) d'acétonitrile, et équilibrées avec de l'eau. Après le chargement de la totalité de l'échantillon (500 μL à un débit de 0,1 mL.min⁻¹), les cartouches SPE sont lavées avec 2 mL de 20% d'ACN (débit 1 mL.min⁻¹). Le dérivé $17\beta\text{-E}_2\text{-Q8S}$ est élué avec 2 mL de 50% d'ACN (débit 0,1 mL.min⁻¹), puis les cartouches sont séchées. Les solutions récupérées sont évaporées à sec au Speedvac à température ambiante. Les extraits sont repris dans 50 μL de solution $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (60/40, v/v) et analysés en LC-MS/MS.

Annexe III. Application du dosage LC-MS/MS des œstrogènes (sans dérivation) aux échantillons biologiques

Pour comprendre les résultats présentés ci-dessous il faut avoir en tête le schéma métabolique suivant :

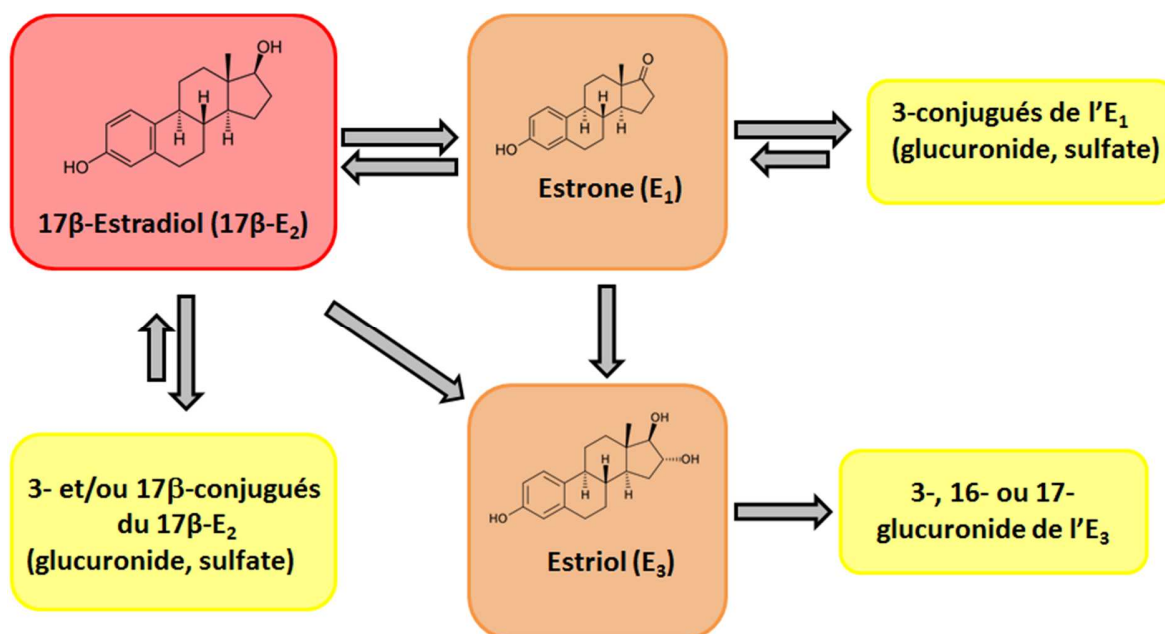


Figure AIII.1 : Voies métaboliques permettant la réduction de l'activité des œstrogènes.

L'Estradiol (17β-E₂) peut être désactivé de plusieurs façons différentes. Il peut être directement conjugué en position 3- ou 17β-. La formation des deux formes mono-conjuguées (glucuronide ou sulfate) est possible pour chaque hydroxyle. Des dérivés du 17β-E₂ doublement conjugués ont également été identifiés, il s'agit des formes diglucuronidées (deux motifs glucuronide, l'un après l'autre, uniquement en position 17β-) ou disulfatées en position 3- et 17β-. Il existe également des formes mixtes, c'est-à-dire glucuronidée en position 3- et sulfatée en 17β-, ou l'inverse.

Le 17β-E₂ est inclus dans une chaîne métabolique complexe.¹ Le 17β-E₂ peut aussi être désactivé par une métabolisation en Estrone (E₁) et en Estriol (E₃). Ces composés sont beaucoup moins œstrogéniques que le 17β-E₂ ; l'un des deux est considéré actuellement comme une forme de stockage. En effet, la réaction métabolique est réversible dans le cas de l'E₁ et permet la

¹ <http://lsresearch.thomsonreuters.com/maps/850/> ;
<http://lsresearch.thomsonreuters.com/maps/849/>

mobilisation de la forme active en cas de besoin. L'E₁ est déstockée par la formation de conjugués de type glucuronide ou sulfate. Notons que l'hydrolyse enzymatique effectuée lors des analyses présentées ici réduit l'ensemble de ces composés conjugués en composés analysables. Lorsque l'on parle de composés totaux il faut entendre l'ensemble de toutes les formes libres et conjuguées qu'elles soient glucuronidées ou sulfatées. La gradation de couleur du rouge au jaune et passant par l'orange indique une échelle décroissante d'œstrogénécité (Figure AIII.1).

Afin d'estimer les variations possibles, toutes les données ont été analysées statistiquement par le test d'ANOVA (outil StatGraphics) pour un intervalle de confiance de 95%. L'échantillon « cerveau » signifie : le cerveau entier sans hippocampe. Toutes les données présentées ici sont originales car elles ne sont pas encore disponibles dans la littérature.

AIII.1. Variation de la concentration du 17β-E₂ dans le cerveau et l'hippocampe en fonction de l'âge

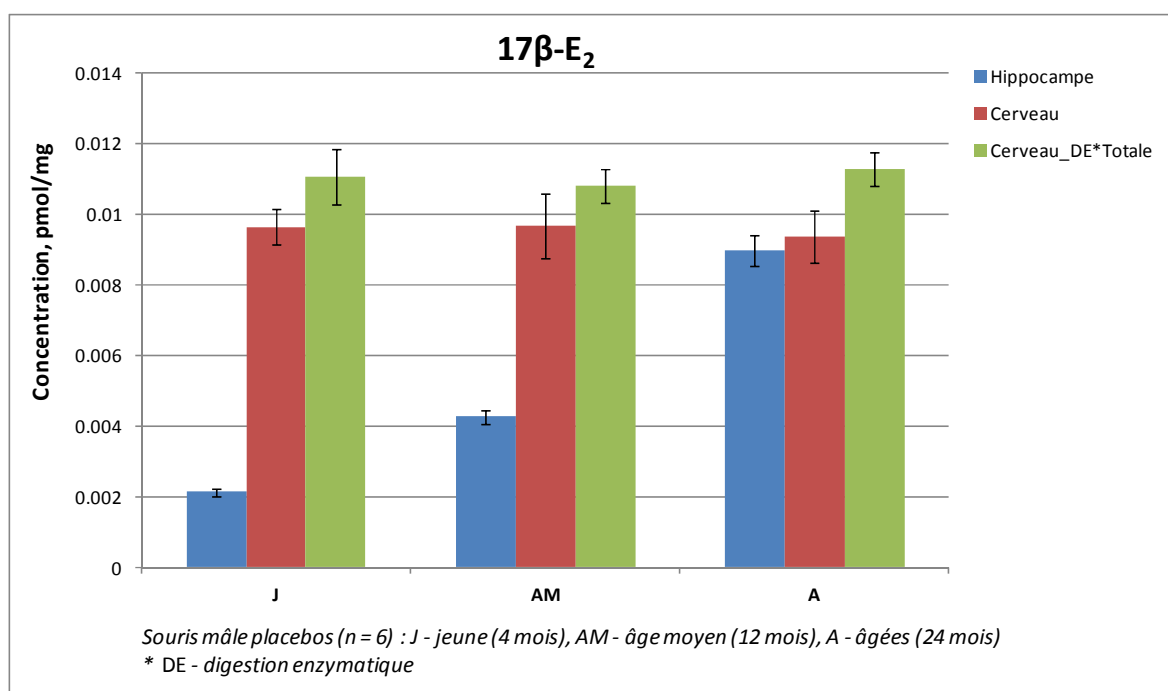


Figure AIII.2 : Variation de la concentration du 17β-E₂ en fonction de l'âge

L'étude de la variation de la concentration du 17β-E₂ a été réalisée sur trois groupes d'âge de souris mâles placebos (n = 6 par groupe) : jeunes (4 mois), âge moyen (12 mois) et âgées (24 mois). Ces dosages avaient pour but d'analyser l'évolution naturelle de l'hormone dans l'hippocampe et le cerveau.

Hippocampe. Avec l'âge, une augmentation d'un facteur deux de la concentration du 17β-

E₂ dans l'hippocampe a été observée entre les souris de 4 mois et celles de 12 mois. Précisément, les concentrations hippocampiques ont évoluées de $0,0021 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ à $0,0043 \pm 0,0004$ pmol.mg⁻¹ chez les souris jeunes et d'âge moyen respectivement (*Figure AIII.2*). De la même façon, la concentration du 17β-E₂ dans l'hippocampe a encore augmenté avec l'âge et est de $0,009 \pm 0,001$ pmole.mg⁻¹ chez les souris âgées de 24 mois. Ainsi, dans l'hippocampe, si l'on compare les souris jeunes et âgées, il apparaît que la concentration du 17β-E₂ a augmenté d'un facteur quatre chez les souris âgées.

Cerveau. Dans le même temps, la concentration du 17β-E₂ dans le cerveau entier (sans hippocampe) est restée stable : $0,0095 \pm 0,0014$ pmol.mg⁻¹ et $0,011 \pm 0,001$ pmole.mg⁻¹ après la digestion enzymatique totale. La comparaison des concentrations du 17β-E₂ dans le cerveau obtenues avec (en vert) ou sans (en rouge) digestion enzymatique totale révèle le faible niveau de conjugaison : la forme dominante est le 17β-E₂ libre.

AIII.2. Concentration des œstrogènes après l'injection par voie sous-cutanée des différentes concentrations du 17β-E₂

Une partie de ces résultats est présentée et discutée dans la partie principale de thèse (Chapitre II.3). Il s'agit surtout des données sur les taux de 17β-E₂, trouvés dans les tissus cérébraux et le plasma des souris après différents modes d'administration du 17β-E₂ (injection sous-cutanée ou par voie orale dans l'eau de boisson). Les deux modes d'administration sont couramment utilisés au laboratoire pour les expériences biologiques.

Après l'administration par voie sous-cutanée (n = 5 par groupe), les souris mâles placebo ont été comparées aux animaux ayant reçu une injection de 3, 10 et 150 µg de 17β-E₂ et sacrifiés une heure après. La méthode de dosage sans dérivation a été appliquée à tous les échantillons pour rechercher les taux des quatre œstrogènes, 17β- et 17α-E₂, E1 et E3. La présence de 17α-E₂ n'a été détectée dans aucun échantillon analysé.

17β-Estradiol

Avec l'augmentation de la quantité injectée, une augmentation de la concentration du 17β-E₂ a été observée dans toutes les matrices étudiées (*Figure AIII.3*).

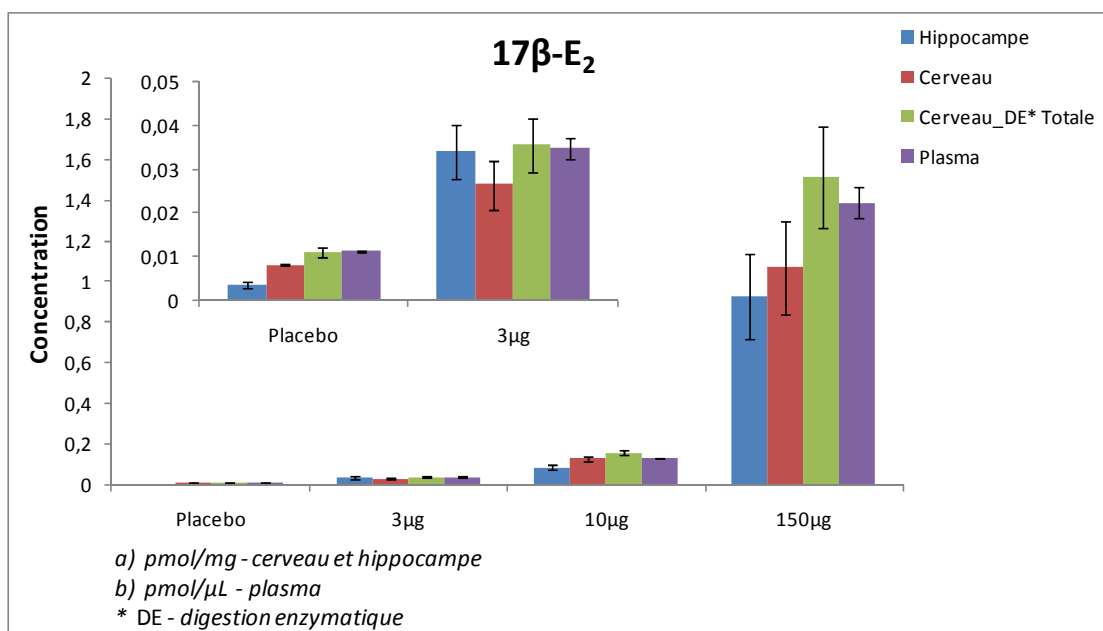


Figure AIII.3 : Concentration du $17\beta\text{-E}_2$ dans les échantillons cérébraux et le plasma en fonction des concentrations injectées. Souris de 4 mois : JP (n=5) – jeunes souris placebos, 3 μg (n=5), 10 μg (n=5) et 150 μg (n=5) – jeunes souris ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3, 10 et 150 μg du $17\beta\text{-E}_2$

Hippocampe. La concentration du $17\beta\text{-E}_2$ dans l'hippocampe était de $0,003 \pm 0,001$ (placebo); $0,034 \pm 0,012$; $0,084 \pm 0,029$ et $0,927 \pm 0,416$ pmole.mg^{-1} après l'injection respective de 3, 10 et 150 μg . Ainsi, même l'injection de la plus faible concentration de $17\beta\text{-E}_2$ augmente considérablement son taux dans l'hippocampe (facteur 10 par rapport au taux normal). La tendance s'accroît de façon spectaculaire avec l'augmentation des quantités injectées, atteignant après l'injection de 150 μg , un niveau 300 fois supérieur au taux basal.

Cerveau. Dans le cerveau (sans hippocampe), la concentration du $17\beta\text{-E}_2$ libre était de $0,0080 \pm 0,0004$ pmole.mg^{-1} (placebo) ; $0,026 \pm 0,011$ pmole.mg^{-1} (3 μg) ; $0,125 \pm 0,024$ pmole.mg^{-1} (10 μg) et $1,07 \pm 0,45$ pmole.mg^{-1} (150 μg). L'évolution du niveau de $17\beta\text{-E}_2$ suit la même tendance que celle de l'hippocampe, arrivant à l'augmentation d'un facteur 130 pour l'injection de 150 μg . Pour cette injection, la présence des formes conjuguées devient également très importante et représente autour de 30% du $17\beta\text{-E}_2$ total.

