



**HAL**  
open science

**Attachement anionique en spectrométrie de masse électrospray négative : étude de la régiosélectivité et application à l'amélioration de la détection des stéroïdes en matrice urinaire pour le contrôle antidopage dans le sport.**

Quentin Dumont

► **To cite this version:**

Quentin Dumont. Attachement anionique en spectrométrie de masse électrospray négative : étude de la régiosélectivité et application à l'amélioration de la détection des stéroïdes en matrice urinaire pour le contrôle antidopage dans le sport.. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066520 . tel-01343985

**HAL Id: tel-01343985**

**<https://theses.hal.science/tel-01343985>**

Submitted on 11 Jul 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.

# Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

Ecole doctorale 406 – Institut Parisien de Chimie Moléculaire

*Equipe de Chimie Structurale Organique et Biologique*

## **Attachement anionique en spectrométrie de masse électrospray négative**

*Etude de la régiosélectivité et application à l'amélioration de  
la détection des stéroïdes en matrice urinaire pour le contrôle  
antidopage dans le sport.*

Par Quentin Dumont

Thèse de doctorat de Chimie Analytique

Dirigée par Pr. Richard B. Cole

Présentée et soutenue publiquement à Paris 5<sup>e</sup> le 18 novembre 2015

Devant un jury composé de :

Dr. Alexandre GIULIANI	Ingénieur de recherche	Rapporteur
Pr. Olivier LAPREVOTE	Professeur	Rapporteur
Pr. Valérie PICHON	Professeur	Examinatrice
Dr. David TOUBOUL	Chargé de recherche 1 <sup>ère</sup> classe	Examineur
Pr. Richard COLE	Professeur	Directeur de thèse
Dr. Corinne BUISSON	Chef de section AFLD	Membre invité



*« The very nature of science is discoveries,  
and the best of those discoveries are the ones you don't expect.»*

- Neil deGrasse Tyson

## Résumé

Les stéroïdes anabolisants androgènes peu acides ou basiques ne permettent pas d'obtenir des signaux importants lors de leur analyse par spectrométrie de masse électrospray (ESI-MS), rendant ainsi leur détection compliquée par l'utilisation de cette technique. Bien que certains stéroïdes puissent être analysés de manière adéquate avec des méthodes d'analyse antidopage classiques comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la MS avec une source d'ionisation électronique (EI), il reste un besoin pour le développement d'une méthode qui soit capable de détecter efficacement les composés plus difficiles, c'est-à-dire ceux qui sont moins susceptibles de s'ioniser en ESI.

Pour résoudre ce problème l'approche envisagée se base sur l'addition d'anions (sous forme de sel d'ammonium) à des stéroïdes anabolisants comme principe pour le développement d'une méthode analytique de détection de ces composés. Il a été confirmé que les limites de détection instrumentales obtenues avec ces anions sont plus basses qu'en comparaison des mêmes analyses sans additif en ESI positif ou négatif. Les étapes de développement de cette méthode basée sur la chromatographie en phase liquide (LC) couplée à la MS en tandem sont également présentées. Les résultats obtenus sur des échantillons en matrice urinaire démontrent que l'attachement anionique apporte une nouvelle approche prometteuse pour la détection des stéroïdes en contrôle antidopage.

De plus, des expériences sur des stéroïdes bifonctionnels comme la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol ou la d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnenolone réduite ont permis de mieux appréhender les facteurs qui permettent que l'attachement préférentiel d'un anion donné puisse se faire sur une région spécifique de la molécule, i.e. que l'attachement anionique soit « régiosélectif ». La fragmentation des adduits anioniques de stéroïdes bifonctionnels en MS en tandem a montré des voies de décomposition produisant des ions produits caractéristiques de chaque anion. La détermination d'acidités en phase gazeuse obtenues par des calculs de chimie théorique a également permis d'apporter une nouvelle lumière sur le comportement des adduits anion-stéroïde.

*Mots clés* : antidopage ; stéroïde ; anion ; électrospray ; fragmentation ; chromatographie.

## Remerciements

Je remercie Pr. Laprèvote ainsi que Dr. Giuliani d'avoir pris le temps de lire et de juger ce travail. Je remercie également Pr. Pichon, Dr. Buisson, et Dr. Touboul d'avoir accepté de faire partie du jury lors de ma soutenance.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde gratitude envers l'ensemble de l'équipe de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage qui m'a accueilli à de nombreuses reprises au sein de son laboratoire, m'a formé, aidé, et répondu à des perpétuelles questions. Je remercie particulièrement Isabelle Bailloux pour sa patience et ses excellents conseils sur les pratiques instrumentales, et Corinne Buisson pour son expertise et son avis éclairé qui m'a permis de progresser en permanence.

Je remercie la Région Ile-de-France et le programme DIM Analytics qui ont financé mon doctorat et sans qui ces travaux n'auraient pas été possibles.

Mes remerciements au Professeur Richard B. Cole qui m'a donné la chance de travailler sur ce passionnant projet, qui a su me canaliser et me motiver lorsque j'en avais besoin. J'ai apprécié ses conseils et son accompagnement pendant ces trois années.

Je remercie chaleureusement les permanents de l'équipe de Chimie Structurale Organique et Biologique (CSOB) qui ont toujours été présents pour m'aiguiller et partager leur savoir dans les moments de difficulté, en particulier Héloïse Dossmann dont l'aide inestimable -à la fois professionnelle et personnelle- a été infiniment appréciée. Un énorme merci aux doctorants et post-docs présents et passés : Farid, Baiyi, Bessem, Adrián, Jean, Sergey pour tous les excellents moments ! Je remercie tout particulièrement mon acolyte Mariana Bárcenas qui a su m'épauler et apporter son dynamisme inébranlable dans tous les instants passés ensemble (y compris ceux de frustration !).

Un remerciement très spécial pour toute ma famille et son soutien inconditionnel dans les bons moments comme les mauvais. Et parce qu'à côté de la thèse il y a aussi une vie, je remercie sincèrement toutes ces personnes qui ont été mon sas de décompression pendant ces 3 ans : Lily, Evguenia, Thierry, Lucile, Olivier, Chaima, Marion, Sibyl, Minh-Vi, Claire, Axelle, Mathilde, Johanna, Anne, Pierre, Seb, Max, Sam, Marylou, Sarah, et tous les gens extraordinaires de Doc'Up. Merci à tous !

# Sommaire

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>2</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>TABLE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>8</b>
1. LE DOPAGE DANS LE SPORT.....	9
1.1. Histoire du dopage.....	9
1.2. L'Agence Française de Lutte contre le Dopage.....	10
1.3. Les substances interdites.....	11
2. LES STEROÏDES.....	13
2.1. Structures.....	13
2.2. Propriétés physico-chimiques et détermination de l'acidité en phase gazeuse.....	15
2.3. Métabolisation et élimination.....	16
2.4. Enjeux du contrôle des stéroïdes anabolisants androgènes (SAA).....	18
3. METHODES DE DETECTION DES STEROÏDES ET PERFORMANCES.....	19
3.1. GC-MS et GC-MS/MS.....	20
3.2. LC-MS/MS.....	24
4. PRESENTATION ET OBJECTIFS DU PROJET.....	28
4.1. Limitations actuelles.....	28
4.2. Attachement anionique.....	32
4.3. Objectifs du projet.....	33
<b>MÉTHODOLOGIE</b> .....	<b>35</b>
1. PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	36
1.1. Extraction liquide-liquide.....	36
1.2. Extraction sur phase solide.....	37
1.2. Analyse des stéroïdes en matrice simple (solvant).....	40
1.3. Analyse des stéroïdes en matrice complexe (urine).....	41
2. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE.....	43
2.1. Principe.....	43
2.2. La phase stationnaire.....	44
2.3. Paramètres expérimentaux.....	45
3. SPECTROMETRIE DE MASSE.....	46
3.1. Fondamentaux.....	46
3.2. Source d'ionisation.....	47
3.3. Analyseur quadripolaire.....	52
3.4. MS en tandem : principes de la fragmentation CID.....	53
3.5. Détecteur.....	56
3.6. Paramètres expérimentaux de MS.....	57
<b>ETUDE DE LA REGIOSELECTIVITE DE L'ATTACHEMENT ANIONIQUE</b> .....	<b>59</b>
1. SITE DE L'ATTACHEMENT ANIONIQUE SUR DES STEROÏDES BIFONCTIONNELS.....	60
1.1. Réduction de la 3 $\beta$ -hydroxypregn-5-en-20-one (pregnénolone) et d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone.....	60
1.2. Etude des décompositions de la pregnénolone, pregnénolone réduite et d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite.....	61
1.3. La 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol, un analogue avec une acidité en phase gazeuse réduite.....	72
2. DOUBLE ATTACHEMENT ANIONIQUE.....	76
3. CONCLUSIONS DE L'ETUDE DE LA REGIOSELECTIVITE DE L'ATTACHEMENT ANIONIQUE.....	78
<b>APPLICATION A L'ANALYSE DES SAA EN CONTROLE ANTIDOPAGE</b> .....	<b>81</b>

1. OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES .....	82
1.1. Choix de l'anion.....	82
1.2. Effet de la concentration d'anion.....	84
1.2.3. Influence de la quantité d'anion sur la qualité du signal : exemple de la calustérone-m	88
1.3. Paramètres d'instrumentation.....	91
2. LIMITES DE DETECTION INSTRUMENTALES .....	100
2.1. Cas général .....	100
2.2. Cas des stéroïdes conjugués à la glucuronide.....	103
3. DEVELOPPEMENT EXPERIMENTAL DE LA METHODE SRM BASEE SUR L'ATTACHEMENT ANIONIQUE.....	107
3.1. Analyses préliminaires en matrice simple (solvant).....	107
3.2. Analyses en matrice semi-complexe (urine synthétique).....	112
3.3. Analyses en matrice complexe (urine).....	114
4. VALIDATION DE LA METHODE SRM BASEE SUR L'ATTACHEMENT ANIONIQUE .....	126
4.1. Rendement d'extraction .....	126
4.2. Effet de matrice .....	128
4.3. Détermination de la « capacité d'identification » .....	132
4.3. Calcul de la limite de décision $CC\alpha$ .....	133
5. CONCLUSIONS DE L'ETUDE .....	138
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>140</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>144</b>
ANNEXE A : DESCRIPTION DES COMPOSES UTILISES .....	145
ANNEXE B : PROCEDURE DE PREPARATION D'UN ECHANTILLON EN SOLVANT DE 6-OXO-ANDROSTENEDIONE A 10 $\mu$ G/ML POUR INTRODUCTION PAR HPLC .....	146
ANNEXE C : DETAILS EXPERIMENTAUX DES PROCEDURES DE PREPARATION D'ECHANTILLONS .....	146
ANNEXE D : DETAILS EXPERIMENTAUX DE LC.....	150
ANNEXE E : PROCEDURE DE REDUCTION DE LA D <sub>4</sub> -PREGNENOLONE .....	151
ANNEXE F : PARAMETRES POUR LES CALCULS THEORIQUES D'ACIDITE EN PHASE GAZEUSE .....	152
ANNEXE G : ETUDE DE LA 6-OXO-ANDROSTENEDIONE .....	153
ANNEXE H : ANALYSES LC-SRM DES GAMMES DE DILUTIONS POUR LE FLUOXYMESTERONE-M ET LA 6-OXO-ANDROSTENEDIONE .....	158
ANNEXE I : RESULTATS ET CALCULS POUR LA DETERMINATION DE LA CAPACITE D'IDENTIFICATION DU FURAZABOL-M .....	160
<b>TABLE DES SCHEMAS.....</b>	<b>161</b>
<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>163</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>166</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>167</b>



## Table des abréviations

<b>β-Glu</b> .....	β-Glucuronidase
<b>AFLD</b> .....	Agence Française de Lutte contre le Dopage
<b>AMA</b> .....	Agence Mondiale Antidopage
<b>APCI</b> .....	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (CI à pression atmosphérique)
<b>APPI</b> .....	Atmospheric Pressure PhotoIonisation (Photoionisation à pression atmosphérique)
<b>BSTFA</b> .....	N,O-bis(triméthylsilyle)trifluoroacétamide
<b>CER</b> .....	Composé Endogène de Référence
<b>CI</b> .....	Chemical Ionization (Ionisation chimique)
<b>CID</b> .....	Collision-Induced Dissociation (Dissociation induite par collision)
<b>EI</b> .....	Electron Ionization (Ionisation électronique)
<b>EM</b> .....	Electron Multiplier (Electromultiplicateur)
<b>ESI</b> .....	Electrospray Ionization (Ionisation par électronébullisation)
<b>FT-ICR</b> .....	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier)
<b>GA</b> .....	Gas-phase Acidity (Acidité en phase gazeuse)
<b>GC-C-IRMS</b> .....	Gas-phase Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de ratio isotopique par combustion)
<b>GC-MS</b> .....	Gas-phase Chromatography Mass Spectrometry (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)
<b>GC-MS/MS</b> .....	Gas-phase Chromatography tandem Mass Spectrometry (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem)
<b>HPLC</b> .....	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
<b>IUPAC</b> .....	International Union of Pure and Applied Chemistry (Union International de Chimie Pure et Appliquée)
<b>IRMS</b> .....	Isotope-Ratio Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse de rapport isotopique)
<b>LCH</b> .....	Liquid Chromatography Hydrolysis (Hydrolyse pour Chromatographie Liquide)
<b>LC-MS</b> .....	Liquid-phase Chromatography Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la MS)

<b>LC-MS/MS</b> .....	Liquid-phase Chromatography tandem Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la MS en tandem)
<b>LLE</b> .....	Liquid-Liquid Extraction (Extraction liquide-liquide)
<b>LOD</b> .....	Limit Of Detection (Limite de détection)
<b>m/z</b> .....	Rapport masse-sur-nombre de charges
<b>MALDI</b> .....	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (Désorption ionisation laser assistée par matrice)
<b>MS</b> .....	Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
<b>MS/MS</b> .....	Spectrométrie de masse en tandem
<b>MSTFA</b> .....	N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
<b>PFBr</b> .....	Pentafluorobenzyle
<b>Q</b> .....	Quadripôle
<b>RF</b> .....	Radiofréquence
<b>SAA</b> .....	Stéroïde Anabolisant Androgène
<b>S/N</b> .....	Signal-to-Noise ratio (Rapport signal sur bruit)
<b>SPE</b> .....	Solid-Phase Extraction (Extraction sur phase solide)
<b>SRM</b> .....	Selected Reaction Monitoring (Suivi de réaction sélectionnée)
<b>TBME</b> .....	<i>Tert</i> -Butyl Methyl Ether (Méthyl <i>tert</i> -butyl éther)
<b>TBS</b> .....	<i>Tert</i> -ButylSilyl
<b>TBSMTFA</b> .....	N-( <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle)-N-méthyltrifluoroacétamide
<b>Th</b> .....	Thomson
<b>THF</b> .....	TétraHydroFurane
<b>TIC</b> .....	Total Ion Count (Compte d'ion total)
<b>TMS</b> .....	Triméthylsilyl
<b>TQ</b> .....	Triple Quadripôle
<b>t<sub>r</sub></b> .....	Temps de rétention
<b>WADA</b> .....	World Anti Doping Agency (Agence Mondiale Antidopage)

# **Introduction**

# 1. Le dopage dans le sport

## 1.1. Histoire du dopage

Depuis les prémices du dopage et jusqu'à aujourd'hui, le contrôle antidopage est devenu une course incessante entre la création de nouvelles substances dopantes et l'adaptation des tests pour inclure chaque année plus de molécules et de méthodes frauduleuses (dopage sanguin en 1970, EPO en 1990, etc.).<sup>1</sup> Les scandales liés au dopage des coureurs du Tour de France ont poussé à la création d'un organisme qui permettrait d'unifier les normes de la lutte antidopage, tout en coordonnant les actions des organisations sportives et des pouvoirs publics. Fondée à Lausanne le 10 novembre 1999, l'Agence Mondiale Antidopage (AMA, en anglais World Anti Doping Agency WADA) remplit aujourd'hui ce rôle de référence dans l'antidopage sportif : elle émet les critères et les règles et accrédite les laboratoires susceptibles de mener à bien les analyses de contrôle.

Dans le code mondial antidopage, l'AMA définit le dopage comme il suit : « La violation d'une ou plusieurs règles antidopage énoncée aux articles 2.1 à 2.10 du *Code* »<sup>2</sup> Les articles sont :

1. Présence d'une substance interdite, de ses métabolites ou de ses marqueurs dans un échantillon fourni par un sportif
2. Usage ou tentative d'usage par un sportif d'une substance interdite ou d'une méthode interdite
3. Se soustraire au prélèvement d'un échantillon, refuser le prélèvement d'un échantillon ou ne pas se soumettre au prélèvement d'un échantillon
4. Manquements aux obligations en matière de localisation
5. Falsification ou tentative de falsification de tout élément du contrôle du dopage
6. Possession d'une substance ou méthode interdite
7. Trafic ou tentative de trafic d'une substance ou méthode interdite
8. Administration ou tentative d'administration à un sportif en compétition d'une substance interdite ou d'une méthode interdite, ou administration ou tentative d'administration à un sportif hors compétition d'une substance interdite ou d'une méthode interdite dans le cadre de contrôles hors compétition
9. Complicité pour l'une des actions précédentes

10. Association, à titre professionnel ou sportif, entre un sportif ou une autre personne soumise à l'autorité d'une organisation antidopage et un membre du personnel d'encadrement du sportif

En France, c'est le département des analyses de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD) qui est en charge d'analyser les échantillons de la grande majorité des compétitions se déroulant sur le sol français. En cas d'événement majeur (coupe du monde, jeux olympiques, etc.), un effort concerté entre tous les laboratoires accrédités par l'AMA, quelle que soit leur localisation, est mis en place.

## **1.2. L'Agence Française de Lutte contre le Dopage**

L'AFLD est une autorité publique indépendante créée par la loi du 5 avril 2006 relative à la lutte antidopage et à la protection de la santé des sportifs. Son budget provient principalement de l'enveloppe accordée par le ministère chargé des sports et du produit des prestations d'analyses ou de prélèvements réalisées pour des fédérations internationales. Divisé en plusieurs départements, le laboratoire d'analyses de l'AFLD où les expériences de ce doctorat ont été conduites est situé à Châtenay-Malabry dans les Hauts-de-Seine (92). Plusieurs activités s'y déroulent :

- Les analyses en routine, qui consistent en la recherche de substances interdites dans les échantillons reçus. Les prélèvements obtenus des sportifs sont purifiés par des méthodes de préparation et analysés par diverses techniques en fonction des composés à identifier (analyses chimiques, biologiques). Un suivi très strict des échantillons depuis la réception jusqu'au rapport d'analyse final est mis en place de façon à assurer la traçabilité des opérations effectuées.
- Recherche et développement : une partie des effectifs du laboratoire est affectée à la mise au point de nouvelles méthodes analytiques pour la détection de composés dopants qui viennent d'être découverts ou à l'amélioration de procédures qui ne produisent pas des résultats suffisants pour la validation par l'AMA. Comme pour les analyses, un contrôle qualité régule toutes les étapes de ces développements.

L'AFLD est chargée de définir la stratégie des contrôles et de leur mise en œuvre opérationnelle, en ce qui concerne les compétitions et les entraînements se déroulant en France, à l'exception des compétitions internationales relevant des fédérations internationales. Elle est également compétente pour les contrôles antidopage animaux réalisés lors de

compétitions équestres, canines, et autres (bien que d'autres laboratoires existent spécifiquement pour les chevaux par exemple). Elle peut organiser des contrôles lors de compétitions internationales en coordination avec les fédérations internationales compétentes ou l'AMA. Elle devient alors prestataire des organismes qui demandent ces contrôles.

### **1.3. Les substances interdites**

Chaque année, l'AMA publie un document officiel comprenant la liste détaillée de chaque molécule considérée comme substance interdite en compétition.<sup>3</sup> Plusieurs familles de composés agissant avec des effets différents sur l'organisme font partie de ce document (Tableau 1).

**Tableau 1.** Les substances interdites en 2015<sup>3</sup> et leurs effets sur l'organisme.

<b>Famille</b>	<b>Sous-catégorie</b>	<b>Effet</b>	<b>Exemple</b>
<i>Agents anabolisants</i>	Stéroïdes anabolisants androgènes	Stimule l'anabolisme, accroissent la masse musculaire	1-testostérone
	Autres agents anabolisants		modulateurs sélectifs des récepteurs aux androgènes
<i>Hormones peptidiques, facteurs de croissance</i>	Agonistes du récepteur de l'érythropoïétine	Stimulation de la production de globules rouges	érythropoïétines (EPO)
	Stabilisateurs de facteurs inductibles par l'hypoxie	Stimulation de la construction protéique : performances améliorées et meilleure récupération	cobalt
	Gonadotrophine chorionique		busérelène
	Corticotrophines		corticoréline
	Hormone de croissance		tésamoréline
<i>Bêta-2-agonistes</i>	Tous, y compris les isomères optiques	Amélioration de la fonction respiratoire, augmentation de la masse musculaire, brûleur de graisses	salbutamol
<i>Modulateurs hormonaux et métaboliques</i>	Inhibiteurs d'aromatase	Empêche la transformation d'hormones (ex : testostérone) en œstrogène	testolactone
	Modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes		tamoxifène
	Autres substances anti-œstrogéniques		clomifène
	Agents modificateurs de(s) la fonction(s) de la myostatine	Empêche l'expression de la myostatine, qui régule la croissance des muscles	inhibiteurs de la myostatine
	Modulateurs métaboliques	Agit sur la gestion énergétique pour améliorer l'endurance	GW 1516
<i>Diurétiques et agents masquants</i>	Tous	Permet d'altérer ou de dissimuler des substances prohibées dans l'urine	desmopressine, métolazone
<i>Stimulants</i>	Stimulants non spécifiés	Élimination ou diminution des sensations de fatigue	benzylpipérazine
	Stimulants spécifiés		isométhéptène
<i>Narcotiques</i>	Tous	Effet similaire aux stimulants ou cannabinoïdes	morphine
<i>Cannabinoïdes</i>	Tous	Sécrétion de dopamine, euphorie, relaxation	cannabis
<i>Glucocorticoïdes</i>	Tous	Empêche le processus inflammatoire	cortisol
<i>Alcool</i>		Dépresseur du système nerveux, relaxant	éthanol
<i>Bêta-bloquants</i>		Diminue l'anxiété et stabilise les performances motrices	propranolol

Le document de l'AMA comprend également une partie sur les « méthodes interdites », qui constituent l'ensemble des moyens de dopage sans absorption directe d'un composé en particulier. Elles comportent :

- La manipulation de sang ou de composés sanguins (ex : transfusion)
- La manipulation chimique ou physique (ex : substitution d'urine)
- Le dopage génétique (ex : utilisation de cellules normales ou génétiquement modifiées)

On commence ainsi à percevoir toute la difficulté du contrôle antidopage : la diversité chimique et biologique des molécules à dépister oblige à mettre en place des procédures analytiques spécifiques, basées sur des méthodes radicalement différentes. Dans le cadre de ce travail de recherche, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'analyse des stéroïdes anabolisants androgènes (SAA), notamment très présents dans les sports nécessitant une masse musculaire importante (haltérophilie par exemple).<sup>4</sup> En 2013, sur 8553 échantillons prélevés sur des haltérophiles, 3,4% ont été contrôlés positif au dopage, notamment avec des SAA.<sup>5</sup> Les autres scores importants se trouvent en lutte (2,3% sur 4331 prélèvements) et en équitation (2,3% sur 556 tests). Toutes les disciplines olympiques sont représentées quant aux résultats positifs obtenus lors des contrôles antidopage. Il a également été estimé que 3 millions de personnes aux USA utilisent illégalement des stéroïdes.<sup>6</sup> La généralisation de l'abus de substances dopantes est préoccupante et appelle à des mesures de développement analytique afin d'assurer la robustesse des tests.

## **2. Les stéroïdes**

### **2.1. Structures**

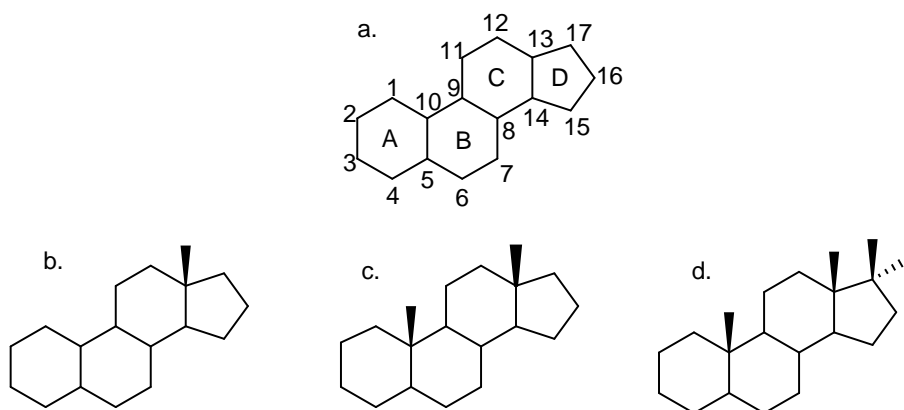
Les stéroïdes sont des substances naturellement produites par l'organisme. Ces hormones endogènes (i.e. produite par le corps) jouent des rôles essentiels dans plusieurs voies physiologiques comme la croissance des os et des muscles,<sup>7,8,9</sup> ou la production de protéines.<sup>10</sup> La dérégulation de la synthèse ou de la métabolisation des hormones stéroïdiennes peut conduire à des problèmes importants de santé, tel qu'une différenciation sexuelle anormale.<sup>11,12</sup> La masse totale journalière de testostérone synthétisée par un homme se situe entre 2,1 et 11 mg. Les niveaux plasmatiques se trouvent entre 3 et 10 ng/mL.<sup>13</sup> Les



stéroïdes peuvent être catégorisés en 5 familles de fonction : androgène, œstrogène, progœstogène, anabolique, et catabolique. Les deux familles de fonction d'intérêt pour le contrôle antidopage sont les androgènes et les anaboliques. Les androgènes induisent des effets masculinisant sur le corps (croissance des muscles, développement de la pilosité et de la gravité de la voix), les anaboliques favorisent quant à eux la croissance. La testostérone est par exemple un stéroïde androgène anabolisant : elle combine les effets de ces deux familles.

Les stéroïdes font partie de la famille des lipides et représentent une des 8 sous-classes mises en place selon les définitions de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) avec les acides gras, sphingolipides, glycolipides, etc.<sup>14</sup> Tous les stéroïdes partagent une structure similaire composée d'un squelette carboné de base appelé noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène (Schéma 1a). Il comprend 3 cycles de type cyclohexane accolés (A, B, C) comme dans le phénanthrène (hydrocarbure aromatique polycyclique composé de trois anneaux de benzène), généralement de manière *trans* et un cyclopentane (D). Ce squelette carboné rend les stéroïdes « neutres », c'est-à-dire qu'ils ne sont ni acides ni basiques (cela peut cependant être modifié par la présence de groupes fonctionnels sur la molécule). Une sous-classification en plusieurs catégories a été mise en place en fonction des groupes carbonés présents sur la structure de base (Schéma 1b,c,d) et inclut :

- Le tétracycle oestrane : ajout en sur le C13 d'un 18<sup>ème</sup> carbone
- Le tétracycle androstane : ajout en C10 d'un 19<sup>ème</sup> carbone
- Le tétracycle prégane : ajout sur C17 d'un 20<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> carbone



**Schéma 1.** (a) Structure carbonée commune aux stéroïdes et nomenclature des carbones, (b) cycle oestrane, (c) cycle androstane, (d) cycle prégane.

La numérotation des carbones sur la structure a été réglementée en 1972 par l'IUPAC.<sup>15</sup> Les noms systématiques des stéroïdes peuvent rapidement devenir très longs, ainsi, il est plus commun de se référer aux noms usuels. Par exemple, on utilisera « testostérone » pour évoquer la 17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one.<sup>16</sup> L'addition de groupements fonctionnels supplémentaires (souvent hydroxyle et cétone) et des différences de saturation sur les cycles permettent une large variété structurale pour les composés de cette famille.

## 2.2. Propriétés physico-chimiques et détermination de l'acidité en phase gazeuse

Bien que l'ensemble des stéroïdes possèdent un squelette carboné commun, des variations importantes de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, acidité/basicité, etc.) peuvent être observées. Ces changements sont notamment dus à la présence de groupes fonctionnels sur la molécule. Dans le cas des stéroïdes les groupes de type hydroxyle, cétone, ou alkyle sont les plus fréquemment présents, bien que la diversité des groupements chimiques pouvant se trouver sur ces composés soit très importante.

Un exemple concret de la modification des propriétés des stéroïdes par les groupes fonctionnels est la métabolisation (cf: §2.3.). Les stéroïdes sont des substances majoritairement hydrophobes et ne peuvent pas être éliminées par l'urine (milieu aqueux) dans leur forme libre (i.e. sans modification). La modification chimique de la structure des stéroïdes en combinaison avec leur conjugaison à des groupes fonctionnels hydrophiles permet d'augmenter l'affinité de ces molécules pour les phases aqueuses et facilitent leur élimination par l'urine. Ces conjugaisons peuvent également influencer sur la polarité du stéroïde et donc améliorer leur solubilité dans l'eau.

Dans le cadre de ces travaux, la propriété jouant le rôle le plus prépondérant est l'acidité/basicité en solution (pour l'ionisation en électrospray) et en phase gazeuse des composés étudiés. En effet, en spectrométrie de masse les analytes sont analysés sous forme gazeuse. La nature et la force des interactions inter- et intra-molécules ne sont pas les mêmes qu'en phase aqueuse du fait de l'absence de solvation.<sup>17</sup> L'acidité en phase gazeuse (GA) d'un composé correspond à  $\Delta G_r^0$  (variation de l'énergie de Gibbs) pour la réaction en phase gaz :  $A-H \rightarrow A^- + H^+$  et peut s'exprimer en kJ/mol. Ainsi, plus un groupement fonctionnel du stéroïde a une GA élevée, plus la réaction de déprotonation est défavorable, donc moins le proton porté par ledit groupement est acide. Afin d'évaluer ces valeurs, deux méthodes

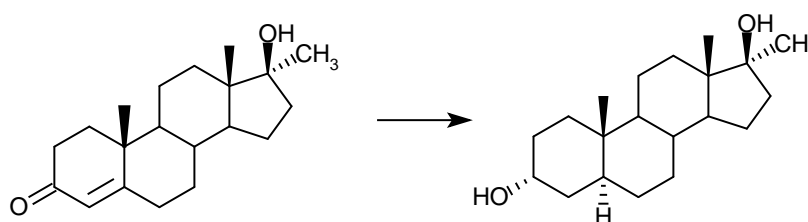
peuvent être employées : la première est expérimentale<sup>18</sup> et s'appuie sur la spectrométrie de masse pour déterminer les constantes d'équilibre des réactions de déprotonation, qui permettent ensuite de déduire les GA associées.<sup>19</sup> On aboutit alors à des échelles relatives de GA.<sup>20,21,22,23</sup> Cependant ces expériences sont difficiles à mettre en place et demandent une instrumentation spécifique et performante (cellule de résonance cyclotronique ionique en général). Les GA peuvent aussi être évaluées par la chimie théorique avec des calculs de structure électronique par des méthodes *ab initio* (résolution de l'équation de Schrödinger pour chaque électron) ou DFT (on considère la densité électronique dans son ensemble, les calculs sont beaucoup plus rapides).<sup>24</sup> Dans le cadre de cette étude des calculs utilisant la fonctionnelle de densité B3LYP ont été effectués avec le logiciel GAUSSIAN. Dans un premier temps on effectue une optimisation de géométrie qui permet d'obtenir la structure la plus stable du composé étudié, puis un calcul plus précis est effectué pour obtenir l'énergie de la configuration trouvée. Pour cela, on utilise différents types de « bases »<sup>25,26</sup> (en chimie quantique, cela représente un ensemble de fonctions qui permettent de modéliser les orbitales atomiques) qui permettent de décrire électroniquement chaque atome. Le calcul est effectué pour AH et A<sup>-</sup> (pour H<sup>+</sup> on utilise des valeurs expérimentales connues) et permet de déduire la GA de AH.<sup>27</sup> Pour estimer la précision des résultats, des GA connues expérimentalement sont calculés pour un ensemble de composés avec des fonctions chimiques proches de celles des stéroïdes. Les résultats théoriques sont comparés aux résultats expérimentaux et permettent de déduire un facteur de calibration qui est appliqué aux GA calculées des stéroïdes. Les développements du logiciel et des bases utilisées permettent de nos jours d'obtenir des résultats théoriques fiables et en accord avec les valeurs trouvées par l'expérience.<sup>28,29,30</sup> Cette méthode de calcul a donc été utilisée pour l'évaluation des acidités en phase gazeuse de différents stéroïdes. Ces informations permettent d'évaluer les protons labiles de la molécule qui sont les plus à même de conduire à la déprotonation du stéroïde en présence d'une base ou d'un anion. En conséquence, on peut utiliser la théorie pour prédire sur quel site du composé on peut obtenir un départ de proton ou l'attachement anionique.

### **2.3. Métabolisation et élimination**

Toute substance ingérée par l'organisme doit passer par des voies métaboliques avant d'être éliminée dans l'urine. Malgré des inconvénients bien connus (falsification, facteur de dilution ou stabilité) l'urine constitue une matrice adaptée pour le contrôle antidopage car le prélèvement est non-invasif (aucune effraction de la peau, au contraire du sang par exemple),<sup>31</sup> les volumes obtenus sont importants et les analytes sont en phase aqueuse. Ces

transformations visent à rendre la molécule plus polaire, permettant en général de la désactiver et de faciliter son élimination. Les stéroïdes ne font pas exception à la règle et il est important de tenir compte du fait qu'ils seront trouvés dans l'urine sous leur forme métabolisée, rarement libre. De plus, la détection du composé parent ne peut se faire que sur une courte période après l'administration, alors que les métabolites permettent des analyses plus éloignées dans le temps.<sup>32</sup> La métabolisation d'un composé est divisée en deux phases appelées Phase I et Phase II.

Pour les stéroïdes androgènes anabolisants, la Phase I est constituée des réactions catalysées par des enzymes, principalement des oxydations et réductions sur plusieurs positions des cycles qui forment le stéroïde. Les réactions d'oxydation sont catalysées par les cytochromes P450.<sup>33</sup> Les réactions principales sont : réduction de doubles liaisons aboutissant à des structures saturées en  $5\alpha$  et  $5\beta$ , réduction des cétones en position 3 ou 17, 1-2-hydrogénation, 6-, 12- ou 16-hydroxylation, 6-7-déhydrogénation et oxydation du 17-hydroxy.<sup>34</sup> L'exemple ci-dessous (Schéma 2) illustre le processus de Phase I de la méthyltestostérone. Le groupe cétone en position 3 est réduit ainsi que la double liaison, conduisant à la protonation de la position 5.



**Schéma 2.** Phase I de métabolisation de la méthyltestostérone.

Les réactions de la Phase II du métabolisme sont des conjugaisons des stéroïdes (ou de leurs métabolites de Phase I) avec des molécules polaires, principalement l'acide glucuronique ou un sulfate. Ces réactions sont contrôlées enzymatiquement, respectivement par les uridine diphosphoglucuronosyl-transférases et les enzymes sulfotransférase. Des voies alternatives mineures comme la conjugaison par une cystéine ou la N-acétylcystéine,<sup>35,36</sup> et la formation de composés bi-conjugués ont également été observées.<sup>37</sup>

Ces modifications structurales doivent ainsi être prises en compte lors du développement d'une méthode analytique pour l'analyse des stéroïdes utilisés en dopage. En effet, le composé ingéré subit plusieurs modifications avant d'être éliminé de l'organisme. La

préparation d'échantillons et les méthodes d'analyse doivent donc comprendre des étapes qui permettent de pallier ces changements. La connaissance des mécanismes de métabolisation de Phase I permet l'analyse directe de ces composés métabolisés, d'autant que les modifications structurales sont mineures. Cependant, la conjugaison à un groupement glucuronide pose plus de problèmes analytiques, notamment par des changements de structure, de masse et surtout de polarité importants de l'analyte. De ce fait, l'utilisation de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase qui permet de couper les groupes glucuronides présents sur les molécules de l'échantillon est une étape courante en préparation d'échantillon.

#### **2.4. Enjeux du contrôle des stéroïdes anabolisants androgènes (SAA)**

Comme expliqué précédemment, les stéroïdes peuvent être utilisés comme substances dopantes de par leur capacité à accroître considérablement la masse musculaire et les performances physiques. L'utilisation de ces composés par les athlètes de haut niveau est souvent évoquée mais les sportifs pratiquant la musculation à titre de loisir constituent en fait la majorité des consommateurs. Les stéroïdes s'accordent avec le but généralement purement esthétique de cette démarche, en faisant gonfler les muscles tout en évitant une augmentation de la masse grasseuse. L'utilisation démocratisée de ces composés pose de ce fait un problème de santé publique. Bien que produits de manière endogène, la consommation en quantité anormale de ces composés (le plus souvent synthétisés en laboratoire) peut provoquer des problèmes à plusieurs niveaux. Le problème majeur de l'abus de SAA repose sur la santé des sportifs qui les consomment. Les dégâts infligés par ces substances peuvent être physiques, psychologiques, ou les deux.

La consommation de stéroïdes peut influencer sur beaucoup de mécanismes biologiques pouvant provoquer des effets plus ou moins graves, à court, moyen et long terme. Il a été prouvé à de nombreuses reprises que l'abus de stéroïdes est lié à des complications cardiovasculaires,<sup>38</sup> comme la cardiomyopathie,<sup>39,40,41</sup> l'infarctus du myocarde (nécrose d'une partie du muscle cardiaque secondaire à la suite d'un manque d'oxygénation),<sup>42,43,44,45,46</sup> des accidents cérébro-vasculaires,<sup>47,48</sup> des problèmes de conduction électrique dans le cœur,<sup>49,50,51</sup> et des défauts de coagulation.<sup>52,53,54,55</sup> Ces changements peuvent causer des dégâts irréparables voire fatals. De manière générale, le taux de mortalité pour les utilisateurs de stéroïdes est estimé 4,6 fois plus élevé que pour une personne n'en consommant pas.<sup>56</sup>

Les stéroïdes ont également un effet neurotoxique. En effet, des études ont montré que la consommation de ces substances provoquait des effets apoptotiques (mort cellulaire) dans

une grande variété de type de cellules,<sup>57,58,59,60</sup> y compris les cellules neuronales humaines.<sup>61</sup> Une expérience pilote réalisée sur deux groupes (un d'utilisateurs de stéroïdes, l'autre d'haltérophiles sains) a permis de constater des déficits spatiaux-visuels dans le groupe consommateur.<sup>62</sup>

Les dégâts des stéroïdes ne se limitent pas à des conséquences physiques, ils exercent également une influence négative sur la psychologie des consommateurs. De nombreuses études ont corrélé des désordres psychiques avec l'utilisation de stéroïdes anabolisants, dont des troubles de l'humeur importants.<sup>63,64,65,66</sup> De manière générale, ces expériences ont montré que certains utilisateurs montraient des signes d'hypomanie et de manie, caractérisés par l'irritabilité, l'agressivité, une confiance en soi démesurée, l'hyperactivité, un comportement dangereux, et parfois des symptômes psychotiques.