Pour l'injection des très fortes doses, des niveaux très variables du $17\beta\text{-E}_2$ ont été observés pour les deux types d'échantillons (cerveau et hippocampe).

Plasma. De même, la concentration plasmatique du $17\beta\text{-E}_2$ était de $0,0112 \pm 0,0006$ $\text{pmole.}\mu\text{L}^{-1}$ (placebo); $0,037 \pm 0,002$ $\text{pmole.}\mu\text{L}^{-1}$; $0,131 \pm 0,003$ $\text{pmole.}\mu\text{L}^{-1}$ et $1,39 \pm 0,15$

pmole. μL^{-1} après l'injection respective de 3, 10 et 150 μg de $17\beta\text{-E}_2$. L'injection de 150 μg augmente le taux circulant du $17\beta\text{-E}_2$ libre d'un facteur 124 (pratiquement le même que pour le cerveau). Malheureusement, compte tenu des quantités insuffisantes de plasma, l'analyse avec la digestion enzymatique n'a pas pu être réalisée.

Estrone

Avec l'augmentation de la quantité injectée, une augmentation de la concentration de l' E_1 a été observée dans toutes les matrices étudiées (Figure AIII.4).

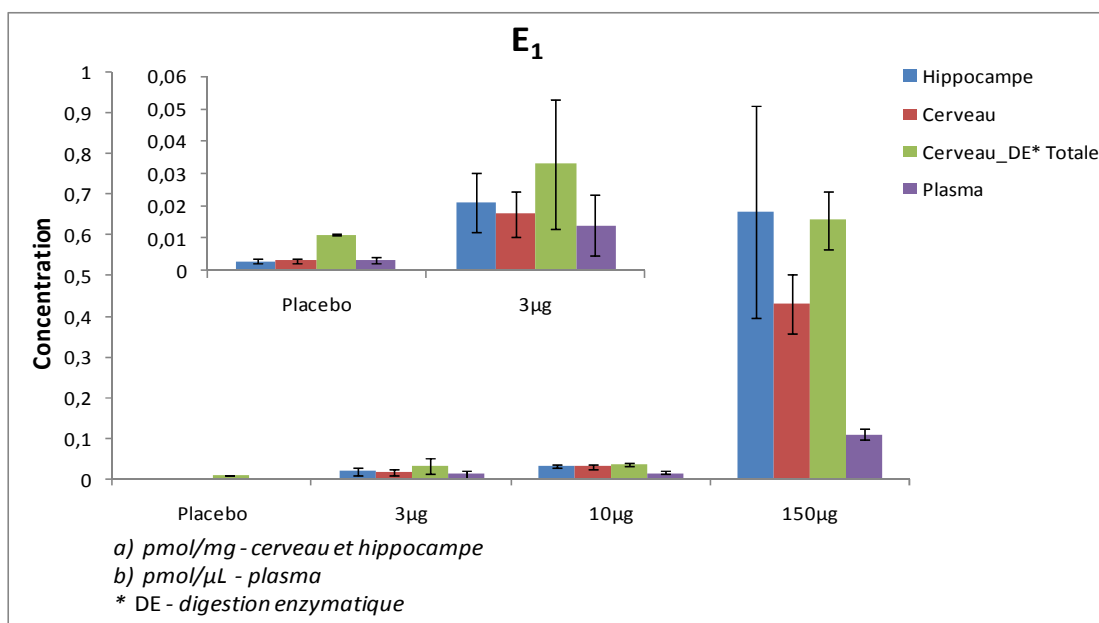


Figure AIII.4 : Concentration de l' E_1 en fonction des concentrations injectées. Souris de 4 mois : JP (n=5) – jeunes souris placebos, 3 μg (n=5), 10 μg (n=5) et 150 μg (n=5) – jeunes souris ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3, 10 et 150 μg du $17\beta\text{-E}_2$

Hippocampe. Les concentrations mesurées pour l' E_1 suivent toujours la même tendance : elles passent progressivement de $0,003 \pm 0,001$ pmole. mg^{-1} pour le placebo à $0,021 \pm 0,018$ pmole. mg^{-1} ; $0,023 \pm 0,009$ pmole. mg^{-1} et $0,66 \pm 0,52$ pmole. mg^{-1} après l'injection de 3, 10 et 150 μg de $17\beta\text{-E}_2$ respectivement.

Cerveau. La concentration de l' E_1 était de $0,003 \pm 0,001$ pmole. mg^{-1} (placebo) ; $0,018 \pm 0,014$ pmole. mg^{-1} (3 μg) ; $0,033 \pm 0,011$ pmole. mg^{-1} (10 μg) et $0,43 \pm 0,14$ pmole. mg^{-1} (150 μg). On remarque la présence importante des formes conjuguées dans tous les échantillons, excepté celui qui correspond à l'injection de 10 μg .

Une grande variabilité interindividuelle dans le cas des échantillons d'hippocampe et du

cerveau a été observée.

Plasma. La concentration plasmatique de l'E₁ était de $0,0033 \pm 0,0017$ pmole. μL^{-1} (placebo); $0,014 \pm 0,012$ pmole. μL^{-1} ; $0,016 \pm 0,008$ pmole. μL^{-1} et $0,11 \pm 0,03$ pmole. μL^{-1} après l'injection respective de 3, 10 et 150 μg de 17 β -E₂. Quel que soit la quantité du 17 β -E₂ injectées, le taux de l'E₁ dans le plasma reste inférieur à ses concentrations dans les échantillons d'origine cérébrale.

Estriol

Avec l'augmentation de la quantité injectée, une augmentation de la concentration de l'E₃ a été également observée dans toutes les matrices étudiées (Figure AIII.5). Cependant, cette tendance est moins prononcée pour ce métabolite d'élimination définitive du 17 β -E₂.

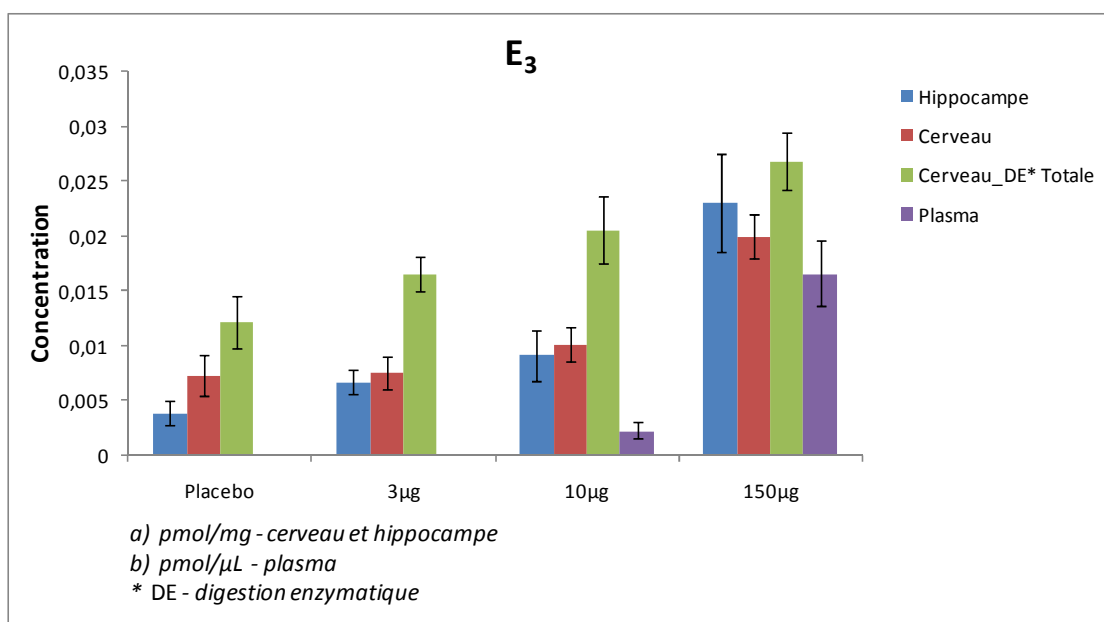


Figure AIII.5 : Concentration de l'E₃ en fonction des concentrations injectées. Souris de 4 mois : JP (n=5) – jeunes souris placebos, 3 μg (n=5), 10 μg (n=5) et 150 μg (n=5) – jeunes souris ayant reçues une injection par voie sous-cutanée de 3, 10 et 150 μg du 17 β -E₂

Hippocampe. Une légère augmentation a été observée dans l'hippocampe : la concentration était de $0,004 \pm 0,002$ pmol.mg⁻¹ (placebo) et $0,007 \pm 0,002$ pmole.mg⁻¹; $0,009 \pm 0,004$ pmol.mg⁻¹ et $0,023 \pm 0,009$ pmole.mg⁻¹ après l'injection respective de 3, 10 et 150 μg de 17 β -E₂. Pour la dose 50 fois supérieure (150 μg contre 3 μg du 17 β -E₂ injecté), le taux de l'E₃ est seulement 3 fois plus important.

Cerveau. La concentration de l'E₃ évolue de même façon dans le cerveau : elle était de

$0,007 \pm 0,004 \text{ pmole.mg}^{-1}$ (placebo) ; $0,008 \pm 0,003 \text{ pmole.mg}^{-1}$ (3 μg) ; $0,010 \pm 0,003 \text{ pmole.mg}^{-1}$ (10 μg) et $0,020 \pm 0,004 \text{ pmole.mg}^{-1}$ (150 μg). La comparaison des valeurs obtenues avec (en vert) et sans (en rouge) digestion enzymatique indique la contribution très importante des formes conjuguées dans tous les échantillons. Elles représentent presque la moitié du taux total de l'E₃ (à l'exception des souris traitées avec la quantité maximale du 17 β -E₂).

Plasma. L'E₃ n'a pas été détecté dans le plasma des souris placebos et des souris ayant reçu une injection de 3 μg de 17 β -E₂. Il apparaît en très faible concentration après l'injection de 10 μg de 17 β -E₂ ($0,0023 \pm 0,0014 \text{ pmole.}\mu\text{L}^{-1}$) et sa concentration circulante devient plus importante après l'injection de 150 μg de 17 β -E₂ ($0,017 \pm 0,006 \text{ pmole.}\mu\text{L}^{-1}$).

AIII.3. Comparaison entre les souris jeunes et âgées placebos et les souris jeunes et âgées traitées avec de l'eau de boisson contenant 1 μM du 17 β -E₂

Dans cette expérience, les souris mâles placebos, jeunes (4 mois) et âgées (24 mois), ont été comparés aux animaux de même âge ayant reçu l'eau de boisson contenant 1 μM de 17 β -E₂ de boisson pendant dix jours avant le sacrifice. La méthode de dosage sans dérivation a été appliquée à tous les échantillons (avec digestion enzymatique pour le cerveau et le plasma en plus) pour rechercher les taux des quatre œstrogènes, 17 β - et 17 α -E₂, E1 et E3. La présence de 17 α -E₂ n'a été détectée dans aucun échantillon analysé.

17 β -Estradiol

Hippocampe. Une analyse des histogrammes montre que les concentrations de 17 β -E₂ dans l'hippocampe de souris de 4 mois (barre bleue, *Figure AIII.6*) ne sont pas significativement modifiées par un traitement à 1 μM de 17 β -E₂ dans l'eau de boisson. Pour ces souris, la concentration du 17 β -E₂ baisse de façon non significative dans l'hippocampe (de $0,0023 \pm 0,0002$ à $0,0020 \pm 0,0004 \text{ pmole.mg}^{-1}$, ($p < 0,05$, intervalle de confiance 95%). Si l'on examine à présent l'effet du traitement chronique à 1 μM de 17 β -E₂ par l'eau de boisson chez les animaux âgés de 24 mois, on observe que paradoxalement, l'ajout de 17 β -E₂ conduit à une diminution de la concentration de 17 β -E₂ dans l'hippocampe. Précisément, cette concentration hippocampique passe de $0,006 \pm 0,001$ à $0,0035 \pm 0,0008 \text{ pmole.mg}^{-1}$. Notons ici que cette baisse de la concentration hippocampique de 17 β -E₂ ramène la teneur de l'hormone à celle que l'on observe chez les animaux jeunes.

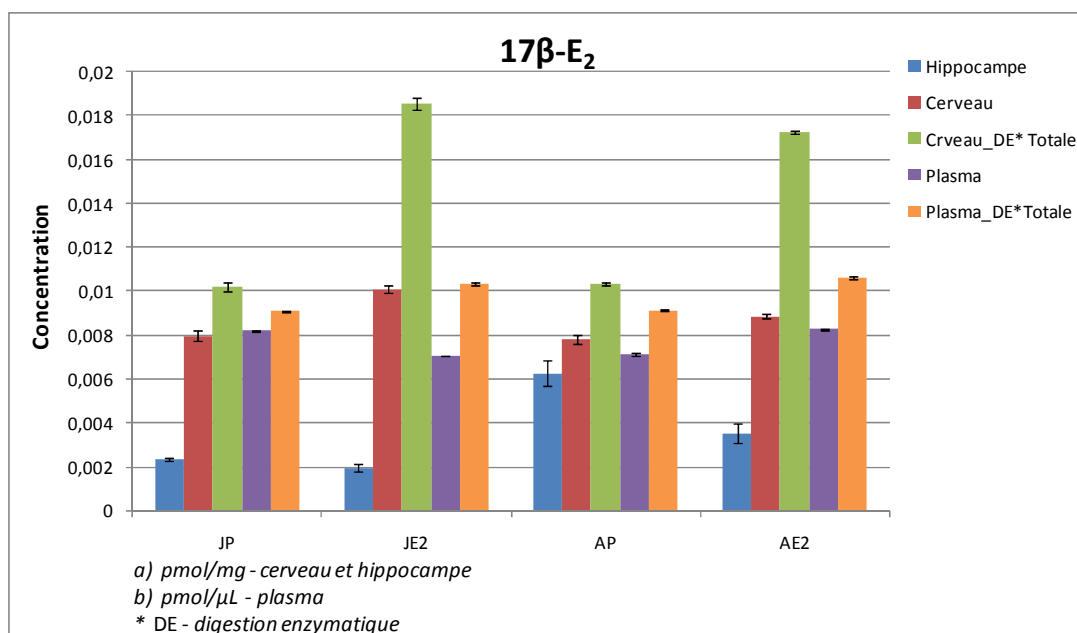


Figure AIII.6 : Concentration du 17β -E₂. Souris : JP (n=5) – jeunes souris placebos de 4 mois, JE2 (n=6) – jeunes souris de 4 mois traitées avec 17β -E₂ dans l'eau de boisson, AP (n=5) – souris âgées placebos de 24 mois et AE2 (n= 6) –souris âgées placebos de 24 mois traitées avec 17β -E₂ dans l'eau de boisson.

Cerveau. Contrairement à ce qui se passe dans l'hippocampe, le traitement induit une augmentation des concentrations de 17β -E₂ dans le cerveau entier des souris jeunes âgées de 4 mois. Cette augmentation très significative ($p < 0,05$, intervalle de confiance 95%) est surtout visible après digestion enzymatique des échantillons révélant que ce surplus de 17β -E₂ est essentiellement présent sous des formes conjuguées, d'élimination ou de circulation, qui sont inactives. Dans le détail, les concentrations de 17β -E₂ libres passent de $0,0079 \pm 0,0005$ à $0,0101 \pm 0,0004$ pmole.mg⁻¹ chez les animaux jeunes lors du traitement à 1μM de 17β -E₂ par l'eau de boisson. Dans le même temps, la concentration de 17β -E₂ total mesurée dans le cerveau passe de $0,0102 \pm 0,0005$ à $0,0190 \pm 0,0005$ pmole.mg⁻¹ chez les animaux jeunes ($p < 0,05$).

L'examen des données obtenues sur le cerveau entier des animaux âgés de 24 mois montre un profil similaire à celui observé chez les animaux jeunes. Le traitement à l'eau de boisson n'induit pas de changement significatif dans les concentrations de 17β -E₂ libre dans le cerveau. Précisément, ces concentrations passent de $0,0080 \pm 0,00054$ à $0,0090 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹. En parallèle, les concentrations de 17β -E₂ total incluant les composés conjugués évaluées après digestion enzymatique, augmentent de façon très significative ($p < 0,05$) passant de $0,01 \pm 0,0002$ à $0,0173 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹.

Plasma. Les concentrations du 17β -E₂ mesurées dans le plasma avec ou sans digestion enzymatique sont beaucoup moins variables. Les taux du 17β -E₂ libre sont entre 0,007 et 0,008 pmol.μL⁻¹ selon le type d'échantillon. Les formes conjuguées représentent entre 10 et 30% de la concentration totale.

Estrone

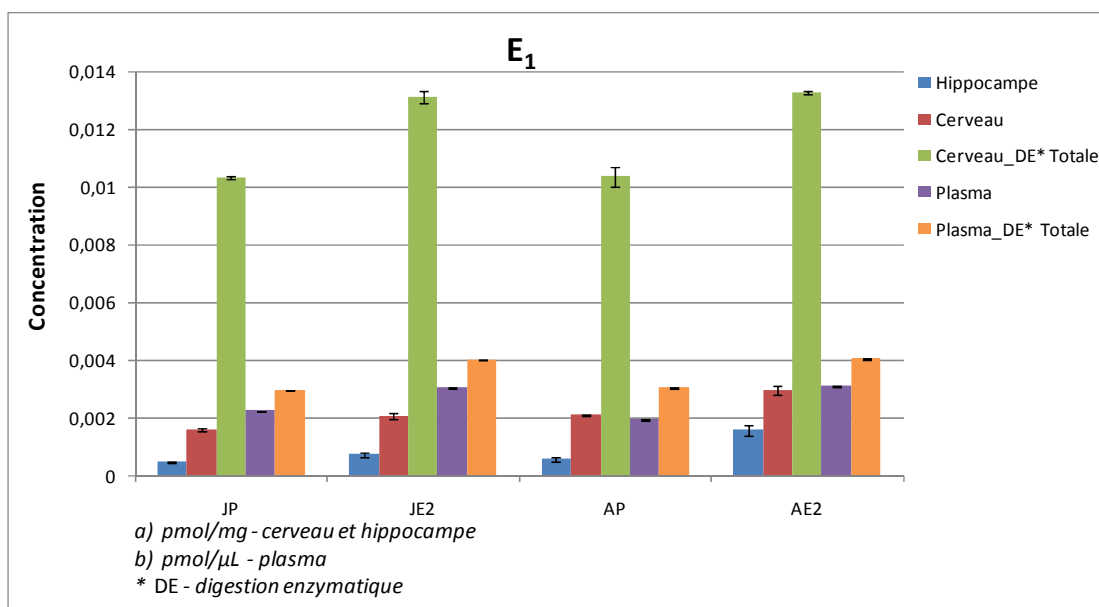


Figure AIII.7 : Concentration de l'E₁. Souris : JP (n=5) – jeunes souris placebos de 4 mois, JE2 (n=6) – jeunes souris de 4 mois traitées avec 17β -E₂ dans l'eau de boisson, AP (n=5) – souris âgées placebos de 24 mois et AE2 (n=6) – souris âgées placebos de 24 mois traitées avec 17β -E₂ dans l'eau de boisson.

Hippocampe. La concentration de l'E₁ libre dans l'hippocampe (barres bleues, Figure AIII.7) ne varie pas beaucoup entre les groupes. La seule augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration de l'E₁ libre apparaît chez les souris âgées traitées avec 1μM de 17β -E₂ dans l'eau de boisson. Précisément, la concentration hippocampique de E₁ libre passe de $0,0006 \pm 0,0001$ chez les animaux âgés de 24 mois placebos, à $0,0016 \pm 0,0004$ pmole.mg⁻¹ chez les individus âgés de 24 mois traités avec 1μM de 17β -E₂ dans l'eau de boisson.

Cerveau. Les concentrations d'E₁ libre dans le cerveau augmentent de manière significative ($p < 0,05$) par rapport à celles dans l'hippocampe et de manière faible dans le cerveau des animaux traités vs les animaux placebos. Ceci s'observe à la fois chez les animaux jeunes et âgés. Précisément, chez les animaux de 4 mois les concentrations d'E₁ libres passent de $0,0017 \pm 0,0001$ à $0,0020 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ dans le cerveau. Chez les animaux âgés de 24 mois, ces

concentrations passent de $0,0020 \pm 0,0001$ à $0,0030 \pm 0,0003$ pmole.mg⁻¹.

En parallèle, les concentrations d'E₁ totales (obtenues après digestion enzymatique) augmentent de façons très significatives chez les souris jeunes et âgées, placebos et soumises au traitement de 17β-E₂ dans l'eau de boisson. Ceci montre que la part des composés conjugués inactifs et prêts à être éliminés augmente. Cette fois, le graphe ci-dessus montre que la prise du 17β-E₂ dans l'eau de boisson augmente les concentrations d'E₁ totale (incluant les conjugués) de $0,0103 \pm 0,0001$ à $0,0136 \pm 0,0004$ pmole.mg⁻¹ chez les souris jeunes placebos et traitées respectivement (p<0,05). En parallèle, la prise de 17β-E₂ dans l'eau de boisson chez les animaux âgés se traduit par une augmentation statistiquement significative (p<0,05) des formes conjuguées d'E₁ dans l'hippocampe. Plus précisément, ces concentrations passent de $0,0103 \pm 0,0007$ à $0,0133 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ chez les souris âgées placebos et traitées respectivement.

Ceci indique que lors d'un apport exogène de 17β-E₂, dans des conditions physiologiques, le cerveau oriente les voies métaboliques vers la formation d'une forme de stockage (E₁) et d'élimination (formes conjuguées) qui permettent de maintenir l'homéostasie cérébrale en œstrogènes.

Plasma. Les concentrations de l'E₁ mesurées dans le plasma avec ou sans digestion enzymatique sont beaucoup moins variables. Elles restent pratiquement les mêmes chez les animaux placebos : $0,0022 \pm 0,00002$ pmole.mg⁻¹ chez les souris jeunes et $0,0019 \pm 0,00003$ pmole.mg⁻¹ chez les souris âgées. Les taux de l'E₁ augmentent légèrement avec le traitement par le 17β-E₂ dans l'eau de boisson : $0,0030 \pm 0,00005$ pmole.mg⁻¹ chez les souris jeunes et $0,0031 \pm 0,00005$ pmole.mg⁻¹ chez les souris âgées. La forme dominante est l'E₁ libre, les formes conjuguées représentent entre 24 et 37% de la concentration totale.

Estriol

Hippocampe. La concentration de l'E₃ libre varie peu dans l'hippocampe des souris jeunes et âgées, après le traitement avec 1μM du 17β-E₂ dans l'eau de boisson (*Figure AIII.8*). Précisément, les concentrations hippocampiques de l'E₃ passent de $0,00064 \pm 0,00005$ à $0,0007 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ chez les animaux jeunes placebos et traités respectivement. En parallèle, chez les animaux âgés, les concentrations de l'E₃ sont identiques chez les animaux jeunes et âgés mais augmentent légèrement chez les animaux âgés avec le traitement. Précisément, les concentrations d'E₃ libre varient de $0,00064 \pm 0,00002$ à $0,0008 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ chez les animaux âgés de 24 mois sans et avec une supplémentation de 17β-E₂ dans l'eau de boisson respectivement.

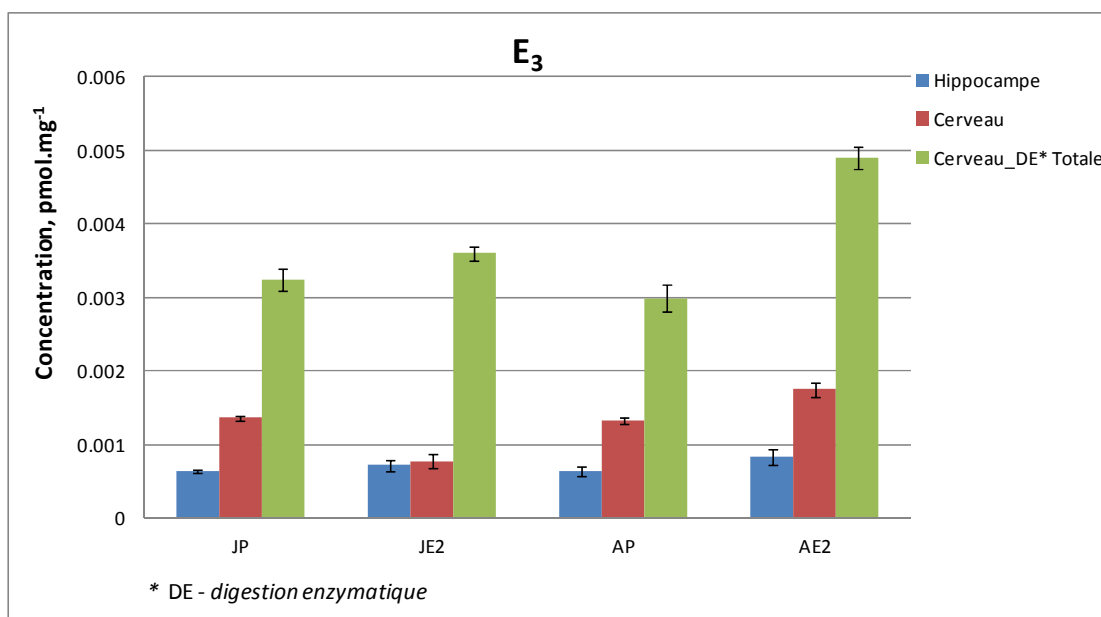


Figure AIII.8 : Concentration de l'E₃. Souris : JP (n=5) – jeunes souris placebos de 4 mois, JE2 (n=6) – jeunes souris de 4 mois traitées avec 17β-E₂ dans l'eau de boisson, AP (n=5) – souris âgées placebos de 24 mois et AE2 (n=6) – souris âgées placebos de 24 mois traitées avec 17β-E₂ dans l'eau de boisson.

Cerveau. Parallèlement, dans le cerveau, une diminution significative ($p < 0,05$) des concentrations d'E₃ a été observée dans le cas des souris jeunes (4 mois) traitées avec le 17β-E₂ dans l'eau de boisson. Dans ce cas, les concentrations passent de $0,0014 \pm 0,0001$ à $0,0010 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ respectivement chez les individus jeunes placebos et traités. Si l'on examine en revanche les concentrations d'E₃ totales incluant les formes conjuguées inactives, on observe une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) des concentrations chez les jeunes souris supplémentées en 17β-E₂. Précisément, les concentrations passent de $0,0033 \pm 0,0003$ à $0,0036 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹ après traitement. Ceci semble indiquer une activation de la voie de la conjugaison des œstrogènes.

Chez les animaux âgés de 24 mois, la concentration de l'E₃ libre augmente significativement dans le cerveau passant de $0,0013 \pm 0,0001$ à $0,0018 \pm 0,0002$ pmole.mg⁻¹. L'E₃ total (associant l'hormone libre et conjuguée) augmente également, passant de $0,0030 \pm 0,0003$ à $0,0050 \pm 0,0003$ pmole.mg⁻¹.

Ceci semble indiquer que lorsque l'on supplémente un animal en 17β-E₂ à des doses qui restent dans la gamme physiologique, le cerveau se défend en activant des voies métaboliques qui permettent de transformer cet œstrogène en forme de stockage peu actives puis de les éliminer par

les réactions de conjugaison non-réversible et/ou de métabolisation définitive. Ceci permet de conserver l'homéostasie œstrogénique du cerveau.

Plasma. La présence de l'E₃ (libre ou conjugué) n'a été détectée dans aucun des groupes de souris étudiés.

DISCUSSION

Avis général. Les résultats que nous présentons ici sont originaux et apportent des données intéressantes au champ d'études des neurosciences.

Initialement, ce qui nous a conduit à la mise au point de cette technique de dosage à la fois sensible, précise et délicate est un constat biologique. L'analyse initiale de la bibliographie scientifique concernant les effets du 17β-E₂ sur le cerveau, sur l'hippocampe et sur la mémoire en particulier nous a semblé pleine de contradictions. Les effets semblaient à la fois positifs et négatifs et parfois en contradiction en fonction des doses de traitement utilisées (Chapitre I.1). Ceci nous a conduit à penser que la dose de 17β-E₂ intra-cérébrale et intra-hippocampique était très finement régulée et était vraisemblablement la clé du mystère. En effet, il est connu qu'en fonction des doses, les œstrogènes au sens large, peuvent activer des voies de signalisations intra-cellulaires différentes, conduisant à des effets cellulaires puis physiologiques différents. Nous savons aussi que les territoires cérébraux contiennent des neurones différents qui n'expriment pas les mêmes voies de signalisation. Nous nous attendons donc à des réactions différentes des neurones d'aires cérébrales différentes en réponse à un même traitement. Lorsque nous avons initié ce travail, le consensus tournait autour d'une diminution du 17β-E₂ dans le cerveau et l'hippocampe avec l'âge. Cette hypothèse consensuelle reposait essentiellement sur deux faits avérés :

- (1) On pouvait restaurer ou amplifier certains effets liés à la plasticité neuronale (poussée des épines dendritiques, fonction mnésique spatiale...) en supplémentant en 17β-E₂ des animaux déprivés d'œstrogènes. Ces effets n'étaient pourtant pas systématiques.
- (2) On observait chez les animaux et l'homme une réduction de l'expression de l'aromatase (ARNm et protéine) dans le cerveau et l'hippocampe avec l'âge.