Ces effets sont particulièrement remarquables pour des doses ingérées importantes de stéroïdes, à partir de 1000 mg de testostérone par semaine ou plus.<sup>67</sup> Il est important de noter pour que pour un dosage inférieur, il existe une grande variation de la sensibilité des individus à la prise d'anabolisants,<sup>68,69</sup> ainsi qu'à leur sevrage,<sup>70,71</sup> rendant peu probable une corrélation claire entre les troubles psychiques et la prise de ces substances dopantes. Parmi les effets qui viennent d'être présentés, l'un d'entre eux est particulièrement associé à la prise de stéroïdes : l'agressivité. Plusieurs résultats montrent que des sujets sans précédent de comportement violent ont commis (ou tenté de commettre) des meurtres sous l'influence des anabolisants.<sup>72,73,74,75</sup> Il a également été mis en évidence la présence de comportements agressifs inhabituels pour les consommateurs de stéroïdes.<sup>65,76,77,78</sup>

### **3. Méthodes de détection des stéroïdes et performances**

En contrôle antidopage, l'analyse en routine des stéroïdes repose principalement sur des méthodes de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ou à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS).<sup>79,80,81</sup> Les échantillons subissent une première analyse via des méthodes permettant de détecter de nombreux composés. Cette procédure d'analyse initiale est appelée « screening ». Les méthodes utilisées sont rapides et sensibles mais peuvent manquer de spécificité. Lors d'une suspicion de présence de composé interdit, l'échantillon subit une analyse de « confirmation » qui est généralement effectuée par GC-MS/MS ou en chromatographie liquide couplée à la MS en tandem (LC-MS/MS).<sup>82,83</sup> Les

techniques utilisées visent spécifiquement le composé sur lequel il y a un doute et sont de fait beaucoup plus précises. De plus, un seul composé est visé plutôt que des familles entières permettant d'obtenir des résultats sans ambiguïté. Les règles officielles déterminées par l'AMA fixent la limite minimale de performance requise pour les laboratoires d'antidopage (Minimum Required Performance Limit, MRPL) à 5 ng/mL. La LOD pour les stéroïdes ne doit pas dépasser la moitié de la MRPL, soit 2,5 ng/mL.<sup>84</sup> Il est à noter que la détection d'un stéroïde exogène (i.e. substance étrangère à l'organisme) à des concentrations inférieures à la LOD constitue tout de même une suspicion de dopage. Les stéroïdes endogènes (naturellement produits par le corps humain et présents dans l'urine) demandent des procédures analytiques spécifiques telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ratio isotopique et ne seront pas abordés dans ces travaux.

### **3.1. GC-MS et GC-MS/MS**

#### **3.1.1. Principe**

En GC, les échantillons sont volatilisés et sont poussés par un gaz vecteur (inerte ou non réactif comme l'hélium ou l'azote, mais le dihydrogène peut également être utilisé) au sein d'une colonne chauffée contenant une phase solide permettant la séparation des analytes en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les molécules sortant de la colonne sont ensuite directement introduites dans un spectromètre de masse qui apporte des informations sur leur rapport masse-sur-charge. Les composés peuvent éventuellement être fragmentés en MS/MS pour obtenir des fragments qui fournissent des informations structurales. La GC-MS(/MS) est très largement utilisée de par la sensibilité de la technique, la rapidité d'analyse, et la reproductibilité des résultats.

#### **3.1.2. Difficultés liées aux analyses en GC-MS(/MS)**

Un des inconvénients majeurs de ce système est la préparation d'échantillon. En effet la GC requiert des composés dont les propriétés physico-chimiques permettent une analyse fiable : ils doivent ainsi être volatils (l'analyse est effectuée en phase gazeuse) et thermiquement stables (pour ne pas se décomposer lors de la volatilisation et dans la colonne chauffée). Peu de molécules sont donc naturellement adaptées à l'analyse par GC et il est nécessaire de trouver des solutions pour rendre un grand nombre de composés compatibles avec cette technique.

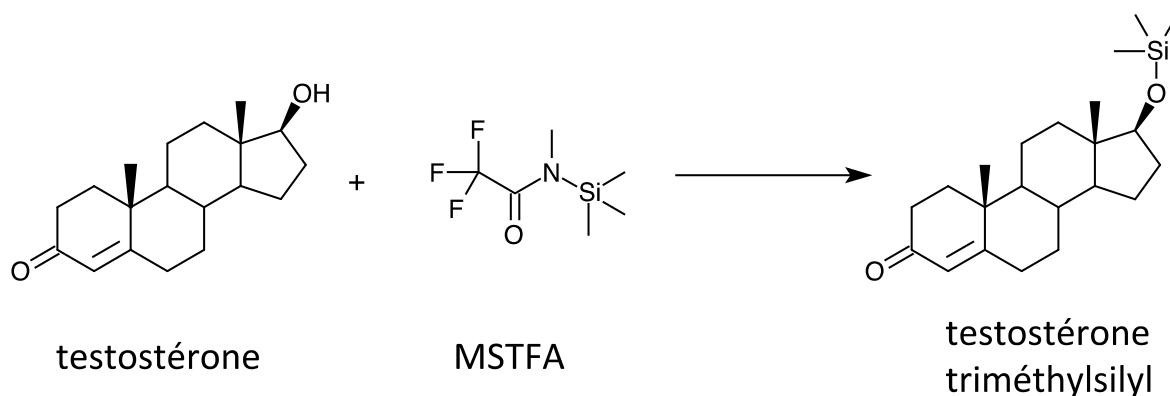
Une autre limitation de la GC apparaît lors de son couplage avec la spectrométrie de masse : les analytes éluent de la colonne sous forme gazeuse, et il faut donc utiliser une source d'ionisation (cf : Chapitre « Méthodologie » §3.2.) qui permet l'analyse de composés dans cette phase. Les choix sont de ce fait très limités, il existe actuellement 2 sortes principales de sources d'ionisation qui sont compatibles avec un système de GC : l'ionisation électronique et l'ionisation chimique (qui ne seront pas discutées en détails ici). Bien que cet inconvénient n'ait pas d'influence sur la technique en elle-même, cela montre cependant un manque de flexibilité au niveau des possibilités analytiques qui sont offertes par la GC-MS.

### **3.1.3. Solutions proposées pour l'analyse des stéroïdes en GC-MS(/MS)**

#### *Fonctionnalisation*

De par leur structure chimique, la plupart des stéroïdes ne répondent pas à aux critères qui viennent d'être évoqués (volatilité, stabilité thermique). Bien que les groupements cétoniques ne présentent pas de difficulté en GC-MS(/MS), les fonctions hydroxyles nécessitent cependant une modification chimique avant l'analyse.<sup>85</sup> Comme les SAAs possèdent généralement des combinaisons de ces deux groupes fonctionnels, il est nécessaire que la fonctionnalisation soit sélective aux groupes hydroxyles.<sup>86</sup> Cela est généralement effectué en contrôlant les conditions réactionnelles : choix du dérivant, température, et temps de réaction.<sup>87</sup> Les réactifs utilisés classiquement sont le pentafluorobenzyle (PFBr), le N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA), le N-(tert-butyl)diméthylsilyl)-N-méthyltrifluoroacétamide (TBSMTFA), ou le N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA) qui conduisent à la formation de dérivés triméthylsilyl (TMS) et tert-butylsilyl (TBS) à partir du proton actif des groupes hydroxyles (Schéma 3). En procédure d'analyse initiale c'est le MSTFA qui est plus utilisé, alors que différents dérivants (adaptés en fonction des SAAs analysés) sont employés pour les analyses de confirmation. Leur utilisation est courante car ils ont une stabilité de 30 minutes et permettent une amélioration de la sensibilité.<sup>88,89,90,91</sup>





**Schéma 3.** Fonctionnalisation de la testostérone par le BSTFA conduisant à un stéroïde triméthylsilylé compatible avec une analyse GC-MS.

### *Analyses sans fonctionnalisation*

L'emploi de colonnes courtes en GC (3,5 m) a permis d'accélérer les temps d'analyse, mais surtout de ne pas avoir à fonctionnaliser les stéroïdes en amont de leur analyse. En effet la température de la colonne peut être baissée, leur séparation est plus rapide et ils sont donc moins susceptibles de se dégrader au sein de la colonne.<sup>92</sup> Des développements ultérieurs basés sur la réduction de la température d'éluion, l'augmentation du débit du gaz vecteur, et la diminution de l'épaisseur du capillaire ont également ouvert de nouvelles possibilités pour les composés thermo-labiles.<sup>93</sup>

### **3.1.3. Performances analytiques de la GC-MS(/MS) pour les stéroïdes**

La GC a traditionnellement été développée pour la chimie du pétrole et il faut attendre les années 60 pour que Sweeley et Horning publient la première expérience de GC sur des stéroïdes<sup>94</sup> puis quelques années plus tard le premier profil métabolique de stéroïdes en GC-MS.<sup>95</sup> Cette technique prend alors de l'ampleur pour analyses de routine en contrôle antidopage de par la rapidité et la capacité d'identification permise par la GC-MS, ainsi qu'une résolution chromatographique élevée.<sup>96</sup> Une large étude de validation de méthode pour la détection des stéroïdes en GC a été publiée<sup>97</sup> et comporte dans la liste des composés analysés des molécules également étudiées dans ces travaux de thèse. Les LOD obtenues pour ces molécules communes sont reportées à titre comparatif (Tableau 2).

**Tableau 2.** LOD obtenues en GC-MS par Jiménez *et al.*<sup>97</sup> pour les stéroïdes également étudiés dans ces travaux de thèse.

<b>Stéroïde</b>	<b>LOD (ng/mL)</b>
<i>Epitestostérone</i>	2
<i>Testostérone</i>	1
<i>Bolastérone-m</i>	10
<i>Fluoxymestérone-m</i>	10
<i>Méténolone-m</i>	10
<i>Méthyltestostérone-m</i>	5
<i>Oxymestérone</i>	10

Dans ces travaux de 2002, on peut noter que seuls 3 composés sont en dessous de la MRPL fixé par l'AMA (5 ng/mL) et 2 en dessous de la LOD correspondante (2,5 ng/mL). Il est cependant important de noter que sur les 40 stéroïdes endogènes et exogènes testés, aucun composé n'a une LOD plus élevée que 10 ng/mL ce qui met en évidence les très bonnes performances de la technique employée. La GC-MS/MS permet d'apporter une dimension supplémentaire grâce à la fragmentation des analytes : les ions produits obtenus donnent des informations structurales supplémentaires en comparaison de la GC-MS simple. De plus la présence de fragments spécifiques augmente la confiance dans l'identification lors des analyses. Une étude plus récente datée de 2015 basée sur la GC-MS/MS a atteint des limites de détection entre 0,02 et 0,06 ng/mL pour 4 stéroïdes endogènes (testostérone, prégnénolone, dehydroepiandrosterone, et dihydrotestostérone).<sup>98</sup> Cette méthode permet d'allier la sélectivité de la séparation en GC et la sensibilité d'une analyse par MS en tandem pour obtenir des LOD excellentes et une confiance élevée dans la capacité d'identification.<sup>99</sup> Enfin, la GC-MS/MS a permis de réduire les temps de séparation chromatographique en autorisant les co-élutions grâce aux paires d'ions précurseur-produit spécifiques à chaque composé analysé.

Les méthodes de GC-MS et GC-MS/MS offrent donc une puissance analytique intéressante de par la rapidité des analyses et les excellentes performances d'identification des stéroïdes

## 3.2. LC-MS/MS

### 3.2.1. Principe

Depuis plusieurs années la LC-MS/MS émerge comme une technique complémentaire à la GC-MS(/MS).<sup>100</sup> A la différence de la GC, l'échantillon est séparé en solution (il est entraîné par des solvants, appelés « phase mobile ») dans une colonne composée d'une phase stationnaire. Lors de son élution de la colonne, le composé est donc en phase liquide ce qui offre un plus large choix de source pour l'instrumentation de MS (cf: Partie « Méthodologie » pour plus de détails sur la LC).<sup>101</sup> Nous utiliserons dans cette partie le terme « LC » pour désigner la technique classique utilisée : l'HPLC (LC haute performance).

### 3.2.2. Difficultés liées aux analyses en LC-MS/MS

Le problème majeur avec l'utilisation de la LC-MS/MS est l'ionisation des composés pour leur analyse MS. En effet, la LC est très fréquemment couplée avec une source d'ionisation electrospray qui est un système versatile et communément utilisé. Cependant cette source ne fournit des charges qu'aux composés susceptibles de subir des réactions d'oxydo-réduction dans la source. Cela crée ainsi une disparité entre les composés, comme observé expérimentalement : certains ont une excellente efficacité d'ionisation alors que d'autres ne peuvent pas être détectés par cette technique (ou très mal). Comme expliqué précédemment, les SAA sont naturellement peu acides ou basiques et ne vont donc pas facilement s'ioniser par des réactions acido-basiques en solution. La présence d'un groupement fonctionnel acide ou basique, ou des caractéristiques structurales particulières (la stabilisation par résonance de la testostérone lui confère un caractère faiblement basique) permettent une meilleure détection en ESI, d'où les différences expérimentales observées. Les SAA « neutres » sont ceux qui posent le plus de problèmes en contrôle antidopage puisqu'il faut trouver des moyens alternatifs de fournir des charges à ces analytes afin pouvoir de les détecter aux concentrations fixées par l'AMA.

Traditionnellement, la LC montre des temps de séparation plus élevés qu'en GC. Malgré des longueurs de colonnes beaucoup plus basses (dizaine de centimètres en LC contre dizaines de mètres en GC), les molécules éluent plus lentement lorsqu'elles sont poussées par une phase mobile liquide. On peut néanmoins noter que l'absence d'étape de dérivation en LC permet de gagner un peu de temps sur la préparation d'échantillons.

Au contraire de la GC-MS/MS, la LC-MS/MS avec source électrospray est une technique moins reproductible du fait de l'influence de nombreux facteurs sur l'aspect des spectres obtenus. Par exemple, la fragmentation de composés ionisés en source électrospray (communément utilisée en LC-MS/MS) est beaucoup moins reproductible qu'avec une source d'ionisation électronique (fréquemment couplée à la GC), avec laquelle des bases de données de spectres de fragmentation sont disponibles. De ce fait la mise en place d'une standardisation des analyses est un processus compliqué et limite la rapidité d'interprétation des résultats.<sup>102</sup>

Enfin, une limitation très pragmatique est le coût des instruments : un système de LC est plus onéreux que son équivalent en GC, il est donc plus facile pour un laboratoire de s'équiper de ce dernier. Il est cependant à noter qu'une diminution importante des prix des appareils de LC a été observée ces dernières années et que les développements actuels gommeront bientôt la différence de coût entre ces deux systèmes de séparation.

### **3.2.3. Solutions proposées pour l'analyse des stéroïdes en LC-MS/MS**

#### *Diminution de la durée des analyses*

Le développement de la chromatographie en phase liquide ultra-haute performance (Ultra-high Performance Liquid Chromatography, UPLC) a permis de réduire les temps d'analyses en LC. Elle est basée sur une colonne plus petite, une granulométrie faible et des pressions plus élevées qu'en HPLC. Ainsi, il faut compter 1,25-7 minutes pour une analyse complète en UPLC contre 3-30 minutes pour l'HPLC tout en gardant des performances élevées.<sup>103,104</sup> L'utilisation de la LC permet également des analyses directes de composés biologiques, ce qui réduit la durée globale de l'analyse. Les développements dans l'automatisation du procédé analytique de LC-MS/MS (avec notamment une extraction « on-line ») ont aussi permis de réduire considérablement le temps nécessaire pour effectuer les analyses en contrôle antidopage.<sup>105</sup>

Un des principaux avantages de la LC est le peu de limitations qu'elle présente quant à la nature des molécules analysables. En effet, la LC ne nécessite pas de contrainte physico-chimique particulière pour la stabilité du composé, autre que celle qui est choisie pour la séparation (dans le cas des stéroïdes elle se base sur des interactions hydrophobes, cf : « Méthodologie » §2. pour plus de détails). Cela ouvre ainsi la possibilité d'augmenter l'éventail de molécules analysables en comparaison de la GC, comme les composés de masse

élevée, polaires, et/ou thermo-labiles.<sup>106</sup> Ainsi il n'est plus nécessaire de passer par une étape de dérivation avant les analyses rendant l'ensemble du processus analytique plus rapide et moins coûteux.

### *Amélioration de l'ionisation*

- Dérivation chargée

Pour les composés plus difficiles à analyser il est possible d'effectuer une étape de dérivation en LC dans le but d'améliorer l'ionisation et donc la sensibilité des analyses.<sup>83</sup> Par exemple, l'utilisation de dérivants de type ferrocène conduit à des cations moléculaires radicaux donnant un signal intense pour les stéroïdes étudiés en LC-MS/MS.<sup>107</sup> La fonctionnalisation peut enfin être utilisée pour apporter un groupement déjà chargé sur la molécule d'intérêt, lui permettant ainsi d'être analysée ; on parle de « dérivation chargée ».<sup>108</sup>

- Formation d'oximes

Une approche efficace pour l'amélioration de l'ionisation des stéroïdes en LC-ESI est la formation d'oximes (imine dont l'atome d'azote porte un groupement hydroxyle).<sup>109</sup> Cette réaction de fonctionnalisation est actuellement très utilisée car elle permet d'atteindre des limites de détections pour certains composés qui sont 20 fois inférieures à celles obtenues pour le stéroïde non-modifié.<sup>110</sup> La formation d'oximes de stéroïdes a également été reportée pour l'analyse d'esters de testostérone dans du plasma humain.<sup>111</sup> Enfin, un avantage majeur de cette préparation est qu'elle permet d'effectuer des analyses quantitatives comme pour la détermination d'hormones naturelles dans du sérum bovin.<sup>112</sup>

- Formation d'adduits

En spectrométrie de masse la présence de sels dans les échantillons est souvent indésirable car leur présence peut provoquer la formation d'adduits avec les molécules d'intérêt, décalant leur rapport masse-sur-nombre de charges par rapport à la valeur attendue et créant potentiellement des effets de suppression d'ion (donc une ionisation moins efficace). Cependant, l'ajout contrôlé de sels peut permettre d'ioniser des composés peu acides ou basiques par la formation de ces mêmes adduits.<sup>113</sup> Par exemple, le sodium peut remplacer un proton sur la molécule et aboutir à un excellent signal pour l'espèce  $[M+Na]^+$ . Ce principe a été démontré pour la détection de 34 stéroïdes exogènes en LC-MS/MS.<sup>114</sup> En mode positif, les espèces  $[M+NH_4]^+$  et  $[M+H+MeOH]^+$  ont été sélectionnées et ont permis d'atteindre des

limites de détection inférieures à 10 ng/mL, valeur qui n'a pas été atteinte sans ces adduits. En ESI négatif, l'adduit  $[M+CH_3COO]^-$  a permis l'ionisation des composés les plus difficiles. Cette technique a ensuite été appliquée à l'analyse de SSA en matrice urinaire pour des applications de médecine légale.<sup>115</sup> L'attachement anionique sur lequel se base les travaux de ce doctorat est une formation d'adduit en ESI négatif à partir d'anions soigneusement sélectionnés.

Ces techniques utilisées individuellement ou en combinaison les unes des autres permettent de surmonter les difficultés de certains SAA à s'ioniser en LC-MS, et d'obtenir des performances analytiques adaptées aux analyses en contrôle antidopage.

### **3.2.4. Performances analytiques de la LC-MS/MS pour les stéroïdes**

La combinaison d'un temps de rétention chromatographique, de transitions de fragmentations spécifiques pour un composé, et d'une sensibilité élevée offre une confiance importante dans les résultats obtenus.<sup>116</sup> L'application de cette méthode sur une série de 11 stéroïdes en matrice urinaire a été reportée<sup>117</sup> et les LODs obtenues sont de l'ordre de 0,2 ng/mL ce qui se situe largement en dessous des valeurs réglementées par l'AMA. Les solvants utilisés pour la phase mobile (méthanol et eau) sont les mêmes que ceux choisis dans ces travaux et malgré une instrumentation différente, ces valeurs de LOD constituent donc une bonne comparaison pour la performance de la méthode analytique présentée dans cette thèse. Des travaux similaires ont été effectués sur le cortisol, la cortisone et leurs dérivés.<sup>118</sup> Les résultats obtenus montrent des LODs entre 0,2 et 0,5 ng/mL ce qui est conforme avec les valeurs reportées précédemment. L'étude de la reproductibilité des analyses a abouti à des coefficients de variation inférieures à 2 % pour des échantillons de contrôle qualité. Ces travaux démontrent la robustesse et les performances élevées de la LC-MS/MS pour l'analyse des stéroïdes en contrôle antidopage. Cette méthode d'analyse est très efficace pour la détermination d'un grand nombre de composés simultanément, comme montré par une étude de 2011 sur 44 stéroïdes exogènes.<sup>119</sup> Les 29 stéroïdes parents ainsi que les 15 métabolites ont tous été analysés à des LODs comprises entre 0,1 et 10 ng/mL ce qui prouve une nouvelle fois la puissance analytique de la LC-MS/MS.

Il a été évoqué précédemment que la métabolisation des stéroïdes implique une étape d'hydrolyse enzymatique lors de la préparation d'échantillon afin de couper les groupements glucuronide possiblement liés aux analytes. La LC-MS/MS offre la possibilité d'une analyse directe de ces métabolites conjugués, comme démontré par A. Fabregat *et al.* en 2013.<sup>120</sup> La

détection de 13 stéroïdes glucuro-conjugués peut être effectuée jusqu'à 30 ng/mL ce qui se situe en dessous des LODs obtenues pour les mêmes composés analysés après hydrolyse enzymatique. La LC-MS/MS permet également d'obtenir des profils stéroïdiens en urine pour les composés sulfo-conjugués.<sup>121</sup> On voit ainsi que la préparation d'échantillon peut être une nouvelle fois écourtée en retirant l'étape donnant leur forme libre aux stéroïdes.

Enfin, au même titre que la GC, la LC-MS/MS est adaptée pour la quantification des stéroïdes.<sup>122</sup> Bien que l'antidopage se base principalement sur des considérations qualitatives, cette possibilité de quantification ouvre des perspectives intéressantes pour la compréhension des mécanismes biologiques associés aux stéroïdes.<sup>34</sup> La LC-MS/MS se présente donc comme une technique complète et performante qui offre des avantages inégalés pour le contrôle antidopage tout en restant une piste d'étude intéressante puisque son potentiel analytique est immense et qu'il reste beaucoup d'aspects à explorer pour son développement.

## **4. Présentation et objectifs du projet**

### **4.1. Limitations actuelles**

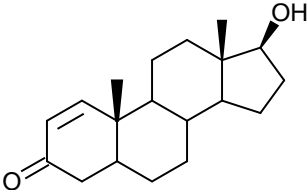
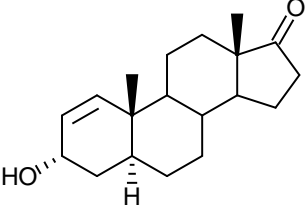
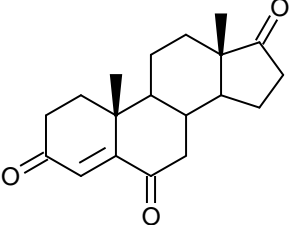
Les nombreuses méthodes de détection disponibles pour l'analyse des stéroïdes permettent d'identifier la majorité de ces composés, même lorsqu'ils sont présents à l'état de traces. En analyse antidopage, un échantillon d'urine passe toujours par une étape d'analyse initiale appelée « screening » : une procédure rapide et complète qui permet de cribler un très grand nombre de composés à la fois. Si il y a suspicion de dopage (c'est-à-dire si on obtient un signal au delà de la concentration autorisée pour un composé endogène, ou n'importe quel signal pour un composé exogène), alors l'échantillon en cause est analysé une seconde fois, c'est la confirmation. Pour cette procédure, on utilise une préparation d'échantillon et une méthode combinant chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse en tandem, spécifiquement optimisée pour l'analyse du composé. Ainsi, on obtient sans ambiguïté un résultat définitif qui confirme ou non la suspicion de dopage.

Si la grande majorité des stéroïdes se détecte bien en screening, il en est autrement pour la confirmation, qui nécessite plus d'informations analytiques et de robustesse. En effet, pour l'analyse en screening, un ou deux signaux caractéristiques par composé suffisent. En confirmation, un minimum de 3 (voire 4) fragments MS/MS est nécessaire pour que

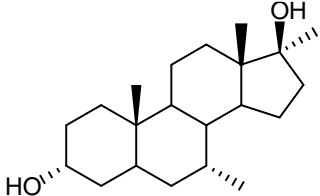
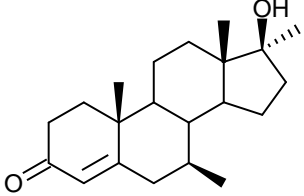
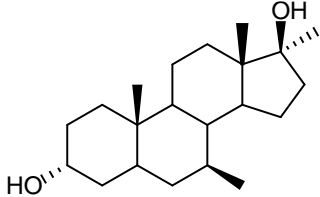
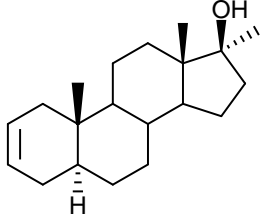
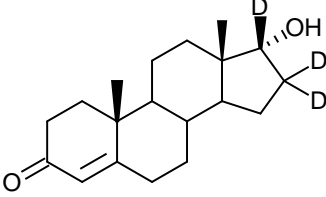
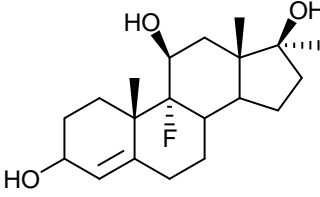
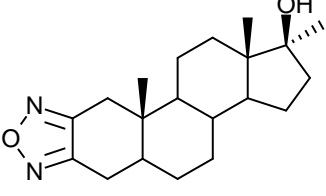
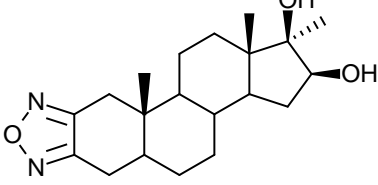
l'identification du stéroïde soit assurée. Du fait de ces contraintes qui se combinent avec des limites de détection très basses et une ionisation difficile des stéroïdes, le développement de méthodes de confirmation est une tâche souvent compliquée.

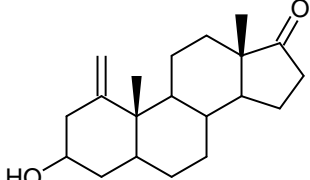
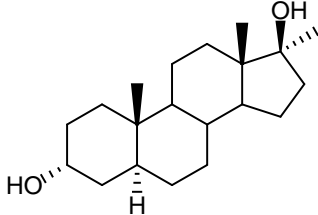
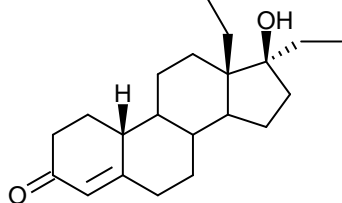
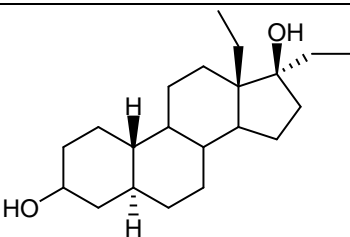
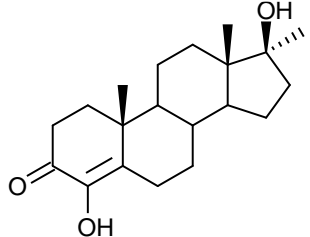
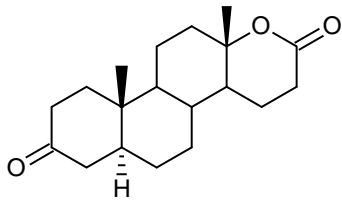
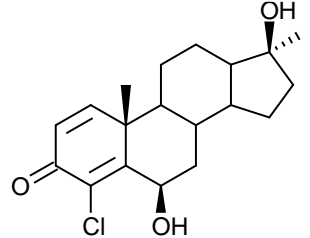
Certains SAA présentent des difficultés à s'ioniser en LC-MS/MS de par leurs propriétés physico-chimiques. Ces composés représentent un défi intéressant dans le développement de procédure permettant d'améliorer leur ionisation et leur détection pour le contrôle antidopage. Une liste de SAA comprenant certains de ces composés difficiles à analyser a été sélectionnée pour les travaux de cette thèse (Tableau 3). Les noms complets de ces stéroïdes ainsi que les informations sur leur provenance se trouvent en Annexe A page 144.

**Tableau 3.** Liste des stéroïdes étudiés lors des travaux de ce doctorat.

Nom	Code AFLD	Masse molaire (g/mol)	Structure
<i>1-testostérone</i>	H117	288,42	
<i>3αOH-androsténone</i>	H129	288,40	
<i>6-oxo-androstènedione</i>	HOR18	300,39	



<i>bolastérone-m</i>	H058	320,51	
<i>calustérone</i>	H068	316,48	
<i>calustérone-m</i>	H069	320,51	
<i>desoxytestostérone</i>	H146	288,47	
<i>epitestostérone-d<sub>3</sub></i>	SI	291,40	
<i>fluoxymestérone-m</i>	H035	354,44	
<i>furazabol</i>	H028	330,47	
<i>furazabol-m</i>	H062	346,47	

<i>méténolone-m</i>	H055	302,45	
<i>methyltestostérone-m</i>	H021	306,50	
<i>norbolétone</i>	H073	316,48	
<i>norbolétone-m</i>	H119	320,48	
<i>oxymestérone</i>	H027	318,45	
<i>testolactone-m2</i>	HOR20	304,42	
<i>turinabol-m</i>	H056	350,89	

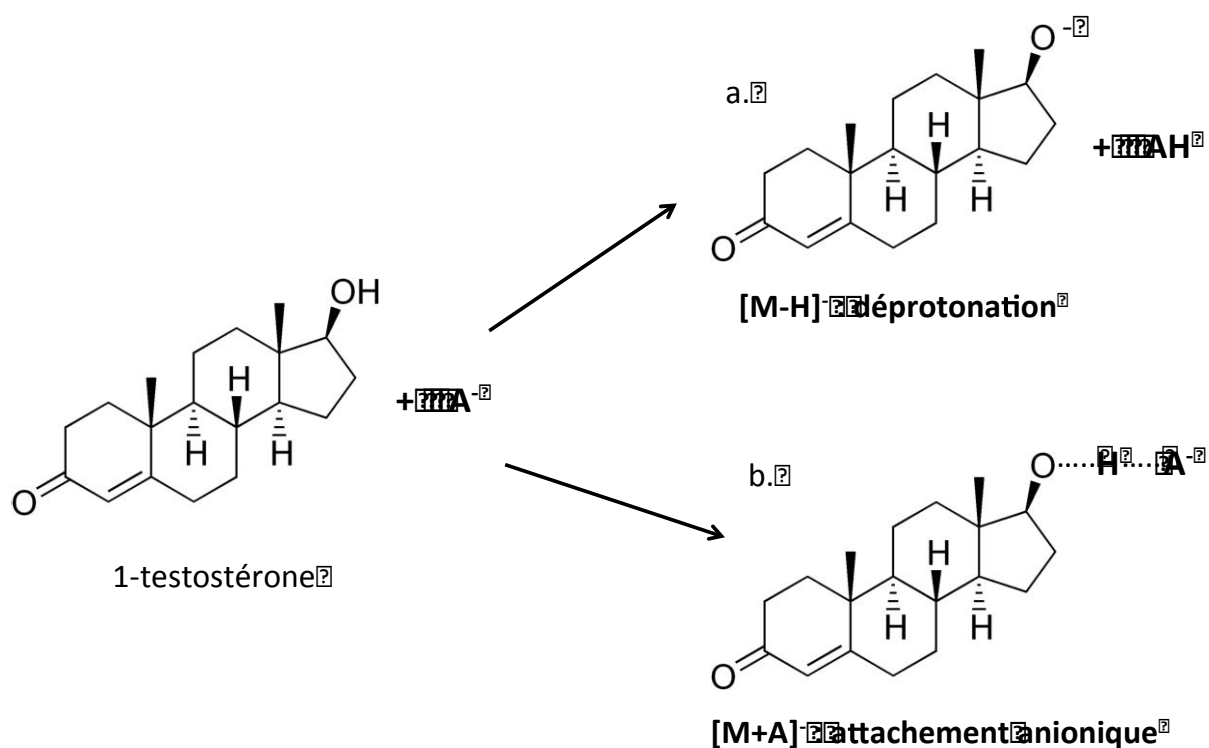
Il est à noter que la 6-oxo-androstènedione et la testolactone-m2 ne sont pas classifiés par l'AMA comme des SAA à proprement parler, mais leur structure est très proche de celle des stéroïdes anabolisants. De plus, la d<sub>3</sub>-épitestostérone est intégrée dans ce tableau car elle

est utilisée comme standard interne mais ne présente aucune difficulté de détection dans les conditions d'analyse de routine en antidopage. Enfin, la nomenclature 'SAA'-m (où 'SAA' est le nom du stéroïde) est utilisée dans un but de simplification de la notation et représente un seul des possiblement nombreux métabolites de Phase I du composé en question.

## 4.2. Attachement anionique

### 4.2.1. Principe

L'attachement anionique est un processus chimique qui correspond à l'interaction d'un anion avec une molécule neutre (par exemple un stéroïde). En fonction de certaines propriétés physico-chimiques des composés en interaction (acidité, nucléophilie, ...), deux voies de réactions sont possibles : (i) l'anion arrache un proton à la molécule neutre menant à l'ion  $[M-H]^-$  (Schéma 4a) ou (ii) un adduit anionique est formé de type  $[M+A]^-$  (Schéma 4b) où A représente l'anion utilisé et M la molécule neutre. On parle alors d'attachement anionique. Ce phénomène est d'essence intéressant pour la spectrométrie de masse, étant donné qu'il permet d'ioniser une molécule en lui procurant une charge négative, que cela soit par le retrait d'un proton ou la formation d'un adduit anionique.



**Schéma 4.** Principe de l'attachement anionique avec formation (a) d'une espèce déprotonée et/ou (b) d'un adduit.

Il a précédemment été évoqué que l'acidité des stéroïdes joue un rôle important dans cette étude. En effet c'est un paramètre important pour l'attachement anionique : c'est le différentiel des valeurs d'acidité des groupements fonctionnels portés par le stéroïde et de l'anion qui guide la formation de  $[M-H]^-$  et  $[M+F]^-$  et leurs abondances relatives. Ainsi, un stéroïde possédant un groupement fonctionnel plus acide que la forme protonée de l'anion (HA) choisi va céder facilement un proton et l'espèce déprotonée sera majoritairement obtenue. Au contraire, si les valeurs d'acidités sont proches, le proton est « partagé » entre le stéroïde et l'anion, et l'on forme alors principalement l'adduit anionique.

#### 4.2.2. Etat de l'art

Afin de surmonter les problèmes posés par la faible efficacité d'ionisation des stéroïdes, l'utilisation d'adduits anionique a été étudiée. En spectrométrie de masse positive l'introduction de cations tels que  $Na^+$  dans l'échantillon de stéroïde a conduit à la formation d'adduits comme  $[M+Na]^+$ ,  $[M+Na+MeOH]^+$ , ou  $[M+H+CH_3CN-H_2O]^+$ .<sup>113</sup> Une autre approche utilise l'argent comme cation pour l'adduit  $[M+Ag]^+$  a également été mise au point.<sup>123</sup> La formation de ces composés a permis une amélioration notable du signal obtenu lors des analyses. Pour le mode négatif il est normalement nécessaire que l'analyte possède un site moyennement ou fortement acide afin de céder un proton et de former l'espèce  $[M-H]^-$ , ce qui n'est pas le cas pour la plupart des stéroïdes. Il a précédemment été montré que l'acétate et le fluorure permettent la formation abondante des adduits  $[M+CH_3COO]^-$  et  $[M+F]^-$  lorsqu'ils sont mélangés dans un échantillon contenant un stéroïde.<sup>124</sup> Il est ainsi possible d'observer des molécules qui ne peuvent pas se déprotoner ou obtenir une charge négative d'elles mêmes. Une étude a mis en lumière que si la valeur de l'attraction du stéroïde pour un proton situé sur un site de sa structure et celle de l'anion s'attachant sur ce même site sont proches, l'adduit formé est alors plus stable et a une durée de vie plus longue.<sup>125</sup> Bien que cette méthode soit performante et offre des avantages uniques pour l'analyse des stéroïdes, il n'existe pas actuellement de protocole d'analyse l'utilisant en contrôle antidopage.

#### 4.3. Objectifs du projet

Le but de ce projet de recherche est de développer une méthode basée sur l'attachement anionique afin de fournir une procédure analytique permettant d'améliorer les limites de détection des composés ayant des structures basées sur le squelette stéroïdien et s'ionisant mal en LC. Il est donc nécessaire d'étudier l'influence de l'ajout d'anions sur la réponse du stéroïde en spectrométrie de masse, puis d'optimiser chaque étape de la méthode

d'analyse. Dans un premier temps, la préparation de l'échantillon a été étudiée afin de choisir la méthode la plus efficace : choix des techniques d'extraction, des solvant utilisés, du temps de préparation, etc. Puis c'est la technique d'analyse en elle-même qui est optimisée : paramètres instrumentaux en spectrométrie de masse, choix des solvants de phase mobile, mise au point du gradient LC, détermination des paramètres expérimentaux et de la méthode de suivi de réaction sélectionnée (Selected Reaction Monitoring, SRM). Cette thèse présente le travail effectué dans ce contexte afin d'aboutir à une méthode viable et robuste qui peut être intégrée dans les procédures utilisées par l'AFLD, et de fournir une alternative pour les stéroïdes répondant moins bien aux méthodes d'analyse classiques.

Un autre aspect de ce travail de recherche est d'étudier de manière plus fondamentale l'attachement anionique et les phénomènes qui entrent en jeu lorsqu'une molécule est mise en présence d'un anion. On s'intéressera particulièrement à la région du composé où l'anion va venir interagir, ainsi qu'à l'influence de cet anion sur les voies de décompositions du stéroïde.

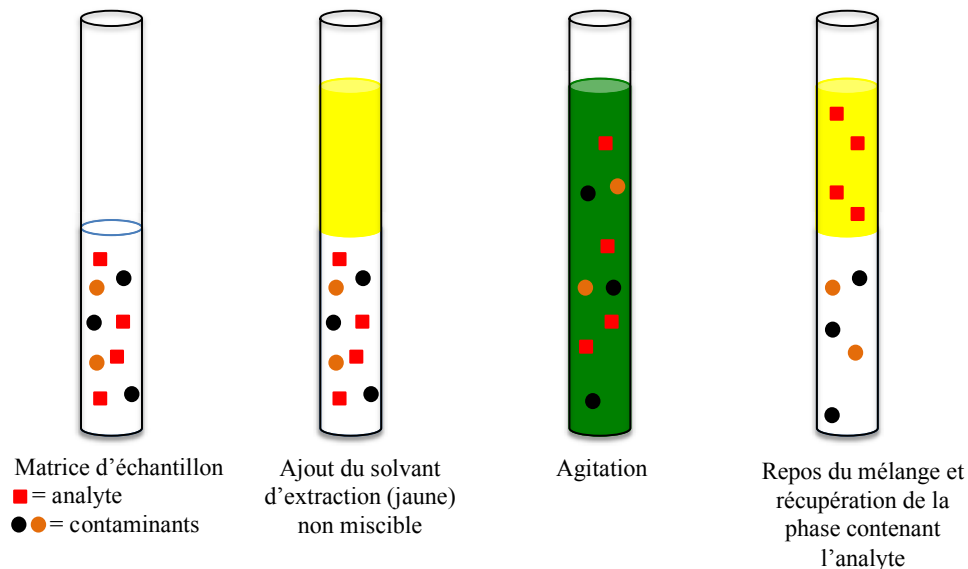
# Méthodologie

La détection des stéroïdes pour le contrôle antidopage nécessite une puissante capacité analytique ainsi qu'une méthode de préparation d'échantillons pouvant concentrer les analytes et purifier une matrice complexe contenant un grand nombre de contaminants. Pour ce travail, les échantillons sont préparés avec des techniques utilisant l'extraction liquide-liquide et/ou l'extraction sur phase solide. Pour l'analyse, un système utilisant la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse a été utilisé. La méthodologie utilisée lors de ce doctorat est présentée dans cette partie.

## **1. Préparation des échantillons**

### **1.1. Extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide (Liquid-Liquid Extraction, LLE) est une technique de séparation simple et commune qui permet de purifier un mélange complexe en extrayant sélectivement un analyte désiré.<sup>126</sup> Le principe est le suivant (Schéma 5) : un échantillon contenant le composé d'intérêt et des impuretés est agité en présence d'un solvant d'extraction qui n'est pas miscible avec la matrice de l'analyte. Une fois que le mélange échantillon/solvant a eu le temps de reposer après l'agitation, deux couches de liquides sont observables dont l'une contient la majeure partie de l'analyte d'intérêt. Une nouvelle agitation permet de s'assurer que toute la surface de l'échantillon entre en contact avec le solvant d'extraction. L'équilibre est déterminé par le coefficient de partage de l'analyte,<sup>127</sup> qui représente le rapport des concentrations du composé dans les deux liquides à l'équilibre. Il est possible de déterminer sa valeur par des calculs,<sup>128,129</sup> mais il est plus courant de l'estimer expérimentalement. Le solvant d'extraction est choisi de manière à ce que le coefficient de partition soit le plus élevé possible, c'est-à-dire que l'analyte possède une affinité largement supérieure pour le solvant que pour la matrice d'échantillon. Ainsi, le composé est transféré dans le solvant, laissant la majorité des impuretés et des contaminants dans la matrice. La dernière étape consiste en la séparation des deux liquides, et la conservation de celui contenant l'analyte pour la suite des expérimentations.



**Schéma 5.** Principe d'une extraction liquide-liquide.

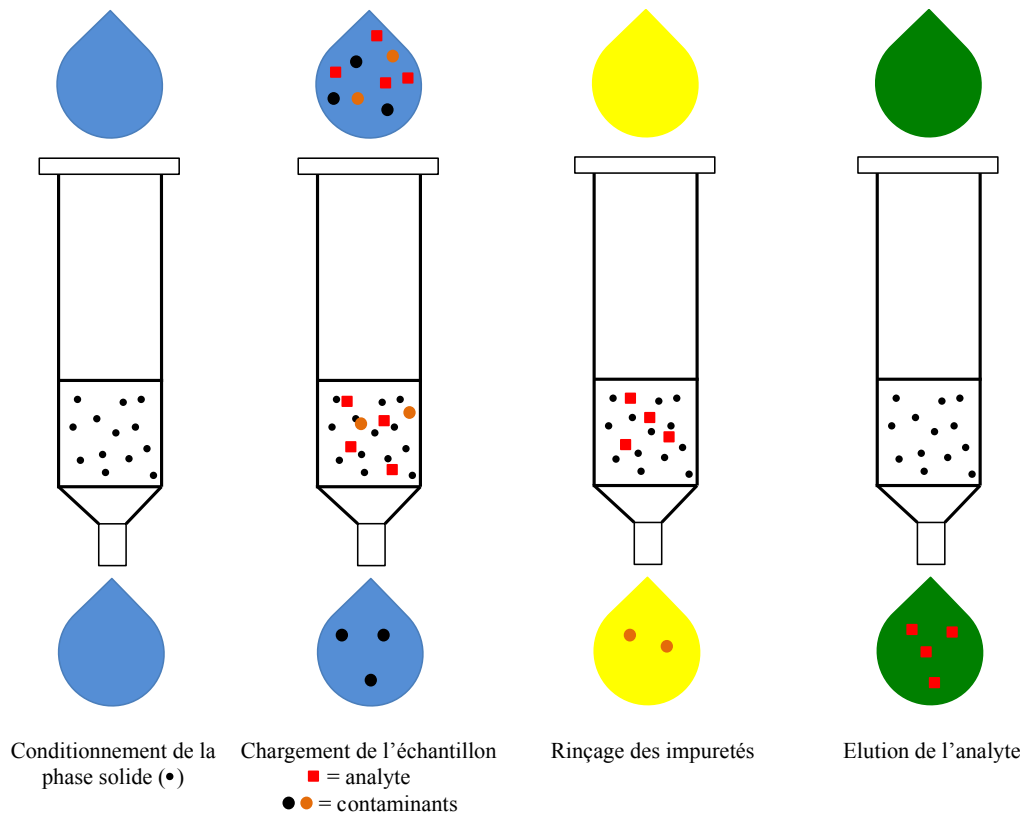
En contrôle antidopage, la LLE offre une technique de purification et de concentration de l'échantillon peu sélective mais rapide. Elle est souvent utilisée en complément d'autres techniques d'extraction afin de retirer quelques impuretés supplémentaires. Il est cependant important de bien choisir le solvant d'extraction car une faible ou moyenne affinité du stéroïde pour celui-ci peut provoquer des pertes importantes et un rendement d'extraction faible.

## 1.2. Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction, SPE)<sup>130</sup> se base sur les mêmes principes que la LLE, à l'exception que le solvant d'extraction est substitué par une phase solide et que l'état d'équilibre n'est jamais atteint.<sup>131,132</sup> Le procédé se déroule en plusieurs étapes séquentielles (Schéma 6) :

- le conditionnement de la cartouche contenant la phase solide,
- la rétention de l'échantillon,
- le rinçage permettant l'élimination des impuretés,
- l'élution de l'analyte étudié.





**Schéma 6.** Principe de l'extraction sur phase solide.

### *Conditionnement*

Le conditionnement consiste à passer un solvant à travers la phase solide contenue dans la cartouche de façon à remplir ce milieu poreux de liquide. Cette étape est nécessaire afin d'assurer l'homogénéité de l'environnement dans lequel l'échantillon est déposé. La présence de bulles d'air ou un mouillage incomplet peut aboutir à une rétention et une élution faussées lors de la procédure.

### *Dépôt de l'échantillon*

La matrice liquide contenant l'analyte d'intérêt ainsi que les contaminants indésirables est chargée dans la cartouche. L'analyte ainsi que la plupart des impuretés sont retenus dans la phase solide sur la surface ou par la pénétration de la couche externe des molécules de cette surface. Il se crée alors un équilibre de distribution (de la même manière que pour la LLE), caractérisé par un coefficient  $K_d$  qui indique quelle fraction de l'analyte est restée en solution, et quelle fraction a été adsorbée par ou a pénétré la phase solide. Par souci de praticité,  $K_d$  est couramment exprimé en fonction des concentrations selon la formule :

$$K_d = \frac{[analyte]_{phase\ solide}}{[analyte]_{\acute{e}chantillon}}$$

Ainsi, lorsque l'échantillon est en quasi-totalité retenu par la phase solide, le coefficient de partition est très élevé. La SPE en phase inverse implique une matrice d'échantillons polaire (généralement aqueuse) ou modérément polaire et une phase stationnaire apolaire (dans le cas de ces travaux, une phase C<sub>18</sub>). La rétention dans la cartouche des composés organiques en solution polaire est principalement due aux forces attractives entre les liaisons carbone-hydrogène de l'analyte et les groupes fonctionnels de la surface de la phase solide. Ces interactions apolaire-apolaire sont communément appelées forces de van der Waals, forces de dispersion, ou effet hydrophobe. Les composés polaires présents dans l'échantillon ne sont pas retenus lors du chargement de l'échantillon et éluent avec la matrice (composé noir dans le Schéma 6).

### *Lavage*

Pendant la phase de rétention, de nombreux composés présents dans la matrice complexe d'échantillons ont été retenus par la phase solide (composé orange Schéma 6) au même titre que l'analyte d'intérêt (composé rouge Schéma 6). Une élution effectuée directement après le passage de l'échantillon dans la cartouche pourrait alors conduire à la co-élution de contaminants et impuretés avec le composé étudié. Ainsi, afin de minimiser les interférences que cette pollution indésirable serait susceptible de créer lors de l'analyse suivant l'extraction, un ou plusieurs rinçages sont effectués entre le chargement de l'échantillon sur la phase solide et l'élution. Chaque étape de rinçage implique un solvant soigneusement choisi de façon à mettre en place un équilibre dans lequel le coefficient de partition est élevé pour l'analyte ciblé (il reste alors dans la phase solide) et faible pour les impuretés qui sont de ce fait éluées avec le solvant. Des expériences d'efficacité d'extraction permettent de déterminer les solvants optimaux pour cette opération. Au terme de ces lavages, il ne reste idéalement dans la phase solide que le composé que l'on souhaite analyser.

### *Elution*

La dernière étape de la SPE consiste à éluer l'analyte de la phase solide et le collecter pour qu'il se trouve dans un milieu permettant son analyse. Lorsqu'un liquide fournit un environnement plus favorable pour l'analyte que la phase solide, le composé d'intérêt est élué par le solvant qui est alors recueilli à la sortie de la cartouche : c'est l'étape d'élution. Dans ce

cas, le solvant est choisi afin d'obtenir un  $K_d$  très faible, c'est-à-dire que l'échantillon a une préférence largement plus marquée pour le solvant que pour la phase stationnaire. La SPE apporte un avantage intéressant par rapport à la LLE ; en effet le solvant d'éluion utilisé a la possibilité d'être miscible avec l'échantillon de départ car ces deux liquides ne sont jamais en contact direct du fait de la séquentialité du procédé. Ainsi, il est possible d'éluier un échantillon aqueux avec du méthanol (miscible dans l'eau), une combinaison qui ne serait pas possible à mettre en place dans une LLE.

La SPE est une technique de préparation d'échantillons couramment utilisée pour son efficacité, sa simplicité et sa possibilité d'automatisation.<sup>133,134</sup> Elle offre également un éventail d'avantages analytiques :

- Concentration de l'échantillon : il suffit d'utiliser un volume faible de solvant d'éluion afin d'obtenir une solution concentrée de l'analyte. Une solution alternative est de choisir un solvant organique volatile lors de l'éluion, permettant une concentration facile à la suite de la SPE.
- Lavage : la rétention sélective de l'analyte après les étapes de rinçage permet de diminuer le nombre et la quantité de contaminants au sein de l'échantillon. Ainsi les analyses peuvent être conduites sur un liquide plus propre où l'analyte pourra donner un signal avec des interférences limitées.
- Echange de solvant : les analyses en spectrométrie de masse requièrent des échantillons dans un environnement spécifique. La SPE offre la possibilité de convertir la matrice de départ en un solvant compatible avec de telles analyses.

En contrôle antidopage, les échantillons sont fournis dans une matrice urinaire (milieu aqueux), contenant un grand nombre de contaminants et des analytes souvent à l'état de trace. Une SPE lors de la préparation d'échantillon permet de nettoyer l'échantillon, concentrer les analytes ciblés et les placer dans un milieu optimisé pour une analyse par spectrométrie de masse, faisant de cette technique une étape indispensable pour la méthode analytique de détection des stéroïdes.<sup>135</sup>

## **1.2. Analyse des stéroïdes en matrice simple (solvant)**

### **1.2.1. Infusion directe**

L'infusion directe correspond à l'introduction d'un échantillon liquide présent dans une seringue connectée directement à l'instrument utilisé pour l'analyse, donc dans le cas de

ce travail un spectromètre de masse. L'emploi de ce mode d'introduction permet d'optimiser les paramètres instrumentaux du spectromètre de masse. Les solutions de stéroïdes sont préparées en solvant MeOH/H<sub>2</sub>O 90/10 (v/v) à une concentration de 10 µg/mL en analyte de façon à obtenir un signal important pour le composé et de voir rapidement l'influence de chaque paramètre qui est modifié. La solution d'échantillon contient du fluorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>F) en ratio molaire 100:1 par rapport au stéroïde. La solution finale est directement infusée dans l'instrument pour analyse.

### **1.2.2. Injection directe par HPLC**

De la même manière que l'injection directe des stéroïdes préparés en solvant permet d'optimiser les paramètres instrumentaux du spectromètre de masse, l'introduction par chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) d'échantillons en solvant offre un moyen de travailler sur le gradient chromatographique et tous les paramètres associés sans se soucier d'éventuelles interférences.

Les concentrations nécessaires pour l'injection par HPLC sont beaucoup plus faibles que celles utilisées pour l'optimisation en infusion directe. Pour les premiers tests sur un composé une valeur de 100 ng/mL a été utilisée, permettant ainsi d'obtenir avec certitude un signal. Cela est crucial car dans le cas où le composé n'est pas détecté, il est impossible de déterminer son temps de rétention ( $t_r$ ), et de manière générale, son comportement chromatographique. Une fois que le temps de rétention et les fragments MS/MS choisis sont validés, on peut analyser des concentrations plus faibles. Il est important de noter que ces échantillons en solvant ne contiennent aucune contamination, et qu'il est donc peu utile de passer trop de temps à les analyser à faible concentration, car ils ne sont pas représentatifs d'un échantillon réel en matrice urinaire. Un exemple de préparation d'une solution à 10 ng/mL de 6-oxo-androstenedione est donné en Annexe B page 145.

### **1.3. Analyse des stéroïdes en matrice complexe (urine)**

Le passage d'une matrice simple à une matrice urinaire pose de nombreux problèmes du fait de la complexité de l'environnement urinaire.<sup>136</sup> L'ensemble des molécules et composés biologiques rejetés par l'organisme dans l'urine est présent dans l'échantillon. En plus de ces interférences importantes, les stéroïdes se trouvent naturellement dans l'urine à des concentrations très faibles (de l'ordre de l'unité de ng/mL). Il devient alors nécessaire de mettre en place des procédures de préparation d'échantillon permettant de purifier et

concentrer ces échantillons urinaires. Trois protocoles d'extraction/purification/concentration classiques utilisés dans les laboratoires d'antidopage ont été testés pour l'analyse des stéroïdes en matrice urinaire.

### **1.3.1. Procédure 1 : « Hydrolyse et SPE »**

La méthode « Hydrolyse et SPE » est une procédure de préparation d'échantillons utilisée pour le screening de stéroïdes en routine. Elle est basée sur une hydrolyse par la  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -Glu) produite par la bactérie *E.Coli*, qui permet de rompre les liaisons entre un stéroïde et un groupement glucuronide qui y est attaché suite à la Phase II de métabolisation. On obtient ainsi des stéroïdes sous forme libre (structure de base ou métabolisés par la Phase I),<sup>137</sup> qui sont ensuite purifiés par SPE avec une cartouche Bond Elut contenant une phase solide C<sub>18</sub> avec des lavages au cyclohexane et une élution avec du méthanol. Une reconstitution finale dans une phase optimisée pour la séparation HPLC conclut la procédure. Les détails complets de cette méthode sont donnés en Annexe C page 145.

### **1.3.2. Procédure 2 : « Hydrolyse et LLE »**

Cette préparation est basée uniquement sur l'extraction liquide-liquide pour la purification de l'échantillon après l'hydrolyse enzymatique par la  $\beta$ -Glu. C'est une méthode rapide qui ne nécessite pas de SPE et qui est utilisée pour préparer les stéroïdes pour une confirmation. Le TBME qui est utilisé comme solvant d'extraction n'étant pas très spécifique, on obtient généralement un bruit de fond assez important, dû aux contaminants présents dans l'urine. Les étapes détaillées sont consultables en Annexe C page 145.

### **1.3.3. Procédure 3 : « SPE, hydrolyse et LLE »**

Cette technique de préparation est également une méthode de confirmation, qui combine cette fois une extraction sur phase solide qui prend place avant l'hydrolyse, permettant une meilleure action de l'enzyme, et un mélange post-digestion plus propre. L'extraction liquide-liquide à la fin de la procédure permet d'apporter une purification supplémentaire, notamment lorsque le n-pentane est utilisé comme solvant d'extraction, car moins de contaminants dans l'urine ont une affinité pour ce solvant. Les détails de cette procédure sont donnés en Annexe C page 145.

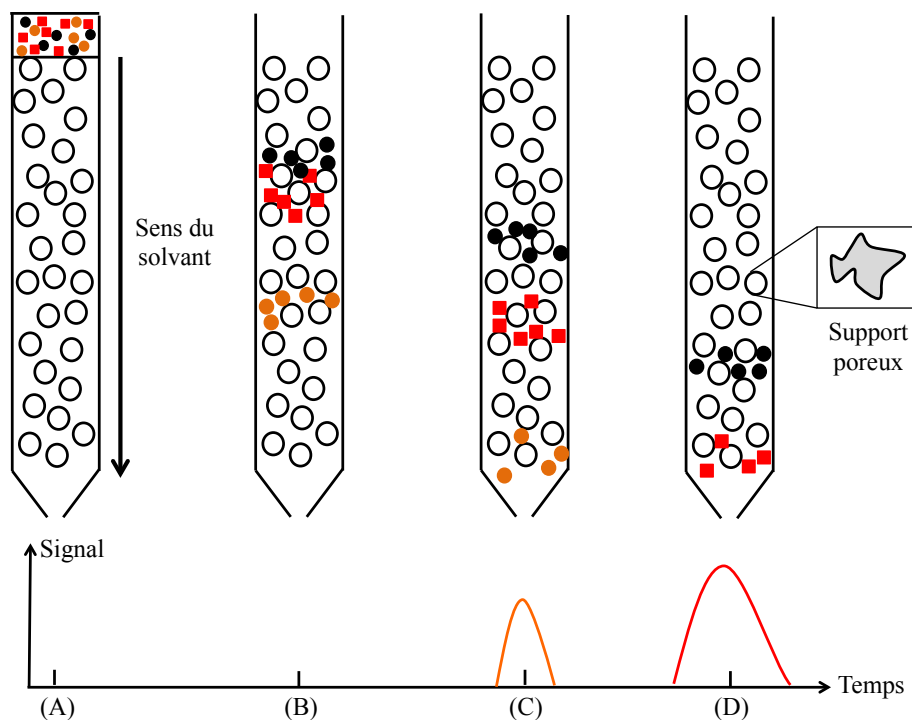
Les extractions sur phase solide réalisées lors de la préparation des échantillons en matrice urinaire ont été réalisées par les robots d'extraction de type « ASPEC » commercialisés par la société Gilson. Le procédé est réalisé sur des cartouches Bond Elut C<sub>18</sub>, 200 mg/3 mL avec bouchons d'étanchéité. Les tableaux 13a et 13b (Annexe C page 145) récapitulent chaque étape du programme de SPE.

En matrice urinaire, le problème posé par le nombre de contaminants est trop important pour être entièrement résolu à travers la préparation de l'échantillon. Il est nécessaire d'inclure une étape de séparation avant l'analyse par spectrométrie de masse. Dans cette étude, il s'agit de la chromatographie en phase liquide.

## **2. Chromatographie en phase liquide**

### **2.1. Principe**

La chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography, LC) est une technique analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier les différents composés présents dans un mélange complexe.<sup>138</sup> L'échantillon est entraîné par une phase mobile liquide à travers une colonne contenant une phase solide (phase stationnaire) qui va retenir de manière plus ou moins importante les composés en fonction des interactions physico-chimiques qui se créent avec ces phases. Les toutes premières méthodes de chromatographie reposaient sur un phénomène de gravitation pour le passage du liquide dans la colonne, ce qui demandait un temps de séparation important. Actuellement, la technique la plus employée est la chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)<sup>139</sup> où la phase mobile est poussée par des pompes dans une colonne adaptée aux fortes pressions. Cette amélioration offre des temps de séparation beaucoup plus courts et la possibilité d'utiliser des quantités d'échantillons plus faibles.<sup>103</sup> Les récents développements tendent cependant vers une popularisation de la chromatographie en phase liquide ultra-haute performance (UPLC, ou U-HPLC) permettant de réduire d'autant plus les temps de séparation : 1,25-7 minutes pour l'UPLC contre 3-30 minutes pour l'HPLC. De plus, il a été montré que l'utilisation de l'UPLC induit une meilleure sensibilité qu'en HPLC.<sup>140</sup> Le principe général de la LC est illustré dans le Schéma 7.



**Schéma 7.** Principe de la chromatographie en phase liquide. (A) : injection de l'échantillon, (B) séparation dans la colonne avec une rétention dépendant des propriétés physico-chimiques des composés, (C) éluion du premier composé, (D) éluion du second composé.

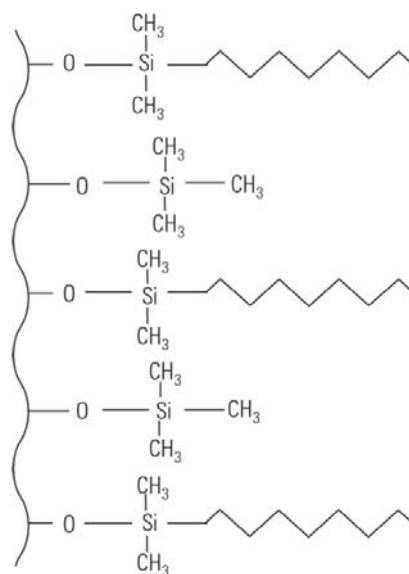
## 2.2. La phase stationnaire

En LC, la rétention des composés est effectuée par l'intermédiaire de la force des interactions qu'ils ont avec la phase stationnaire (solide) qui se trouve dans la colonne et avec la phase mobile.<sup>141</sup> Ces interactions peuvent se baser sur :

- La taille moléculaire (chromatographie d'exclusion stérique)<sup>142</sup>
- La charge (chromatographie d'échange ionique)<sup>143</sup>
- L'hydrophobicité (chromatographie d'interaction hydrophobe)<sup>144</sup>
- Des interactions spécifiques (chromatographie d'affinité)<sup>145</sup>
- Une combinaison des points précédents (chromatographie multimodale)<sup>146</sup>

Pour l'analyse des stéroïdes qui sont de petites molécules organiques hydrophobes, la technique employée est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée où la phase stationnaire est constituée de billes de silices fonctionnalisées à leur surface par des groupements alkyls C<sub>8</sub> (Figure 1).<sup>147</sup> Lorsque la phase stationnaire est hydrophobe et retient principalement les composés hydrophobes de la phase mobile, on se réfère communément à

l'appellation « phase inverse », en opposition à la « phase normale » hydrophile utilisée historiquement.<sup>148</sup>



**Figure 1.** Représentation de la surface d'une bille de silice dans une colonne de chromatographie phase inverse C<sub>8</sub>.<sup>149</sup>

Lors de la séparation, les analytes se partagent entre les deux phases (phase mobile liquide et phase stationnaire solide). L'élution est effectuée par un gradient commençant par un haut pourcentage de solvant aqueux et progressant vers une proportion croissante de solvant organique. Lors de l'analyse de stéroïdes, la totalité des composés est retenue dans la colonne de manière plus ou moins forte et l'élution se fait par ordre d'hydrophobicité croissante au fur et à mesure que la quantité de solvant dans la phase organique augmente. La chromatographie en phase inverse est adaptée en couplage avec la spectrométrie de masse car les solvants aqueux et organiques de la phase mobile donnent de bonnes performances même sans addition de sels.

### 2.3. Paramètres expérimentaux

Deux types de colonnes de phase inverse ont été utilisés pour la séparation par chromatographie en phase liquide couplée à la MS : Zorbax SB-C<sub>8</sub> et Zorbax Eclipse XDB C<sub>8</sub>, commercialisées par Agilent. Les caractéristiques de ces colonnes sont compilées dans le Tableau 14 en Annexe D page 149.

La phase mobile est constituée d'eau ultrapure (voie A) et de méthanol (voie B), avec ou sans des concentrations variables de NH<sub>4</sub>F. Chaque colonne présentant des caractéristiques



très différentes, les gradients utilisés le sont également. Les gradients ont été optimisés afin de fournir une séparation optimale des composés, tout en faisant en sorte que les stéroïdes d'intérêt n'éluent pas dans les zones où les concentrations de contaminants sont les plus élevées. Les gradients pour chaque colonne sont présentés dans le Tableau 15 (Annexe D page 145).

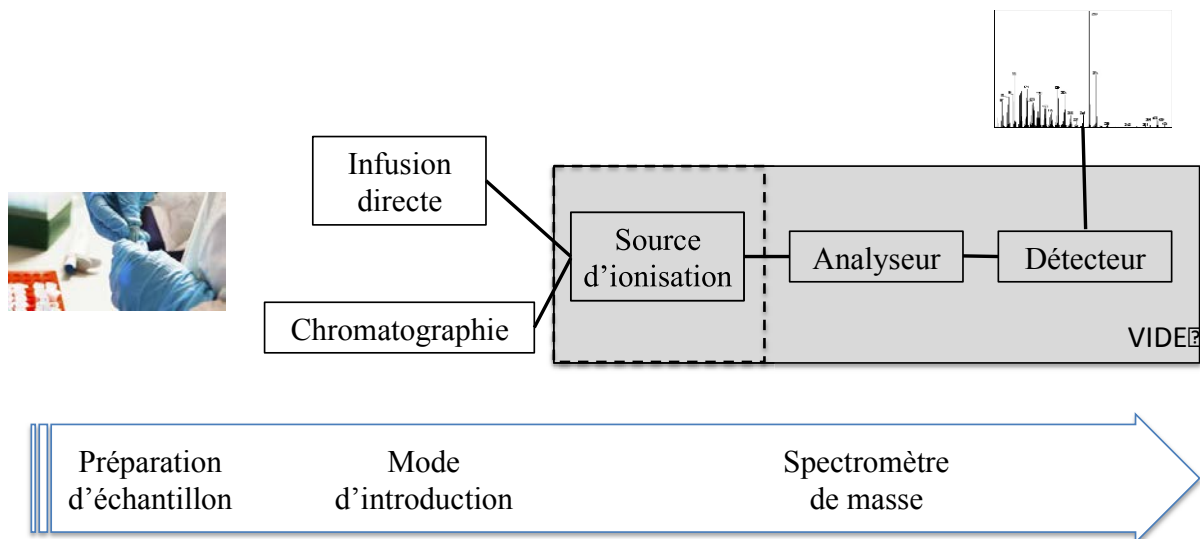
La détection des composés éluant de la colonne de chromatographie s'effectue par un couplage à un spectromètre de masse. Ainsi les analytes sont caractérisés à la fois par leur temps de rétention chromatographique, mais également leur masse, et les fragments qu'ils produisent en MS en tandem. Cette combinaison permet une identification spécifique des stéroïdes d'intérêt.

### **3. Spectrométrie de masse**

#### **3.1. Fondamentaux**

De toutes les techniques analytiques actuelles, peu se montrent aussi polyvalentes que la spectrométrie de masse. Grâce aux développements des spectromètres de masse lors des dernières décennies, la spectrométrie de masse fournit des performances inégalées en terme de sensibilité, limites de détection, facilité d'utilisation et rapidité d'analyse. Les applications sont très variées et vont de l'analyse de nanoparticules à l'étude de ribosomes intacts.

Lors d'une analyse MS, les ions introduits sont séparés dans l'instrument en fonction de leur ratio masse-sur-nombre de charges ( $m/z$ ) et détectés proportionnellement à leur abondance.<sup>150</sup> Les données collectées sont présentées sous forme d'un spectre de masse, où l'abscisse est une échelle de  $m/z$  et l'ordonnée l'intensité relative. L'axe  $y$  peut également représenter le compte d'ions total (Total Ion Count, TIC) dans certaines représentations. Pour que l'analyte puisse être détecté, il doit se présenter sous forme d'ion en phase gazeuse. C'est la source d'ionisation qui permet de vaporiser et d'ioniser les composés. Après cette première étape, les ions sont dirigés et séparés par l'analyseur de masse, qui discrimine les ions en fonction de leur  $m/z$ . Ils atteignent finalement le détecteur qui compte le nombre d'ions pour chaque valeur de  $m/z$  et envoie un signal électrique interprété par l'ordinateur (Schéma 8).<sup>151</sup>



**Schéma 8.** Représentation des différentes étapes pour une analyse en MS ainsi que les 3 parties principales d'un spectromètre de masse. La source d'ionisation peut être sous vide ou à pression atmosphérique.

Les spectromètres de masse fonctionnent sous vide (avec une pression de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  torr généralement)<sup>152</sup> afin d'éviter la perte des ions par collision. La source est parfois à pression atmosphérique (mais toujours pour le couplage HPLC), et un gradient de pressions (appelé pompage différentiel)<sup>153</sup> fait la transition entre la pression atmosphérique de la source et le vide de l'instrument. De très basses pressions assurent un libre parcours moyen plus long, qui est la distance qu'un ion peut voyager sans provoquer de collision avec une autre particule. Il est nécessaire pour l'instrument d'avoir un important libre parcours moyen de façon à ce que les ions puissent atteindre le détecteur.

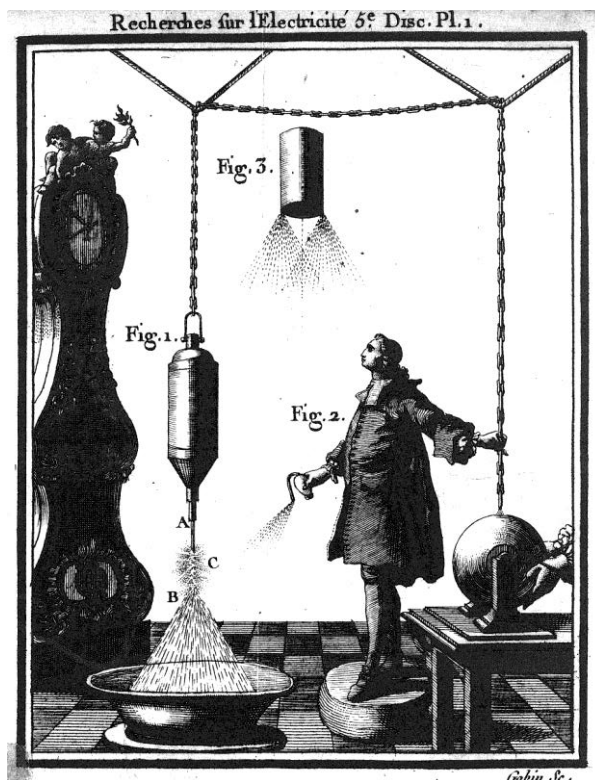
### 3.2. Sources à ionisation

Une analyse en spectrométrie de masse repose sur une séparation des composés en fonction de leur  $m/z$  grâce à l'application de champs électromagnétiques (selon l'analyseur utilisé). Pour cela, les particules doivent être chargées en phase gazeuse (car l'instrument fonctionne sous vide). La source d'ionisation est ainsi la première étape d'une analyse MS et permet la formation d'ions en phase gazeuse. De nombreuses sources sont disponibles et sont plus ou moins adaptées à la nature physico-chimique des composés à étudier, comme l'ionisation électronique (EI),<sup>154</sup> l'ionisation chimique (CI)<sup>155,156</sup> et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI),<sup>157,158</sup> la photoionisation à pression atmosphérique (APPI),<sup>159,160</sup> la désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI),<sup>161,162</sup> etc. Dans le

cadre de ce projet, la source principalement utilisée est l'électronébuliseur (electrospray ionization ESI).<sup>163,164,165,166</sup>

### 3.2.1. Bref historique du développement de l'ESI

Les scientifiques britanniques William Gilbert<sup>167</sup> et quelques années plus tard Sire Thomas Browne<sup>168</sup> ont observé la formation d'un cône lors de l'attraction électrostatique de gouttelettes d'eau. Le chimiste anglais Stephen Gray<sup>169,170</sup> a été le premier à noter des émissions depuis le cône mais il faut remonter au XVIII<sup>e</sup> siècle avec Jean-Antoine Nollet pour trouver le premier rapport d'une vraie expérience d'ESI. Cet Abbé et physicien français a été le premier à étudier le comportement des liquides à travers un capillaire électrifié (Figure 2).<sup>171</sup>



**Figure 2.** Abbé Nollet montrant la forme spécifique d'un liquide passant à travers un capillaire électrifié.<sup>172</sup>

Le développement de l'ESI tel qu'il est utilisé de nos jours en spectrométrie de masse est le fruit du travail de Malcolm Dole et John Fenn. Dans les années 1960, Dole était intéressé par l'analyse de polymères qu'il souhaitait observer intacts. Il eut l'idée de nébuliser une solution très diluée de polymère en fines gouttelettes. Le procédé ne fut pas très efficace mais, alors qu'il travaillait comme consultant pour une compagnie de peinture,<sup>173</sup> il remarqua

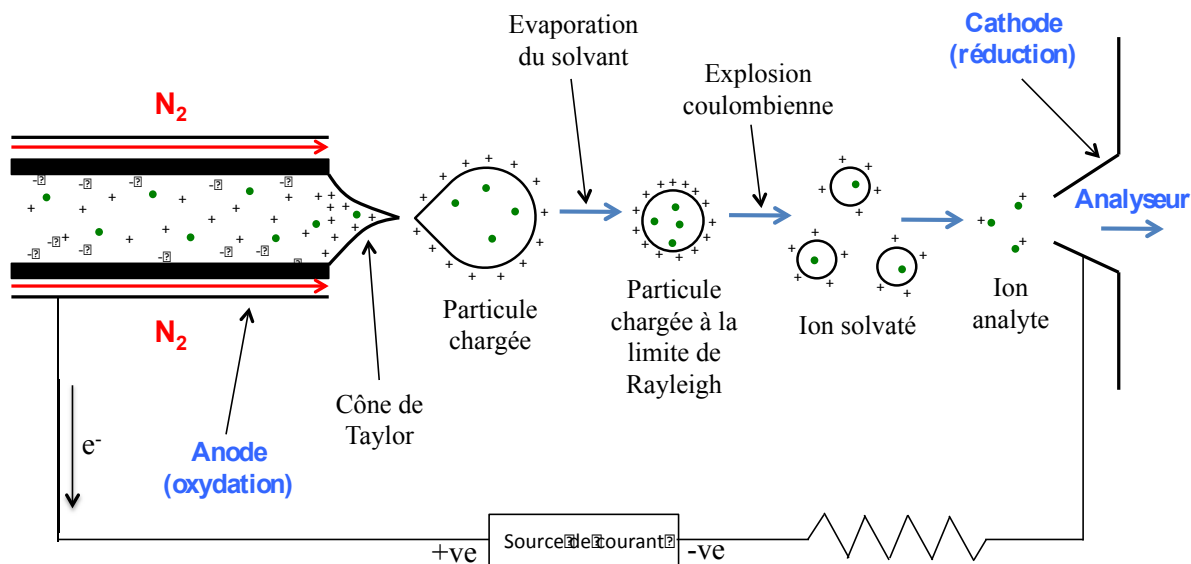
que la peinture pour la carrosserie de voiture était vaporisée en utilisant un procédé appelé électrospray. Il appliqua cette technique à des solutions de polystyrène et mit en place la première expérience d'ESI en MS.<sup>174</sup> Quelques années plus tard, Fenn et son équipe appliquèrent l'ESI à l'analyse de peptides et protéines en le couplant avec un analyseur quadripolaire.<sup>175</sup> Ce travail débuta la révolution de l'ESI et valu à Fenn le prix Nobel de chimie en 2002.

### 3.2.2. Principe de l'ESI

En ESI, l'échantillon passe à travers un capillaire électrifié (généralement 2-5 kV) qui va former à son extrémité des gouttelettes chargées de taille relativement importante.<sup>176</sup> Cette haute tension produit un champ électrique entre le capillaire (anode) et la contre-électrode (cathode) située à l'entrée de l'instrument (Schéma 9). Lorsque la solution sort du capillaire, le champ induit une accumulation de charges sur la surface du liquide à la pointe du capillaire résultant en la formation d'un cône de Taylor, suivi par une dispersion en aérosol contenant des gouttelettes hautement chargées. L'évaporation du solvant dans la zone de désolvation conduit à une réduction de la taille des gouttelettes, jusqu'à ce qu'elles atteignent la limite de Rayleigh, c'est-à-dire lorsque la force de répulsion coulombienne (due à la répulsion des charges positives à proximité les unes des autres) est exactement égale à la tension superficielle de la gouttelette. La condition pour l'instabilité coulombienne est définie par l'équation de Rayleigh :<sup>177</sup>

$$Q_{Ry} = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{\frac{1}{2}}$$

où  $Q_{Ry}$  est la charge de la gouttelette,  $\gamma$  la tension superficielle du solvant,  $R$  le rayon de la gouttelette et  $\epsilon_0$  la permittivité électrique. Toute évaporation de solvant d'une gouttelette à cette limite entraîne une explosion coulombienne : la goutte se scinde alors en plusieurs gouttelettes de plus petit rayon. Ce processus se répète jusqu'à obtenir des ions solvatés (une molécule d'analyte entourée de solvant). Enfin, une fois l'ensemble du solvant évaporé l'analyte est sous forme ionique mono- ou multi-chargée et peut être envoyé vers l'analyseur.



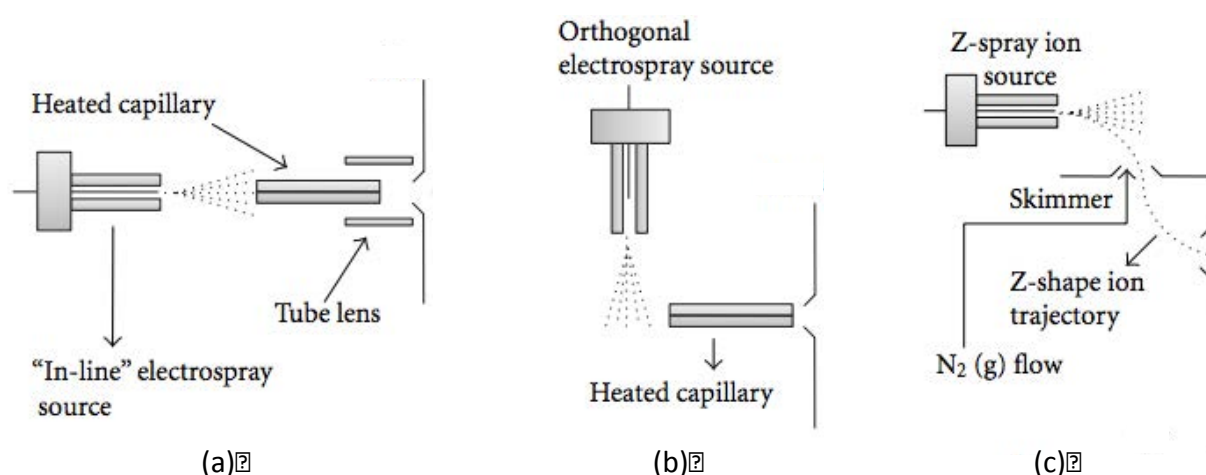
**Schéma 9.** Principe d'une source ESI opérée en mode positif.