L'aromatase est un des enzymes majeurs qui conduit à la biosynthèse de 17β-E₂. L'activité de cet enzyme est down-régulée par la présence de son produit c'est-à-dire par la présence d'E₁ ou de 17β-E₂. Elle transforme la testostérone en 17β-E₂ et l'androstén-dione en E₁. Selon les principaux spécialistes, la disparition progressive de l'aromatase avec l'âge ne pouvait conduire

qu'à une réduction de la teneur locale en 17β -E₂. Pourtant, cette hypothèse bien que séduisante n'expliquait pas l'ensemble des données recueillies. Elle n'était qu'une preuve indirecte de la carence en 17β -E₂. La littérature suggérait également une régulation fine de la concentration du 17β -E₂ cérébrale et hippocampique, montrant des évolutions à la fois structurales et comportementales chez les jeunes souris femelles au cours du cycle.

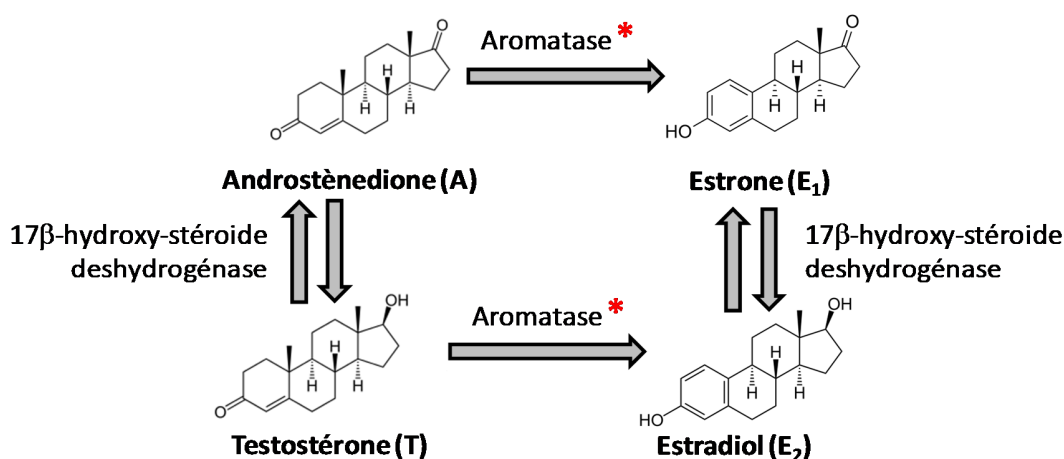
L'Estradiol dans le cerveau et ses effets sur la mémoire. Afin de construire ensuite un travail sur des bases solides, nous avons décidé de doser directement le 17β -E₂ dans le cerveau et dans l'hippocampe. Les résultats que nous obtenons ici, bien qu'en désaccord complet avec l'hypothèse de départ, sont d'une très grande cohérence. Nous observons en effet une augmentation du 17β -E₂ hippocampique avec l'âge. Cette augmentation est restreinte, dans notre approche, à l'hippocampe dans la mesure où si l'on considère le cerveau entier (sans hippocampe), les concentrations de 17β -E₂ restent stables. Ceci montre que même si la concentration de 17β -E₂ augmente dans l'hippocampe, tout concourt à un maintien de l'homéostasie cérébrale du 17β -E₂. Nous savons qu'en conditions normales, les animaux âgés éprouvent des difficultés à réaliser les tests de mémoire que nous leur proposons et qui sont hippocampe-dépendants. Cela signifierait qu'un surcroît de 17β -E₂ dans l'hippocampe a naturellement un effet délétère sur la mémoire des animaux.

Nous observons sur le plan comportemental qu'un traitement avec $1\mu\text{M}$ de 17β -E₂ dans l'eau de boisson améliore la mémoire des animaux âgés. Or ici, nous voyons que ce traitement, au lieu d'augmenter la concentration hippocampique comme on aurait pu l'attendre, la diminue. Ceci concorde bien avec l'observation précédente. Ce n'est pas la carence de 17β -E₂ qui est délétère pour la mémoire des animaux âgés mais son augmentation. Ceci étant établi, on doit s'interroger pour comprendre comment une supplémentation en 17β -E₂ peut conduire à la réduction de sa concentration hippocampique chez les animaux jeunes et âgés.

A ce stade, les dosages d'E₁ et d'E₃ ainsi que l'estimation des conjugués par la différence qui peut être faite entre les composés dosés avec et sans digestion enzymatique nous sont d'un très grand secours. Bien que nous soyons conscients que nous n'avons fait qu'estimer les concentrations de conjugués et que le dosage spécifique de ces composés doit encore être développé, nous observons que lorsque le 17β -E₂ est apporté dans l'eau de boisson à des doses compatibles avec la physiologie, ce surcroît de 17β -E₂ semble être pris en charge par le cerveau pour limiter son impact. Toutes les voies possibles conduisant à son inactivation semblent alors être recrutées : celles qui conduisent à la formation de 17β -E₂ conjugué (voir *Figure AIII.3* et *AIII.6*) et celles qui conduisent

à la formation d'E₁ et ses conjugués et d'E₃ et ses conjugués (voir *Figure AIII.4, AIII.5, AIII.7 et AIII.8*).

Notez que cette analyse vaut essentiellement pour les animaux âgés pour lesquels il est connu de façon certaine que le taux de l'aromatase décline avec l'âge. Chez les jeunes souris en revanche, il est possible que la régulation des concentrations intra-hippocampique et intra-cérébrale de 17β-E₂ passe aussi par la régulation de la vitesse d'aromatisation de la testostérone (T) et de l'androstènedione (A) (*Figure AIII.9*).



* Diminution de l'expression génomique et protéique avec l'âge

Figure AIII.9 : Schéma métabolique liant le 17β-E₂ aux androgènes.

En effet, dans ce travail nous avons essentiellement pu discuter de la désactivation des œstrogènes par la formation d'E₁ et d'E₃ ainsi que par la formation des conjugués que nous avons mesurés. Chez les souris jeunes et d'âge moyen, chez qui l'aromatase est très active, cette voie de « dés-œstrogénisation » doit aussi être envisagée. Dans ce cas, l'augmentation locale du produit de la réaction enzymatique aurait pour effet de freiner, voire de bloquer l'activité de l'aromatase. Pour la confirmer, il faudrait doser les androgènes T et A dans le cerveau des animaux jeunes et âgés suite à un traitement à 1μM de 17β-E₂ dans l'eau de boisson. Si notre hypothèse est exacte, on s'attend à une augmentation de la T et de la A dans l'hippocampe et dans le cerveau des souris jeunes. Chez les animaux âgés, en revanche, compte tenu de la faible expression de l'aromatase, le même traitement avec du 17β-E₂ devrait conduire à une faible augmentation de la T et de l'A locale. On doit aussi pouvoir observer une augmentation des conjugués de ces hormones dans tous les tissus cérébraux. Notons ici que le déclin de l'activité aromatase dans l'hippocampe avec l'âge pourrait être une conséquence et non pas une cause du vieillissement. Ce serait alors l'augmentation

intra-hippocampique du 17β -E₂ qui rendrait l'activité aromatasase superfétatoire puisque son produit de réaction serait déjà abondamment présent. Tout semble se passer comme si au cours du vieillissement les voies métaboliques du 17β -E₂ sont modifiées dans l'hippocampe.

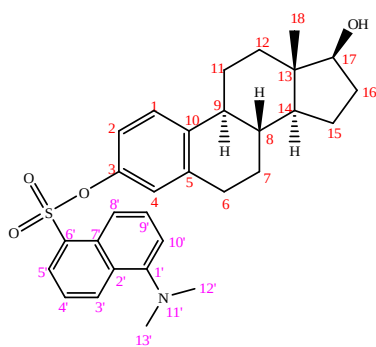
Globalement, les teneurs plasmatiques qui ont été mesurées sont peu variables dans le cas des faibles quantités du 17β -E₂ administré. Cela indique que la dose de 1 μ M dans l'eau de boisson, bien qu'active, reste dans la gamme des doses physiologiques. Les teneurs plasmatiques sont inférieures aux concentrations hormonales cérébrales si l'on considère les formes totales que nous avons estimées. Ceci est en accord avec la littérature (Hojo *et al.*, 2009). Toutefois, il faut noter que nos estimations indiquent que la part des conjugués dans le cerveau, même si elle peut être modulée en cas d'apport exogène est relativement faible. A notre connaissance cette information est nouvelle. Elle est cohérente avec la nature très lipophile du tissu cérébral. Ce dernier ne concentrerait pas en temps normal des composés conjugués présentant un fort caractère hydrophile.

Nos résultats montrent que les concentrations de 17β -E₂ hippocampiques n'évoluent pas avec l'âge comme les concentrations cérébrales. Si la régulation des concentrations du 17β -E₂ semble efficace dans le cerveau, la concentration hippocampique quant à elle augmente de manière significative. Ceci montre que l'hippocampe est un tissu particulier vis-à-vis du 17β -E₂. Cela n'exclut pas que d'autres territoires cérébraux puissent aussi avoir un comportement particulier vis-à-vis du 17β -E₂. Nous ne les avons pas analysés. La synthèse locale ainsi que le métabolisme du 17β -E₂ sont particuliers dans l'hippocampe. Comme nous l'avions anticipé, la régulation de la concentration de cette hormone est très fine si l'on veut rester dans un fonctionnement physiologique normal. Il semble que l'homéostasie cérébrale du 17β -E₂ soit essentielle. Cela démontre à quel point cette hormone est cruciale pour le fonctionnement du cerveau.

Annexe IV. Caractérisation des molécules obtenues (RMN)

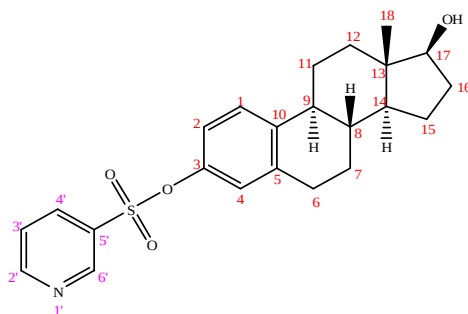
Les spectres ^1H , ^{13}C et 2D (COSY, HSQC, HMBC) ont été réalisés grâce à un BRUKER DPX 300 MHz. Les déplacements chimiques (δ) et les constantes de couplage (J) sont exprimés respectivement en ppm et en Hz. Les abréviations pour la multiplicité dans l'interprétation des spectres : s = singulet; d = doublet; dd = doublet de doublets; t = triplet; q = quadruplé; qt = quintuplet; m = multiplet.

17 β -E₂-Dns



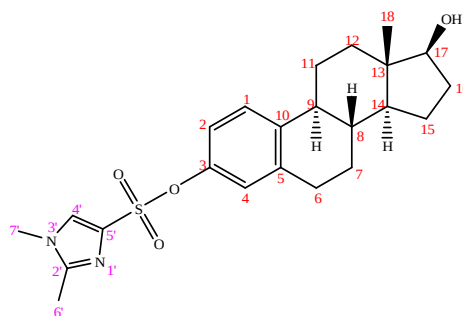
^1H NMR (300 MHz, Acétone- d_6) : δ 0,78 (s, 3H, **CH₃ -18**), 1,69-1,97 (m, 13H, **CH₂ - 7, 9, 11, 12, 15, 16, CH - 8, 14**), 2,68 (m, 2H, **CH₂ - 6**), 2,94 (s, 3H, **CH₃ - 12'**), 3,14 (s, 3H, **CH₃ - 13'**), 3,70 (m, 1H, **CH - 17**), 6,63 (d, 2H, $J = 3,7$ Hz, **CH - 2, 4**), 7,30 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, **CH - 1**), 7,17 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, **CH - 5'**), 7,39 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz, **CH - 10'**), 7,63 (m, 1H, **CH - 4'**), 7,77 (m, 1H, **CH - 9'**), 8,45 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, **CH - 3'**), 8,70 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, **CH - 8'**).

17 β -E₂-PS



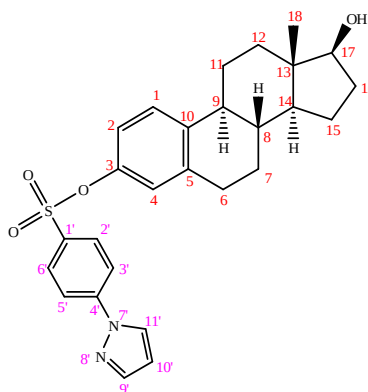
^1H NMR (300 MHz, Acétone- d_6) : δ (ppm) 0.80 (s, 3H, **CH₃ -18**), 1,08-2,36 (m, 13H, **CH₂ - 7, 9, 11, 12, 15, 16, CH - 8, 14**), 2,80 (m, 2H, **CH₂ - 6**), 3,69 (m, 1H, **CH - 17**), 6,79-6,84 (m, 2H, $J = 7,5$ Hz, **CH - 2, 4**), 7,30 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, **CH - 1**), 7,74 (m, 1H, $J = 8,1$ Hz, **CH - 3'**), 8,28 (m, 1H, $J = 8,1$ Hz, **CH - 4'**), 8,97 (m, 2H, $J = 5,0$ Hz, **CH - 2', 6'**).

17 β -E₂-DMIS



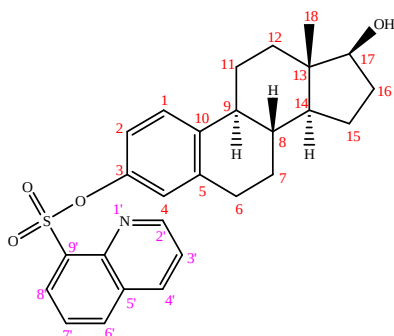
^1H NMR (300 MHz, MeOH-*d*₄) : δ 0,78 (s, 3H, **CH**₃ -18), 1,27-1,76 (m, 13H, **CH**₂ – 7, 9, 11, 12, 15, 16, **CH** – 8, 14), 2,03 (s, **CH**₃ - 6'), 2,63 (s, **CH**₃ - 7'), 2,79 (m, 2H, **CH**₂ – 6), 3,80 (m, 1H, **CH** – 17), 6,80 (m, 2H, *J* = 7,5 Hz, **CH** – 2, 4), 7,24 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, **CH** – 1), 7,65 (d, 1H, *J* = 11,9 Hz, **CH** – 4').