La différence de potentiel cône-skimmer est appliquée entre le skimmer et le cône de l'instrument. Sa valeur est cruciale lors d'une analyse puisque si elle est trop faible les ions restent solvatés et ne peuvent possiblement pas atteindre l'entrée de l'instrument créant une perte de signal importante, ou bien être détectés sous forme d'adduit de solvant, décalant leur  $m/z$  par rapport à la valeur attendue. Au contraire si elle est trop élevée, les ions récupèrent une énergie trop importante et ils peuvent se fragmenter dans la source ; de plus, une valeur de cône de désolvation trop élevée peut briser les complexes non-covalents ou adduits. Il est important de noter que le mécanisme de formation des ions en phase gazeuse dans une source ESI n'est pas entièrement connu. Deux modèles différents proposent une explication : celui qui est expliqué précédemment et repose sur des explosions coulombiennes consécutives est celui de Dole.<sup>174</sup> Iribarne et Thomson ont postulé que lorsque les gouttelettes ont une densité de charge suffisante, elles ne subissent plus de fission mais émettent directement des ions en phase gazeuse.<sup>178</sup> Ce deuxième modèle (évaporation ionique) propose une alternative à celui de Dole (charge résiduelle).

### 3.2.3. Propriétés de l'ESI

Par son mécanisme de formation des ions, l'ESI permet d'obtenir des espèces multichargées de forme  $[M+nH]^{n+}$  en mode positif ou  $[M-nH]^{n-}$  en mode négatif. Plus le composé a une masse (ou surface) importante, plus il sera capable de contenir de charges. Ainsi les protéines analysées en ESI peuvent facilement atteindre des états de charge élevés. C'est un avantage majeur dans l'analyse de composés de masse molaire importante puisque l'augmentation de leur état de charge permet d'obtenir des  $m/z$  compatibles avec la plupart

des analyseurs. Cependant la présence de plusieurs états de charge sur un spectre pour le même composé peut rapidement compliquer l'analyse des données. Dans le cas des stéroïdes qui sont de petites molécules, il n'est pas attendu plus d'une charge lors de leur ionisation en ESI ce qui simplifie l'analyse du spectre. Une autre propriété intéressante de la source ESI est qu'elle fait partie de la catégorie des sources d'ionisation dites « douces ». Ce terme se réfère aux sources qui permettent la formation d'ions avec une énergie interne plutôt faible et qui ainsi ne se fragmentent pas (au contraire de sources dites « dures » telle que l'ionisation électronique par exemple). Enfin, l'ESI est une source qui opère à pression atmosphérique permettant des designs instrumentaux variés. La source ESI classique est placée en alignement de l'entrée de l'instrument (Schéma 10a) mais des développements ont abouti à d'autres conformations de la source, comme l'ESI orthogonal où le capillaire est placé perpendiculairement à l'ouverture du spectromètre (Schéma 10b). Cette dernière, chargée négativement, va attirer les ions positifs qui sortent du capillaire et dont la trajectoire va être déviée. Les ions négatifs et des molécules neutres continuent leur chemin droit et ne pénètrent pas dans l'instrument. Pour obtenir le même résultat on peut également utiliser une conformation « spray-Z » (Schéma 10c) où le capillaire est parallèle à l'entrée de l'instrument, mais pas en face. Les ions d'intérêt sont déviés par l'attraction électrostatique et la trajectoire des analytes a une forme de « Z », d'où le nom de ce design. On obtient ainsi dès la source une sélection des ions d'intérêt et une augmentation des performances de l'instrument puisque moins d'analytes sont présents.

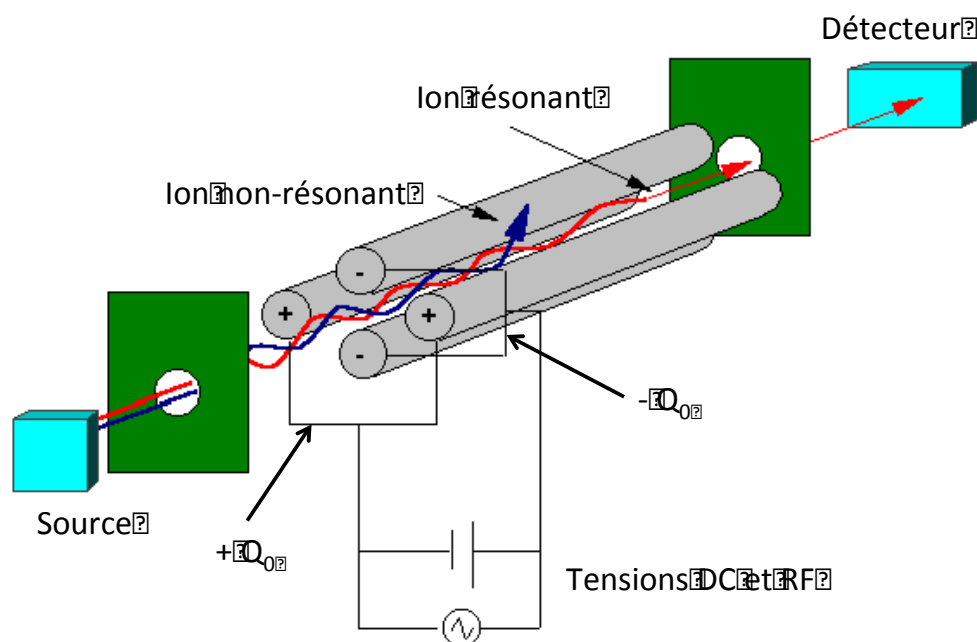


**Schéma 10.** Principaux designs d'une source ESI. (a) source en ligne (b) source orthogonale, (c) source en Z.<sup>179</sup>

### 3.3. Analyseur quadripolaire

L'analyseur est la partie du spectromètre de masse qui permet de séparer les ions en fonction de leur  $m/z$ . Différents types d'analyseurs sont disponibles commercialement, chacun présentant des caractéristiques spécifiques et des modes de fonctionnement qui permettent d'adapter leur utilisation en fonction de l'analyte.<sup>180</sup> Il existe deux grandes catégories d'analyseurs selon leur principe de fonctionnement : i) les analyseurs à balayage, qui ne laissent passer que les ions ayant un  $m/z$  spécifique (ex : quadripôle)<sup>181</sup> et ii) les analyseurs à transmission simultanée dans lesquels tous les ions sont transmis en même temps (ex : temps de vol).<sup>182</sup> Dans le cas des expériences sur les SAA présentées ici, l'analyseur employé principalement est de type quadripolaire.

L'analyseur quadripolaire simple (Q) est un dispositif composé de 4 électrodes métalliques de section hyperbolique ou cylindrique parallèles les unes aux autres.<sup>183,184</sup> Ces électrodes sont connectées deux à deux et subissent un champ  $\pm Q_0 = \pm(U + V\cos(\omega t))$  où  $U$  est une tension constante (DC) et  $V$  une tension alternative (radiofrequency voltage RF). La polarité de chaque barre bascule de positif à négatif de manière cyclique, avec un décalage de  $180^\circ$  entre chaque paire d'électrodes. Le principe du quadripôle est que ces électrodes créent un champ électrique oscillatoire dans lesquels seuls les ions ayant un  $m/z$  défini sont stables. Lorsqu'un ion positif entre dans le quadripôle, il est attiré par l'électrode négative du fait des interactions électrostatiques. Si l'électrode change de polarité avant que l'ion ne l'atteigne, ce dernier est repoussé et continue d'avancer vers la sortie de l'analyseur (Schéma 11). Dans le cas contraire, il percute la barre, devient neutre et n'est pas détecté. La modulation des courants (intensité, fréquence, oscillation, etc.) permet de balayer une large gamme de valeurs de  $m/z$ . L'avantage de l'utilisation des analyseurs à balayage comme le quadripôle est que seuls les ions ayant des  $m/z$  très proches sont transmis et atteignent le détecteur en même temps. Cela permet d'obtenir une bonne sensibilité puisque le détecteur reçoit que peu d'ions simultanément.



**Schéma 11.** Principe de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire.<sup>185</sup>

Les quadripôles sont peu chers, ont une longue durée de vie et sont utilisés couramment. Cependant, leur inconvénient principal est qu'ils sont limités à l'analyse de molécules dont le  $m/z$  est inférieur à 5000 (contrairement à l'analyseur temps-de-vol par exemple, qui peut analyser une gamme de  $m/z$  en théorie illimitée). La combinaison avec une source ESI qui produit des espèces multichargées (et donc avec un  $m/z$  faible même si la masse est importante) est donc souvent employée pour l'analyse de molécules lourdes avec un quadripôle. Ces analyseurs sont considérés comme des analyseurs basse résolution. Les quadripôles, lorsqu'ils ne sont pas utilisés comme analyseurs peuvent également servir de guides ioniques à l'entrée des spectromètres de masses afin de faire converger les ions et leur assurer une trajectoire stable (mode RF uniquement).<sup>186</sup> Dans le cas des triples quadripôles, le deuxième d'entre eux sert de cellule de collision pour la fragmentation des analytes (cf : § 3.4.1.).

### 3.4. MS en tandem : principes de la fragmentation CID

Pour aboutir à la fragmentation d'un ion (pour obtenir des informations structurales), il existe différentes méthodes dites « d'activation », c'est-à-dire que l'on augmente l'énergie interne de l'ion pour le rendre instable et le pousser à se casser en plusieurs fragments. Une de ces méthodes est la dissociation induite par collision (Collision-Induced Dissociation, CID) qui est basée sur une activation collisionnelle.<sup>187</sup> En effet, lorsqu'un ion percute un atome ou une molécule neutre, une partie de l'énergie cinétique de l'ion est convertie en énergie



interne. Lorsque l'énergie interne est assez importante, les liens chimiques se cassent et l'ion se décompose. Expérimentalement, la cellule de collision est pressurisée avec un gaz neutre (en général azote ou gaz rare) dans laquelle les ions sont accélérés afin de créer des collisions. La relation entre l'énergie interne de l'ion ( $E_{cm}$ ) et son énergie cinétique ( $E_{lab}$ ) est donnée par :

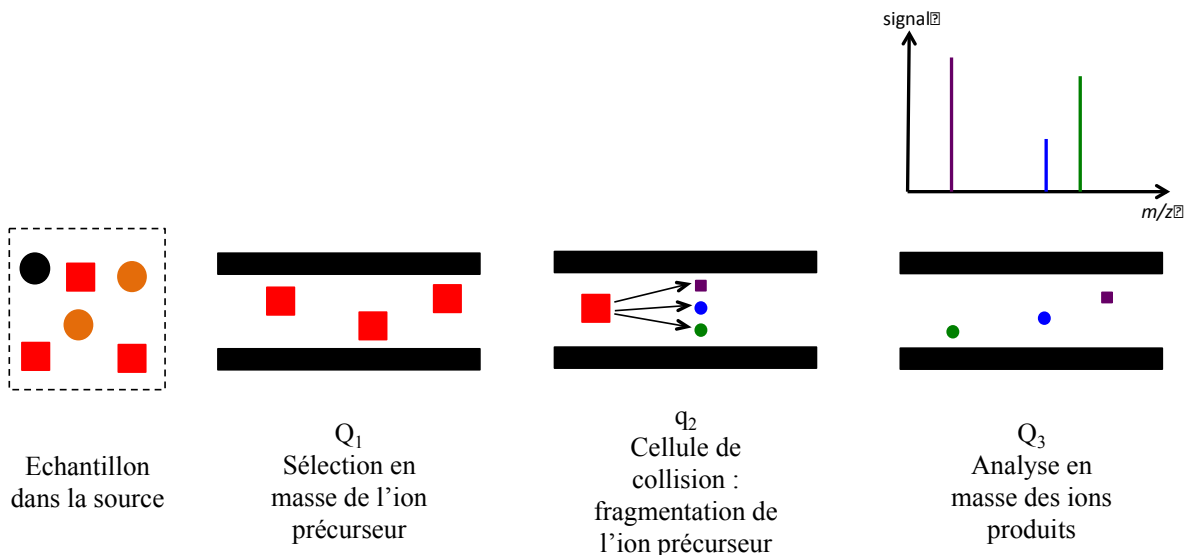
$$E_{cm} = E_{lab} \times \frac{m_2}{(m_1 + m_2)}$$

où  $m_1$  est la masse de l'ion et  $m_2$  la masse du gaz de collision. On voit ainsi que l'on peut moduler la quantité d'énergie récupérée par l'ion en modifiant son énergie cinétique (i.e. son accélération au sein de la cellule de collision) et la masse du gaz de collision.<sup>188</sup>

Il existe deux types de fragmentations CID qui sont classifiés en fonction de l'énergie fournie aux ions. Avec des analyseurs comme le secteur magnétique ou le temps de vol, l'énergie fournie aux ions en CID est très élevée. Au contraire, dans le cas d'un quadripôle ou d'une trappe ionique, on parle de CID basse énergie puisque les analytes reçoivent une énergie plus faible pour leur fragmentation. La quantité d'énergie accumulée par les ions est un paramètre crucial en CID puisqu'elle va influencer très fortement les mécanismes de fragmentation et les ions obtenus. Il existe plusieurs modes de MS en tandem basés sur la fragmentation CID avec un triple quadripôle.

### 3.4.1. Balayage d'ions produits

En MS simple, les analytes entrent dans l'instrument, sont séparés dans l'analyseur et sont détectés pour produire un spectre de masse. On a alors un aperçu de l'ensemble des ions présents dans la source d'ionisation. Le balayage d'ions produits présente 3 étapes (Schéma 12) : i) la sélection d'un  $m/z$  désiré (ions précurseurs) qui permettra de ne laisser passer que les molécules ayant ce rapport et offrant donc une sélection en masse parmi toutes les molécules présentes au départ, ii) la fragmentation des analytes sélectionnés, on obtient alors des « morceaux » de la molécule de départ (ions produits), et iii) l'analyse des fragments, cette dernière étape est similaire à une analyse en MS simple, à la différence que ce n'est pas la molécule intacte qui est analysée mais ses fragments.

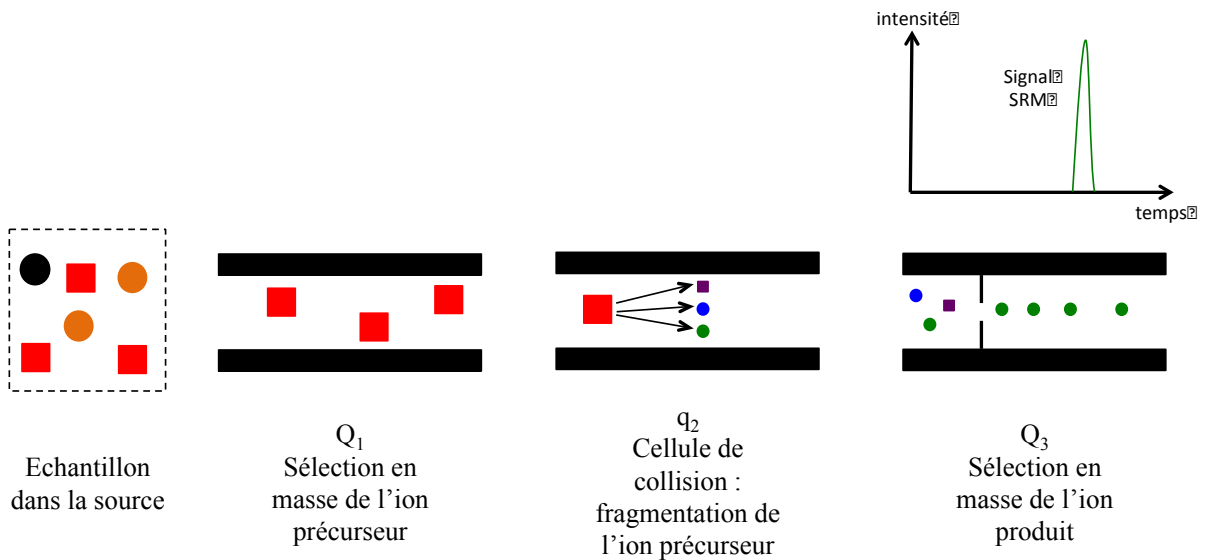


**Schéma 12.** Principe d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (balayage d'ion produit).

Sur le Schéma 12, la MS/MS est représentée sur un instrument à triple quadripôle, qui est constitué de 3 quadripôles simples alignés les uns après les autres (cf : § 3.3.).<sup>189</sup> Le premier quadripôle (Q<sub>1</sub>) sert de filtre et ne laisse passer que les ions ayant le rapport  $m/z$  établi par l'utilisateur. Le deuxième quadripôle (q<sub>2</sub>) n'est pas utilisé comme analyseur, mais comme cellule de collision : c'est là que la fragmentation des ions précurseurs va se produire par un mécanisme de CID.<sup>190</sup> Enfin les ions produits obtenus sont analysés en masse par le 3<sup>e</sup> quadripôle (Q<sub>3</sub>) pour aboutir à un spectre de masse. Cette méthode de MS/MS est appelée balayage d'ions produits puisque Q<sub>3</sub> scanne l'ensemble des fragments qui sont produits par un ion précurseur donné.

### 3.4.2. SRM

Il existe également un autre mode de MS/MS appelé suivi de réaction sélectionnée (Selected Reaction Monitoring, SRM).<sup>191</sup> Le principe est similaire au balayage d'ions produits à la différence que Q<sub>3</sub> agit de la même manière que Q<sub>1</sub> : il ne laisse passer que les fragments de  $m/z$  donné (Schéma 13). Ainsi l'utilisateur peut créer des méthodes basées sur des « transitions » qui correspondent à des paires de  $m/z$ , un pour l'ion précurseur, et l'autre pour l'ion produit. Lorsque cette technique est couplée à une introduction de l'échantillon par LC, on obtient en sortie de l'instrument un chromatogramme représentant l'intensité du signal SRM (combien d'ions ont effectué la transition  $m/z_{\text{précurseur}} \rightarrow m/z_{\text{produit}}$ ) en fonction du temps.



**Schéma 13.** Principe d'une analyse SRM.

Ce mode de MS/MS est utilisé à la fois en analyses de screening et de confirmation pour le contrôle antidopage des stéroïdes du fait de sa puissance identificatoire et sa spécificité. Chaque stéroïde possède des transitions spécifiques (elles sont choisies parmi tous les fragments possibles de façon à être propres à un stéroïde donné) et la réponse d'un échantillon à ces transitions révèle de manière non-ambiguë la présence de ce dopant. En combinant ces informations avec un temps de rétention chromatographique également répertorié pour chaque stéroïde, les chances de faux positifs sont très faibles.<sup>192</sup>

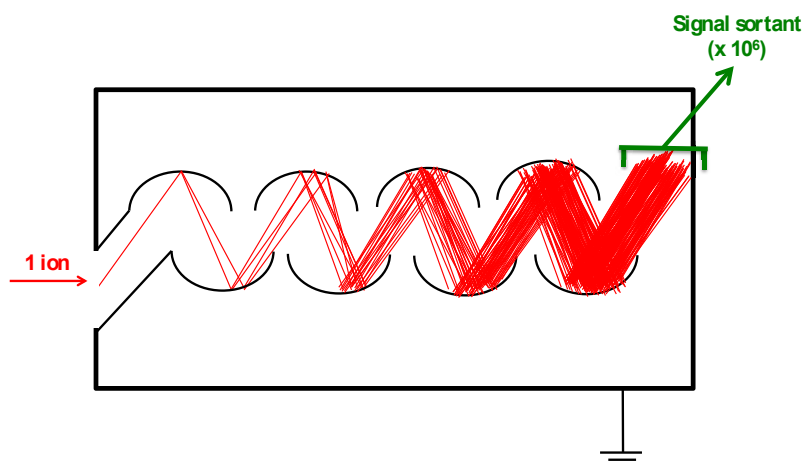
### 3.5. Détecteur

A la sortie de l'analyseur où ils ont été séparés selon leur  $m/z$ , les ions rencontrent le détecteur qui va permettre leur comptage.<sup>193,194</sup> Un détecteur enregistre le courant produit ou bien la charge induite lorsqu'un ion passe près de sa surface ou la touche. Le but principal du détecteur est d'amplifier le signal qu'il reçoit et de le convertir en message électrique qui sera interprétable par un ordinateur. Les principales caractéristiques d'un bon détecteur sont une amplification importante, un temps de réponse rapide, peu de bruit, une collecte des ions efficace, une réponse constante quelle que soit la masse et une grande gamme dynamique. De nombreux types de détecteurs sont disponibles et au même titre que l'analyseur, c'est le composé d'intérêt qui va dicter lequel sera le plus adapté. Les principaux détecteurs trouvés dans les instruments de MS sont :

- L'électromultiplicateur<sup>195</sup>
- La cavité de Faraday<sup>196</sup>

- La plaque photographique<sup>197</sup>
- Le détecteur à scintillation<sup>198</sup>
- Le détecteur à anode résistive
- Le détecteur à hautes masses

A titre d'exemple, le principe de l'électromultiplicateur (electron multiplier, EM) sera brièvement décrit de façon à mieux comprendre les enjeux et le fonctionnement d'un détecteur de MS. L'EM est le détecteur le plus utilisé, particulièrement quand à la fois des ions positifs et négatifs doivent être détectés sur le même instrument. Le système est composé de plusieurs dynodes (une électrode ayant des capacités d'émission secondaire) la première étant à 0 V, puis les suivantes à des potentiels croissants allant jusqu'à +1500/+3500 V en fonction de l'âge et du type d'EM. Lorsqu'un ion frappe la première dynode, elle produit quelques (1, 2 ou 3) électrons secondaires qui sont accélérés vers la seconde dynode. Comme celle-ci est à potentiel plus élevé, elle produit en retour plus d'électrons secondaires et le procédé se poursuit pour aboutir à une cascade d'électrons secondaires (Schéma 16). L'amplification finale est de l'ordre de 1 million pour 1.



**Schéma 14.** Principe de fonctionnement d'un détecteur électromultiplicateur.

### 3.6. Paramètres expérimentaux de MS

Les expériences de développement de méthode ont été réalisées sur les instruments de l'AFLD de façon à ce que le résultat final puisse être utilisé en l'état sans avoir besoin de mettre en place une procédure d'adaptation sur un instrument différent. En confirmation, pour la LC-MS/MS, ce sont des triples quadripôles équipés d'une source électrospray (ESI-TQ) qui sont utilisés. La majorité des essais a été réalisée sur un Quattro Premier de Waters (Milford,

MA) équipé d'une HPLC Acquity. La source d'ionisation est un électrospray « Z-spray » opéré en mode négatif.

Les paramètres expérimentaux utilisés ont été optimisés en fonction de l'analyse effectuée. Pour l'infusion directe, la méthode « MS » a été utilisée pour la MS simple et « MS/MS » a servi pour la fragmentation. En couplage LC-MS, les valeurs expérimentales sont drastiquement différentes, dû au débit important de la LC qui nécessite une désolvation plus puissante, i.e. une température de source plus élevée et un débit du gaz de désolvation beaucoup plus important. Ainsi, la méthode « LC » est la référence pour toutes les expériences nécessitant une injection. Les paramètres de ces différentes méthodes sont regroupés dans le Tableau 4.

**Tableau 4.** Paramètres expérimentaux (source et analyseur) des 3 méthodes utilisées.

	MS	MS/MS	LC
<i>Capillaire (kV)</i>	2,5	2,5	2,5
<i>Cône de désolvation (V)</i>	variable	variable	variable
<i>Température source (°C)</i>	80	80	120
<i>Température de désolvation (°C)</i>	200	200	450
<i>Débit du gaz de désolvation (L/h)</i>	200	200	800
<i>Débit du gaz de cône (L/h)</i>	2	0	50
<i>Energie de collision (V)</i>	0	variable	variable
<i>Multiplicateur d'électrons</i>	650	650	650

Les spectres et chromatogrammes enregistrés avec le Quattro Premier sont analysés grâce au logiciel « MassLynx » v4.1 fourni avec l'instrument. Les spectres de MS sont collectés sur une période de 30 secondes à raison d'un scan par seconde et sont présentés sans transformation (aucun lissage ou soustraction de ligne de base). Les spectres MS/MS sont une moyenne de 120 scans individuels enregistrés au rythme de 1 scan/s ; ils ne subissent aucune modification post-enregistrement. Les transitions SRM sont visualisées et évaluées avec le logiciel « QuanLynx » fourni avec l'instrument.

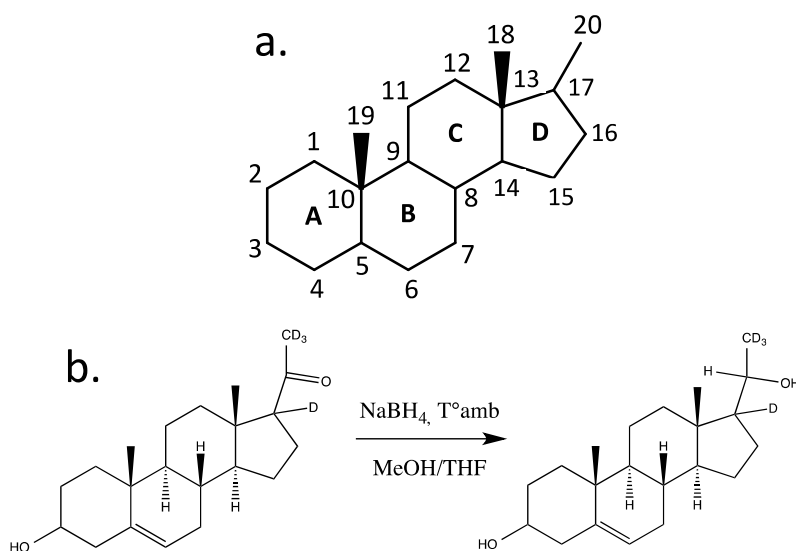
**Etude de la  
régiosélectivité de  
l'attachement  
anionique**

# 1. Site de l'attachement anionique sur des stéroïdes bifonctionnels

## 1.1. Réduction de la 3 $\beta$ -hydroxypregn-5-en-20-one (pregnénolone) et d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone

D'après un postulat de R. Cole *et al.*, l'attachement anionique conduit à des adduits stables en phase gazeuse lorsque l'anion et le groupe fonctionnel impliqué ont des valeurs d'acidité en phase gazeuse (gas-phase acidities, GA) qui sont proches.<sup>125</sup> Ainsi, deux anions distincts (par exemple F<sup>-</sup> et CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) peuvent s'attacher préférentiellement sur des sites différents d'un stéroïde bifonctionnel. Pour cela, les groupes fonctionnels doivent être séparés dans l'espace et offrir des valeurs de GA qui ne sont pas égales.

Pour tester cette hypothèse, les fragmentations de plusieurs adduits anioniques de la pregnénolone réduite ont été étudiées. La pregnénolone possède deux fonctions chimiques différentes : un groupe hydroxyle à la position 3 et une cétone sur le carbone 20 (Schéma 15a). Bien que les deux sites soient candidats pour l'attachement anionique (le proton en position  $\alpha$  d'une cétone est labile), il a été décidé de réduire la cétone pour obtenir un stéroïde bifonctionnel avec le même groupe fonctionnel (hydroxyle) à chaque extrémité de la molécule. Les deux groupements hydroxyle ont la même fonction chimique (alcool tertiaire) mais un environnement légèrement différent. On s'attend donc à ce que leurs valeurs de GA soient distinctes, bien que proches. Afin d'obtenir des informations pertinentes sur les schémas de fragmentation de la pregnénolone réduite, les expériences ont également été menées sur la d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone réduite. Les analogues avec isotopes lourds sont communément utilisés en spectrométrie de masse pour différencier les décompositions pouvant impliquer deux sites différents de la molécule. La réaction de réduction à partir de la d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone pour aboutir à son analogue réduit est présentée dans le Schéma 15b (procédure complète Annexe E, page 150). La stéréochimie du centre chiral formé en position 20 du produit est inconnue, mais n'est pas critique dans le but de cette expérience. L'analyse par MS du produit final a révélé une conversion de 100 % pour cette réaction (i.e. on n'observe aucun signal pour la pregnénolone sur le spectre).

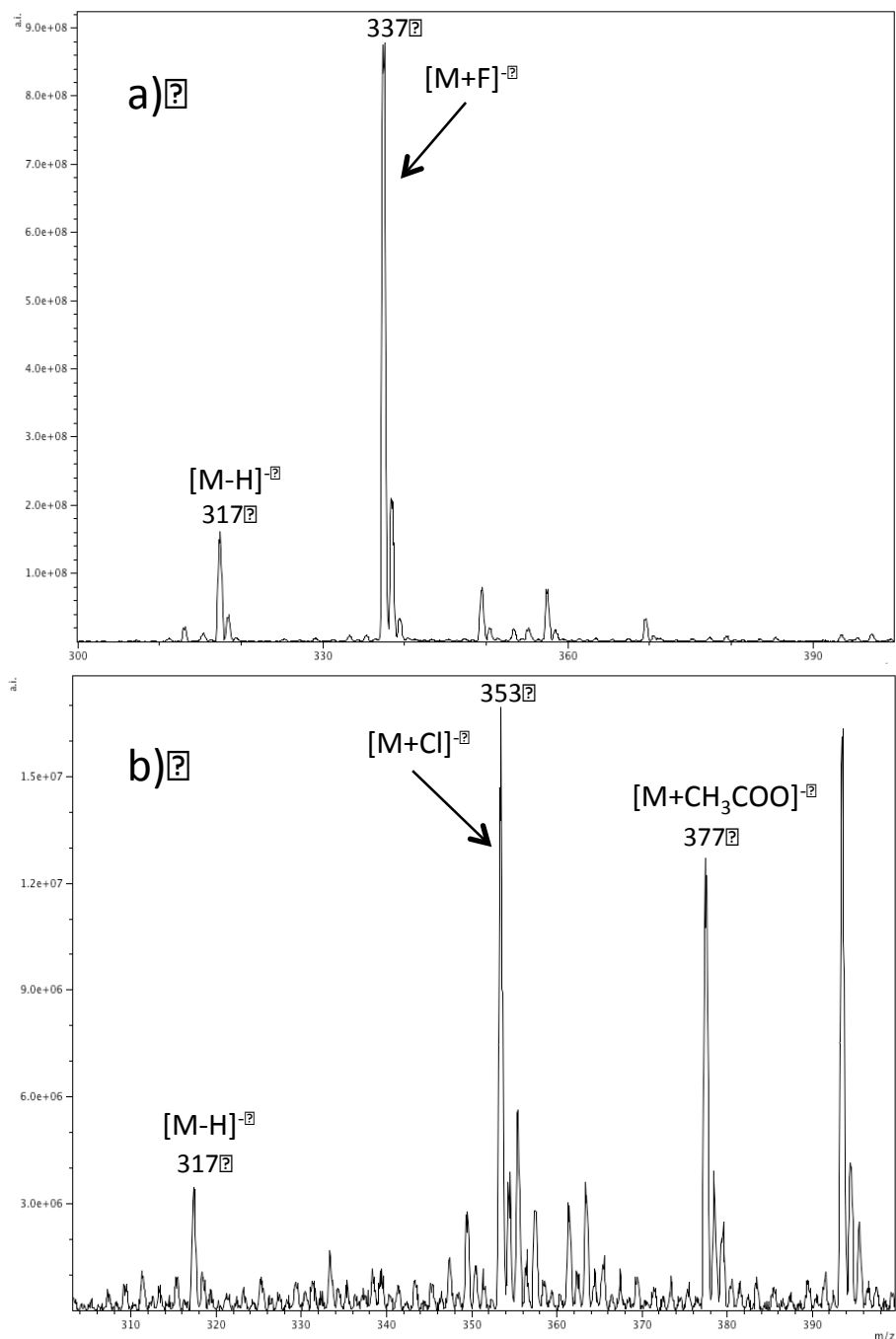


**Schéma 15.** (a) Rappel de la numérotation des carbones sur le squelette stéroïdien et (b) réaction de réduction de la d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone.

## 1.2. Etude des décompositions de la pregnénolone, pregnénolone réduite et d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone réduite.

En utilisant un seul stade de MS (Figure 3), il est difficile d'estimer l'emplacement d'attachement de l'anion sur le stéroïde. La régiosélectivité de l'attachement anionique peut être mise en évidence par l'observation de décompositions régiospécifiques d'un site particulier d'attachement de l'anion, ces voies n'étant pas accessibles aux adduits résultant d'un attachement sur un autre site du stéroïde. Pour cela, des expériences MS/MS CID sont nécessaires afin d'étudier les mécanismes de fragmentation mis en jeu et déterminer lesquels sont régiospécifiques.

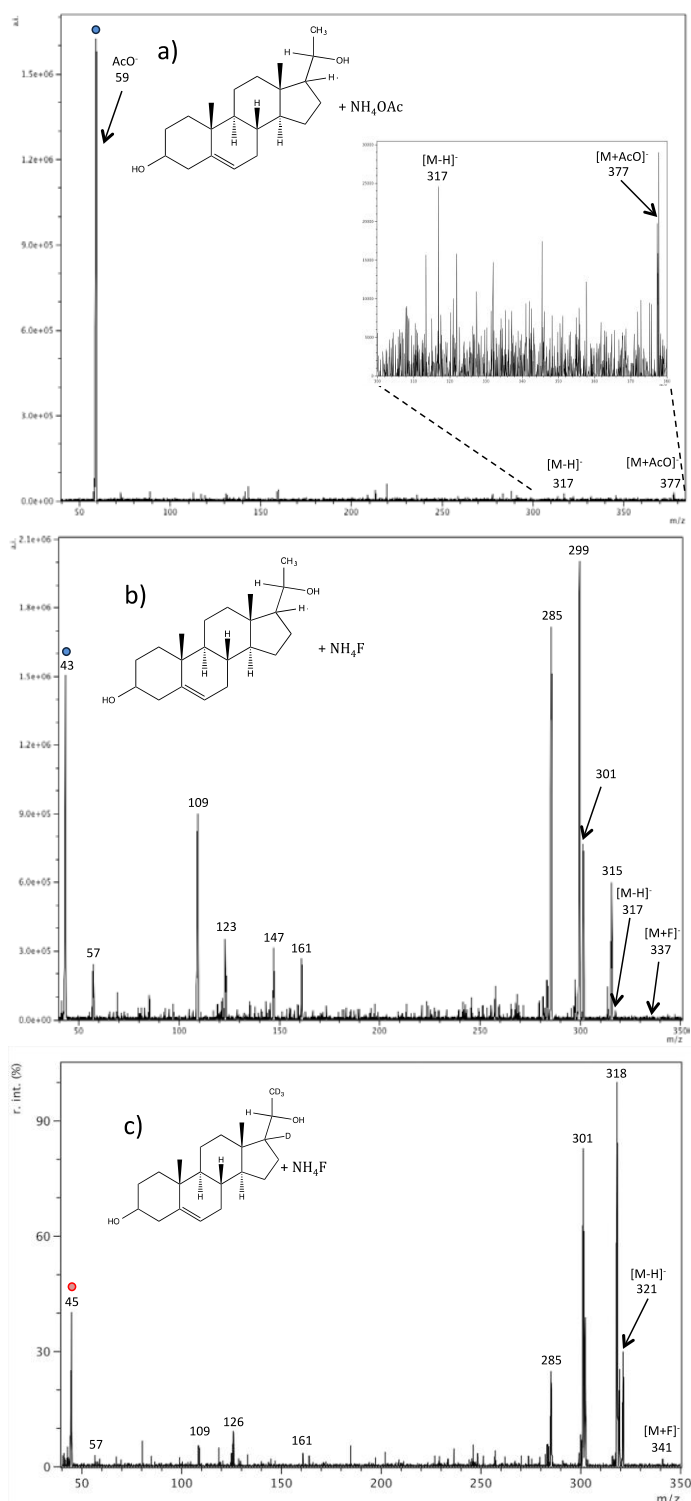




**Figure 3.** Spectres de masse pour la pregnénolone réduite en mélange avec un ratio molaire 1:100 de (a) NH<sub>4</sub>F et (b) NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO

Les expériences de MS sur la pregnénolone réduite ont révélé que parmi l'ensemble des anions testés, de bons signaux d'ions négatifs pouvaient être obtenus à la fois pour [M+F]<sup>-</sup> (Figure 3a) et [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup> (Figure 3b). L'acidité en phase gazeuse de ces anions est connue : GA(HF) = 1530 kJ/mol<sup>199,200</sup> et GA(CH<sub>3</sub>COOH) = 1429 kJ/mol<sup>201,199</sup> et ces valeurs sont assez éloignées pour envisager que chaque anion s'attache préférentiellement à un site distinct du stéroïde (notamment ici sur un des deux groupements hydroxyde, sous réserve que

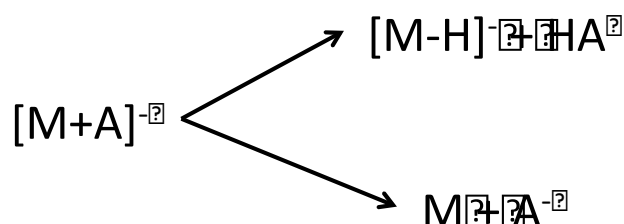
ces deux sites présentent des GA suffisamment distinctes).<sup>124,202</sup> La fragmentation de ces adduits a été étudiée par CID et les spectres MS/MS obtenus sont présentés sur les Figures 4a et b.



**Figure 4.** Spectres MS/MS CID de l'ion adduit issu de la pregnénone réduite avec (a)  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  et (b)  $\text{F}^-$ , et (c) de la  $\text{d}_4$ -17,21,21,21-pregnénone réduite avec  $\text{F}^-$ . Les énergies de fragmentation sont optimisées pour l'obtention d'une intensité maximale du pic  $m/z$  43/45.

Les profils de fragmentation sont notablement différents pour les deux espèces. La fragmentation de l'adduit de fluorure ( $m/z$  337) conduit à la formation de plusieurs ions fragments dont les plus abondants sont  $m/z$  315, 299, et 285 (Figure 4b). Au contraire, le spectre CID de l'adduit d'acétate ne présente que peu de fragments avec une faible abondance pour des conditions expérimentales identiques (Figure 4a). Pour les deux adduits, la perte de HA (où A est l'anion utilisé) conduit à la formation des fragments  $[M-H]^-$  ( $m/z$  317). Bien que le rendement soit faible pour l'adduit d'acétate, cela prouve que les deux anions sont capables de capturer un proton du stéroïde, comme prouvé par la présence des espèces déprotonées sur les spectres de masse des adduits fluoré et d'acétate de la pregnénolone réduite (Figure 3).

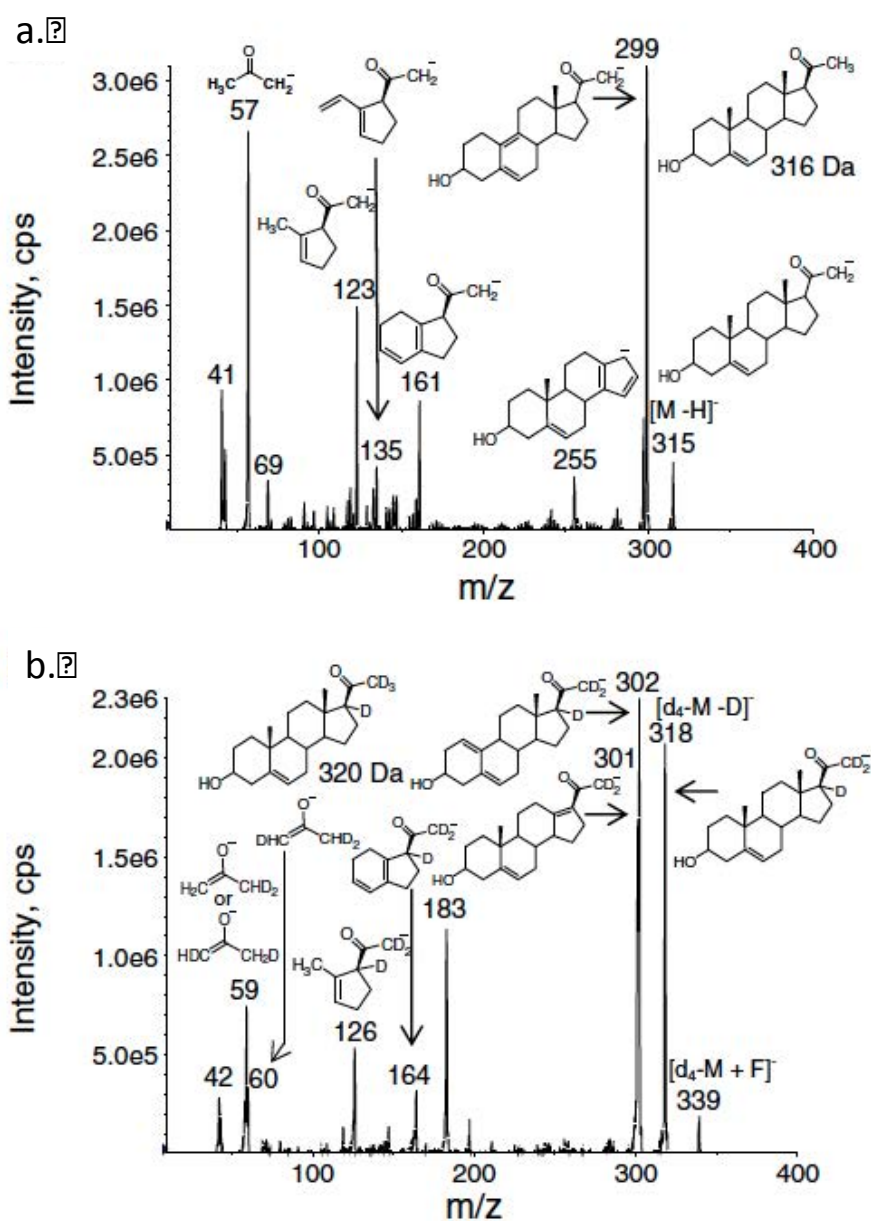
Parmi les fragmentations possibles des adduits anioniques  $[M+A]^-$ , on s'attend à observer une perte neutre de HA ou la formation de  $A^-$  (Schéma 16). Les intensités relatives de ces deux ions peuvent donner des informations sur les valeurs d'acidité des espèces mises en présence. Nous émettons ici l'hypothèse que les fragments obtenus lors de la décomposition par CID des adduits anioniques découlent tous de la forme déprotonée, qui est toujours le premier fragment. Cela peut être prouvé par la comparaison des spectres CID de  $[M+A]^-$  et  $[M-H]^-$  : si les mêmes fragments sont présents, alors l'hypothèse est correcte. Cependant le but de ces expériences étant la régiosélectivité de l'attachement anionique, seuls les adduits ont été étudiés en fragmentation. Bien que cette considération n'ait pas été étudiée spécifiquement, l'optimisation des transitions de 14 stéroïdes (cf : chapitre suivant) a révélé que l'on observe pas de fragment présent sur le spectre MS/MS CID de l'adduit fluoré qui n'est pas également présent sur le spectre MS/MS CID de l'espèce déprotonée. Nous considérons donc ici que l'hypothèse est, si ce n'est correcte, non réfutée par l'expérience.



**Schéma 16.** Voies de dissociation possibles pour un adduit anionique de stéroïde. M représente le stéroïde neutre et  $A^-$  l'anion.

Ainsi, la présence de l'ion  $m/z$  59 comme pic de base du spectre MS/MS CID de l'adduit d'acétate de la pregnénolone réduite indique que l'acide acétique a une acidité plus grande que le stéroïde (i.e. une valeur de  $GA$  plus petite). L'anion acétate cède facilement le

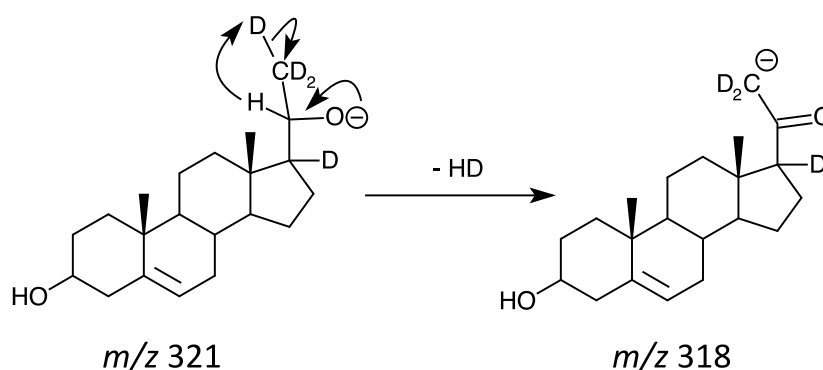
proton partagé au stéroïde ce qui est illustré par le très faible signal correspondant à l'ion  $[M-H]^-$ . Cette observation contraste fortement avec le comportement de  $F^-$  qui arrive à capturer au moins un proton du stéroïde et forme ainsi une espèce déprotonée avec un rendement beaucoup plus important qu'avec l'acétate. On peut noter que l'ion  $[M-H]^-$  ( $m/z$  317) produit ne présente pas un signal très élevé par rapport à  $m/z$  315 (Figure 4b). Cela est attribué notamment à l'oxydation de cet ion menant à la formation de l'ion  $m/z$  315 par perte de  $H_2$ . L'ion  $m/z$  315 possède vraisemblablement la structure de la pregnénolone déprotonée. En effet, cet ion a été étudié par attachement anionique et il a pu être montré que l'ion  $[M-H]^-$  menait majoritairement à l'ion  $m/z$  299 par perte de  $CH_4$  (Figure 5).<sup>124</sup>



**Figure 5.** Spectres de fragmentation CID de l'adduit fluoré de (a) la pregnénolone et (b) la d<sub>4</sub>-pregnénolone. Reproduit de la référence 109.<sup>124</sup>

Certains ions du spectre de la Figure 4b proviennent au moins en partie de cette espèce oxydée, comme les ions  $m/z$  299, 161, 123, 57 et 41. Cette comparaison est intéressante à faire puisqu'elle permet d'identifier les fragments spécifiquement issus de la pregnénolone réduite tels que les ions  $m/z$  285, 147, 109 et 43. Ainsi, en plus d'avoir une première indication de l'acidité du stéroïde en comparaison de l'acide fluorhydrique (i.e. le stéroïde possède au moins un site plus acide que l'acide fluorhydrique), il peut être possible d'obtenir des détails sur le site d'attachement de l'anion grâce à cette fragmentation spécifique.

Avant d'aller plus loin dans cette analyse, des expériences avec un isotope marqué de la pregnénolone réduite ont été effectuées. Comme pour la pregnénolone réduite, l'adduit fluoré et l'espèce déprotonée sont tous deux observés sur le spectre de masse. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 4c (spectre MS/MS CID de l'adduit fluoré de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnénolone réduite). La première observation sur le spectre de l'analyte deutéré est que l'ion  $[M+F]^-$  ( $m/z$  341) présente un déplacement de +4 unités de masse correspondant bien à l'ajout de 4 atomes de deutérium, non concernés par la déprotonation ( $m/z$  337  $\rightarrow$   $m/z$  341). On observe le même déplacement pour l'espèce déprotonée  $[M-H]^-$  ( $m/z$  317  $\rightarrow$   $m/z$  321). Cet ion subit, comme son analogue non-deutééré, une réaction d'oxydation se traduisant par une perte de HD majoritaire (par rapport à une perte de  $H_2$  ou  $D_2$ ) en accord avec le mécanisme présenté sur le Schéma 17.

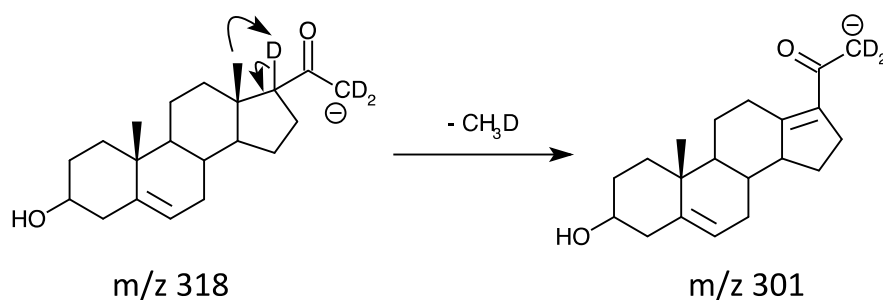


**Schéma 17.** Proposition de mécanisme pour la perte de 3 Da observée lors de la fragmentation de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnénolone réduite.

Cette première observation permet de montrer sans ambiguïtés que la réaction se fait sur le site portant les atomes de deutérium et aussi que l'un des sites avérés de déprotonation de la pregnénolone réduite est le groupe hydroxyle du cycle D (en haut de la molécule).

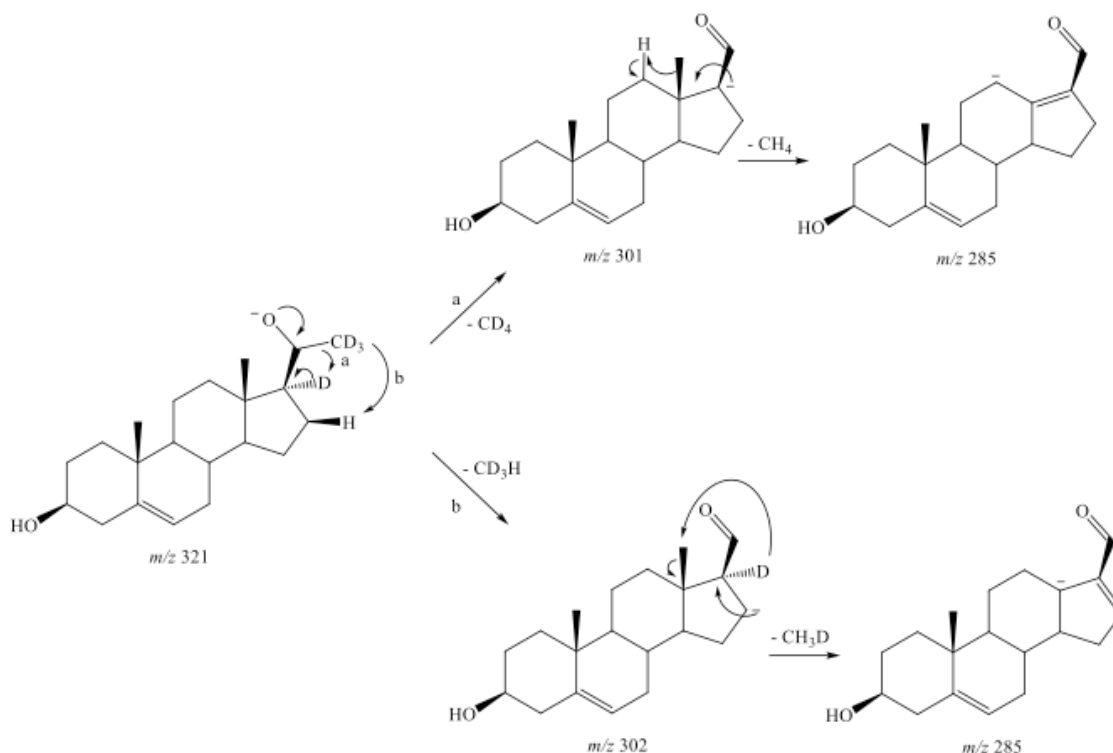
Ensuite parmi les autres ions observés sur le spectre de masse de la Figure 4c, on peut voir l'ion  $m/z$  299 qui s'est totalement déplacé à  $m/z$  301 (+ 2 deutériums). La formation de

cet ion peut s'expliquer par la perte de  $\text{CH}_3\text{D}$  consécutive à partir de l'ion  $m/z$  318 (de façon similaire à la perte de  $\text{CH}_4$  pour l'ion  $m/z$  315), comme proposé sur le Schéma 18.



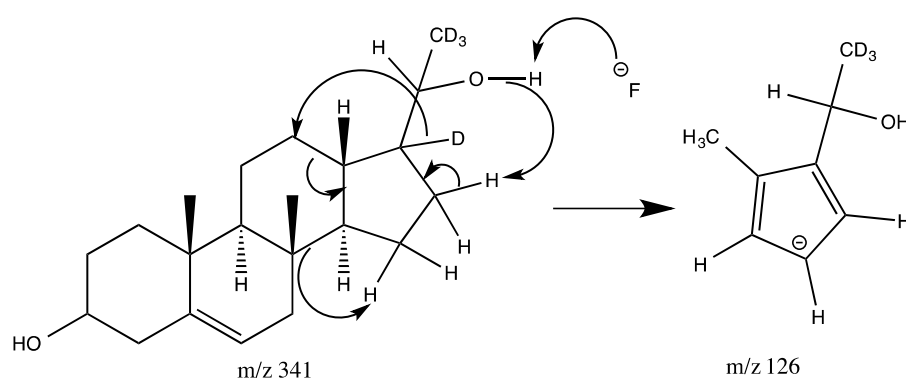
**Schéma 18.** Proposition de mécanisme pour la perte consécutive de 17 Da à partir de l'ion  $m/z$  318 observée lors de la fragmentation de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnénolone réduite.

Par ailleurs, l'ion  $m/z$  285 est observé sans déplacement sur la Figure 4c. Cet ion est vraisemblablement formé par perte de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (respectivement  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) à partir de l'ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  317 de la pregnénolone (respectivement  $m/z$  321,  $[\text{d}_3\text{-M}-\text{H}]^-$  pour l'analogue deutéré). Cette transition est spécifique à la pregnénolone réduite car cet ion produit n'est pas observé sur le spectre CID de la pregnénolone (Figure 5). Son mécanisme de formation est proposé dans le Schéma 19.



**Schéma 19.** Mécanisme proposé pour la perte de 36 Da à partir de l'ion  $m/z$  321 observée lors de la fragmentation de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnénolone réduite conduisant à la formation de  $m/z$  285.

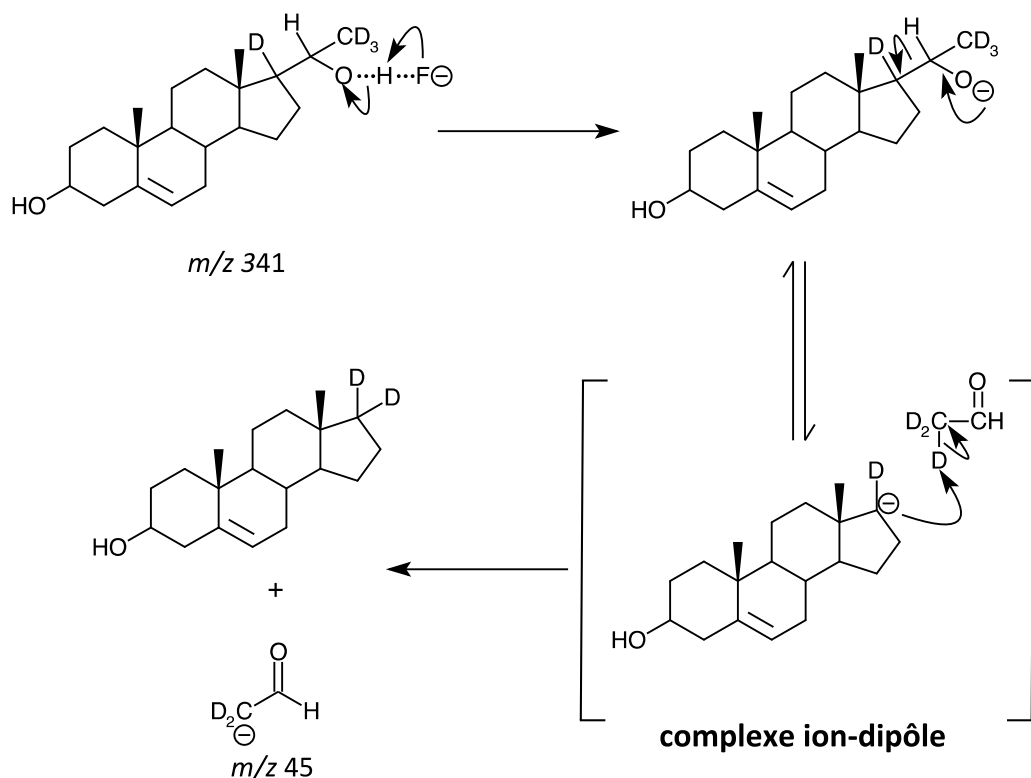
Concernant les fragments de plus basse masse, les ions  $m/z$  161, 109 et 57 ne subissent pas de déplacement de masse lorsque l'analogue deutéré est étudié, contrairement aux ions  $m/z$  123 et 43 qui présentent un déplacement quantitatif (i.e. total) de +3 et +2 Da, respectivement. Nous avons d'abord porté notre intérêt sur la formation de l'ion  $m/z$  126. Le déplacement observé (+3 Da) par rapport au même fragment de l'analogue non-deutééré suggère que le mécanisme de formation a lieu au niveau du cycle D contenant les atomes de deutérium (car l'ion  $m/z$  126 en contient 3). Une proposition de mécanisme est présentée pour la formation de cet ion sur le Schéma 20.



**Schéma 20.** Proposition de mécanisme pour la formation de l'ion fragment  $m/z$  126 lors de la fragmentation de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnénolone réduite.

Dans une première étape, l'ion fluorure abstrait un proton du groupe hydroxyle porté par le carbone 20, résultant en la perte de HF. Un transfert de proton a ensuite lieu depuis le site alcoolate en C16, qui conduit à une série de décompositions induites par la charge qui aboutissent finalement à la formation d'un anion aromatique (cycle à 5 carbones stabilisé par résonance) à  $m/z$  126. L'ion produit  $m/z$  123 (Figure 4b) est formé par un mécanisme similaire où les deutériums sont remplacés par les protons.

Concernant ensuite l'ion  $m/z$  45 (déplacement de +2 Da par rapport à l'ion  $m/z$  43), on peut envisager un mécanisme de formation tel que celui présenté sur le Schéma 21.

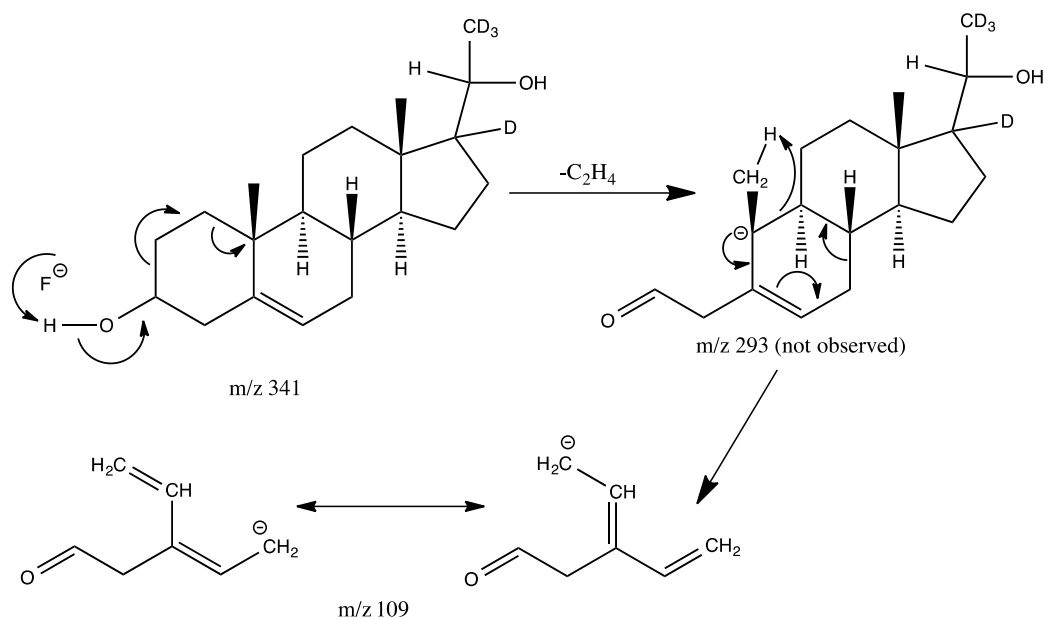


**Schéma 21.** Mécanisme proposé pour la formation de l'ion fragment  $m/z$  45 obtenu par décomposition de l'adduit fluoré de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnénolone.

Lorsque l'adduit précurseur  $m/z$  341 [ $d_4$ -M+F]<sup>-</sup> est fragmenté par CID, la première étape consiste en l'abstraction d'un proton du groupe hydroxyle porté par le carbone en position 20 du stéroïde par le fluorure, résultant en la perte d'acide fluorhydrique HF. Cela est confirmé par la présence de [M-H]<sup>-</sup> et l'absence de l'espèce [M-D]<sup>-</sup> dans le spectre CID de la Figure 4c. A la suite de cette première étape, la molécule peut être amenée à se réarranger par mésomérie avec un départ initial de CD<sub>3</sub>CHO, mais ce fragment neutre reste dans les environs du stéroïde négativement chargé, formant un intermédiaire appelé complexe ion-dipôle (ou complexe ion-neutre).<sup>203</sup> Le carbanion en position 17 sur le cycle D récupère ensuite un cation D<sup>+</sup> du groupement CD<sub>3</sub> du fragment neutre formant ainsi le composé [CD<sub>2</sub>CHO]<sup>-</sup> ( $m/z$  45) stabilisé par résonance. Ce mécanisme permet d'expliquer à la fois la formation du fragment  $m/z$  45 depuis le précurseur deutéré et la formation de  $m/z$  43 lors de l'expérience sur la pregnénolone réduite non-deutérée. Le déplacement de  $m/z$  43 à  $m/z$  45 étant quantitatif lorsque le composé deutéré est utilisé, l'hypothèse du mécanisme proposé qui implique une interaction du fluorure avec le groupe hydroxyle présent sur le cycle D du stéroïde est renforcée.



Concernant les ions fragments ne présentant pas de déplacement d'unité de masse, on peut tout d'abord observer l'ion  $m/z$  109 pour lequel le Schéma 22 présente le mécanisme proposé pour sa formation. Cet ion n'est pas observé sur le spectre de masse de la pregnénolone alors qu'on pourrait s'y attendre car le site impliqué y est également présent. Cette observation permet ainsi de renforcer l'hypothèse d'un attachement régiosélectif du  $F^-$  sur la pregnénolone : bien que présent sur cette molécule, le site hydroxyle ne peut pas avoir de déprotonation et ainsi l'ion fragment  $m/z$  109 n'est pas observé.



**Schéma 22.** Mécanisme proposé pour la formation de l'ion fragment  $m/z$  109 lors de la fragmentation de la  $d_4$ -17,21,21,21-pregnenolone réduite passant par une réaction retro Diels-Alder.

Certains ions fragments présentent un déplacement partiel tels que les ions :  $m/z$  161 (Figure 4b)  $\rightarrow$   $m/z$  161 et 164 (Figure 4c), ainsi que  $m/z$  57 (Figure 4b)  $\rightarrow$   $m/z$  57 et 59 (Figure 4c). Il apparaît que ces fragments peuvent être produits par des voies de décompositions impliquant des atomes de deutérium, ou pas. Leur mécanisme de formation est donc plus ambigu. Le cas de l'ion produit  $m/z$  161 est intéressant à étudier car dans la fragmentation de la pregnénolone (Figure 5), le déplacement observé est quantitatif :  $m/z$  161  $\rightarrow$  164 lorsque l'analogue deutéré est utilisé. On en conclut que la formation de cet ion provient d'une voie de décomposition provenant du cycle D du stéroïde où les atomes de deutérium sont localisés. Or dans les expériences réalisées sur la pregnénolone réduite et la pregnénolone deutérée réduite, l'ion  $m/z$  161 ne présente qu'un déplacement partiel ( $m/z$  161  $\rightarrow$  161 et 164). De façon similaire à la pregnénolone, ce fragment  $m/z$  164 est vraisemblablement formé à partir du cycle D. Au contraire, l'ion produit  $m/z$  161 (Figure 4c) n'implique par d'atomes de deutérium dans son mécanisme de formation, ce qui indique qu'il est produit par une voie de

décomposition prenant origine sur le cycle A du stéroïde. Cette observation met en lumière la différence de comportement de la pregnénolone et de son analogue réduit (deutérisé ou non) face à l'attachement anionique. Dans le cas de la pregnénolone, on obtient un déplacement quantitatif ce qui montre qu'il y a un seul mécanisme de formation de l'ion, et que l'attachement est régiosélectif. Cela est probablement dû à la grande différence de valeur de  $G_A$  entre le groupement cétone du cycle D et l'hydroxyle du cycle A. Au contraire, dans le cas de la pregnénolone réduite, l'expérience indique qu'il y a 2 mécanismes intervenant pour la formation de cet ion produit : l'un provenant du cycle D et impliquant les deutériums, et l'autre ayant pour origine le cycle A (fragment de même masse pour la pregnénolone réduite et son analogue deutéré). Deux sites d'attachement du fluorure sont donc impliqués pour la pregnénolone réduite (attachement non régiosélectif) et un seul pour la pregnénolone, pour laquelle l'attachement anionique est régiosélectif.

Enfin, le dernier ion produit spécifique à la pregnénolone réduite est  $m/z$  147. L'intensité de cet ion pour la fragmentation du composé deutéré est trop faible pour évaluer son déplacement. Il n'est donc pas possible de tirer de conclusions quant au mécanisme de formation de ce fragment ou la position de l'attachement du fluorure qui conduit à cette décomposition.

L'analyse des spectres de masse de la pregnénolone réduite deutérée et non-deutérée et leur comparaison avec le spectre de masse de la pregnénolone ont permis de montrer que ces 2 stéroïdes possèdent des fragments en commun, ce qui est une information importante dans le choix des transitions SRM permettant l'analyse de ces composés. Ainsi, pour la pregnénolone réduite, les ions fragments  $m/z$  285, 147, 109, et 43 semblent être les plus indiqués puisqu'ils sont formés spécifiquement par le composé réduit et non par son analogue oxydé. Les composés de départ n'ont certes pas la même masse mais ils sont proches ( $m/z$  315 vs.  $m/z$  317 pour les ions  $[M-H]^-$  de la pregnénolone et de la pregnénolone réduite, respectivement), ce qui peut éventuellement entraîner une séparation LC moins efficace qu'avec des composés de masse très différente. De plus la pregnénolone réduite subit une oxydation massive qui produit l'ion  $m/z$  315 dans son spectre de masse. Il est donc important de choisir des transitions bien spécifiques à chaque stéroïde.

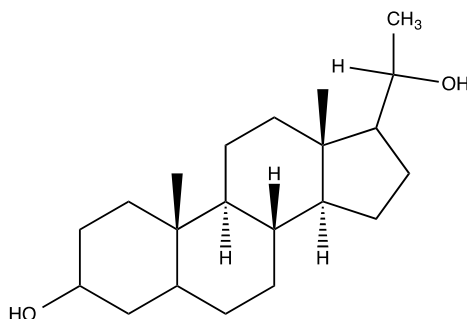
Par ailleurs, l'analyse des spectres de masse a pu confirmer que l'attachement du fluorure se fait de façon régiosélective sur la pregnénolone contrairement à sa forme réduite où des fragments issus des deux sites de déprotonation sont observés. Afin de valider ces

hypothèses, des calculs d'acidités en phase gazeuse de différents sites de ces stéroïdes ont été effectués, ainsi que l'étude d'un troisième stéroïde, la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol.

### 1.3. La 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol, un analogue avec une acidité en phase gazeuse réduite

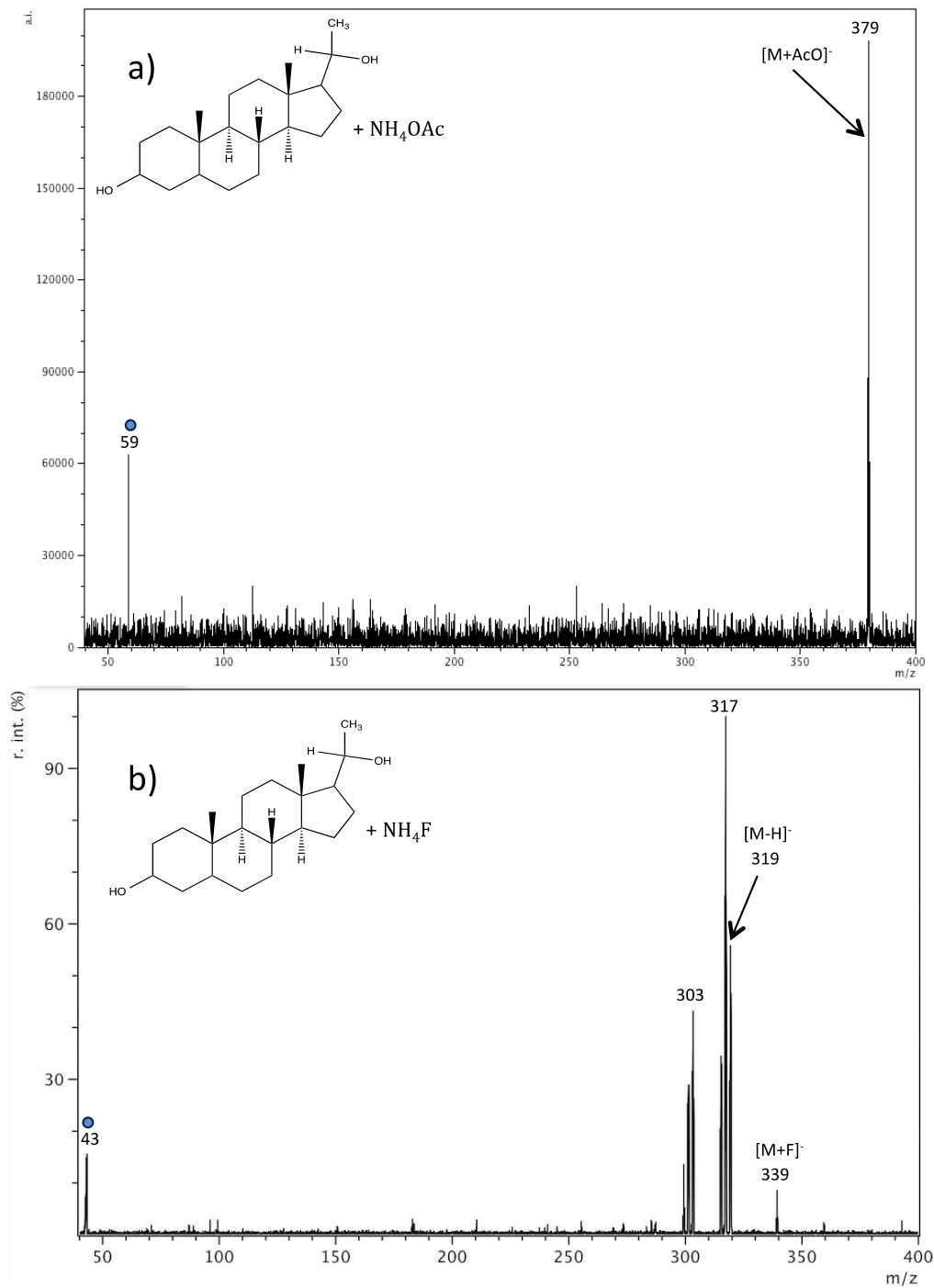
*En collaboration avec Héloïse Dossmann*

Afin de renforcer les résultats expérimentaux de la pregnénolone réduite, un autre stéroïde a été étudié pour l'attachement anionique régiosélectif : la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol (5- $\alpha$ -pregnane). Elle partage une structure similaire avec la pregnénolone réduite, à la différence que la double liaison en position 5 de cette dernière est saturée sur la 5- $\alpha$ -pregnane (Schéma 23).



**Schéma 23.** Structure de la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol

Le stéroïde est analysé dans MeOH/H<sub>2</sub>O (90/10 v/v) après ajout d'un excès de NH<sub>4</sub>F ou NH<sub>4</sub>OAc. Les adduits des deux anions sont observés avec une bonne intensité et sont sélectionnés comme précurseurs pour fragmentation CID. Les spectres MS/MS de ces espèces sont montrés en Figure 6.

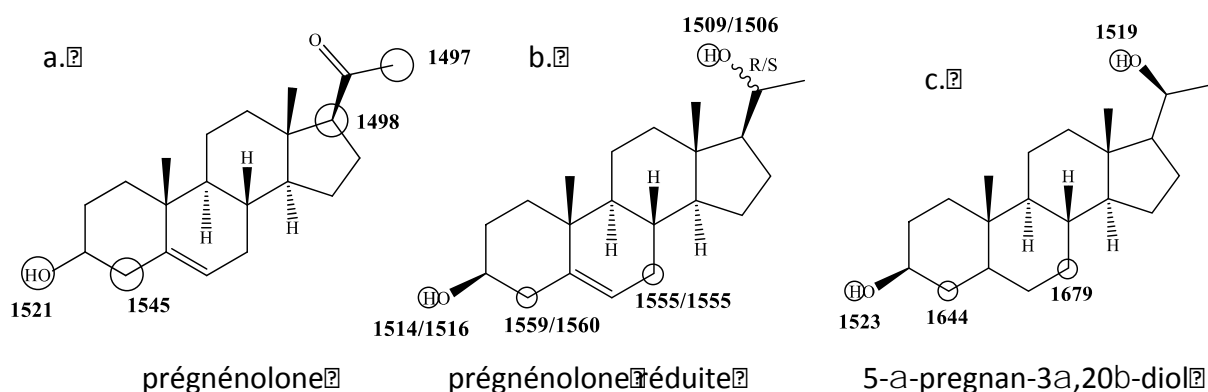


**Figure 6.** Spectres obtenus par fragmentation CID de la 5- $\alpha$ -pregnane avec (a)  $\text{NH}_4\text{F}$  et (b)  $\text{NH}_4\text{OAc}$ .

La comparaison des deux spectres CID issus des adduits anioniques de la 5- $\alpha$ -pregnane conduit à des observations similaires à celles obtenues pour les décompositions de la pregnénolone réduite. Alors que l'espèce  $[\text{M}+\text{F}]^-$  donne des ions fragments de grande intensité à  $m/z$  319, 317 et 303, l'adduit d'acétate produit un spectre avec un rapport signal-sur-bruit faible avec peu de fragments identifiables. On remarque notamment dans la Figure

6b la présence d'un ion fragment  $m/z$  43 comme observé dans la Figure 4b pour la décomposition de  $[M+F]^-$  de la pregnénolone réduite. Un mécanisme de décomposition similaire à celui décrit dans le Schéma 21 peut aussi être proposé pour la 5- $\alpha$ -pregnane. On en déduit alors que le fluorure s'attache sur le groupe hydroxyle du cycle D de ce composé.

Une autre observation intéressante est l'absence complète de fragment  $[M-H]^-$  pour les décompositions de  $[M+CH_3COO]^-$  de la 5- $\alpha$ -pregnane, même à faible rendement (Figure 6a), ce qui contraste avec le résultat obtenu pour la fragmentation de la même espèce avec la pregnénolone réduite (Figure 4a), où  $[M-H]^-$  est observé (bien qu'à faible abondance). La différence structurale entre ces deux composés, bien que faible, semble donc avoir une influence sur les valeurs de GA des différents sites de la molécule et aussi la capacité du stéroïde à former  $[M-H]^-$ . Afin d'expliquer les différences observées sur les spectres de masse, des calculs de structure électronique ont été effectués pour obtenir une estimation des valeurs de GA de plusieurs sites de la pregnénolone, pregnénolone réduite et 5- $\alpha$ -pregnane (Figure 7 et Annexe F page 151).



**Figure 7.** Acidités calculées en phase gazeuse ( $\Delta G_{\text{acide}}$ ) en kJ/mol de (a) la pregnénolone réduite, (b) pregnénolone réduite, et (c) la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol obtenues au niveau de théorie B3LYP/Def2TZVP//B3LYP/Def2-SVP. Les doubles valeurs pour la pregnénolone réduite correspondent aux stéréochimies R ou S sur le site 20.

La seule différence entre la pregnénolone et son analogue réduit et que ce dernier possède un groupe hydroxyle en position 20 à la place d'un groupement cétone. Cette modification induit une grande variation sur les valeurs de GA pour ces deux stéroïdes. Les résultats montrent que des différences jusqu'à 24 kJ/mol peuvent être observées entre les deux sites les plus acides de la pregnénolone alors que les valeurs de GA sont beaucoup plus

proches pour les sites les plus acides de la pregnénolone réduite et de la 5- $\alpha$ -pregnane (respectivement 10 et 4 kJ/mol). Cette considération permet d'apporter une explication sur les phénomènes observés expérimentalement : la régiosélectivité plus marquée de la pregnénolone est très probablement due à une importante différence de GA entre ses deux groupes fonctionnels, favorisant un site préférentiel pour l'attachement du fluorure. Ce même comportement n'est pas observé avec la pregnénolone réduite dont les deux groupes hydroxyle ont des valeurs de GA proches. Ainsi il n'y a pas de site principalement préférentiel sur cette molécule quant à l'attachement du fluorure. Un autre paramètre à prendre en compte est que la production de  $[M-H]^-$  lors de la décomposition d'un adduit anionique est favorable thermodynamiquement quand  $\Delta G_{\text{acide}}(\text{groupe fonctionnel}) < \Delta G_{\text{acide}}(\text{anion protoné})$ , sachant que  $\Delta G_{\text{acide}}(\text{AcOH}) = 1427$  kJ/mol et  $\Delta G_{\text{acide}}(\text{HF}) = 1529$  kJ/mol. Les valeurs de GA obtenues par les calculs montrent que pour la pregnénolone réduite, les protons des deux groupes hydroxyle remplissent cette condition et peuvent donc potentiellement être arrachés pour produire l'espèce déprotonée. Dans le cas de la pregnénolone, les protons en  $\alpha$  de la cétone ont des GA qui permettent également de former  $[M-H]^-$ . Cependant, le proton du groupe hydroxyle sur le groupe A a une valeur de GA de 1521 kJ/mol, soit une faible différence (de 8 kJ/mol) avec l'anion fluorure. Dans un cas, la réaction est exothermique ( $GA(M_{\text{cycleA}}) - GA(A) = 8$  kJ/mol), dans l'autre elle est très exothermique ( $GA(M_{\text{cycleD}}) - GA(A) = 30$  kJ/mol), la voie majoritaire de la réaction de déprotonation est donc la seconde, qui correspond à un attachement du fluorure sur le cycle D. Ces considérations apportent une explication supplémentaire sur la régiosélectivité observée avec la pregnénolone.