17 β -E₂-PBS



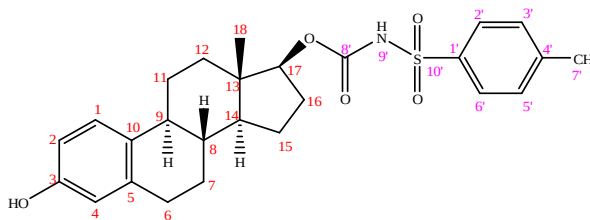
^1H NMR (300 MHz, MeOH-*d*₄) : δ 0,78 (s, 3H, **CH**₃ -18), 1,14-2,07 (m, 13H, **CH**₂ – 7, 9, 11, 12, 15, 16, **CH** – 8, 14), 2,76 (m, 2H, **CH**₂ – 6), 3,66 (m, 1H, **CH** – 17), 6,61 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, **CH** – 1), 6,73 (m, 2H, *J* = 7,5 Hz, **CH** – 2, 4), 7,24 (m, 1H, **CH** – 10'), 7,81 (d, 1H, **CH** – 9'), 7,92 (d, 2H, *J* = 1,6 Hz, **CH** – 2', 3'), 7,92 (d, 2H, **CH** – 5', 6'), 8,41 (d, 1H, *J* = 2,6 Hz, **CH** – 11').

17 β -E₂-Q8S



^1H NMR (300MHz, MeOH-*d*₄) : δ 0,73 (s, 3H, CH₃ -18), 1,25-2,18 (m, 13H, CH₂ – 7, 9, 11, 12, 15, 16, CH – 8, 14), 2,62 (m, 2H, CH₂ - 6), 3,67 (m, 1H, CH - 17), 6,61 (q, 2H, *J* = 8,5 Hz, *J*=2,6 Hz, CH – 2, 4), 7,09 (d, 1H, *J*=2,59 Hz, CH - 1), 7,71 (q, 2H, *J*=8,3 Hz, *J*=7,4 Hz, CH - 2', 6'), 8,33 (q, 2H, *J*=3,4 Hz, *J*=1,5, CH - 5', 7'), 8,53 (dd, 1H, *J*=8,4 Hz, *J*=1,8 Hz, CH - 3'), 9,14 (dd, 1H, *J*=4,3 Hz, *J*=1,8 Hz, CH – 1').

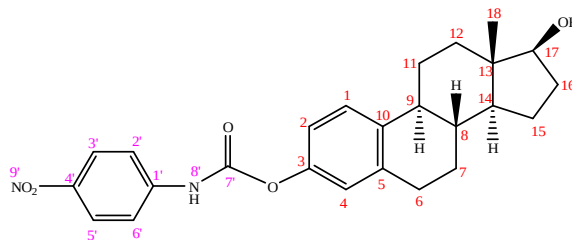
17 β -E₂-TS



^1H RMN (300 MHz, Acétone-*d*₆) : δ 0,76 (s, 3H, CH₃-18), 1,17-2,05 (m, 13H, CH₂-7, 9, 11, 12, 15, 16, CH-8, 14), 2,45 (s, 3H, CH₃-7'), 2,74 (m, 2H, CH₂-6), 4,56 (dd, *J*=9,2 Hz, 7,3 Hz, 1H, CH-17), 6,52 (d, *J*=2,5 Hz, 1H, CH-4), 6,59 (dd, *J*=8,4 Hz, 2,7 Hz, 1H, CH-2), 7,06 (d, *J*=8,4 Hz, 1H, CH-1), 7,45 (d, *J*=7,8 Hz, 2H, CH-3',5'), 7,91 (d, *J*=7,8 Hz, 2H, CH-2',6').

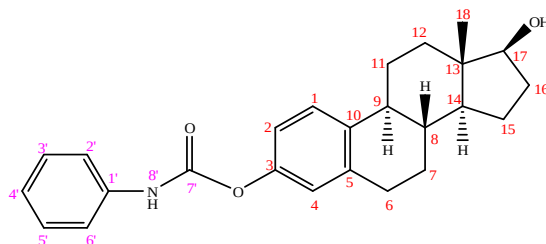
^{13}C NMR (100 MHz, Acétone-*d*₆) : δ 156,09, 145,46, 138,41, 138,08, 131,78, 130,45, 128,87, 127,13, 116,05, 113,73, 85,64, 50,26, 44,67, 43,87, 39,70, 37,60, 29,55, 29,36, 28,05, 27,04, 23,76, 21,60, 12,38.

17 β -E₂-NO₂Ph



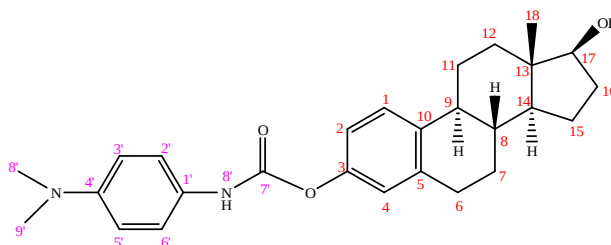
^1H RMN (300 MHz, MeOH- d_4) : δ 0,80 (s, 3H, CH₃-18), 1,06-2,48 (m, 13H, CH₂-7, 9, 11, 12, 15, 16, CH-8, 14), 2,88 (m, 2H, CH₂-6), 3,68 (t, J = 8.5 Hz, 1H, CH-17), 6,89 (d, J =2,5 Hz, 1H, CH-4), 6,94 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, CH-2), 7,33 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH-4), 7,72 (d, J =9,3 Hz, 2H, CH-2',6'), 8,22 (d, J =9,3 Hz, 2H, CH-3',5').

17 β -E₂-Ph



^1H RMN : (300 MHz Acétone- d_6) : δ 0,80 (s, 3H, CH₃-18), 1,19-2,39 (m, 13H, CH₂-7, 9, 11, 12, 15, 16, CH - 8, 14), 2,76 (m, 2H, CH₂-6), 3,68 (m, 1H, CH-17), 6,88 (d, J = 2,5 Hz, 1H, CH-4), 6,94 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, CH-2), 7,09 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH-4), 7,32 (m, 3H, C-3', 4', 5'), 7,61 (dd, J = 8.7, 1.0 Hz, 2H, CH-2', 6').

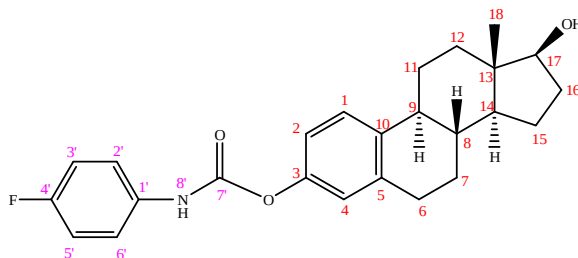
17 β -E₂-DMAP



^1H RMN (300 MHz, MeOH- d_4) : δ 0.79 (s, 3H, CH-18), 1,26-2,26 (m, 13H, CH₂-7, 9, 11, 12, 15, 16, CH-8, 14), 2,78 (m, 2H, CH₂-6), 2,87 (s, 3H, CH₃-8'), 2,89 (s, 3H, CH₃-9'), 3,67 (t, J =8,5 Hz, 1H, CH-17), 6,85 (d, J = 2,5 Hz, 1H, CH-4), 6,78 (d, J = 9,1 Hz, 2H, CH-3',5'), 6,89 (dd, J =

8.5, 2.5 Hz, 1H, CH-2), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH-4), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH-2',6').

17 β -E₂-FPh



^1H RMN (300 MHz, MeOH- d_4) : δ 0.79 (s, 3H, CH_3 - 18), 1.22-2.32 (m, 13H, CH_2 - 7, 9, 11, 12, 15, 16, CH - 8, 14), 2.85 (m, 2H, CH_2 - 6), 3.67 (t, 1H, $J=8.5$ Hz, CH - 17), 6.86 (d, 1H, $J= 2,4$ Hz, CH - 2, 4), 6.92 (dd, 1H, $J^3=8,6$ Hz, $J^4=2,5$ Hz, CH - 1), 7.05 (m, 2H, CH - 2', 6'), 7.30 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, CH - 2', 6') 7.41 (m, 2H, CH - 5', 3'), 8.54 (s, 1H, NH- 8').

Annexe V. Les ions précurseurs et les ions fragments les plus abondants et spécifiques des dérivés synthétisés

Dérivés du 17β-E ₂	ESI (+)			ESI (-)		
	MS	MS/MS	CE	MS	MS/MS	CE
PS	414,3 [M+H] ⁺	172,1; 213,2; 272,3; 350,2	47	-	-	
Dns	506,2 [M+H] ⁺	171,0; 427,3; 442,3	47	-	-	
DMIS	431,3 [M+H] ⁺	144,1; 159,0; 213,1; 367,2	40	-	-	
PBS	479,2 [M+H] ⁺	144,1; 159,2; 207,1; 213,1; 272,2; 415,2	47	-	-	
Q8S	464,2 [M+H] ⁺	129,2 ; 213,1; 272,2; 400,3	47	-	-	
Ph	392,3 [M+H] ⁺	149,0 ; 159,2 ; 255,1; 273,3; 295,2	30	-	-	
pTS	470,2 [M+H] ⁺	133,2; 159,1; 255,3; 341,5	30	468,2 [M-H] ⁻	132,0; 170,0; 196,0; 269,1; 271,1	- 40
FPh	410,2 [M+H] ⁺	135,0; 159,1; 255,1; 273,1; 392,3	20	-	-	
DMAP	435,3 [M+H] ⁺	148,1; 181,2; 255,3; 272,2; 420,3	40	433,4 [M-H] ⁻	120,0; 145,1; 253,3; 271,2; 283,4	- 35
NO ₂ Ph	437,2 [M+H] ⁺	107,0; 159,1; 255,2; 273,3; 313,4; 419,0	30	-	-	
DMAB	420,3 [M-H] ⁻	166,2; 151,1; 134,1	10	418,3 [M-H] ⁻	164,0; 253,2; 271,1; 374,1; 403,3	- 40

Annexe VI. Gamme d'étalonnage sur les solutions standards des dérivés 17β-E₂-Dns, 17β-E₂-DMIS et 17β-E₂-Q8S

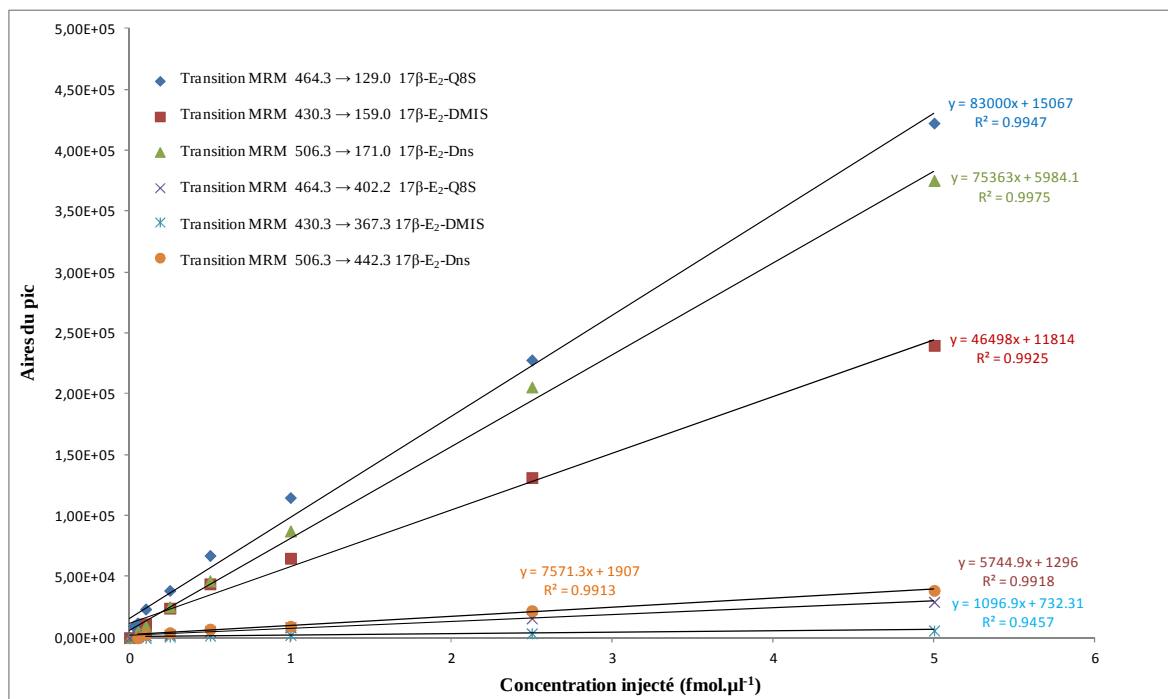


Figure AVI : Aires de pic des dérivés : 17β-E₂-Dns, 17β-E₂-DMIS et 17β-E₂-Q8S en fonction de la concentration injectée en HPLC-ESI(+)-MS/MS, n = 3

Annexe VII. Communications écrites et orales réalisées durant la thèse

Publications en cours

- (1) "Quantitative measurement of 17 β -estradiol in mouse brain and plasma after oral and subcutaneous administration by a derivatization free LC-MS/MS method" Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Alice Sham Al Abed, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter, Corinne Buré
- (2) "Novel derivatization reagents to enhance ionization efficiency of 17- β -Estradiol in LC-MS/MS". Ecaterina Lozan, Corinne Buré, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter, Svitlana Shinkaruk

Communication orale

"High Performance LC-MS/MS method for quantification of 17- β -Estradiol in mouse plasma and brain", Journées scientifiques de CBMN, 23-24 Octobre 2014, Bordeaux, France

Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter, Corinne Buré

Communications par affiches

Locale

- (1) *Etude de la dérivation chimique du β -E₂ en vue de développement d'une méthode de dosage des oestrogènes dans les tissus cérébraux par LC-MS/MS*, 22^{ème} Journée Chimie Grand Sud-Ouest de la Société Chimique de France (GSO 2012), 30 Novembre 2012, Bordeaux, France
Carine Tchakounté, Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Corinne Buré, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter
- (2) *La dérivation chimique du 17- β -œstradiol en vue de son dosage par LC-MS/MS*, Journée Scientifique de l'École Doctorale et Rencontres Doctorants Entreprise, 25-26 Avril 2013, Bordeaux-Talence, France
Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Corinne Buré, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter
- (3) *Development and performance evaluation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for 17- β -Estradiol*, 4^{ième} Symposium du Neurocentre Magendie, 24-25 Octobre 2013, Bordeaux – Talence, France
Ecaterina Lozan, Corinne Buré, Svitlana Shinkaruk, Jean-Marie Schmitter, Catherine Bennetau-Pelissero
- (4) *Development and performance evaluation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for 17- β -Estradiol*, 16^{ième} Journée de l'École Doctorale des sciences chimiques, 17 Avril 2014, Bordeaux-Talence, France
Ecaterina Lozan, Corinne Buré, Svitlana Shinkaruk, Jean-Marie Schmitter, Catherine Bennetau-Pelissero
- (5) *High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry method for quantification of 17- β -Estradiol in mouse plasma and brain*, la Journée Scientifique de l'ISM, 3 Juillet 2014, Bordeaux-Talence, France

Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Corinne Buré, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter

- (6) “*Novel derivatization reagents to enhance ionization efficiency of 17- β -Estradiol in LC-MS/MS*”, la Journée Scientifique de l’ISM, 2 Juillet 2015, Bordeaux-Pessac, France