Si l'on s'intéresse à présent à la comparaison de la pregnénolone réduite avec la 5- $\alpha$ -pregnane, il est intéressant de noter que la présence de la double liaison en position 5 a une influence marquée sur les GA des protons des groupes hydroxyle : la saturation de la liaison en position 5 induit une augmentation globale des valeurs de GA, i.e. une réduction de l'acidité des protons. Les résultats révèlent que l'acétate est une base trop faible pour déprotoner un hydroxyle sur la 5- $\alpha$ -pregnane, étant donné que  $\Delta G_{\text{acide}}(\text{AcOH}) = 1427$  kJ/mol, ce qui est en dessous de toutes les valeurs trouvées (idem pour la pregnénolone réduite, mais l'écart entre les valeurs est plus faible). Cela explique pourquoi le CID de  $[M+AcO]^-$  de la 5- $\alpha$ -pregnane a conduit à une perte significative d'anion acétate et à l'absence de  $[M-H]^-$  dans le spectre. De plus,  $\Delta G_{\text{acide}}(\text{HF}) = 1529$  kJ/mol, montrant que la déprotonation du groupe hydroxyle porté par le cycle A de la 5- $\alpha$ -pregnane n'est en théorie pas possible. Même en

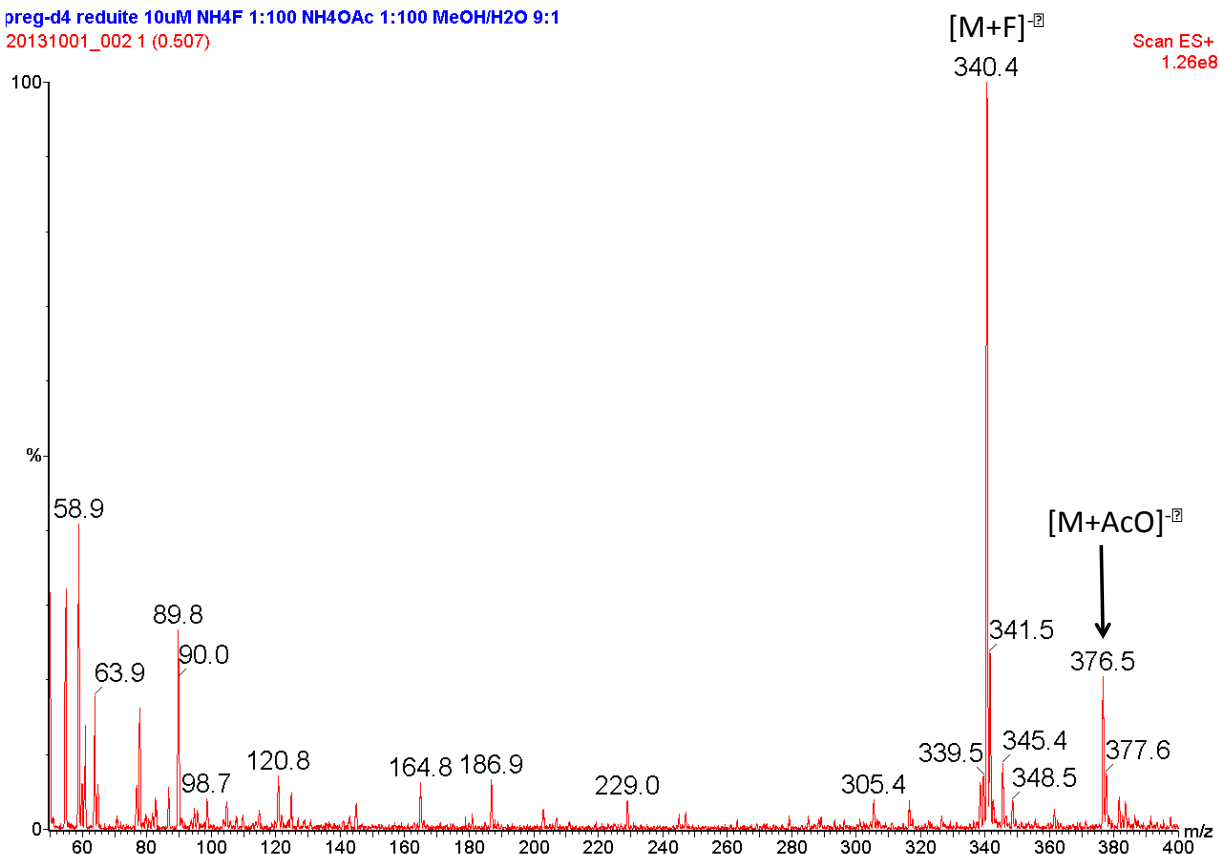
mettant ces données en relation avec les résultats expérimentaux de fragmentation (Figure 6), il apparaît qu'il est difficile de tirer des conclusions définitives quant à l'attachement anionique sur la 5- $\alpha$ -pregnane. En effet, le spectre de fragmentation de l'adduit d'acétate ne produit qu'un seul fragment correspondant à la perte de l'anion. Quant aux tests avec le fluorure, on obtient uniquement des ions produits issus de décompositions depuis le cycle D : perte de HF pour à partir du précurseur pour  $m/z$  319 (=  $[M-H]^-$ ), perte de  $H_2$  à partir de  $m/z$  319 pour  $m/z$  317, perte de  $CH_4$  à partir de  $m/z$  319 pour  $m/z$  303, et  $m/z$  43 est formé par le mécanisme présenté sur le Schéma 21. Etant donné qu'aucun fragment ne provient d'une voie de décomposition débutant par une déprotonation du cycle A, il n'est pas possible de conclure sur le site d'attachement du fluorure.

Cette étude met en lumière la difficulté de prouver la régiosélectivité de l'attachement anionique, puisque l'absence de fragments provenant de décompositions partant d'une région précise de la molécule n'implique pas forcément que l'anion ne s'y attache pas. Nous avons cependant obtenu plusieurs résultats qui tendent vers les mêmes conclusions : (i) l'attachement anionique sur la prégnénolone est régiosélectif, mais (ii) il ne l'est pas sur son analogue réduit (attachement du fluorure sur les cycles A et D, comme montré par les ions déplacés partiellement) et (iii) l'expérience et la théorie ne permettent pas de conclure sur les sites d'attachement du fluorure sur la 5- $\alpha$ -pregnane.

## 2. Double attachement anionique

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du phénomène d'attachement anionique, des expériences supplémentaires ont été réalisées.

Le test consiste à ajouter deux anions distincts (fluorure et acétate) dans une solution MeOH/H<sub>2</sub>O (90/10 v/v) à 10  $\mu$ M de d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone réduite. Le ratio molaire anion:stéroïde est de 100:1. La solution est analysée en MS simple (Figure 8). Il est important de préciser que la différence de  $m/z$  obtenu pour  $[M+F]^-$  (Figure 4 :  $m/z$  341 et Figure 8 :  $m/z$  340,4) est due à un décalage de la calibration de l'instrument utilisé (TQ avec source ESI).



**Figure 8.** Spectre MS d'une solution de 10  $\mu$ M d<sub>4</sub>-17,21,21,21-pregnénolone réduite en présence de NH<sub>4</sub>F et NH<sub>4</sub>OAc en ratio 100:1 avec le stéroïde.

Le postulat est que si les anions s'attachent à des sites du stéroïde différents, il devrait être possible d'obtenir une espèce avec double attachement anionique du fluorure et de l'acétate. Expérimentalement, le spectre exhibe des pics importants pour les deux adduits de  $[M+F]^{-}$  et  $[M+AcO]^{-}$ . L'examen du reste du signal obtenu révèle l'absence de pics à l'état de charge -2 ce qui prouve que le stéroïde avec les deux anions attachés n'est pas formé ou détecté.

Plusieurs facteurs peuvent être évoqués pour expliquer la non-observation de l'espèce recherchée :

- L'attachement anionique n'est pas assez spécifique pour avoir les deux anions sur la même molécule. Le même site est préférentiel pour les deux anions et on n'observe de ce fait que les adduits classiques avec un seul anion à la fois.
- La structure moléculaire du stéroïde est petite il est donc possible que des phénomènes de répulsion électrostatique entre les deux anions chargés négativement entrent en jeu. Une fois qu'un anion s'est attaché au stéroïde, l'environnement devient trop défavorable pour que l'autre puisse venir dans les environs de la molécule. Cette idée



peut être étendue au fait que le stéroïde est de manière générale trop petit pour être doublement chargé. Il n'a pas été possible de trouver dans la bibliographie actuelle de rapport de la formation d'un stéroïde doublement chargé en ESI.

- L'espèce est présente mais en faible quantité et n'est donc pas détectée par l'instrument. Son signal est trop faible en comparaison de celui des adduits (notamment  $[M+F]^-$ ).
- Les paramètres instrumentaux (cône de désolvatation, tension du capillaire, etc) ont été optimisées pour cette analyse, mais d'autres facteurs n'étaient peut-être pas assez adaptés pour la détection d'une espèce doublement chargée à faible  $m/z$  : concentration des anions en solution, gamme de masse scannée par le quadripôle, paramètres de guidage optique, etc.

### **3. Conclusions de l'étude de la régiosélectivité de l'attachement anionique**

Bien qu'une étude précédente ait mis en évidence la régiosélectivité de l'attachement anionique sur la pregnénolone,<sup>202</sup> les expériences menées au cours de ce doctorat apportent des nouvelles informations quant à ce phénomène.

La pregnénolone réduite possède deux groupements hydroxyle à chaque extrémité de la molécule, dont les protons sont tous deux susceptibles d'être un site pour l'attachement anionique. L'utilisation d'acétate et de fluorure en mélange avec ce composé a révélé qu'il était possible de former les adduits  $[M+AcO]^-$  et  $[M+F]^-$  à bonne intensité. La fragmentation de l'adduit d'acétate ne permet pas d'apporter beaucoup d'informations si ce n'est que l'adduit est très peu stable, comme mis en évidence par la présence d'un pic de base correspondant à cet anion. L'adduit fluoré est plus intéressant puisque l'on a réussi à identifier des fragments qui sont spécifiques à la pregnénolone réduite et qui ne sont pas observés lors de la fragmentation de son analogue non-réduit. Ces ions produits spécifiques sont primordiaux pour la mise en place de méthodes SRM dans lesquelles les transitions sont spécifiques aux stéroïdes analysés.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la production des fragments de la pregnénolone réduite, son analogue deutéré (la  $d_4$ -17,21,21,21-prégnénolone)

a également été étudiée et fragmentée en CID. Comme pour la pregnénolone réduite, le spectre CID de l'adduit d'acétate ne permet pas de tirer de conclusion satisfaisante. L'analyse des déplacements en masse des fragments a permis de les catégoriser en 3 groupes : ceux qui sont totalement déplacés, ceux qui ne le sont pas du tout, et ceux qui le sont partiellement. Ce dernier groupe est compliqué à comprendre du fait qu'un même fragment peut être produit à la fois par un mécanisme impliquant les atomes de deutérium, et par un autre ne les faisant pas intervenir. Pour les deux autres catégories, il a été possible de rationaliser la plupart des mécanismes de formation de ces ions. Dans le cas des fragments totalement déplacés, il a été conclu qu'ils proviennent de voies de décompositions débutant par une déprotonation du groupe porté par le cycle D, où les atomes de deutérium sont localisés. Au contraire, les fragments restant au même  $m/z$  même lorsque l'analogue deutéré est fragmenté sont de ce fait engendrés par une déprotonation de l'hydroxyle du cycle A. Ces expériences ont donc montré que l'attachement anionique du fluorure et de l'acétate n'est pas régiosélectif sur la pregnénolone réduite.

Bien qu'inattendus, ces résultats soulèvent la question de l'acidité des groupements présents sur une molécule. La réduction du groupe cétone de la pregnénolone a totalement fait perdre la régiosélectivité de l'attachement anionique. Pour élucider ce phénomène, des calculs théoriques d'acidités en phase gazeuse ont été effectués et ont révélé que i) la réduction de la cétone a entraîné une baisse globale de l'acidité des protons du stéroïde, ii) la différence d'acidité entre les deux groupes fonctionnels est beaucoup plus importante entre un hydroxyle et une cétone qu'entre deux hydroxyles. Cette deuxième observation n'est pas surprenante mais elle permet d'apporter un éclairage sur la perte de la régiosélectivité : on peut émettre l'hypothèse que l'attachement anionique n'est régiosélectif que s'il y a une différence d'acidité en phase gazeuse assez importante entre les deux groupes fonctionnels.

Pour mieux évaluer l'effet de la structure du composé étudié, la 5- $\alpha$ -pregnane a également été fragmentée en utilisant comme précurseurs les adduits d'acétate ou de fluorure. Ce composé possède la même structure que la pregnénolone réduite à la différence d'une saturation en position 5. Les spectres CID obtenus n'ont pas permis de tirer de conclusions : celui de l'acétate ne montre que le précurseur et la perte de l'anion. Quant à celui du fluorure, des fragments identiques à ceux obtenus lors de la fragmentation de la pregnénolone réduite sont observés, mais il n'apporte pas d'informations supplémentaires. Il a cependant été noté que l'absence de la double liaison provoque une baisse d'acidité sur l'ensemble de la

molécule. Il est postulé que de ce fait, l'acétate est lui même plus acide que le proton le plus acide de la 5- $\alpha$ -pregnane et ne peut donc pas former l'espèce  $[M-H]^-$ .

Enfin, d'autres tests ont été réalisés pour essayer de comprendre plus en profondeur comment se passe l'attachement anionique. La pregnénolone deutérée a été préparée en mélange avec à la fois le fluorure et l'acétate dans le but de former une espèce doublement chargée. Dans le cas où l'attachement anionique est régiosélectif, il devrait être possible de former une espèce où chaque anion est attaché à une extrémité de la molécule. Cependant ce composé n'a pas pu être observé.

L'attachement anionique présente donc des propriétés intéressantes en spectrométrie de masse pour la fragmentation des composés bifonctionnels. Une perspective pour mieux comprendre ce phénomène serait les analyses de plusieurs stéroïdes bifonctionnels dont les différences de GA entre les deux sites les plus acides sont variables. Cela permettrait ainsi d'évaluer quel écart de GA est nécessaire pour que l'attachement anionique soit régiosélectif.

**Application à  
l'analyse des SAA en  
contrôle antidopage**

L'attachement anionique a été étudié dans son aspect fondamental, mais sa capacité à fournir une charge par la formation d'un adduit anionique ou en favorisant la déprotonation d'une molécule en fait un bon candidat pour ioniser les composés pas ou peu acides. Les SAA font typiquement partie de cette catégorie de composés, et une méthode d'analyse de ces dopants basée sur l'attachement anionique a été mise en place. Les travaux présentés dans ce chapitre présentent les étapes d'optimisation de la méthode de façon à obtenir les meilleures performances possibles, ainsi qu'une évaluation de ses performances analytiques.

## 1. Optimisation des conditions expérimentales

### 1.1. Choix de l'anion

La première étape du développement de l'application de l'attachement anionique à l'analyse des SAA a été de choisir un anion qui offre des performances optimales pour le plus grand nombre de composés. Comme expliqué dans l'introduction, la présence d'un anion en mélange avec l'analyte peut conduire soit à la déprotonation de la molécule soit à la formation d'un adduit anionique. L'anion choisi doit présenter les caractéristiques suivantes : signal élevé pour  $[M-H]^-$  et/ou  $[M+A]^-$  (où M est le stéroïde d'intérêt et A l'anion utilisé), faible contamination, et possibilité de fragmentation CID avec des rendements élevés d'ions produits apportant des informations structurelles pertinentes.

Plusieurs anions ont été testés avec différents stéroïdes : le fluorure d'ammonium ( $NH_4F$ ), l'hydrogencarbonate d'ammonium ( $NH_4HCO_3$ ), l'acétate d'ammonium ( $NH_4CH_3COO$ ), et le cyanure d'ammonium ( $NH_4CN$ ). La première série d'expériences sur la testostérone et la 1-testostérone a montré que le fluorure et le bicarbonate étaient les meilleurs candidats en terme d'intensité des ions  $[M-H]^-$  et  $[M+A]^-$  formés. L'acétate et le cyanure ne produisent pas un signal suffisant, que cela soit pour le stéroïde déprotoné ou l'adduit.

L'ensemble des stéroïdes sélectionnés a ensuite été testé avec ces deux anions. Pour chaque composé, 3 solutions à 5 mg/mL sont préparées dans MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v) : une sans anion, une avec du fluorure en ratio molaire 8:1 et la dernière contenant de l'hydrogencarbonate en ratio molaire 8:1 avec le stéroïde. Toutes les solutions sont analysées en infusion directe et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5. Pour chaque ion, une appréciation qualitative de 1 à 5 est donnée, basée sur l'abondance et la stabilité de l'espèce formée (dans le cas de l'adduit), où 5 représente un excellent signal. Ces

expériences préliminaires de « preuve de concept » ont pour but de comparer les données obtenues dans des conditions identiques avec ou sans l'anion, montrant ainsi son influence.

**Tableau 5.** Intensité (échelle de 1 à 5) des ions produits par différents stéroïdes en analyse avec ou sans fluorure et hydrogénocarbonate. Nd = non détecté

	Avec NH <sub>4</sub> F		Avec NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>		
	Sans anion	[M-H] <sup>-</sup>	[M+F] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	[M+ HCO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<i>l</i> -testostérone	2	5	4	4	Nd
<i>Bolastérone-m</i>	1	4	4	2	Nd
<i>Oxymestérone</i>	4	5	2	1	Nd
<i>Norbolétone</i>	3	5	3	5	Nd
<i>Norbolétone-m</i>	2	4	4		
<i>Furazabol</i>	2	4	4		
<i>Furazabol-m</i>	4	5	Nd		
<i>Calustérone</i>	3	4	3	3	Nd
<i>Calustérone-m</i>	Nd	2	5	2	1
<i>Méténolone-m</i>	2	4	4		
<i>Fluoxymestérone-m</i>	5	3	4	4	1
<i>Turinabol-m</i>	4	5	4	4	1

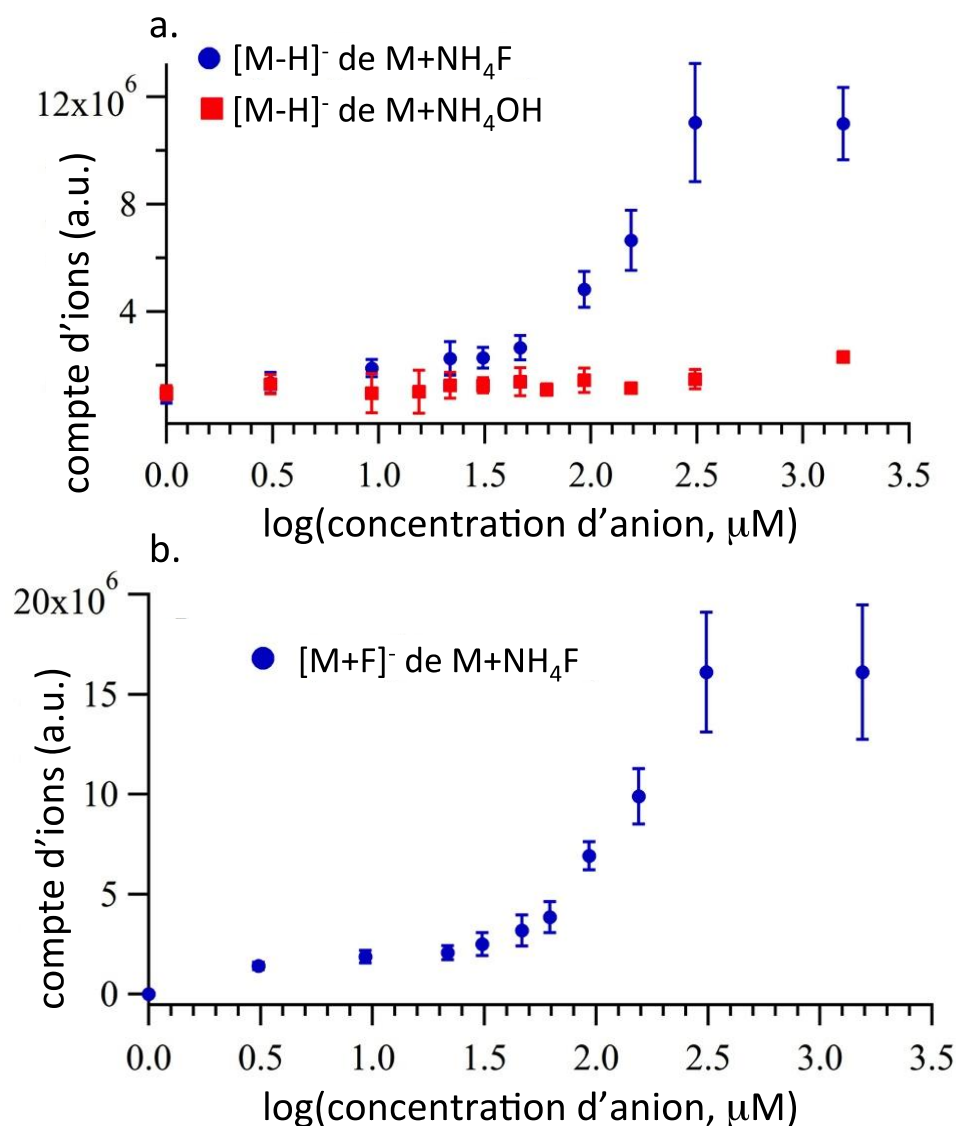
Ces données qualitatives sont suffisantes pour tirer plusieurs conclusions. Tout d'abord, le fluorure apparaît comme anion de choix dans l'analyse des stéroïdes. Contrairement à l'hydrogénocarbonate, il permet d'obtenir des signaux d'ions élevés pour l'ensemble des composés ([M-H]<sup>-</sup> et/ou [M+F]<sup>-</sup>). Il est également intéressant de noter la variété des comportements des stéroïdes suite à l'ajout d'anion : dans le cas du furazabol-m, on obtient un excellent signal pour l'espèce [M-H]<sup>-</sup> alors que l'adduit n'est pas détecté, ce qui peut être dû à une très forte acidité du stéroïde ou à un manque de stabilité de l'adduit. Au contraire, le métabolite de la calustérone forme un adduit très stable qui permet d'obtenir une réponse élevée ce qui inhibe la formation du [M-H]<sup>-</sup>. Ce composé a également la particularité d'être le seul à ne pas être détectable sans ajout d'anion en électrospray négatif.

On peut également observer que l'ajout du fluorure permet d'obtenir un meilleur signal pour l'ensemble des stéroïdes analysés, à l'exception de la fluoxymestérone-m qui a aussi une excellente réponse en ESI négatif.

## 1.2. Effet de la concentration d'anion

### 1.2.1. Cas de la norboléthone-m

Les expériences décrites précédemment se basent sur une étude précédente,<sup>204</sup> indiquant que le ratio molaire optimal entre l'anion et le stéroïde est de 8 pour 1. Afin de maximiser le signal sur les instruments de l'AFLD et de vérifier que ce résultat publié s'applique effectivement à ces expériences, une étude de l'influence de la quantité d'anion présente dans l'échantillon a été effectuée. La série de test consiste en l'analyse en infusion directe (sans phase mobile) de solution de norboléthone-m à concentration fixe (1 µg/mL, 3.1 µM), en faisant varier la quantité de NH<sub>4</sub>F ajoutée à chaque échantillon, avec des concentrations allant de 0 à 310 mM, correspondant à des ratios molaires stéroïde:anion de 1:0 à 1:500, respectivement. Les intensités expérimentales de l'espèce déprotonée [M-H]<sup>-</sup> et de l'adduit anionique [M+A]<sup>-</sup> (si détecté) ont été enregistrées en triplicat pour chaque échantillon de norboléthone-m. Dans la deuxième partie du protocole, le fluorure d'ammonium a été remplacé par l'hydroxyde d'ammonium et le procédé complet a été exécuté à nouveau. Comme aucun attachement anionique n'a été observé avec l'hydroxyde, seules les intensités de [M-H]<sup>-</sup> ont été enregistrées. Tous les protocoles et paramètres expérimentaux ont été conservés à l'identique entre les deux séries d'expériences. Les résultats obtenus sont présentés Figure 9.



**Figure 9.** Intensité du signal (a) de la norbolétone-m déprotonée et (b) de l'adduit fluoré en fonction de la concentration d'anions. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur les mesures en triplicat.

Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration de fluorure dans les échantillons entraîne une amélioration du signal à la fois de la molécule déprotonée (courbe bleue, Figure 9a) ainsi que l'adduit anionique (courbe bleue, Figure 9b). Il apparaît clairement que l'addition de fluorure a un effet bénéfique sur la quantité d'ions formés en électrospray négatif. Les signaux de [M-H]<sup>-</sup> and [M+F]<sup>-</sup> augmentent avec la concentration de l'anion, jusqu'à un maximum de 300 μM (log 2,5 Figure 9a) ce qui correspond à un ratio molaire anion:stéroïde de 100:1. Au-delà de ce palier, ajouter plus d'anion n'augmente (ou ne diminue) pas l'intensité du signal obtenu. C'est une propriété intéressante d'un point de vue applicatif, car des concentrations plus élevées de fluorure (un large excès par exemple)



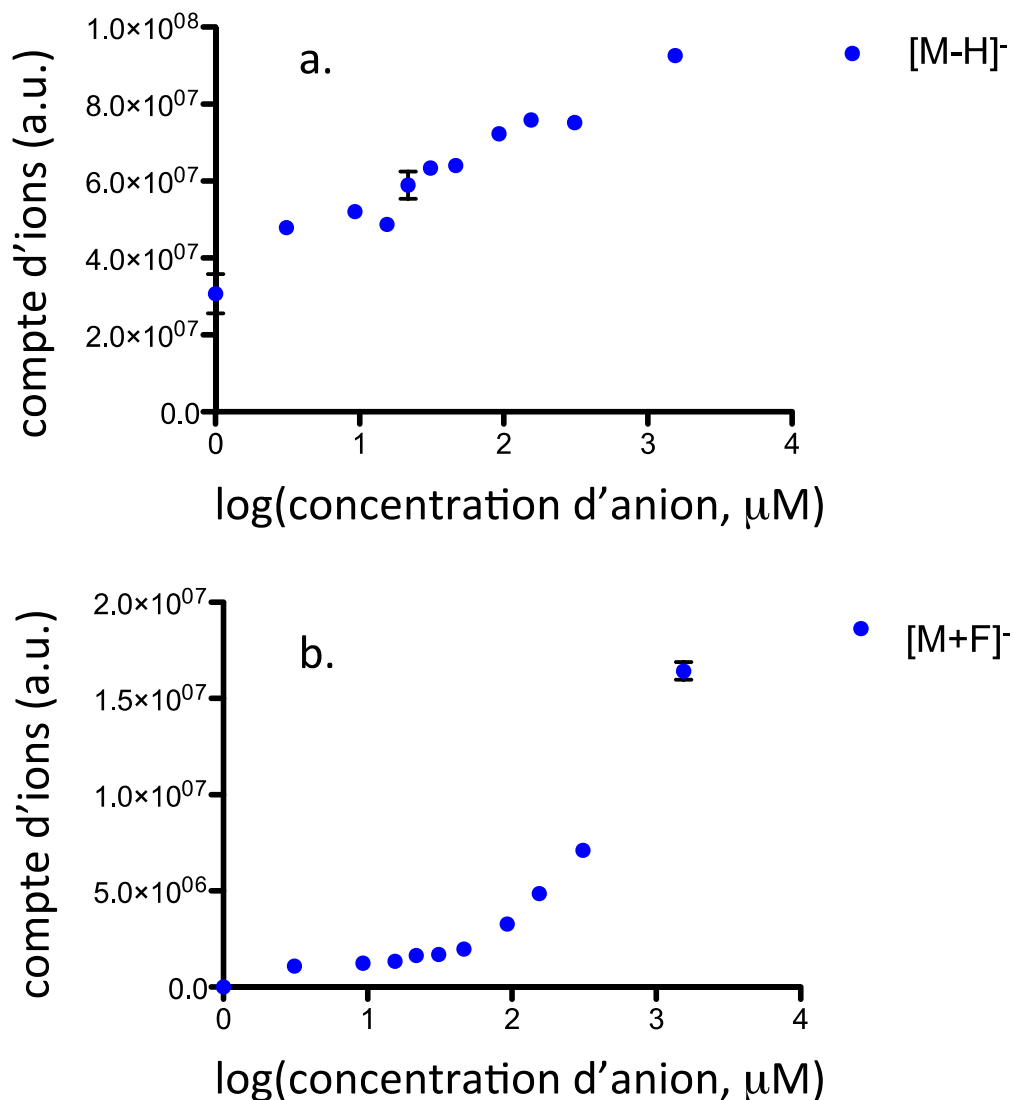
n'induisent pas d'effet de suppression d'ion dans cet exemple précis. Dans des échantillons biologiques (urine, plasma), les concentrations de stéroïdes peuvent varier sur plusieurs ordres de grandeur. Si un ratio d'anion précis était nécessaire pour obtenir un signal maximal, l'optimisation des analyses s'en serait trouvée extrêmement plus compliquée. En utilisant la solution anionique en excès, le signal maximal peut être obtenu pour une grande variété de concentrations d'analytes présents dans l'échantillon.

En ESI, les ions doivent être formés en solution et l'ajout d'acide ou de base dans l'échantillon est une technique commune pour former des espèces chargées par des réactions acido-basiques. Il doit être noté que la valeur du  $pK_a$  d'un groupe hydroxyle sur un stéroïde se trouve autour de 16,5 dans l'eau,<sup>205,206</sup> ce qui les rend peu susceptibles à la perte d'un proton en solution. L'ion hydroxyde est trop basique pour l'attachement anionique car son affinité protonique est très élevée comparée à celle des groupes fonctionnels du stéroïde. De ce fait, l'ion hydroxyde n'aura donc qu'un effet de déprotonation. Ainsi, l'utilisation de  $HO^-$  permet d'évaluer si l'amélioration de l'ionisation observée avec le fluorure est purement due à ses propriétés basiques conduisant à des réactions de déprotonation en solution ou si un autre phénomène est en jeu. La comparaison des expériences où  $F^-$  et  $HO^-$  ont été utilisés comme anions révèle de manière intéressante que l'effet de l'hydroxyde est négligeable en comparaison à celui du fluorure. Pour un ratio anion:stéroïde de 500:1, l'échantillon contenant le fluorure a vu son signal multiplié par 10, alors que celui du  $[M-H]^-$  de la solution de  $HO^-$  a moins que doublé (par comparaison respective avec l'échantillon analysé sans anion). Au contraire du fluorure ( $\Delta G^0_{acide} = 1530 \text{ kJ/mol}$ ),<sup>199,200</sup> l'ion hydroxyde a une acidité en phase gazeuse ( $\Delta G^0_{acide} = 1635 \text{ kJ/mol}$ )<sup>207</sup> trop élevée pour former un adduit stable avec le stéroïde ; à la place, il arrache un proton de l'analyte ce qui conduit à la formation exclusive de l'espèce  $[M-H]^-$ . Cette expérience permet de démontrer que l'augmentation du signal obtenue avec le fluorure est bel et bien une conséquence de l'attachement anionique (processus en phase gaz) et ne peut pas être attribué à des effets acido-basiques qui ont lieu en solution. Ainsi, comme montré avec  $NH_4OH$ , lorsque l'on ajoute une base dans une solution aqueuse de stéroïde (dont le groupe le plus acide est un hydroxyle), on ne s'attend pas à une amélioration drastique de la déprotonation du stéroïde.

### 1.2.2. Cas du furazabol-m

La même étude a été répétée avec le stéroïde anabolisant furazabol-m, dont l'efficacité d'ionisation en ESI négatif est bonne même sans anion (comparé à la norbolétone-m), dû en particulier à la présence de la fonction hydroxyle en position 16 (Schéma 1 p. 14). Ces deux

stéroïdes ont des comportements divergents quant à leur réponse à l'ionisation et ont été sélectionnés pour tester si l'effet du fluorure est significatif à la fois sur des composés faciles et difficiles à ioniser (Figure 10).



**Figure 10.** Intensité du signal (a) du furazabol-m déprotoné et (b) de l'adduit fluoré en fonction de la concentration de fluorure. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur les mesures en triplicat.

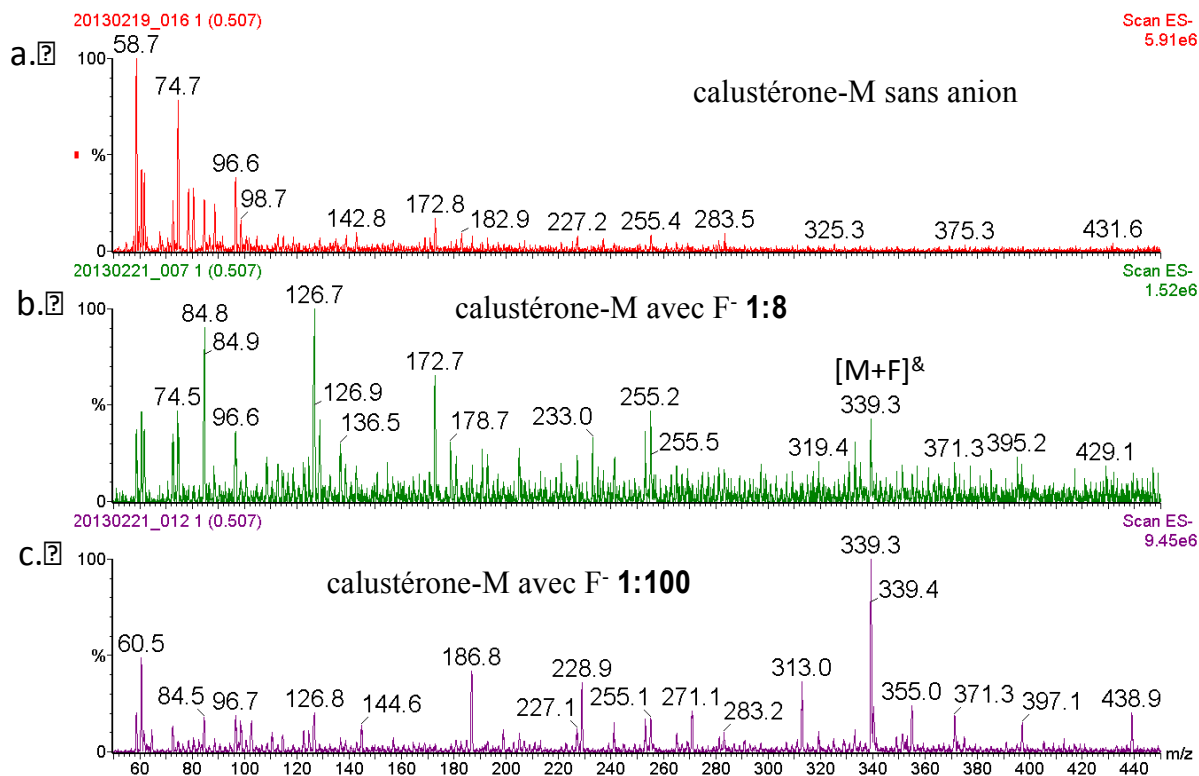
Les tests sur le furazabol-m ont abouti à des profils différents de ceux de la norboléthane-m. On voit que pour l'espèce déprotonée (Figure 10a) l'augmentation est plus régulière mais moins importante globalement que pour la norboléthane-m. On a cependant un gain de signal en augmentant la concentration d'anion comme précédemment. Pour l'adduit fluoré la tendance est très similaire à celle observée en Figure 10b, à la différence que l'on

n'atteint pas de palier à partir duquel le signal est constant. Ces tests montrent que la différence structurale entre les différents stéroïdes étudiés peut mener à des comportements variables avec le fluorure. Néanmoins la tendance générale est la même pour les deux composés testés : l'ajout de fluorure permet une augmentation des ions détectés, que cela soit pour  $[M-H]^-$  ou  $[M+F]^-$ .

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces expériences : i) l'intensité du signal des adduits anioniques de stéroïdes augmente avec la concentration d'anion jusqu'à un certain palier, ii) l'augmentation du signal induite par l'addition de fluorure n'est pas due à des réactions acido-basiques en solution auquel cas l'effet de  $HO^-$  aurait été beaucoup plus marqué, iii) le ratio molaire anion:stéroïde optimal est de 100:1 (ou plus) et cette valeur est utilisée pour toute la suite du développement de méthode, iv) comme aucun effet de suppression d'ion n'a été observé, même avec un large excès d'anion, cette méthode peut être facilement adaptée pour des applications pratiques où la concentration des différents stéroïdes peut varier drastiquement (par exemple, dans le contrôle antidopage).

### **1.2.3. Influence de la quantité d'anion sur la qualité du signal : exemple de la calustérone-m**

La quantité d'anion est optimale lorsqu'il est présent à une concentration 100 fois plus élevée que celle du stéroïde. Les études présentées précédemment ne permettent pas de visualiser l'influence de cette optimisation sur la qualité des spectres obtenus. Dans ce but, la calustérone-m (qui n'est pas détectée en l'absence d'anion) a été analysée en infusion directe dans MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v) avec différentes concentrations de fluorure, correspondant à des rapports anion:stéroïde de 0:1 à 100:1. Les spectres obtenus sont présentés dans la Figure 11.



**Figure 11.** Spectres MS de la calustérone-m analysée (a) sans anion, avec un ratio molaire stéroïde:F<sup>-</sup> de (b) 1:8 et (c) 1:100.

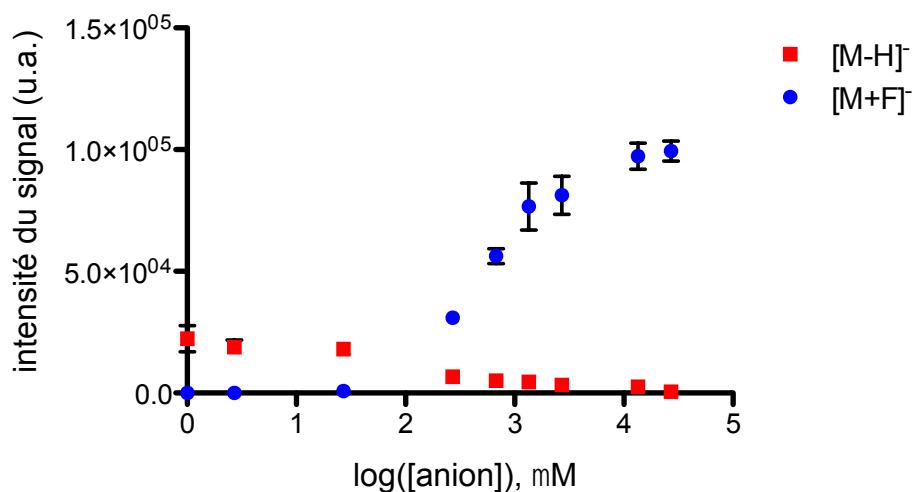
Les spectres obtenus pour la calustérone-m sont révélateurs de l'effet de l'attachement anionique sur la détection des stéroïdes. Ce stéroïde n'est pas du tout détecté en ESI négatif lorsqu'il n'y a pas d'additif dans l'échantillon comme observé sur la Figure 11a. Cependant, lorsque l'on ajoute du fluorure en mélange avec le stéroïde à un ratio molaire de 1:8 (stéroïde:anion), on observe un pic pour l'adduit fluoré à  $m/z$  339,3 avec un rapport signal-sur-bruit assez faible. L'augmentation de la concentration d'anion jusqu'à un ratio 1:100 aboutit à un spectre où le pic de l'analyte est le pic de base, avec un rapport signal-sur-bruit (S/N) très élevé et une intensité multipliée par environ 10. L'attachement anionique apporte donc un vrai gain de sensibilité pour la détection des stéroïdes.

### 1.2.3. Cas du fluoxymestérone-m en LC-MS

*En collaboration avec Mariana Bárcenas*

Les expériences précédentes réalisées en infusion directe sont prometteuses mais ne prennent pas en compte l'influence de la LC, qui est un aspect important de la procédure analytique. Afin de comprendre si l'augmentation du signal est la même ou non en ajoutant l'étape de LC, des tests ont été réalisés sur des solutions de fluoxymestérone-m à 2,7  $\mu$ M. Les

échantillons injectés en LC contiennent également des concentrations variables de fluorure d'ammonium (de 0 à  $2,7 \times 10^4 \mu\text{M}$ ). Les intensités de  $[\text{M}+\text{F}]^-$  et  $[\text{M}-\text{H}]^-$  sont obtenues par spectrométrie de masse (Figure 12).