Ecaterina Lozan, Corinne Buré, Chloé Papin, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter, Svitlana Shinkaruk

Nationale

- (1) “*Novel derivatization reagents to enhance ionization efficiency of 17- β -Estradiol in LC-MS/MS*”, Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP), 15-18 Septembre 2015, Ajaccio

Ecaterina Lozan, Corinne Buré, Chloé Papin, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter, Svitlana Shinkaruk

Internationale

- (1) *Etude de la dérivation chimique du 17- β -œstradiol en vue de son dosage dans les tissus cérébraux par LC-MS/MS*, IECB Young Scientist Symposium (Journées Jeunes Chercheurs - IECB), 27-28 Mai 2013, Bordeaux-Pessac, France

Carine Tchakounté, Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Corinne Buré, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter

- (2) *Analysis of 17- β -Estradiol by LC-MS/MS*, EUPA 2013 Scientific Meeting (European Proteomics Association), 14-17 Octobre 2013, Saint-Malo, France

Ecaterina Lozan, Corinne Buré, Svitlana Shinkaruk, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter

- (3) *High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry method for quantification of 17- β -Estradiol in mouse plasma and brain*, The 20TH International Mass Spectrometry Conference, 24-29 Août 2014, Genève, Suisse

Ecaterina Lozan, Svitlana Shinkaruk, Catherine Bennetau-Pelissero, Jean-Marie Schmitter, Corinne Buré

RÉFÉRENCES

1. Abdel-Khalik, J., E. Bjorklund, and M. Hansen, *Simultaneous determination of endogenous steroid hormones in human and animal plasma and serum by liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 2013. **928**(58-77): p. 1010-1016.
2. Mellon, S.H. and L.D. Griffin, *Neurosteroids: biochemistry and clinical significance*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2002. **13**(1): p. 35-43.
3. Gracia, T., et al., *Modulation of steroidogenesis by coastal waters and sewage effluents of Hong Kong, China, using the H295R assay*. Environmental Science and Pollution Research - International, 2008. **15**(4): p. 332-343.
4. McEwen, B.S. and S.E. Alves, *Estrogen actions in the central nervous system*. Endocr Rev., 1999. **20**(3): p. 279-307.
5. Simpson, E., et al., *The Role of Local Estrogen Biosynthesis in Males and Females*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2000. **11**(5): p. 184-188.
6. Thomas, J.L., et al., *Structure/function aspects of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004. **215**(1-2): p. 73-82.
7. Thomas, M.P. and B.V.L. Potter, *The structural biology of oestrogen metabolism*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2013. **137**: p. 27-49.
8. Blair, I.A., *Analysis of Estrogens in Serum and Plasma from Postmenopausal Women: Past Present, and Future*. Steroids, 2010. **75**(4-5): p. 297-306.
9. Raftogianis, R., et al., *Estrogen metabolism by conjugation*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2000(27): p. 113-124.
10. Coughtrie, M.W., et al., *Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases*. Chem Biol Interact., 1998. **109**(1-3): p. 3-27.
11. Eckhardt, U., et al., *Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells*. Am J Physiol., 1999. **276**(4-1): p. 1037-1042.
12. Kanai, N., et al., *Estradiol 17 beta-D-glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter*. Am J Physiol., 1996. **270**(2-2): p. 326-331.
13. Kancheva, L., et al., *The identification and simultaneous quantification of neuroactive androstane steroids and their polar conjugates in the serum of adult men, using gas chromatography-mass spectrometry*. Steroids., 2007. **72**(11-12): p. 792-801.
14. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1996. **93**(12): p. 5925-5930.
15. Ogawa, S., et al., *The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro*. Biochem Biophys Res Commun., 1998. **243**(1): p. 122-126.
16. Vasudevan, N. and D.W. Pfaff, *Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain*. Frontiers in Neuroendocrinology, 2008. **29**(2): p. 238-257.
17. Jia, M., K. Dahlman-Wright, and J.-Å. Gustafsson, *Estrogen receptor alpha and beta in health and disease*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **29**(4): p. 557-568.

18. Thomas, P., et al., *Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 624-632.
19. Landers, J.P. and T.C. Spelsberg, *New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1992. **2**(1): p. 19-63.
20. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology., 1997. **138**(3): p. 863-870.
21. Roman-Blas, J., et al., *Osteoarthritis associated with estrogen deficiency*. Arthritis Research & Therapy, 2009. **11**(5): p. 241.
22. Collins, P., et al., *17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease*. Circulation., 1995. **92**(1): p. 24-30.
23. Carani, C., et al., *Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency*. N Engl J Med., 1997. **337**(2): p. 91-95.
24. Wharton, W., et al., *Potential role of estrogen in the pathobiology and prevention of Alzheimer's disease*. Am J Transl Res., 2009. **1**(2): p. 131-147.
25. Bishop, J. and J.W. Simpkins, *Estradiol treatment increases viability of glioma and neuroblastoma cells in vitro*. Mol Cell Neurosci., 1994. **5**(4): p. 303-308.
26. Singer, C.A., et al., *Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity*. Neuroscience Letters, 1996. **212**(1): p. 13-16.
27. Green, P.S., K.E. Gridley, and J.W. Simpkins, *Estradiol protects against β -amyloid (25–35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells*. Neuroscience Letters, 1996. **218**(3): p. 165-168.
28. Green, P.S., J. Bishop, and J.W. Simpkins, *17 α -Estradiol Exerts Neuroprotective Effects on SK-N-SH Cells*. The Journal of Neuroscience, 1997. **17**(2): p. 511-515.
29. Sherwin, B.B., *Estrogenic Effects on Memory in Women*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1994. **743**(1): p. 213-230.
30. Auyeung, B., M.V. Lombardo, and S. Baron-Cohen, *Prenatal and postnatal hormone effects on the human brain and cognition*. Pflugers Arch., 2013. **465**(5): p. 557-571.
31. Kramar, E.A., et al., *Estrogen promotes learning-related plasticity by modifying the synaptic cytoskeleton*. Neuroscience., 2013. **23**(2): p. 3-16.
32. Amtul, Z., et al., *Neuroprotective mechanism conferred by 17beta-estradiol on the biochemical basis of Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2010. **169**(2): p. 781-786.
33. Dubal, D.B., et al., *Estradiol protects against ischemic injury*. J Cereb Blood Flow Metab., 1998. **18**(11): p. 1253-1258.
34. Kulkarni, J., et al., *A clinical trial of adjunctive oestrogen treatment in women with schizophrenia*. Arch Womens Ment Health., 2002. **5**(3): p. 99-104.
35. Norbury, R., et al., *The neuroprotective effects of estrogen on the aging brain*. Exp Gerontol., 2003. **38**(1-2): p. 109-117.
36. Pike, C.J., et al., *Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease*. Frontiers in neuroendocrinology, 2009. **30**(2): p. 239-258.
37. Spence, R.D. and R.R. Voskuhl, *Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration*. Frontiers in neuroendocrinology, 2012. **33**(1): p. 105-115.

38. Henderson, V.W., *Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease*. Am J Med., 1997. **103**(3A): p. 11S-18S.
39. Czlonkowska, A., et al., *Gender differences in neurological disease: role of estrogens and cytokines*. Endocrine., 2006. **29**(2): p. 243-256.
40. Wooten, G.F., et al., *Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?* J Neurol Neurosurg Psychiatry., 2004. **75**(4): p. 637-639.
41. Shulman, L.M., *Gender differences in Parkinson's disease*. Gend Med., 2007. **4**(1): p. 8-18.
42. Cyr, M., et al., *Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease*. J Psychiatry Neurosci., 2002. **27**(1): p. 12-27.
43. Osterlund, M.K., M.R. Witt, and J.A. Gustafsson, *Estrogen action in mood and neurodegenerative disorders: estrogenic compounds with selective properties-the next generation of therapeutics*. Endocrine., 2005. **28**(3): p. 235-242.
44. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease*. Cold Spring Harb Perspect in Biology, 2011(1943-0264 (Electronic)): p. 1-16.
45. Cooke, B.M. and C.S. Woolley, *Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS*. Journal of Neurobiology, 2005. **64**(1): p. 34-46.
46. Foy, M.R., et al., *Estrogen and Hippocampal Plasticity in Rodent Models*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2008. **15**(4): p. 589.
47. Gibbs, R.B., *Estrogen Therapy and Cognition: A Review of the Cholinergic Hypothesis*. Endocrine Reviews, 2010. **31**(2): p. 224-253.
48. Simpkins, J.W., et al., *Mitochondrial Mechanisms of Estrogen Neuroprotection*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1800**(10): p. 1113-1120.
49. Turner, P.R., et al., *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. Progress in Neurobiology, 2003. **70**(1): p. 1-32.
50. Corrigan, F., et al., *The neuroprotective activity of the amyloid precursor protein against traumatic brain injury is mediated via the heparin binding site in residues 96-110*. Journal of Neurochemistry, 2014. **128**(1): p. 196-204.
51. Gandy, S., *Estrogen and Neurodegeneration*. Neurochemical Research, 2003. **28**(7): p. 1003-1008.
52. Csöregi Nord, L., et al., *Analysis of Oestrogen Regulation of Alpha-, Beta- and Gamma-Secretase Gene and Protein Expression in Cultured Human Neuronal and Glial Cells*. Neurodegenerative Diseases, 2010. **7**(6): p. 349-364.
53. Cui, J., Y. Shen, and R. Li, *Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain*. Trends Mol Med., 2013. **19**(3): p. 197-209.
54. Yang, S.H., et al., *Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult*. Stroke., 2000. **31**(3): p. 745-750.
55. Levin-Allerhand, J.A., et al., *17Alpha-estradiol and 17beta-estradiol treatments are effective in lowering cerebral amyloid-beta levels in AbetaPPSWE transgenic mice*. J Alzheimers Dis., 2002. **4**(6): p. 449-457.
56. Toran-Allerand, C.D., et al., *17alpha-estradiol: a brain-active estrogen?* Endocrinology., 2005. **146**(9): p. 3843-3850.
57. Melcangi, R.C., G. Panzica, and L.M. Garcia-Segura, *Neuroactive steroids: focus on human brain*. Neuroscience., 2011. **191**(1-5): p. 1010-1016.

58. Kipp, M., et al., *Multiple sclerosis: neuroprotective alliance of estrogen-progesterone and gender*. Front Neuroendocrinol, 2012. **33**(1): p. 1-16.
59. Dhandapani, K.M. and D.W. Brann, *Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection*. Experimental Gerontology, 2007. **42**(1–2): p. 70-75.
60. Struble, R.G., et al., *Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: An important role in neuronal regeneration*. Experimental Gerontology, 2007. **42**(1–2): p. 54-63.
61. Spence, R., *Mixed and Dynamic Opamp Circuits*, in *Introductory Circuits*. 2008, John Wiley & Sons, Ltd. p. 105-115.
62. Arnold, S., M.B. Victor, and C. Beyer, *Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2012. **131**(1–2): p. 2-9.
63. Yang, S.-H., et al., *Mitochondrial localization of estrogen receptor β* . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(12): p. 4130-4135.
64. Chen, J.Q., et al., *Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors α and β to human mitochondrial dna estrogen response elements*. Journal of Cellular Biochemistry, 2004. **93**(2): p. 358-373.
65. Ding, F., et al., *Ovariectomy Induces a Shift in Fuel Availability and Metabolism in the Hippocampus of the Female Transgenic Model of Familial Alzheimer's*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e59825.
66. CHENG, C.M., et al., *Estrogen augments glucose transporter and IGF1 expression in primate cerebral cortex*. The FASEB Journal, 2001. **15**(6): p. 907-915.
67. Arnold, S. and C. Beyer, *Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target*. Journal of Neurochemistry, 2009. **110**(1): p. 1-11.
68. Yao, J., et al., *Shift in brain metabolism in late onset Alzheimer's disease: Implications for biomarkers and therapeutic interventions*. Molecular Aspects of Medicine, 2011. **32**(4–6): p. 247-257.
69. Moor, A.N., et al., *A putative mitochondrial mechanism for antioxidative cytoprotection by 17beta-estradiol*. Experimental Eye Research, 2004. **78**(5): p. 933-944.
70. Vina, J., et al., *Females live longer than males: role of oxidative stress*. Curr Pharm Des., 2011. **17**(36): p. 3959-3965.
71. Viña, J., et al., *Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens*, in *Biological Chemistry*. 2008. p. 273.
72. Horstman, A.M., et al., *The Role of Androgens and Estrogens on Healthy Aging and Longevity*. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 2012. **67**(11): p. 1140-1152.
73. Irwin, R.W., et al., *Progesterone and Estrogen Regulate Oxidative Metabolism in Brain Mitochondria*. Endocrinology, 2008. **149**(6): p. 3167-3175.
74. Yao, J., et al., *Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial β -amyloid*. Neurobiology of Aging, 2012. **33**(8): p. 1507-1521.
75. Evsen, M.S., et al., *Effects of estrogen, estrogen/progesterone combination and genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized rats*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(14): p. 1869-73.
76. Matejuk, A., et al., *17beta-estradiol treatment profoundly down regulates gene expression in spinal cord tissue in mice protected from experimental autoimmune encephalomyelitis*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2003. **51**(3): p. 185-193.

77. Subramanian, S., et al., *Oral Feeding with Ethinyl Estradiol Suppresses and Treats Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in SJL Mice and Inhibits the Recruitment of Inflammatory Cells into the Central Nervous System*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(3): p. 1548-1555.
78. Offner, H. and A.A. Vandenbark, *Congruent effects of estrogen and T-cell receptor peptide therapy on regulatory T cells in EAE and MS*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(5-6): p. 447-477.
79. Gold, S.M., et al., *Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase (MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha (ERalpha)*. Lab Invest, 2009. **89**(10): p. 1076-1083.
80. Palaszynski, K.M., et al., *Estriol treatment ameliorates disease in males with experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis*. Journal of Neuroimmunology. **149**(1): p. 84-89.
81. Papenfuss, T.L., et al., *Estriol Generates Tolerogenic Dendritic Cells In Vivo That Protect against Autoimmunity*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2011. **186**(6): p. 3346-3355.
82. Holmqvist, P., et al., *Symptoms of multiple sclerosis in women in relation to sex steroid exposure*. Maturitas, 2006. **54**(2): p. 149-153.
83. Caruso, D., et al., *Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes*. Neurochem Int., 2008. **52**(4-5): p. 560-568.
84. Caruso, D., et al., *Effect of short-and long-term gonadectomy on neuroactive steroid levels in the central and peripheral nervous system of male and female rats*. J Neuroendocrinol., 2010. **22**(11): p. 1137-1147.
85. Giatti, S., et al., *Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels*. Neurochem Int., 2010. **56**(1): p. 118-127.
86. Pesaresi, M., et al., *Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats*. Horm Behav., 2010. **57**(1): p. 46-55.
87. Weill-Engerer, S., et al., *Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients*. J Clin Endocrinol Metab., 2002. **87**(11): p. 5138-5143.
88. Ahboucha, S., et al., *Increased levels of pregnenolone and its neuroactive metabolite allopregnanolone in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma*. Neurochem Int., 2006. **49**(4): p. 372-378.
89. Marx, C.E., et al., *The neurosteroid allopregnanolone is reduced in prefrontal cortex in Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry., 2006. **60**(12): p. 1287-1294.
90. Luchetti, S., et al., *Neurosteroid biosynthetic pathway changes in substantia nigra and caudate nucleus in Parkinson's disease*. Brain Pathol., 2010. **20**(5): p. 945-951.
91. Luchetti, S., et al., *Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging., 2011. **32**(11): p. 1964-1976.
92. Meffre, D., et al., *3beta-Hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase mRNA expression in rat brain: effect of pseudopregnancy and traumatic brain injury*. J Steroid Biochem Mol Biol., 2007. **104**(3-5): p. 293-300.
93. Meffre, D., et al., *Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry*. Endocrinology., 2007. **148**(5): p. 2505-2517.
94. Patte-Mensah, C. and A.G. Mensah-Nyagan, *Peripheral neuropathy and neurosteroid formation in the central nervous system*. Brain Res Rev., 2008. **57**(2): p. 454-459.
95. Luchetti, S., I. Huitinga, and D.F. Swaab, *Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis*. Neuroscience., 2011. **191**(6-21): p. 1010-1016.

96. Yi, K.D., et al., *The Assessment of Non-Feminizing Estrogens for Use in Neuroprotection*. Brain research, 2011. **1379**: p. 61-70.
97. Petrone, A.B., et al., *Non-feminizing estrogens: A novel neuroprotective therapy*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2014. **389**(1–2): p. 40-47.
98. Patrone, C., et al., *Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**(19): p. 10905-10910.
99. Shughrue, P., et al., *The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. Endocrinology., 1997. **138**(12): p. 5649-5652.
100. Chowen, J.A., I. Torres-Aleman, and L.M. Garcia-Segura, *Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons*. Neuroendocrinology., 1992. **56**(6): p. 895-901.
101. Hara, Y., et al., *Estrogen Effects on Cognitive and Synaptic Health Over the Lifecourse*. Physiol Rev, 2015. **95**(3): p. 785-807.
102. Osterlund, M.K., et al., *Estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: distinct distribution pattern to ERalpha mRNA*. J Clin Endocrinol Metab., 2000. **85**(10): p. 3840-3846.
103. Moore, J.T., et al., *Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms*. Biochem Biophys Res Commun., 1998. **247**(1): p. 75-78.
104. Foster, T.C., *Role of Estrogen Receptor Alpha and Beta Expression and Signaling on Cognitive Function During Aging*. Hippocampus, 2012. **22**(4): p. 656-669.
105. Han, X., et al., *Role of estrogen receptor alpha and beta in preserving hippocampal function during aging*. J Neurosci., 2013. **33**(6): p. 2671-2683. .
106. Brinton, R.D., *Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function*. Trends Pharmacol Sci., 2009. **30**(4): p. 212-222.
107. Brailoiu, E., et al., *Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system*. Journal of Endocrinology, 2007. **193**(2): p. 311-321.
108. Srivastava, D.P. and P.D. Evans, *G-Protein Oestrogen Receptor 1: Trials and Tribulations of a Membrane Oestrogen Receptor*. Journal of Neuroendocrinology, 2013. **25**(11): p. 1219-1230.
109. Toran-Allerand, C.D., *Estrogen and the Brain: Beyond ER- α , ER- β , and 17 β -Estradiol*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. **1052**(1): p. 136-144.
110. Sellers, K., P. Raval, and D.P. Srivastava, *Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition*. Frontiers in Neuroendocrinology, 2015. **36**: p. 72-89.
111. Kim, M.J., T.H. Kim, and H.H. Lee, *G-protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) and Women's Health*. J Menopausal Med, 2015. **21**(2): p. 79-81.
112. Spencer, J.L., et al., *Uncovering the Mechanisms of Estrogen Effects on Hippocampal Function*. Frontiers in neuroendocrinology, 2008. **29**(2): p. 219-237.
113. Day, M., et al., *Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning*. Behavioural Brain Research, 2005. **164**(1): p. 128-131.
114. Fugger, H.N., et al., *Novel effects of estradiol and estrogen receptor α and β on cognitive function*. Brain Research, 2000. **883**(2): p. 258-264.
115. Rissman, E.F., et al., *Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3996-4001.

116. Mazzucco, C.A., et al., *Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats*. Neuroscience, 2006. **141**(4): p. 1793-800.
117. Mukai, H., et al., *Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons*. J Neurochem, 2007. **100**(4): p. 950-67.
118. Murakami, G., et al., *Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus*. Brain Res, 2015. **1621**: p. 133-46.
119. Waters, E.M., et al., *Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus*. Brain research, 2009. **1290**: p. 1-11.
120. Ishunina, T.A., D.F. Fischer, and D.F. Swaab, *Estrogen receptor α and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease*. Neurobiology of Aging, 2007. **28**(11): p. 1670-1681.
121. Takahashi, K., et al., *11C-Cetozole: An Improved C-11C-Methylated PET Probe for Aromatase Imaging in the Brain*. Journal of Nuclear Medicine, 2014. **55**(5): p. 852-857.
122. Zhang, Q.G., et al., *Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus*. Mol Cell Endocrinol., 2014. **389**(1-2): p. 84-91.
123. Azcoitia, I., J.G. Yague, and L.M. Garcia-Segura, *Estradiol synthesis within the human brain*. Neuroscience., 2011. **191**(139-47): p. 1010-1016.
124. Steckelbroeck, S., et al., *Characterization of aromatase cytochrome P450 activity in the human temporal lobe*. J Clin Endocrinol Metab., 1999. **84**(8): p. 2795-2801.
125. Hojo, Y., et al., *Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2004. **101**(3): p. 865-870.
126. Garcia-Segura, L.M., *Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore*. J Neuroendocrinol., 2008. **20**(6): p. 705-12.
127. Stoffel-Wagner, B., et al., *Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in different areas of the human brain*. J Steroid Biochem Mol Biol., 1999. **70**(4-6): p. 237-241.
128. Gottfried-Blackmore, A., et al., *Brain Microglia Express Steroid-Converting Enzymes in the Mouse*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2008. **109**(1-2): p. 96-107.
129. Strom, J.O., A. Theodorsson, and E. Theodorsson, *Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(3): p. 1533-62.
130. Barron, A.M. and C.J. Pike, *Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease*. Frontiers in bioscience (Elite edition), 2012. **4**: p. 976-997.
131. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *IMMUNOASSAY OF ENDOGENOUS PLASMA INSULIN IN MAN*. Journal of Clinical Investigation, 1960. **39**(7): p. 1157-1175.
132. Goldsmith, S.J., *Radioimmunoassay: Review of basic principles*. Seminars in Nuclear Medicine, 1975. **5**(2): p. 125-152.
133. Abraham, G.E. and W.D. Odell, *Solid-Phase Radioimmunoassay of Serum Estradiol-17 β : A Semi-Automated Approach*, in *Immunologic Methods in Steroid Determination*, F. Péron and B. Caldwell, Editors. 1970, Springer US. p. 87-112.
134. Stanczyk, F.Z., J. Jurow, and A.W. Hsing, *Limitations of Direct Immunoassays for Measuring Circulating Estradiol Levels in Postmenopausal Women and Men in Epidemiologic Studies*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2010. **19**(4): p. 903-906.

135. Hill, M., et al., *The identification and simultaneous quantification of 7-hydroxylated metabolites of pregnenolone, dehydroepiandrosterone, 3 β ,17 β -androstenediol, and testosterone in human serum using gas chromatography–mass spectrometry*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2005. **96**(2): p. 187-200.
136. Hosogi J., et al., *LC-MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17 β -estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 2010. **878**(2): p. 222-227.
137. Ray, J.A., et al., *Direct measurement of free estradiol in human serum by equilibrium dialysis-liquid chromatography-tandem mass spectrometry and reference intervals of free estradiol in women*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(11-12): p. 1008-1014.
138. Suominen, T., et al., *Neurosteroid analysis by gas chromatography–atmospheric pressure photoionization–tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2013. **794**: p. 76-81.
139. Ciofi, L., et al., *Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater*. Journal of Chromatography A, 2013. **1283**: p. 53-61.
140. Prokai-Tatrai, K., D. Bonds, and L. Prokai, *Simultaneous Measurement of 17 β -Estradiol, 17 α -Estradiol and Estrone by GC-Isotope Dilution MS/MS*. Chromatographia., 2010. **71**(3-4): p. 311-315.
141. Courant, F., et al., *Assessment of circulating sex steroid levels in prepubertal and pubertal boys and girls by a novel ultrasensitive gas chromatography-tandem mass spectrometry method*. J Clin Endocrinol Metab., 2010. **95**(1): p. 82-92.
142. Zacharia L. C., Dubey R. K., and Jackson E. K., *A gas chromatography/mass spectrometry assay to measure estradiol, catecholestradiols, and methoxyestradiols in plasma*. Steroids, 2004. **69**(4): p. 255-261.
143. Courant, F., et al., *Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disrupters 1. Analytical strategy for estrogens measurement in plasma at ultra-trace level*. Anal Chim Acta., 2007. **586**(1-2): p. 105-114.
144. Moon, J.-Y., et al., *A novel GC-MS method in urinary estrogen analysis from postmenopausal women with osteoporosis*. Journal of Lipid Research, 2011. **52**(8): p. 1595-1603.
145. Guo, T., et al., *Rapid measurement of estrogens and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization*. Clin Biochem., 2008. **41**(9): p. 736-741.
146. Zhao, Y., et al., *Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of free and conjugated estrogens in breast cancer patients before and after exemestane treatment*. Anal Chim Acta., 2014. **806**(2): p. 172-179.
147. Rosset, R., M. Caude, and A. Jardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*. Livre, 1982. **2^{édition}**.
148. Banerjee, S. and S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. International Journal of Analytical Chemistry, 2012. **2012**: p. 40.
149. Smallwood, I.M., *Handbook of organic solvent properties* 1996.
150. Kostianinen, R. and T.J. Kauppila, *Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A., 2009. **1216**(4): p. 685-699.
151. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Negative ion production with the electrospray ion source*. J. Phys. Chem. , 1984. **88**(20): p. 4671-4675.

152. Wong, S.F., C.K. Meng, and J.B. Fenn, *Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols)*. The Journal of Physical Chemistry, 1988. **92**(2): p. 546-550.
153. Mann, M., C.K. Meng, and J.B. Fenn, *Interpreting Mass Spectra of Multiply Charged Ions*. Analytical Chemistry 1989. **61**(15): p. 1702-1708.
154. Blades, A.T., M.G. Ikononou, and P. Kebarle, *Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell*. Analytical Chemistry 1991. **63**(19): p. 2109-2114.
155. Ikononou, M.G., A.T. Blades, and P. Kebarle, *Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance*. Analytical Chemistry 1991. **63**(18): p. 1989-1998.
156. Dole, M., et al., *Molecular Beams of Macroions*. The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
157. Iribarne, J.V. and B.A. Thomson, *On the evaporation of small ions from charged droplets*. The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
158. Thomson, B.A. and J.V. Iribarne, *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure*. The Journal of Chemical Physics, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
159. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(7): p. 804-17.
160. Paul, W.a.S., H.S., *Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld*. Zeitschrift für Naturforschung A, 1953. **8**(7): p. 448-450.
161. Paul, W., H.P. Reinhard, and U. von Zahn, *Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner*. Zeitschrift für Physik, 1958. **152**(2): p. 143-182.
162. Wolfgang, P., *ELECTROMAGNETIC TRAPS FOR CHARGED AND NEUTRAL PARTICLES*. Nobel Lecture Physics, 1989: p. 601-622.
163. JT, W., *Introduction to Mass Spectrometry*. Ed Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1997.
164. Hopfgartner, G., et al., *Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules*. Journal of Mass Spectrometry, 2004. **39**(8): p. 845-855.
165. McLuckey, S.A., et al., *Ion trap mass spectrometry using high-pressure ionization*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(14): p. 737A-743A.
166. de Hoffmann, E., *Tandem mass spectrometry: A primer*. J Mass Spectrom., 1996. **31**(2): p. 129-137.
167. Collette, C. and E. De Pauw, *Calibration of the internal energy distribution of ions produced by electrospray*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998. **12**(4): p. 165-170.
168. Collette, C., et al., *Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electrospray sources*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998. **12**(22): p. 1673-1678.
169. Higashi, T. and K. Shimada, *Derivatization of neutral steroids to enhance their detection characteristics in liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem., 2004. **378**(4): p. 875-882.
170. Xu, L. and D.C. Spink, *Analysis of steroidal estrogens as pyridine-3-sulfonyl derivatives by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*. Anal Biochem., 2008. **375**(1): p. 105-114.
171. Yamashita, K., et al., *Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Steroids., 2007. **72**(11-12): p. 819-827.
172. Anari, M.R., et al., *Derivatization of ethinylestradiol with dansyl chloride to enhance electrospray ionization: application in trace analysis of ethinylestradiol in rhesus monkey plasma*. Anal Chem., 2002. **74**(16): p. 4136-4144.

173. Petucci, C., et al., *Trace LC/MS/MS quantitation of 17 β -estradiol as a biomarker for selective estrogen receptor modulator activity in the rat brain*. J Mass Spectrom., 2010. **45**(1): p. 65-71.
174. Nguyen, H.P., et al., *Simultaneous quantification of four native estrogen hormones at trace levels in human cerebrospinal fluid using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal., 2011. **54**(4): p. 830-837.
175. Higashi, T., et al., *Studies on Neurosteroids XXI: An Improved Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for Determination of 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol in Rat Brains*. Analytical Sciences, 2007. **23**(8): p. 1015-1019.
176. Higashi, T., et al., *Studies on Neurosteroids XXVI. Fluoxetine-Evoked Changes in Rat Brain and Serum Levels of Neuroactive Androgen, 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009. **32**(9): p. 1636-1638.
177. Yamashita, K., et al., *Synthesis of pyridine-carboxylate derivatives of hydroxysteroids for liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*. Steroids., 2007. **72**(1): p. 50-59.
178. Honda, A., et al., *Highly sensitive quantification of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS*. J Lipid Res., 2007. **48**(2): p. 458-464.
179. Ahonen, L., et al., *Separation of steroid isomers by ion mobility mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2013. **1310**: p. 133-137.
180. Zuo, M., et al., *p-Toluenesulfonyl isocyanate as a novel derivatization reagent to enhance the electrospray ionization and its application in the determination of two stereo isomers of 3-hydroxyl-7-methylnorethynodrel in plasma*. Journal of Chromatography B, 2005. **814**(2): p. 331-337.
181. Aycirix, S., et al., *Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **404**(10): p. 3049-3059.
182. Tai, S.S.C. and M.J. Welch, *Development and Evaluation of a Reference Measurement Procedure for the Determination of Estradiol-17 β in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(19): p. 6359-6363.
183. Nelson, R.E., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma*. Clin Chem., 2004. **50**(2): p. 373-384.
184. Xia, Y.-Q., et al., *Trace level quantification of deuterated 17 β -estradiol and estrone in ovariectomized mouse plasma and brain using liquid chromatography/tandem mass spectrometry following dansylation reaction*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(14): p. 1621-1628.
185. Higashi, T., et al., *Procedure for increasing the detection responses of estrogens in LC-MS based on introduction of a nitrobenzene moiety followed by electron capture atmospheric pressure chemical ionization*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **386**(3): p. 658-665.
186. Higashi, T., et al., *Alternative Procedure for Charged Derivatization to Enhance Detection Responses of Steroids in Electrospray Ionization-MS*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2007. **55**(4): p. 662-665.
187. Lin, Y.-H., C.-Y. Chen, and G.-S. Wang, *Analysis of steroid estrogens in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chemical derivatizations*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(13): p. 1973-1983.
188. Nishio, T., et al., *Development and application of electrospray-active derivatization reagents for hydroxysteroids*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **44**(3): p. 786-795.
189. Kushnir, M.M., et al., *High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol*. Am J Clin Pathol., 2008. **129**(4): p. 530-539.