**Figure 12.** Intensité du signal du fluoxymestérone-m déprotoné et de l'adduit fluoré en fonction de la concentration de fluorure après séparation LC. Les barres d'erreur représentent la déviation standard sur les mesures en triplicat.

Les résultats obtenus confirment la tendance déjà observée avec les expériences précédentes pour  $[\text{M}+\text{F}]^-$  : une augmentation de la concentration d'anion induit une augmentation du signal qui se stabilise pour des quantités importantes de fluorure. On remarque qu'il est nécessaire d'ajouter plus d'anion (ratio molaire anion:stéroïde de 10000:1) pour obtenir le palier à partir duquel le signal n'augmente plus ou peu. Cela peut être expliqué par deux facteurs :

- Les conditions instrumentales utilisées pour la LC sont moins douces qu'en infusion directe. En effet, le débit sortant de la colonne (0,4 mL/min) est beaucoup plus important que celui de la seringue servant à introduire l'échantillon en infusion (10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). De ce fait, il est nécessaire d'utiliser des valeurs de température de source et de désolvatation beaucoup plus importantes afin d'assurer une évaporation totale du solvant. La dureté de ces conditions peut entraîner la perte de l'adduit (interaction non-covalente), d'où la nécessité d'une quantité d'anion plus importante.
- Les effets de dilution prenant place lors d'une analyse LC. En effet en infusion les concentrations d'analytes dans les échantillons sont plus élevées que celles utilisées

pour la LC. De plus, le passage des molécules dans le système de LC et dans la colonne peut conduire à des pertes. Le même phénomène entre en jeu pour l'anion : comme le fluorure se retrouve sous forme libre, il est nécessaire d'en ajouter en plus grande quantité de façon à ce que les stéroïdes se trouvent dans un environnement riche en F<sup>-</sup> pour former les adduits anioniques.

Une autre observation intéressante est le comportement de l'espèce déprotonée. Sans surprise, en l'absence d'anion, le seul signal obtenu est celui de [M-H]<sup>-</sup>. L'augmentation de la quantité de fluorure présent dans l'échantillon provoque la diminution du signal de cette espèce jusqu'à la disparition complète du signal de l'espèce déprotonée. Une explication possible serait que les concentrations d'anion utilisées pour les dernières mesures sont tellement élevées que l'omniprésence de fluorure dans l'échantillon et la colonne déplace la réaction vers la formation de l'adduit au détriment de la déprotonation. En considérant que le signal global de l'échantillon est plus important que celui sans anion (à 2,7x10<sup>4</sup> mM de NH<sub>4</sub>F, soit log([anion]) = 4,5, on obtient 4 fois le signal sans anion), la disparition du stéroïde déprotoné ne pose pas de problème. Il est important de noter que le fluoxymestérone-m est un cas un peu particulier puisque qu'il forme l'un des adduits fluorés le plus stable. On obtient donc naturellement très peu de [M-H]<sup>-</sup>, ce qui renforce la conclusion précédente. Ces expériences confirment donc qu'une augmentation de la quantité d'anion, même présent en excès, ne se fait pas au détriment de la qualité du signal obtenu.

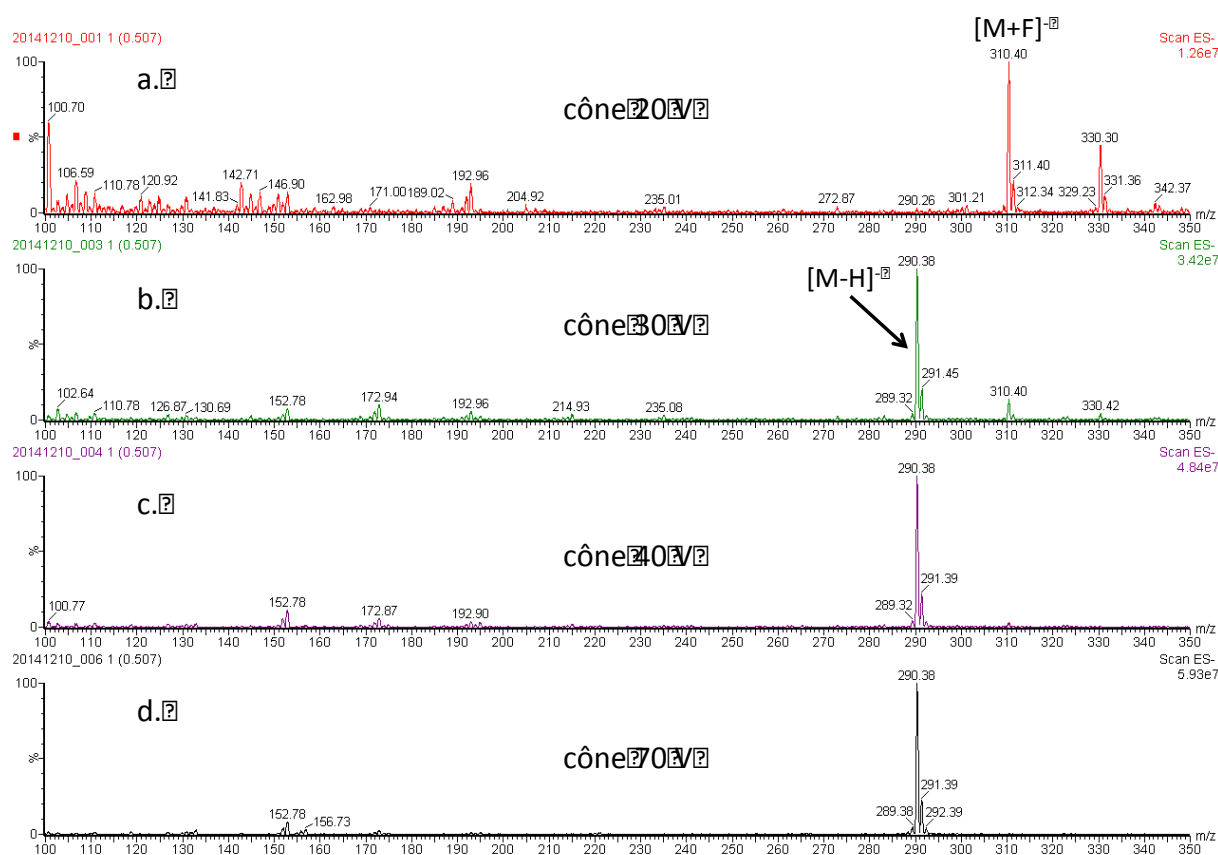
### **1.3. Paramètres d'instrumentation**

Afin de développer une méthode LC-SRM, il est nécessaire d'optimiser les paramètres expérimentaux qui permettront d'obtenir un signal maximal pour chaque composé étudié (ce qui se traduit par une meilleure sensibilité). Deux paramètres sont en particulier cruciaux : la tension de cône de désolvation de la source ESI en MS qui influe fortement sur l'abondance des ions détectés et l'énergie de collision en CID MS/MS qui joue un rôle important dans la nature et l'intensité de la fragmentation.

#### **1.3.1. Cône de désolvation**

Pour optimiser ces paramètres, chaque stéroïde étudié est infusé en solution à 10 µg/mL en mélange avec NH<sub>4</sub>F (ratio molaire anion:stéroïde 100:1, soit une concentration de fluorure de l'ordre de plusieurs unités de mM en fonction de la masse du stéroïde) et plusieurs valeurs de tension de cône sont testées successivement puis comparées afin de garder celle qui

permet d'obtenir la plus grande intensité pour l'ion d'intérêt. La valeur de la tension de cône reste la même en infusion et en LC (elle varie en fonction de la méthode SRM pour cette dernière). Il est à noter que la grande majorité des stéroïdes présentent la capacité de former à la fois  $[M+F]^-$  et  $[M-H]^-$  et que la présence et l'abondance de ces espèces sont intimement liées à la valeur de la tension de cône. Ainsi, une basse tension de cône va privilégier la formation de l'adduit, plus fragile et moins stable, alors que l'énergie apportée par une valeur plus élevée va induire une perte plus importante d'anions, conduisant à la déprotonation du stéroïde (Figure 13). Pour chaque composé, deux valeurs de cônes optimales indépendantes sont gardées : l'une pour l'adduit et l'autre pour  $[M-H]^-$ .



**Figure 13.** Spectres MS de l'épitéstostérone-d<sub>3</sub> à différentes valeurs de tension de cône : (a) 20 V, (b) 30 V, (c) 40 V, et (d) 70 V.

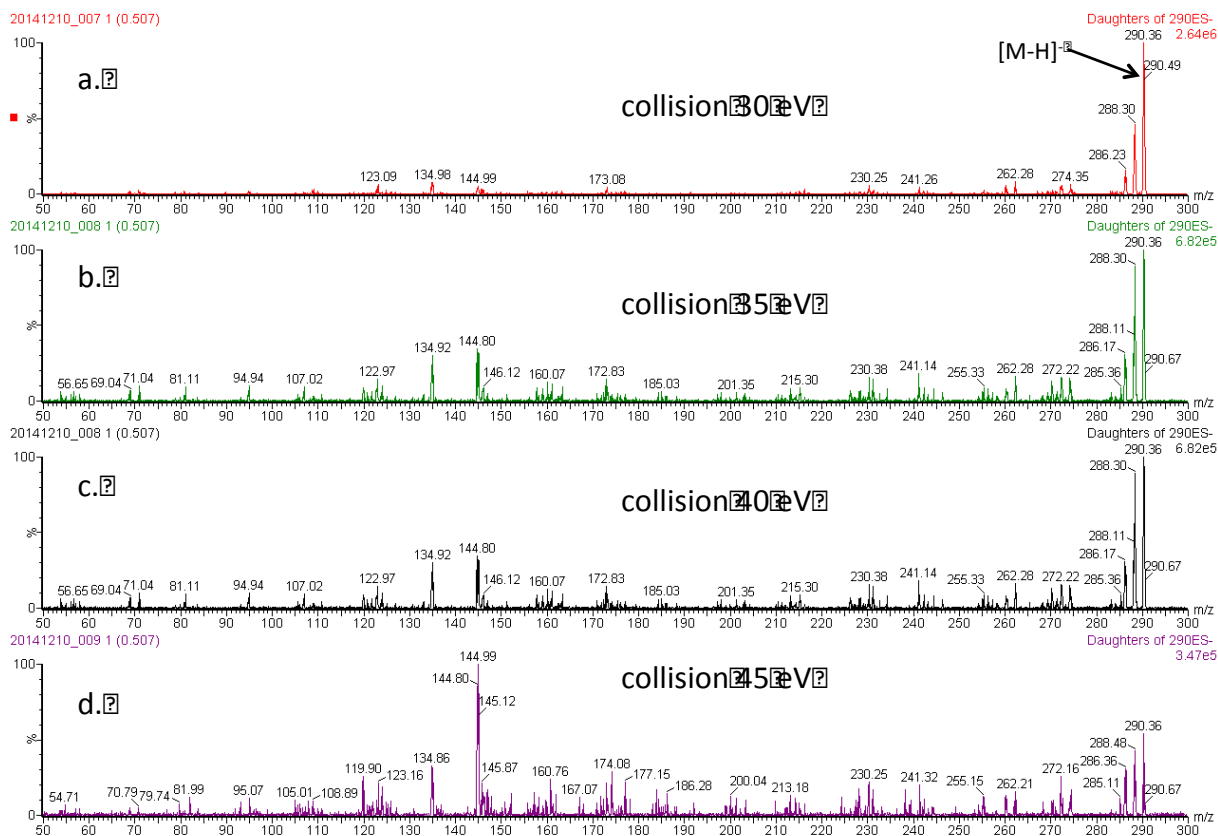
On voit dans cet exemple que l'intensité de l'adduit fluoré ( $m/z$  310) est maximale pour une tension de cône de 20 V, alors qu'à 30 V cet ion n'est presque plus visible. La valeur de tension de cône de désolvatation à 20 V est donc choisie pour travailler avec l'adduit  $[M+F]^-$ . Cela est en accord avec le fait qu'une augmentation de la tension de cône donne plus d'énergie aux ions, ce qui peut provoquer des ruptures de liaisons non-covalentes (comme dans le cas d'un adduit). En faisant varier la tension de cône entre 30 et 70 V, l'aspect du

spectre change peu. Le signal de l'ion  $[M+F]^-$  décroît progressivement jusqu'à disparaître à 40 V. L'ion majoritaire est dans tous les cas l'ion  $[M-H]^-$ . Le rapport signal-sur-bruit s'améliore en augmentant la tension de cône (le nombre d'ion total augmente passant de  $3,42 \times 10^7$  à  $5,93 \times 10^7$  u.a.) Au delà de 70 V, le nombre d'ion total diminue. Ainsi la valeur optimale de tension de cône pour observer  $[M-H]^-$  est choisie à 70 V.

### 1.3.2. Transitions et énergies de collision

Une fois l'optimisation de la tension de cône effectuée, les deux précurseurs (adduit et déprotoné) sont fragmentés par CID en faisant varier l'énergie de collision dans la cellule de fragmentation. On cherche ici les conditions permettant d'obtenir les fragments les plus intenses tout en conservant le signal de l'ion précurseur. La Figure 14 présente les spectres obtenus pour la fragmentation de la forme déprotonée de l'épitéstostérone- $d_3$  avec une valeur de tension de cône fixée à 70 V. Dans ce cas, les fragments les plus intenses sélectionnés pour la méthode SRM sont  $m/z$  288 (énergie de collision 30 eV) et 144 (énergie de collision 45 eV). Ces ions présentent un rapport signal-sur-bruit élevé et sont présent sur l'ensemble des spectres MS/MS, ce ne sont donc pas des artéfacts dus à du bruit électronique. Il est à noter que l'augmentation de l'énergie de collision entraîne une diminution très forte du signal global (perte d'un facteur 10 entre l'intensité du spectre à 30 eV et celui à 45 eV). Il faut donc être attentif car un fragment ayant une intensité relative élevée à une énergie de collision donnée peut présenter une intensité absolue plus importante à une autre énergie de collision, même si il paraît moins intense que sur le premier spectre (par exemple l'ion  $m/z$  272).





**Figure 14.** Spectres de fragmentation CID de l'épitéstostérone-d<sub>3</sub> à différentes énergies de collision : (a) 30 eV, (b) 35 eV, (c) 40 eV, et (d) 45 eV.

Ce travail a ainsi été répété pour l'ensemble des stéroïdes étudiés, afin d'obtenir pour chaque composé les valeurs de tensions de cône et les transitions optimales, associées aux énergies de collision correspondantes. Une situation particulière est à noter : pour un même composé (à l'exception de l'oxymestérone qui ne forme pas d'adduit fluoré), les transitions obtenues ont deux ions précurseurs : l'adduit  $[M+F]^-$  et l'espèce déprotonée  $[M-H]^-$ . Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 6. Les paires d'ions en gras représentent les transitions dont l'ion précurseur est l'adduit fluoré du SAA. Les autres correspondent à un ion précurseur  $[M-H]^-$ .

**Tableau 6.** Tensions de cône et transitions optimales pour les stéroïdes d'intérêt.

Nd = non-déTECTÉ

Stéroïde	Masse molaire	Tension de cône optimisée pour [M-H] <sup>-</sup> (V)	Tension de cône optimisée pour [M+F] <sup>-</sup> (V)	Transitions	Energie de collision (eV)
<i>6-oxo-Androstenendione</i>	300,4	60	10	299,3 > 160,0	35
				299,3 > 172,8	35
				299,3 > 271,1	30
				299,3 > 284,1	30
				<b>319,4 &gt; 299,0</b>	<b>10</b>
<i>Bolastérone-m</i>	320,5	50	40	319,4 > 301,4	35
				319,4 > 303,4	30
				<b>339,4 &gt; 301,2</b>	<b>35</b>
				<b>339,4 &gt; 303,2</b>	<b>25</b>
				<b>339,4 &gt; 319,1</b>	<b>20</b>
<i>Calustérone</i>	316,5	60	20	315,3 > 56,9	39
				315,3 > 144,8	37
				315,3 > 299,5	35
				<b>335,2 &gt; 315,1</b>	<b>10</b>
<i>Calustérone-m</i>	320,5	60	40	319,3 > 301,3	30
				319,3 > 303,4	20
				<b>339,4 &gt; 301,1</b>	<b>35</b>
				<b>339,4 &gt; 319,1</b>	<b>20</b>
<i>Epitestostérone-d<sub>3</sub></i>	291,4	70	20	290,4 > 144,9	45
				290,4 > 288,3	30
				<b>310,4 &gt; 290,4</b>	<b>10</b>
<i>Fluoxymestérone-m</i>	354,4	40	30	353,4 > 245,1	28
				353,4 > 297,2	25
				353,4 > 315,1	20
				353,4 > 333,2	15
				<b>373,3 &gt; 178,9</b>	<b>29</b>
				<b>373,3 &gt; 245,1</b>	<b>29</b>
				<b>373,3 &gt; 315,1</b>	<b>25</b>
<b>373,3 &gt; 333,2</b>	<b>18</b>				
<i>Furazabol</i>	330,5	60	30	329,5 > 302,0	20
				<b>349,5 &gt; 313,3</b>	<b>25</b>
				<b>349,5 &gt; 329,3</b>	<b>20</b>
<i>Furazabol-m</i>	346,5	50	15	345,5 > 90,7	40
				345,5 > 313,3	35
				<b>365,5 &gt; 313,1</b>	<b>45</b>
				<b>365,5 &gt; 329,1</b>	<b>35</b>
				<b>365,5 &gt; 345,1</b>	<b>20</b>

				315,5 > 71,1	40
				315,5 > 161,3	40
<i>Norbolétone</i>	316,5	50	10	315,5 > 313,1	35
				<b>335,5 &gt; 71,1</b>	<b>40</b>
				<b>335,5 &gt; 315,5</b>	<b>20</b>
				319,5 > 70,7	30
<i>Norbolétone-m</i>	320,5	60	25	319,5 > 82,8	32
				<b>339,5 &gt; 82,9</b>	<b>35</b>
				<b>339,5 &gt; 319,5</b>	<b>20</b>
				317,5 > 257,3	35
<i>Oxymestérone</i>	338,5	60	Nd	317,5 > 273,1	35
				317,5 > 301,3	30
				303,4 > 108,7	34
<i>Testolactone-m</i>	304,4	30	20	303,4 > 229,5	34
				303,4 > 273,1	35
				<b>323,4 &gt; 303,1</b>	<b>10</b>
				290,4 > 145,0	40
<i>Testostérone-d<sub>3</sub></i>	291,4	50	10	290,4 > 272,1	42
				290,4 > 288,4	40
				<b>310,4 &gt; 290,3</b>	<b>10</b>
				349,3 > 298,1	25
<i>Turinabol-m</i>	350,9	40	20	349,3 > 313,4	20
				<b>369,3 &gt; 313,4</b>	<b>25</b>
				<b>369,3 &gt; 349,2</b>	<b>15</b>

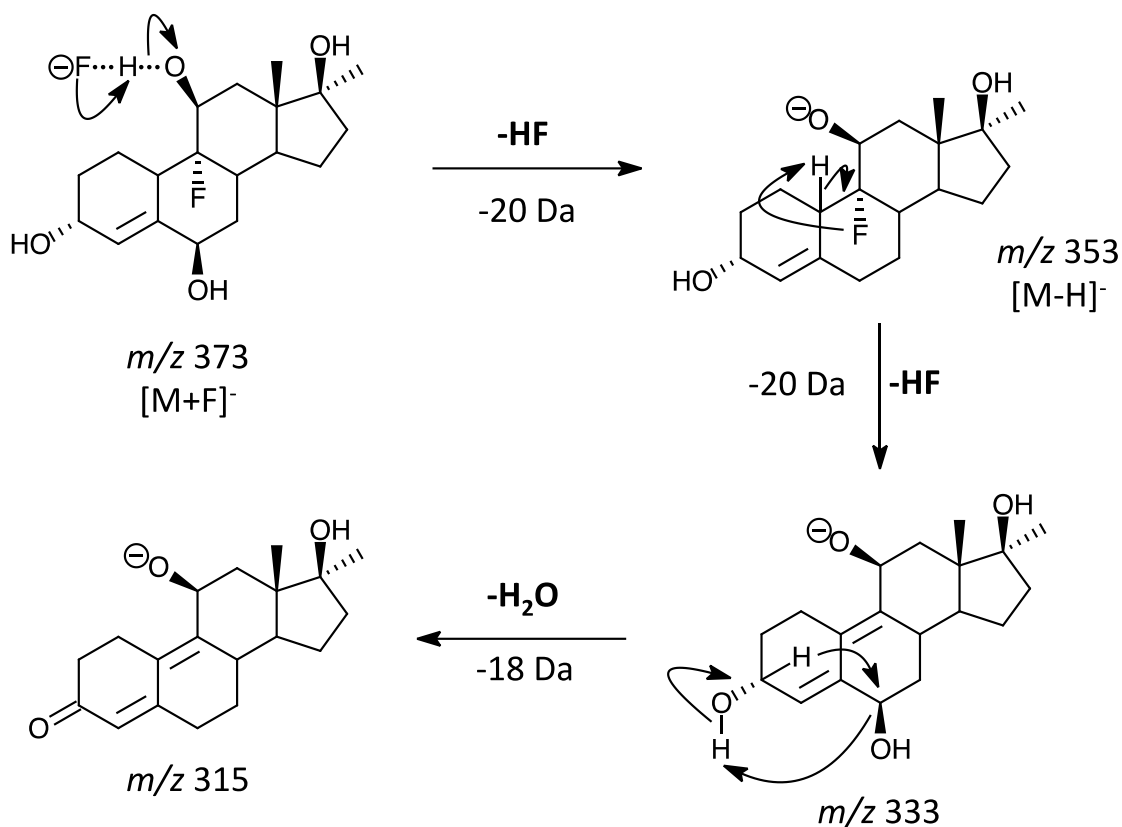
On remarque au premier abord une diversité importante dans les valeurs expérimentales obtenues pour les valeurs de tension de cône. Cela implique une grande disparité dans la stabilité relative des adduits. Ce n'est pas un résultat surprenant puisque les stéroïdes étudiés ont une variété de structures importante, avec des groupes fonctionnels très disparates selon les composés. On peut néanmoins noter une tendance générale qui est la même pour tous les stéroïdes : la valeur de tension de cône optimale pour  $[M+F]^-$  est toujours plus faible que celle pour  $[M-H]^-$ . En effet, l'adduit anionique repose sur des liaisons non-covalentes plus ou moins fortes mais qui seront les premières à se briser lorsque de l'énergie est fournie à l'ion. Un autre aspect intéressant de ces expériences est qu'elles permettent d'évaluer la stabilité de l'adduit. Un adduit « solide » avec des liaisons fortes demandera plus d'énergie avant de se fragmenter. On en déduit que plus la valeur de cône optimale pour l'adduit est faible, plus il est fragile (i.e. moins il faut d'énergie pour que l'anion arrache un proton de la molécule pour former  $[M-H]^-$ ). Il est intéressant de noter que l'oxymestérone est le seul composé à ne pas former d'adduit avec  $F^-$ . En effet, cette molécule possède plusieurs protons labiles : i) en position  $\alpha$  du groupe cétone (base conjuguée stabilisée par mésomérie avec formation d'un énolate) et ii) sur le groupe hydroxyle du cycle A (base conjuguée

stabilisée par résonance avec la double liaison). De ce fait l'oxymestérone ne peut pas former d'adduit puisque la présence du fluorure entraîne la capture d'un de ces protons acides.

Pour le développement d'une méthode de confirmation, il est nécessaire d'avoir 3 (ou mieux, 4) transitions intenses et spécifiques pour un composé. On voit d'ores et déjà une disparité sur la quantité d'informations obtenue en CID en fonction des composés. Ainsi, alors que le furazabol ne donne que 3 transitions, le fluoxymestérone-m possède 9 fragments susceptibles d'être utilisés dans la méthode SRM. Cela offre de plus grandes possibilités d'analyse quant à la sélectivité, bien que la présence de nombreux fragments entraîne le risque d'une diminution de leurs intensités individuelles. On voit donc dès cette étape quels sont les composés qui vont pouvoir donner de meilleurs résultats en LC-MS/MS.

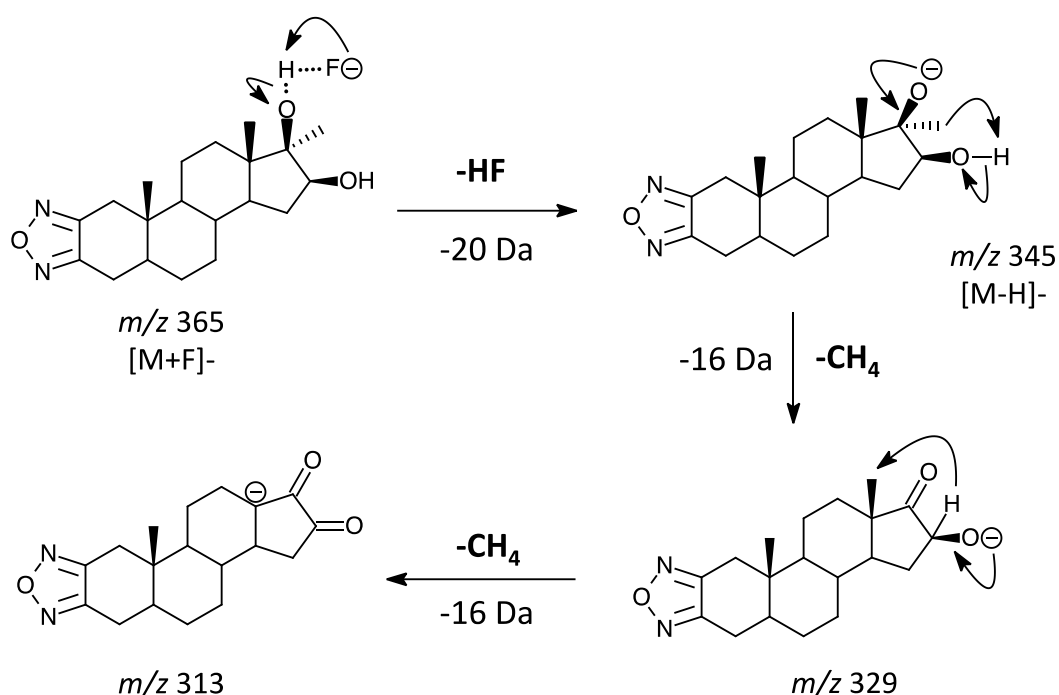
### **3.2.3. Mécanismes de fragmentation**

Afin de valider les transitions sélectionnées pour la méthode SRM il est important de comprendre les mécanismes de formation des fragments. En effet, les transitions doivent être spécifiques au stéroïde pour éviter que des composés isobariques au précurseur du stéroïde étudié puissent se fragmenter de la même manière. Si tel est le cas, les analyses peuvent aboutir à des faux positifs, c'est-à-dire que l'on obtient un signal pour le stéroïde visé alors qu'il n'est pas présent dans l'échantillon analysé. Dans cette optique les voies de fragmentation des deux stéroïdes donnant le meilleur signal (fluoxymestérone-m et furazabol-m) ont été étudiées. Il aurait idéalement été nécessaire d'effectuer ce travail pour l'ensemble des fragments des composés du tableau précédent mais par souci d'efficacité et de clarté il a été décidé de se concentrer sur les deux stéroïdes les plus prometteurs. Les mécanismes proposés sont présentés dans les Schémas 24 et 25.



**Schéma 24.** Mécanisme proposé pour les transitions du fluoxymestérone-m.

La première transition observée pour le fluoxymestérone-m est  $373 > 353$ , soit une perte de 20 Da. Cela correspond à une perte neutre de HF. Nous avons choisi un attachement du fluorure sur le groupe hydroxyle porté par le cycle C (position 11) du stéroïde car l'effet inductif du fluorure en  $\alpha$  du groupe hydroxyle rend le proton de ce groupement fonctionnel relativement labile. Le départ de HF conduit à l'espèce  $[M-H]^-$  à  $m/z$  353, depuis laquelle une autre perte de 20 Da est observée pour aboutir à un fragment à  $m/z$  333. Le fluoxymestérone-m possède naturellement un atome de fluorure dans sa structure et il a été montré précédemment que celui-ci peut capturer un proton de la molécule.<sup>208</sup> Nous proposons ainsi une deuxième perte de HF qui permet la formation d'une espèce stabilisée par mésomérie avec un ion énolate comme indiqué sur le Schéma 24. Enfin, la fragment  $m/z$  315 correspond à une perte de 18 Da par rapport à  $m/z$  333, soit une perte d'eau. Bien que la perte de  $H_2O$  ne soit pas considérée comme spécifique, cette étape intervient en succession de deux autres fragmentations précédentes et peut donc être considérée comme une étape spécifique dans le mécanisme global de fragmentation du fluoxymestérone-m. Les mécanismes présentés sont tous induits par la charge mais il est à noter qu'on peut également expliquer la formation des fragments sans faire intervenir la charge (aussi appelés mécanismes de « charge piégée »). Les fragments obtenus ont donc été expliqués et permettent d'identifier ce stéroïde.



**Schéma 25.** Mécanismes proposés pour les transitions du furazabol-m.

Dans le cas de la fragmentation CID du furazabol-m, la première étape est similaire avec un départ de HF. Entre les deux groupes hydroxyle présents sur la molécule, la déprotonation a été choisie sur l'alcool tertiaire dont le proton est légèrement plus labile. On observe ensuite une perte de 16 Da qui est caractéristique du départ d'une molécule de méthane. On note la perte du centre chiral en position 17 du cycle D lors de ce processus. A nouveau la molécule perd un  $CH_4$  pour aboutir à l'ion  $m/z$  313. Le dernier fragment est trouvé à  $m/z$  91. Cet ion a précédemment été trouvé lors de la fragmentation de stéroïdes en  $ESI^+$  et correspond à l'ion tropylium, cation de formule brute  $[C_7H_7]^+$  qui est la base conjuguée du cycloheptatriène. Il n'est cependant pas possible de trouver son équivalent en  $ESI^-$ . L'utilisation de ChemCalc<sup>209</sup> (outil de détermination de formule à partir de la masse) a conduit aux formules brutes  $C_7H_7$  (cation tropylium) ou  $C_6H_3O$ . Le seul composé correspondant à cette seconde formule est l'ion quintuplement chargé négativement 5-(hydroxyméthyl)-1,3-cyclopentadiène-1,2,3,4,5-pentaïde. Le fragment d'intérêt ne possédant qu'une seule charge négative, il apparaît que cet anion ne peut pas lui correspondre. La détermination de ce fragment n'a pas donc pas pu être effectuée.

## 2. Limites de détection instrumentales

Les tests qui viennent d'être présentés ont mis en évidence l'intérêt de l'ajout de fluorure pour l'amélioration du signal des stéroïdes en ESI négatif. Afin d'apporter une vision plus quantitative des bénéfices de l'attachement anionique, une série d'analyses a été réalisée pour déterminer les limites de détection instrumentales, c'est-à-dire celles obtenues par infusion directe d'étalons en solution dans de solvants classiques d'électrospray (méthanol notamment). A l'occasion de ces expériences, les paramètres instrumentaux ont été optimisés de façon à trouver les valeurs qui maximisent le signal des stéroïdes à la fois pour l'adduit et l'espèce déprotonée, permettant ainsi d'atteindre les limites de détection les plus faibles possibles.

### 2.1. Cas général

Afin d'obtenir la vision la plus globale possible des performances de la méthode, plusieurs stéroïdes avec des comportements et réponses d'ionisation variés ont été choisis. Par exemple, le métabolite de la fluoxymestérone est analysable en LC-MS/MS et s'ionise facilement en ESI positif. La calustérone a des propriétés similaires, cependant son métabolite ne donne aucun signal en électrospray positif ou négatif et est de ce fait difficile à analyser en LC-MS/MS. Quant au métabolite de la norbolétone, il n'est, lui, pas détecté en ESI négatif. Enfin, le furazabol donne un bon signal dans tous les modes d'ionisation. Les tests ont été conduits sur un triple quadripole équipé d'une source électrospray. Des tests complémentaires ont été effectués par Mariana Bárcenas sur un spectromètre de masse Orbitrap couplé à une source de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). Les résultats de ces tests sont présentés dans ce chapitre et permettent une comparaison des LODs pouvant être obtenues par une source ESI ou APPI. Comme l'APPI a permis d'obtenir des limites de détection exceptionnellement basses pour certains stéroïdes,<sup>210,211,159</sup> les résultats du TQ ont été comparés à ceux obtenus sur un Orbitrap avec une source APPI. Les expériences sur l'Orbitrap ayant été réalisées par une personne tierce, cette technique ne sera pas décrite ici. Une description détaillée de l'Orbitrap et de la source APPI peuvent être trouvées dans la littérature.<sup>212,213</sup>

Pour les expériences sur le TQ, deux séries de solutions ont été préparées dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v) pour chaque composé testé. La première série sans additif et la seconde avec du fluorure d'ammonium (ratio molaire anion:stéroïde de 100:1). Deux séries de solutions ont également été préparées : une première dans MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v) avec 5% de

toluène pour l'analyse APPI et une seconde avec du fluorure d'ammonium présent à un ratio molaire anion:stéroïde de 100:1 (valeur ayant donné le signal le plus intense lors des étapes d'optimisation de la quantité d'anion). La série de dilution a été analysée par ordre croissant de concentrations afin d'évaluer les limites de détection instrumentales pour les stéroïdes analysés (rapport signal-sur-bruit > 3). Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 7.

**Tableau 7.** Limites de détection instrumentales (LOD) pour une variété de stéroïdes ionisés par ESI ou APPI en présence ou absence de NH<sub>4</sub>F. Les LOD sont présentées en ng/mL. Nd = non-déTECTÉ.

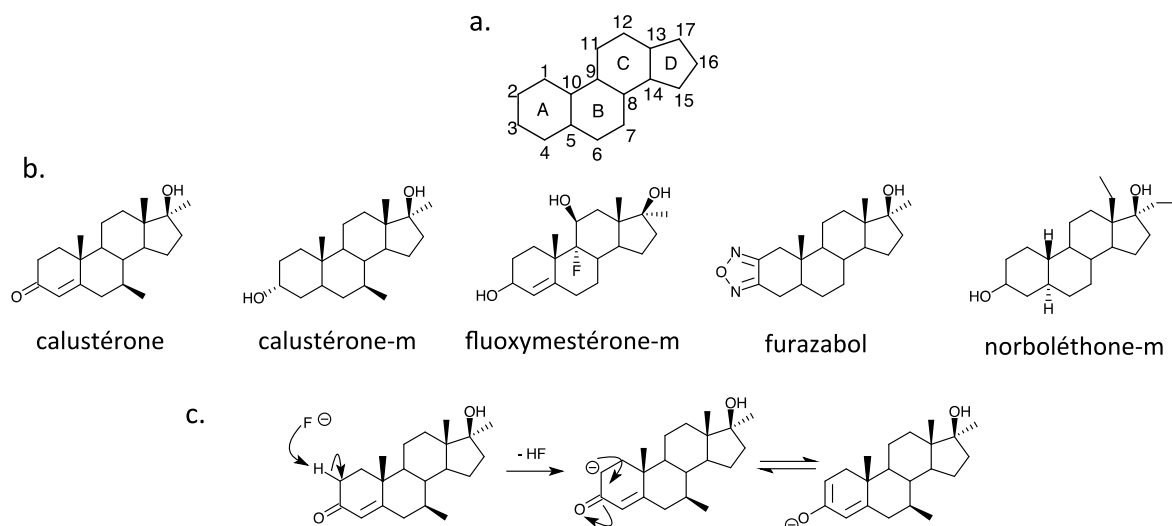
Stéroïde	<i>m/z</i>	ESI+	ESI-	ESI- et F <sup>-</sup>	APPI +	ESI- et F <sup>-</sup>
Instrument		TQ	TQ	TQ	Orbitrap	Orbitrap
<i>Calustérone</i>	315,5	25	50	25	100	100
<i>Calustérone-m</i>	339,5	250	Nd	25	Nd	100
<i>Furazabol</i>	329,5	25	100	25	1000	100
<i>Norbolétone-m</i>	319,5	250	Nd	25	Nd	100
<i>Fluoxymestérone-m</i>	353,4	25	25	10	2500	50

La comparaison des résultats obtenus pour l'ESI<sup>-</sup> et F<sup>-</sup> entre le TQ et l'Orbitrap montre que ce dernier possède une sensibilité moins élevée. Cela est notamment dû au fait que l'instrument sur lequel les analyses ont été effectuées est un Orbitrap de première génération, pour lequel les performances n'étaient pas encore optimales. Il faut donc analyser les résultats en sachant que l'instrument joue un rôle non-négligeable sur les valeurs obtenues.

Il doit être noté que même pour les composés donnant de bons résultats en ESI positif (sans additif), comme la fluoxymestérone-m, la LOD est améliorée lorsque le stéroïde est en présence de NH<sub>4</sub>F. La calustérone s'ionise très bien en ESI positif et peut être détectée à des concentrations de 25 ng/mL. Cette LOD est également celle obtenue en ESI négatif avec addition de fluorure. Quant à la fluoxymestérone-m, qui présente également une LOD de 25 ng/mL en ESI positif, l'ajout d'anion permet de faire descendre cette valeur à 10 ng/mL, soit un gain de 2,5 en sensibilité pour le même composé. Il est intéressant de voir que c'est le signal de l'ion déprotoné [M-H]<sup>-</sup> qui permet d'atteindre les LODs obtenues, alors que l'adduit fluoré pour ces deux composés n'est pas ou peu détecté. Ces observations peuvent être rationalisées en regardant les structures de ces stéroïdes. En effet, la calustérone possède un proton en position 2 (Schéma 26), qui se trouve en α du groupe cétone. La base conjuguée produite par le départ de ce proton est stabilisée par mésomérie avec formation d'un ion énolate, ce qui rend ce proton relativement labile. Ce mécanisme est également possible pour



le proton en position 4, également en  $\alpha$  du groupe cétone. Pour la fluoxymestérone-m, l'effet inductif du fluorure en  $\alpha$  du groupe hydroxyl en position 11 rend le proton de ce groupement fonctionnel également relativement labile. Dans le cas de ces deux stéroïdes l'anion favorise donc l'ionisation en augmentant la déprotonation.



**Schéma 26.** (a) Rappel de la nomenclature du squelette carboné des stéroïdes, (b) structures des stéroïdes étudiés pour la détermination des LODs instrumentales, (c) stabilisation de la base conjuguée de la calustérone après déprotonation.