190. Petucci, C., et al., *Trace LC/MS/MS quantitation of 17 β -estradiol as a biomarker for selective estrogen receptor modulator activity in the rat brain*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(1): p. 65-71.
191. Arai, S., et al., *New quantification method for estradiol in the prostatic tissues of benign prostatic hyperplasia using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Steroids., 2010. **75**(1): p. 13-19.
192. Szarka, S., et al., *Separation of dansylated 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, and estrone on a single HPLC column for simultaneous quantitation by LC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem., 2013. **405**(10): p. 3399-3406.
193. Jasuja, G.K., et al., *Age trends in estradiol and estrone levels measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry in community-dwelling men of the Framingham Heart Study*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci., 2013. **68**(6): p. 733-740.
194. Ke, Y., et al., *A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen-related steroids in postmenopausal serum*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt B**: p. 523-534.
195. Vitku, J., et al., *Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid*. Talanta, 2015. **140**: p. 62-67.
196. Wang, Q., et al., *Ultrasensitive quantification of serum estrogens in postmenopausal women and older men by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Steroids, 2015. **96**: p. 140-152.
197. Taylor, J.K., *Statistical Techniques for Data Analysis*. CRC Press LLC, 2004.
198. Dorschel, C.A., et al., *LC detectors: evaluation and practical implications of linearity*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(17): p. 951A-968A.
199. ICH, *Validation of analytical procedures: text and methodology*. Harmonised Tripartite Guideline, 1994(in 2005 incorporated in Q2(R1)).
200. Hanselman, T.A., D.A. Graetz, and A.C. Wilkie, *Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants:A Review*. Environmental Science & Technology, 2003. **37**(24): p. 5471-5478.
201. Zhiqiang, Y., et al., *SORPTION OF STEROID ESTROGENS TO SOILS AND SEDIMENTS*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004. **23**(3): p. 531-539.
202. Poole, C.F., A.D. Gunatilleka, and R. Sethuraman, *Contributions of theory to method development in solid-phase extraction*. J Chromatogr A., 2000. **885**(1-2): p. 17-39.
203. Maeda N., et al., *Accurate determination of tissue steroid hormones, precursors and conjugates in adult male rat*. J Biochem., 2013. **153**(1): p. 63-71.
204. Renne, A., et al., *Simultaneous quantification of steroids in rat intratesticular fluid by HPLC-isotope dilution tandem mass spectrometry*. J Androl., 2012. **33**(4): p. 691-698.
205. Fiers, T., et al., *Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 2012. **893-894**(57-62): p. 1010-1016.
206. Seo, J., et al., *Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2005. **1067**(1-2): p. 303-9.
207. Chao A., Schlinger B. A., and Remage-Healey L., *Combined liquid and solid-phase extraction improves quantification of brain estrogen content*. Front Neuroanat., 2011. **5**(57): p. 1-7.
208. Bakhtiar, R. and T.K. Majumdar, *Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2007. **55**(3): p. 227-243.

209. Ismaiel, O.A., et al., *Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(31): p. 3303-3316.
210. Bonfiglio, R., et al., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
211. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations*. Anal Chem, 1998. **70**(5): p. 882-889.
212. Buhrman, D.L., P.I. Price, and P.J. Rudewicz, *Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996. **7**(11): p. 1099-1105.
213. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(11): p. 942-950.
214. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Anal Chem, 2003. **75**(13): p. 3019-3030.
215. Nguyen, H.P., et al., *Evaluation of matrix effects in analysis of estrogen using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(15): p. 1781-1787.
216. Giese, R.W., *Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances*. J Chromatogr A., 2003. **1000**(1-2): p. 401-412.
217. Diaz-Cruz, M.S., et al., *Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS)*. J Mass Spectrom., 2003. **38**(9): p. 917-923.
218. Moeller, B.C. and S.D. Stanley, *The development and validation of a turbulent flow chromatography-tandem mass spectrometry method for the endogenous steroid profiling of equine serum*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **905**: p. 1-9.
219. Koal, T., et al., *Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **129**(3-5): p. 129-138.
220. Caruso, D., et al., *Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats*. Psychoneuroendocrinology., 2013. **38**(10): p. 2278-2290.
221. Kaklamanos, G., et al., *Determination of anabolic steroids in bovine serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011. **879**(2): p. 225-229.
222. Guo, T., et al., *Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry*. Clin Chim Acta., 2006. **372**(1-2): p. 76-82.
223. McNamara, K.M., et al., *Measurement of sex steroids in murine blood and reproductive tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Steroid Biochem Mol Biol., 2010. **121**(3-5): p. 611-618.
224. Harwood, D.T. and D.J. Handelsman, *Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization*. Clin Chim Acta., 2009. **409**(1-2): p. 78-84.
225. Al-Amri, I.S., et al., *Seasonal changes in plasma steroid levels in relation to ovarian steroidogenic ultrastructural features and progesterone receptors in the house gecko, Hemidactylus flaviviridis, in Oman*. Gen Comp Endocrinol., 2012. **177**(1): p. 46-54.

226. Fuhrman, B.J., et al., *Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst., 2012. **104**(4): p. 326-339.
227. Kauppila, T.J., et al., *Atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry of neurotransmitters*. Journal of Mass Spectrometry, 2006. **41**(6): p. 781-789.
228. Keski-Rahkonen, P., et al., *LC-MS analysis of estradiol in human serum and endometrial tissue: Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization*. Journal of Mass Spectrometry, 2013. **48**(9): p. 1050-1058.
229. Miramura, K., *Determination of Estrogens in Rat Brains Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*. Chromatography, 2002. **23**(2).
230. Kawato, S., Y. Hojo, and T. Kimoto, *Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain*. Methods Enzymol, 2002. **357**: p. 241-249.
231. Caron, P., et al., *Profiling endogenous serum estrogen and estrogen-glucuronides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chem., 2009. **81**(24): p. 10143-10148.
232. Xu, X., et al., *Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chem., 2007. **79**(20): p. 7813-7821.
233. Finkelstein, M., et al., *Comparative studies of the aromatization of testosterone and epitestosterone by human placental aromatase*. Endocrinology, 1981. **108**(3): p. 943-947.
234. Lewis, K.M. and R.D. Archer, *pKa values of estrone, 17 β -estradiol and 2-methoxyestrone*. Steroids, 1979. **34**(5): p. 485-499.
235. Enke, C.G., *A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(23): p. 4885-4893.
236. Constantopoulos, T.L., C.G. Jackson Gs Fau - Enke, and C.G. Enke, *Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 1999. **10**(1044-0305): p. 625-634.
237. Mirza, U.A. and B.T. Chait, *Effects of anions on the positive ion electrospray ionization mass spectra of peptides and proteins*. Anal. Chem., 1994. **66**: p. 2898-2904.
238. Yen, T.-Y., M. Judith Charles, and R.D. Voyksner, *Processes that affect electrospray ionization-mass spectrometry of nucleobases and nucleosides*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996. **7**(11): p. 1106-1108.
239. Guo, X., et al., *Secondary structural characterization of oligonucleotide strands using electrospray ionization mass spectrometry*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(11): p. 3659-3666.
240. Wang, G. and R.B. Cole, *Effects of solvent and counterion on ion pairing and observed charge states of diquaternary ammonium salts in electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996. **7**(10): p. 1050-1058.
241. Rannulu, N.S. and R.B. Cole, *Novel fragmentation pathways of anionic adducts of steroids formed by electrospray anion attachment involving regioselective attachment, regiospecific decompositions, charge-induced pathways, and ion-dipole complex intermediates*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. , 2012. **23**: p. 1558-1568.
242. <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/index.htm>.
243. Sun, Y., et al., *Ultrafiltration Tandem Mass Spectrometry of Estrogens for Characterization of Structure and Affinity for Human Estrogen Receptors*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(2): p. 271-279.

244. Mukai, H., et al., *Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2010. **1800**(10): p. 1030-1044.
245. Lin, Y.H., C.Y. Chen, and G.S. Wang, *Analysis of steroid estrogens in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chemical derivatizations*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(13): p. 1973-1983.
246. Köhling, R., *Derivatization Agents for LC/MS – An Improved Detection of Estradiol with ESI-MS*. . Analytix, 2011. **4**: p. 10-11.
247. Leffler, M.T. and E.J. Matson, *Carbamate Antimalarials*. Journal of the American Chemical Society, 1948. **70**(10): p. 3439-3442.
248. Suzuki, Y., et al., *Design and Synthesis of Labeling Reagents (MS Probes) for Highly sensitive Electrospray Ionisation Masse Spectrometry and Their Application to the Detection of Carbonyl, Alcohol, Carboxylic Acid and Primary Amine Samples*. Japan Society for Analytical Chemistry, 2004. **20**: p. 475-482.
249. Ulrich, H., *The Chemistry of Sulfonyl Isocyanates*. Chemical Reviews, 1965. **65**(3): p. 369-376.
250. Ruchelman, M.W. and P. Haines, *Solubility Studies of Estradiol in Organic Solvents Using Gas-Liquid Chromatography*. Journal of Chromatographic Science, 1967. **5**(6): p. 290-296.
251. Nelson, R.E., et al., *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Assay for Simultaneous Measurement of Estradiol and Estrone in Human Plasma*. Clinical Chemistry, 2004. **50**(2): p. 373-384.
252. Li, Y., et al., *The use of chemical derivatization to enhance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of 1-hydroxypyrene, a biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(22): p. 3331-3338.
253. Beaudry, F., P. Guenette Sa Fau - Vachon, and P. Vachon, *Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity*. Biomedical Chromatography, 2006. **20**(0269-3879): p. 1216-1222.
254. Xu, L. and D.C. Spink, *1,2-Dimethylimidazole-4-sulfonyl chloride, a novel derivatization reagent for the analysis of phenolic compounds by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry: application to 1-hydroxypyrene in human urine*. J Chromatogr B, 2007. **15**(855(2)): p. 159-165.

Ecaterina LOZAN

Analyse quantitative de l'Estradiol dans les tissus cérébraux et le plasma de souris

Résumé : Les œstrogènes font partie de la famille des neurostéroïdes. Notamment, l'Estradiol (17β -E₂) pourrait avoir des effets bénéfiques sur certaines anomalies liées à l'âge (déclin mnésique et cognitif, maladie d'Alzheimer). Le dosage de très faibles teneurs du 17β -E₂ et de ces métabolites (Estrone, Estriol), dans les tissus cérébraux et le plasma, constitue un outil indispensable pour estimer la variation de leurs niveaux avec l'âge et dans différentes pathologies.

Tout d'abord, nous avons élaboré une méthode en RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS de quantification des œstrogènes sans dérivation chimique. La sélectivité de la séparation et la sensibilité de la détection de ces molécules ont été améliorées après optimisation des paramètres MRM et chromatographiques.

Puis, différents agents de dérivation ont été synthétisés et évalués afin d'augmenter le taux d'ionisation pour améliorer la sensibilité de détection. Après l'analyse ESI-MS et MS/MS de onze dérivés du 17β -E₂, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au dérivé 17β -E₂-Q8S.

Afin de réduire les interférences, une méthode de préparation de l'échantillon biologique (tissus cérébral, plasma de souris) a été développée. Les deux dosages (sans et avec dérivation) ont été comparés en termes de sensibilité, limites de détection et de quantification (LD et LQ), linéarité et reproductibilité. Puis, elles ont été appliquées à l'analyse des échantillons de cerveau, d'hippocampe et de plasma prélevés sur des animaux jeunes et âgés traités avec des quantités connues de 17β -E₂. La méthode qui nous est apparue la plus robuste est la méthode sans dérivation avec une LD de 0,5 fmole. μ L⁻¹.

Mots clés : Estradiol, neurostéroïdes, spectrométrie de masse, SPE, HPLC, MRM, ESI, dérivation

Quantitative analysis of Estradiol in brain tissue and plasma of mouse

Abstract : Estrogens are neurosteroids, especially Estradiol (17β -E₂) which is considered to be the most biologically active form. 17β -E₂ could have positive effects on some age-associated anomalies (memory and cognitive impairment, Alzheimer's disease). For elucidating and better understanding the molecular and cellular mechanisms that underlie the effects within the brain, it is necessary to quantitate 17β -E₂ and its metabolites (estrone and estriol) in brain and plasma.

First, the RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS method without derivatization was developed. The selectivity of the separation and the sensitivity of detection of the estrogens has been improved after optimization of MRM and chromatographic parameters.

Secondly, the various derivatization agents were evaluated after their synthesis in order to improve the sensitivity, selectivity and signal enhancement. After studying the eleven synthesized derivatives of 17β -E₂ in ESI-MS and MS/MS, promising results were obtained with the 17β -E₂-Q8S derivative.

A simple purification method using liquid-liquid extraction followed by C18 solid phase extraction has been optimized in order to minimize assay interferences. The two assays (with and without derivatization) were then compared in terms of efficiency, detection and quantification limits (LOD/LOQ), calibration linearity and reproducibility. Then, both methods were validated on biological samples (brain, hippocampus and plasma) collected from animals treated with known amounts of 17β -E₂. Finally, the more robust method was the method without derivatization with a LOD of 0.5 fmol. μ L⁻¹.

Keywords : Estradiol, neurosteroids, mass spectrometry, SPE, HPLC, MRM, ESI, derivatization

Unité de recherche

Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets, UMR 5248 CNRS, Adresse : Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14, 33600 Pessac cedex

Institut des Sciences Moléculaires, UMR 5255 CNRS, Adresse : Université de Bordeaux Bâtiment A12, 351 Cours de la Libération, 33405 TALENCE cedex