Pour les composés faiblement acides et apolaires difficiles à ioniser (i.e. tous sauf le fluoxymestérone-m et la calustérone), l'utilisation de l'attachement anionique aboutit systématiquement à une amélioration du signal. Les résultats présentés dans le Tableau 7 montrent que la LOD instrumentale obtenue par spectrométrie de masse d'attachement anionique est toujours égale à, voire meilleure, que celle obtenue en ESI positif ou négatif sans anion. Dans le cas des composés les plus difficiles à ioniser (calustérone-m, norboléthane-m), aucun signal n'est enregistré en ESI négatif conventionnel, mais après l'addition de  $\text{NH}_4\text{F}$ , il devient possible de détecter les adduits anioniques de ces composés à des concentrations aussi basses que 25 ng/mL, ce qui représente 1/10 de la LOD obtenue en ESI positif. Au contraire de la fluoxymestérone-m et la calustérone, c'est le signal de l'adduit  $[\text{M}+\text{F}]^-$  qui reste visible aux faibles concentrations alors que le stéroïde déprotoné n'est plus détecté. La Phase I de métabolisation de la calustérone pour aboutir à la calustérone-m se traduit par une réduction de la cétone sur le cycle A en alcool. Le proton en position 2 devient beaucoup moins labile ce qui explique les LODs plus élevées obtenues en ESI positif et négatif sans additif. En ce qui concerne la norboléthane-m, on voit qu'aucun groupe

fonctionnel ou atome présent sur la molécule ne permet d'augmenter la labilité des protons. On obtient donc le même cas de figure où l'adduit est nécessaire pour détecter le stéroïde. Enfin le furazabol est un cas intermédiaire : un signal est obtenu en ESI<sup>-</sup> sans anion, ce qui montre qu'il possède une acidité quoiqu'elle soit très faible comme montré par une LOD très élevée. En présence d'anion, on divise par 4 la LOD obtenue. La MS d'attachement anionique montre ainsi une grande efficacité avec les stéroïdes ne présentant pas ou peu de sites acides, principalement grâce à la formation de l'adduit fluoré. Une précision importante est que l'acidité du composé étudié ne va pas avoir d'influence sur le signal obtenu (et donc par extension la LOD) mais uniquement sur l'espèce qui va permettre de détecter le stéroïde :  $[M-H]^-$  pour les molécules relativement acides (calustérone et fluoxymestérone) et  $[M+F]^-$  pour celles qui le sont peu ou pas (calustérone-m et norboléthone-m).

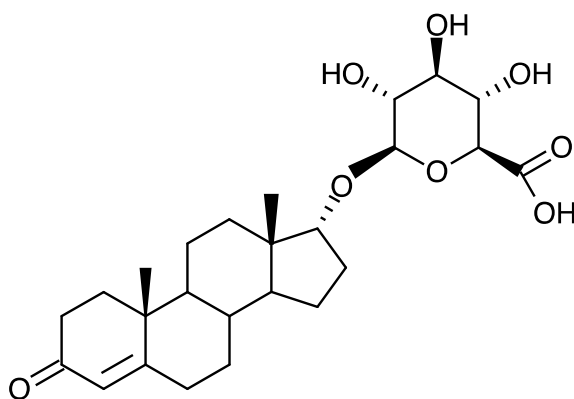
Les résultats montrent que tous les stéroïdes étudiés dans cette série d'expériences ne peuvent pas s'ioniser en APPI. La calustérone s'ionise facilement en APPI pour former  $[M+H]^+$ , un comportement qui s'accorde avec l'observation de molécules protonées en ESI positif. Le furazabol produit aussi  $[M+H]^+$  en APPI, mais en comparaison avec l'adduit formé grâce à l'attachement anionique en ESI, on voit que l'APPI est moins sensible d'un facteur de 100 (1000 ng/mL contre 10 ng/mL). Le métabolite de la fluoxymestérone forme le cation radical ( $M^{\bullet+}$ ) par analyse en APPI, mais ne permet d'obtenir qu'une LOD qui est 50 fois plus haute que celle de l'attachement anionique.

Les conclusions de ces expériences sont prometteuses car elles montrent que l'approche de spectrométrie de masse d'attachement anionique aboutit à une détection améliorée de tous les stéroïdes faiblement acides, difficiles à ioniser, comme montré par les valeurs de LOD instrumentales. Cette méthode nécessite des quantités très faibles d'analytes : une acquisition de 30 secondes d'une solution de 10 ng/mL de stéroïde, infusée dans l'instrument à 10  $\mu$ L/min, consomme seulement 50 pg d'échantillon, soit 0,141 pmol. L'infusion d'étalons en solvant n'est cependant pas représentative des conditions d'analyse d'un échantillon réel qui requiert une séparation par LC avant MS, est analysé dans matrice très polluée (urine), nécessite une lourde préparation d'échantillon, etc. Les étapes suivantes du projet ont donc visé à se rapprocher graduellement de cette complexité en augmentant point par point la difficulté des échantillons.

## **2.2. Cas des stéroïdes conjugués à la glucuronide**

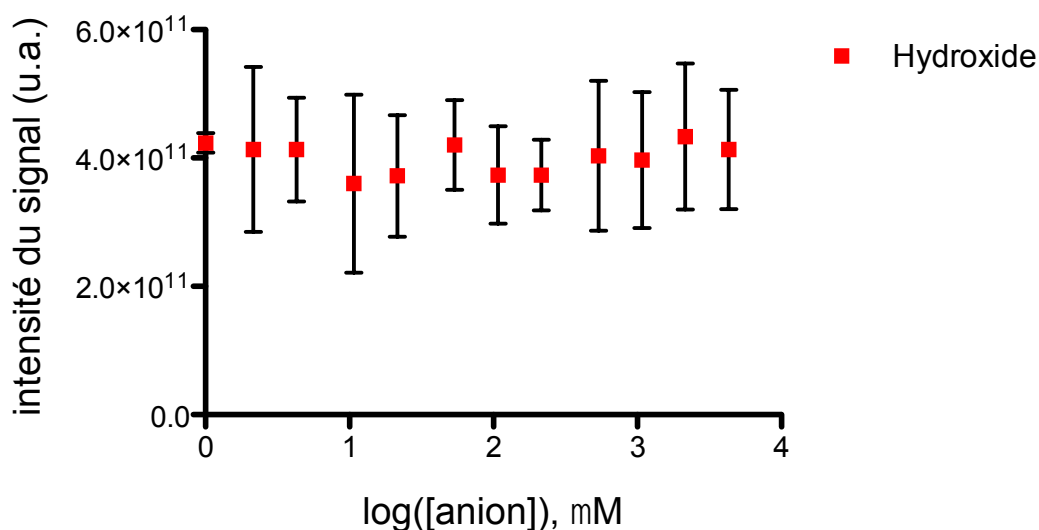
*En collaboration avec Mariana Bárcenas*

L'analyse de stéroïdes conjugués par MS est souvent compliquée du fait de la sensibilité insuffisante. Dans les protocoles utilisés dans ces travaux, les stéroïdes conjugués par la Phase II de métabolisme, comme ceux trouvés sous forme glucuronide ou sulfate, sont sujets à un clivage enzymatique avant l'analyse par GC-MS(/MS) ou LC-MS/MS. Les développements actuels tendent néanmoins vers une analyse directe de ces composés, comme préconisé dans la littérature.<sup>214,215,216</sup> Nous espérons améliorer la détection de ces composés en utilisant l'attachement anionique. En plus d'améliorer la sensibilité, une méthode directe d'analyse basée sur l'attachement anionique peut simplifier la préparation d'échantillons en éliminant le besoin d'une hydrolyse enzymatique. Cela permet de contribuer à l'élimination des faux négatifs provenant d'une hydrolyse incomplète. Pour tester la viabilité d'une telle procédure basée sur l'attachement anionique, l'épitestostérone-glucuronide a été sélectionnée comme composé modèle pour les expériences (Schéma 27).



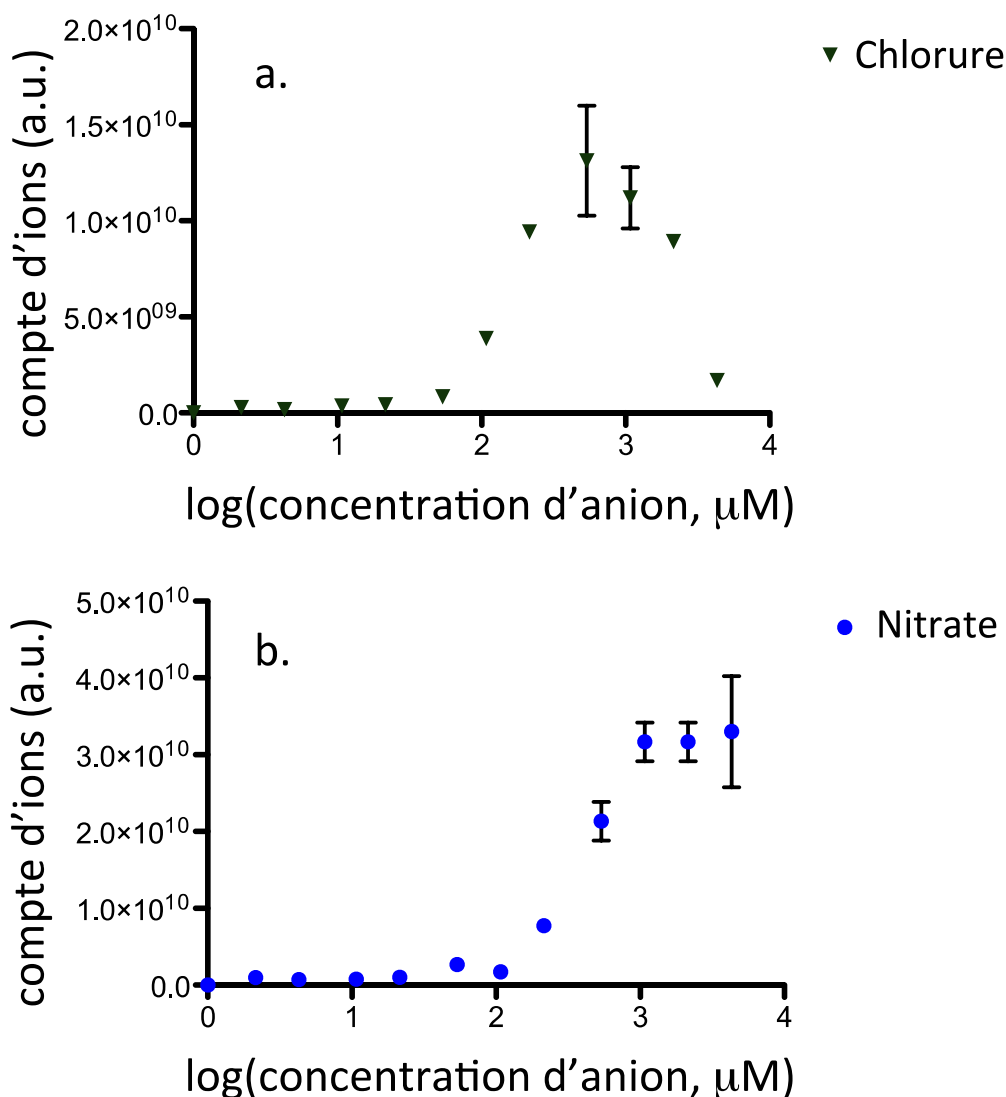
**Schéma 27.** Structure de l'épitestostérone-glucuronide

Dans un premier temps, l'hydroxyde d'ammonium a été utilisé pour évaluer l'influence de l'addition d'une base sur l'ionisation de l'épitestostérone-glucuronide étant donné que l'hydroxyde n'induit pas d'attachement anionique dû à sa haute basicité (il arrache un proton du stéroïde plutôt que de rester dans ses environs). Les résultats montrent que l'addition d'hydroxyde n'a pas d'effet significatif sur la formation de la molécule déprotonée comme observé dans la Figure 15, indiquant que l'épitestostérone-glucuronide s'ionise facilement en mode négatif pour former l'espèce  $[M-H]^-$ .



**Figure 15.** Intensité du signal de  $[M-H]^-$  de l'épitestostérone-glucuronide en présence d'hydroxyde. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur les mesures en triplicat.

Il a été précédemment montré que les ions chlorure<sup>217</sup> et nitrate sont particulièrement adaptés à l'attachement anionique pour une variété de monosaccharides. Ainsi, il est probable que ces anions s'attachent au groupe glucuronide avec un rendement élevé. L'effet de la concentration d'anion a été évalué pour maximiser la sensibilité de l'attachement anionique. Pour l'épitestostérone-glucuronide, le signal obtenu pour l'adduit chloré est moins intense que celui de l'adduit nitré :  $1,4 \times 10^{10}$  contre  $3,2 \times 10^{10}$  respectivement (Figure 16). Les limites de détections ont été étudiées avec l'anion le plus performant, c'est-à-dire le nitrate. Une série d'expériences a été effectuée dans laquelle la quantité d'épitestostérone-glucuronide est maintenue constante ( $1 \mu\text{g/mL}$ ,  $2,15 \mu\text{M}$ ), tandis que sont ajoutées des concentrations de plus en plus importantes de nitrate, allant de 0 à  $4300 \mu\text{M}$  (de 0 à 3,6  $\log([anion])$ ) soit un ratio molaire stéroïde:anion de 1:0 à 1:2000 respectivement.



**Figure 16.** Intensité du signal de (a)  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$  et (b)  $[\text{M}+\text{NO}_3]^-$  de l'épistestérone-glucuronide. Les barres d'erreur représentent la déviation standard sur les mesures en triplicat.

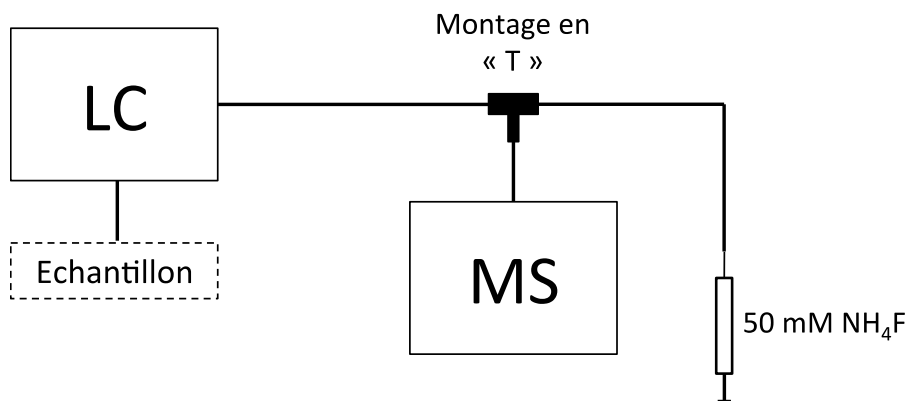
La formation de l'adduit de nitrate commence à augmenter lorsque la concentration de l'anion est 100 fois supérieure à celle du stéroïde, atteignant un maximum pour un ratio stéroïde:nitrate de 1:500 ( $\log([\text{anion}]) = 3$ ), au delà duquel l'intensité reste constante (Figure 16b). Les limites de détection de l'épistestérone-glucuronide en présence et absence de nitrate ont été évaluées. Deux séries de solutions ont été préparées : une sans additif et l'autre avec un ratio molaire de 1:1000 (stéroïde:nitrate). Les solutions contenant le stéroïde à différentes concentrations ont été analysées par ordre croissant de concentration afin de déterminer la limite de détection instrumentale de l'épistestérone-glucuronide ( $S/N > 3$ ). Les résultats montrent une limite de détection de 5 ng/mL pour le stéroïde sans additif et de 25 ng/mL pour l'adduit nitré. Ainsi, ces expériences montrent que la formation de l'adduit de nitrate n'améliore pas l'intensité du signal en comparaison avec le composé seul ou en

présence d'hydroxyde (la LOD obtenue avec le nitrate est même plus faible que celle sans anion). La glucuronide possède un groupement acide carboxylique dont le pKa est de 2,9 (+0,10, -0,05) dans l'eau.<sup>218</sup> Cela implique qu'un stéroïde glucuro-conjugué est ionisé (perte d'un proton) lorsqu'il est placé en solution ce qui explique les très bonnes LODs obtenues sans ajout d'anion. On voit que non seulement le nitrate n'améliore pas la sensibilité des analyses, mais au contraire entrave les performances et aboutit à de moins bonnes valeurs de LOD. L'ajout d'un anion sur une molécule qui est déjà capable de former  $[M-H]^-$  en abondance par elle-même peut potentiellement bloquer le site de déprotonation et réduire l'ionisation du composé. Ce résultat est intéressant à mettre en relation avec les expériences précédentes (Tableau 7) puisqu'il permet de voir que l'attachement anionique favorise la déprotonation uniquement si le composé est faiblement acide (comme la fluoxymestérone-m). Dans le cas de molécules très acides comme l'épitestostérone-glucuronide, l'ajout d'un anion se fait au contraire au détriment de la déprotonation. On conclut donc que pour l'analyse des stéroïdes conjugués à la glucuronide en ESI négatif, l'attachement anionique n'est pas la méthode de choix pour l'amélioration des performances analytiques.

### **3. Développement expérimental de la méthode SRM basée sur l'attachement anionique**

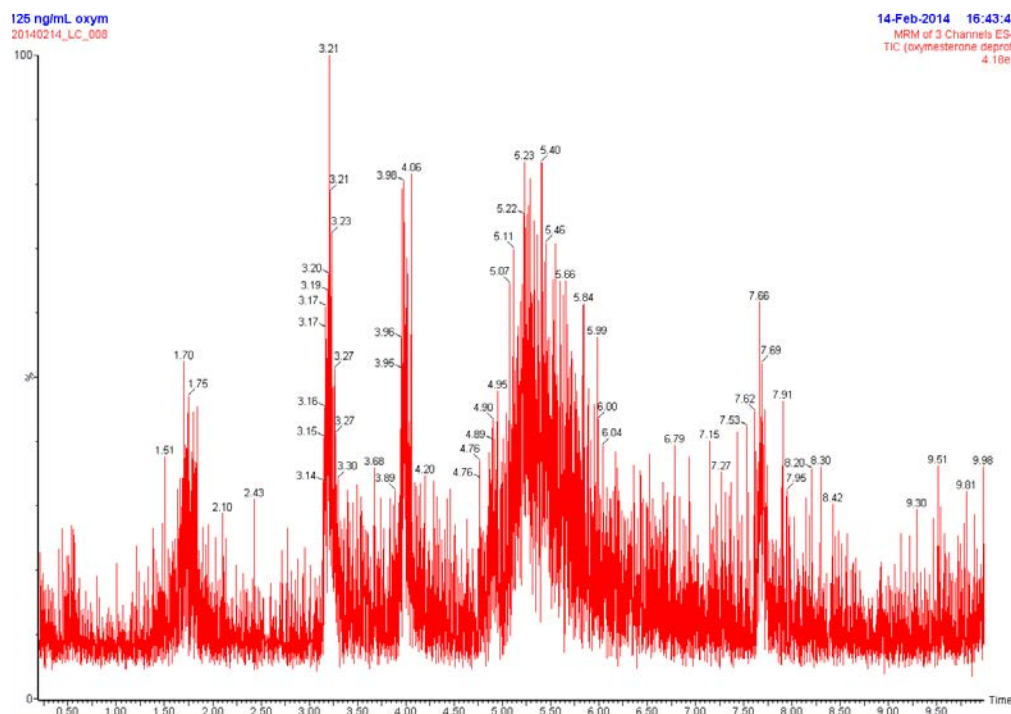
#### **3.1. Analyses préliminaires en matrice simple (solvant)**

Les expériences de LOD ont montré des performances intéressantes pour la méthode basée sur l'attachement anionique, il a donc pu être possible d'augmenter la complexité des analyses en intégrant une séparation chromatographique en phase liquide couplée à une méthode SRM. Les premiers tests de LC-MS/MS ont été effectués en utilisant une colonne utilisée pour les analyses de confirmation des stéroïdes : la Zorbax SB-C<sub>8</sub> de Agilent (cf : Annexe D, Tableau 14 page 149). Chaque composé a été préparé dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O en proportion égale à celle de la phase mobile à  $t = 0$  (10% MeOH, 90% H<sub>2</sub>O v/v). La solution à 50 mM de NH<sub>4</sub>F contenue dans une seringue est mélangée au flux de la LC à la sortie de la colonne avant la source d'ionisation grâce à un montage en « T » (Schéma 28). La formation des adduits prend donc place post-colonne. Le débit de la seringue est de 10  $\mu$ L/min, et celui de la LC 0,4 mL/min.



**Schéma 28.** Montage expérimental des analyses préliminaires par LC-MS/MS.

Chaque composé est analysé individuellement par la méthode SRM de façon à obtenir son temps de rétention (i.e. le temps que met le soluté à sortir de la colonne, soit le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué) et son comportement chromatographique : intensité du signal, forme du pic, etc. Sur l'ensemble des composés, certains n'ont pas pu être gardés pour le développement chromatographique du fait des profils inexploitable, c'est par exemple le cas de l'oxymestérone qui présente de nombreux pics sur le chromatogramme ainsi qu'un bruit de fond très important (Figure 17) malgré une concentration d'échantillon élevée (50 fois la concentration de la LOD visée).



**Figure 17.** Chromatogramme d'une solution de 125 ng/mL d'oxymestérone dans MeOH/H<sub>2</sub>O 10/90 (v/v) analysée en LC-MS/MS.

Pour le reste des composés donnant un pic distinct et identifiable avec un temps de rétention précis en chromatographie, les temps de rétention ont été relevés. Bien que les transitions permettent de différencier deux composés qui co-éluent, il est tout de même préférable d'avoir des éluions espacées dans le temps afin d'obtenir la meilleure séparation chromatographique possible. Les données obtenues sont récapitulées dans le Tableau 8.

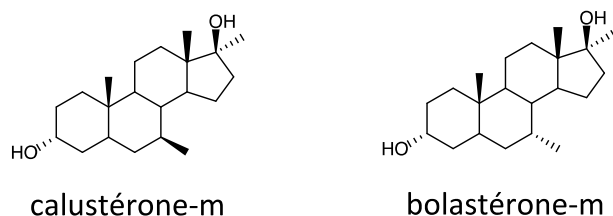
**Tableau 8.** Temps de rétention des stéroïdes sur la colonne Zorbax SB-C<sub>8</sub> dans les conditions présentées Tableau 15 Annexe D.

<b>Composé</b>	<b>Temps de rétention (min)</b>
<i>Fluoxymestérone-m</i>	1,09
<i>Turinabol-m</i>	4,29
<i>Furazabol-m</i>	7,95
<i>Testostérone-d3</i>	8,00
<i>Furazabol</i>	9,32
<i>Bolastérone-m</i>	9,34
<i>Calustérone</i>	9,34/9,59
<i>Calustérone-m</i>	9,36
<i>Norboléthone</i>	9,57
<i>Norboléthone-m</i>	9,62

Bien que tous les composés donnent du signal, plusieurs problèmes se sont posés lors de ces analyses :

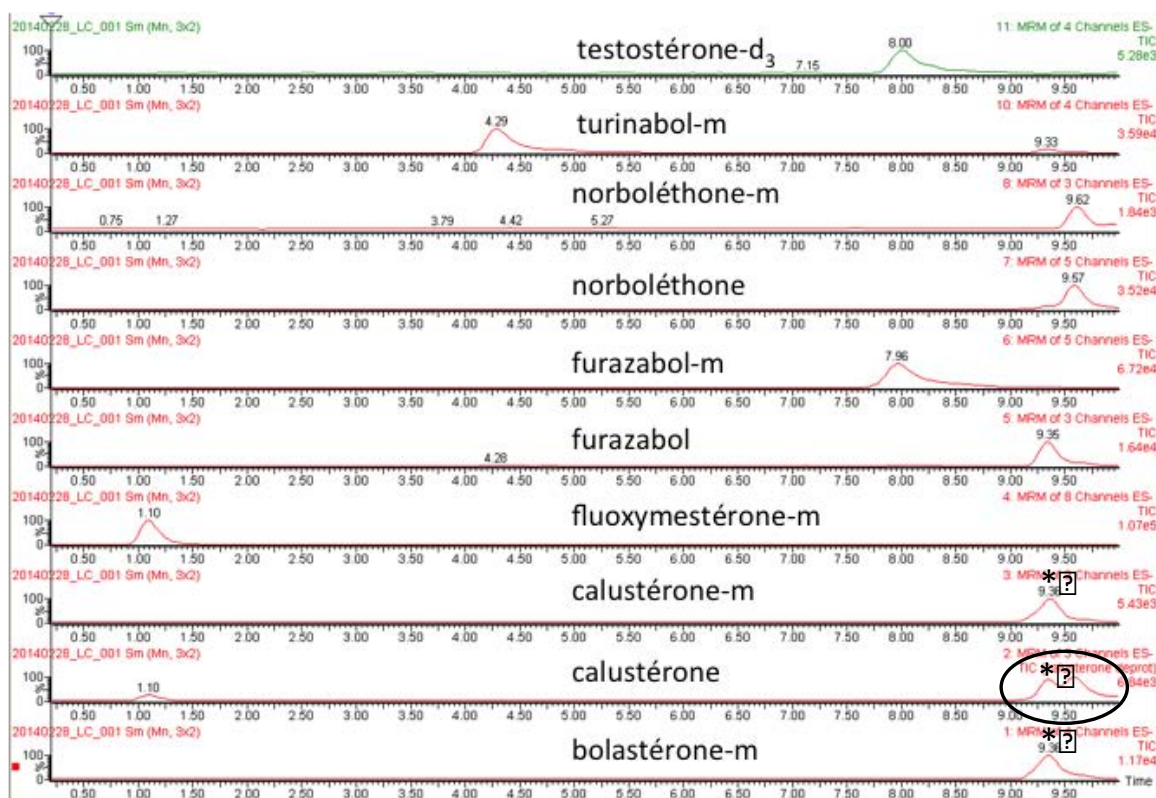
- La calustérone affiche 2 pics non résolus par LC-MS/MS (Figure 18, cercle noir). Cela est dû à la sélection de transitions non-spécifiques : la méthode donne une réponse lorsqu'un autre stéroïde élue de la colonne.
- Le même temps de rétention (9,36 min) a été observé pour la bolastérone-m, calustérone-m et calustérone (Figure 18, \*). La bolastérone-m et la calustérone-m sont des isomères et il apparaît donc que les conditions utilisées ne permettent pas de faire la distinction entre deux composés n'étant différenciés que par leur stéréochimie (Schéma 29). Cependant la calustérone est structuralement différente et n'est pas isobare aux deux composés précédents. Il se pose ici le problème de transitions non-spécifiques, c'est-à-dire que certains composés répondent aux mêmes transitions que la calustérone, conduisant potentiellement à des faux positifs (un pic est obtenu même si le composé n'est pas présent dans l'échantillon analysé).





**Schéma 29.** Structure de la calustérone-m et bolastérone-m, des stéroïdes isomères.

- La plupart des composés éluent à des compositions en solvant de la phase mobile très proches, aboutissant à des temps de rétention quasi-similaires.
- La granulométrie de la colonne étant très faible (1,8 micron), la pression dépassait occasionnellement le seuil limite de l'instrument à 1030 bar causant l'arrêt de toute la machine.



**Figure 18.** Chromatogrammes du mélange de 10 stéroïdes en solvant à 100 ng/mL analysés par LC-MS/MS avec une injection de 20  $\mu$ L et un débit de phase mobile de 0,4 mL/min (Tableau 15 Annexe D).

Plusieurs tentatives d'optimisations du gradient ont été réalisées de façon à résoudre ces problèmes mais si une meilleure séparation des composés a été obtenue (temps de rétention plus distincts les uns des autres), le reste des problèmes exposés ci-dessus n'a pas pu

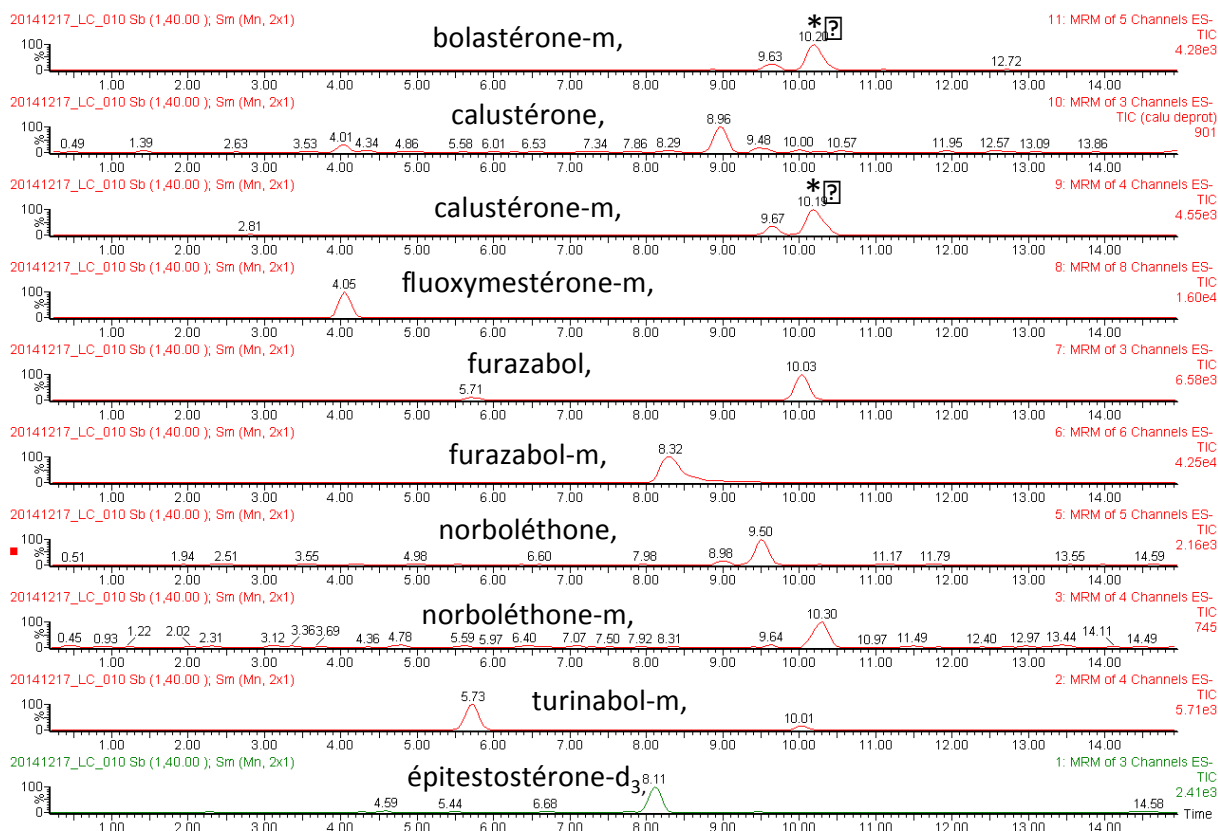
être résolu. La plupart des complications rencontrées avec la première colonne proviennent principalement de sa faible granulométrie. Les composés sont retenus trop longtemps et éluent sur une période très restreinte du gradient (à partir de 1 minute avant la fin du gradient de 10 minutes) et la pression est trop haute pour une reproductibilité des analyses. Il a donc été décidé d'utiliser la colonne Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> qui est plus longue, composée des billes de taille plus importante et a une granulométrie plus élevée (cf : Annexe D, Tableau 14 page 149).

La première conséquence a été une diminution drastique de la pression dans le système : elle est passée de 800-1000 bar à 70-90 bar ce qui se situe très largement en dessous de la limite maximale. Ainsi, le problème de surpression a été réglé. Les propriétés de la nouvelle colonne étant différentes de celles de l'ancienne, le gradient a été optimisé (cf : Annexe D, Tableau 15 page 149). Les composés ont été à nouveau analysés individuellement afin d'obtenir leurs nouveaux temps de rétention (Tableau 9). On peut voir que l'éluion s'étale sur une période temporelle plus importante que précédemment ce qui permet une distinction plus claire entre les composés (Figure 19). La bolastérone-m et calustérone-m sont toujours co-élusés (Figure 19, \*) mais le reste des stéroïdes ont des temps distincts les uns des autres. Avec l'erreur expérimentale, des  $t_r$  différant de 0,1 min sont considérés comme distinguables, ce qui n'est pas le cas si l'écart n'est que de 0,01 min.

**Tableau 9.** Temps de rétention des stéroïdes sur la colonne Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub>.

<b>Composé</b>	<b>Temps de rétention (min)</b>
<i>Fluoxymestérone-m</i>	4,05
<i>Turinabol-m</i>	5,73
<i>Epitestostérone-d3</i>	8,11
<i>Furazabol-m</i>	8,32
<i>Calustérone</i>	8,96
<i>Norboléthone</i>	9,50
<i>Furazabol</i>	10,03
<i>Bolastérone-m</i>	10,20
<i>Calustérone-m</i>	10,20
<i>Norboléthone-m</i>	10,30

Une fois ces informations obtenues, la solution contenant les 10 stéroïdes a de nouveau été analysé par LC-MS/MS (Figure 19). Tous les composés donnent un pic chromatographique avec un signal variable mais plus élevé qu'avec la précédente colonne. Avec les nombreux avantages qu'elle apporte, la Zorbax Eclipse est donc conservée pour la suite des tests.



**Figure 19.** Chromatogrammes du mélange de 10 stéroïdes en solvant à 100 ng/mL analysés par LC-MS/MS après le changement de colonne.

### 3.2. Analyses en matrice semi-complexe (urine synthétique)

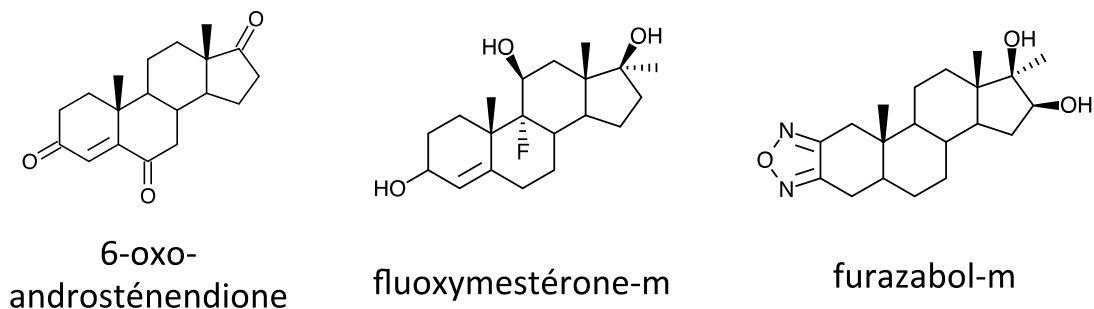
Les expériences en solvant ont montré un potentiel intéressant de l'attachement anionique pour l'analyse des stéroïdes bien que les analyses réalisées se situent dans des conditions éloignées d'un échantillon réel : matrice simple (solvant) sans contaminants et concentrations élevées, ce qui évite les étapes de purification/concentration à effectuer. La suite du développement de la méthode consiste à se rapprocher des paramètres d'analyse d'un contrôle antidopage, notamment en utilisant de l'urine comme matrice d'échantillon.

La première étape est de mettre en place la procédure de préparation d'échantillon qui permet d'éliminer une partie des nombreuses interférences présentes dans l'urine (protéines, autres petites molécules organiques, etc). La procédure « Hydrolyse et SPE » (Annexe C page 145) est utilisée pour la purification des échantillons d'urine afin de les analyser en screening GC-MS/MS. C'est une méthode de sélectivité moyenne basée sur une hydrolyse enzymatique ( $\beta$ -glucuronidase) et une SPE qui a l'avantage d'éliminer rapidement la plupart des impuretés de l'échantillon. Les stéroïdes ne sont plus analysés en mélange mais individuellement



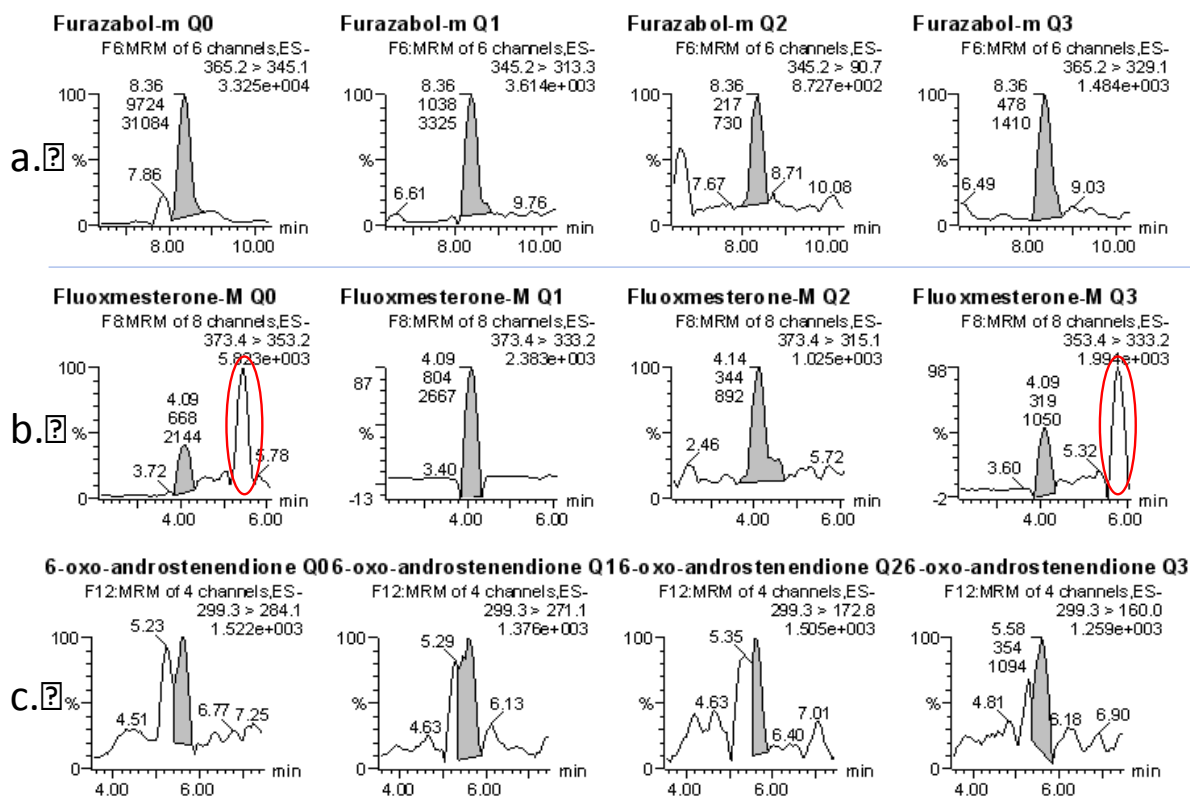
### 3.3. Analyses en matrice complexe (urine)

#### 3.3.1. Evaluation du processus analytique sur 3 stéroïdes



**Schéma 30.** Rappel des structures des 3 stéroïdes étudiés en matrice urinaire.

Les expériences en matrice urinaire ont été effectuées sur les volumes d'urine humaine supplémentée en stéroïde, i.e. des standards de stéroïdes sont ajoutés à l'urine à la concentration désirée. Ces échantillons sont ensuite traités par la procédure « Hydrolyse et SPE » et analysés en LC-MS/MS. Les premières expériences ont montré des résultats peu satisfaisants pour certains composés. Il a été décidé de se concentrer particulièrement sur les stéroïdes ayant fourni les résultats les plus prometteurs et qui se trouvent être ceux s'ionisant le moins bien avec les méthodes classiques : le fluoxymestérone-m et furazabol-m. Un autre composé a également été étudié : la 6-oxo-androsténendione (Schéma 30). Les transitions SRM obtenues pour ces 3 composés à 20 ng/mL en urine sont montrées dans la Figure 21.



**Figure 21.** Transitions SRM obtenues par LC-MS/MS de solutions à 20 ng/mL de (a) furazabol-m, (b) fluoxymestérone-m, et (c) 6-oxo-androsténendione en matrice urinaire après préparation par la méthode « hydrolyse et SPE ».

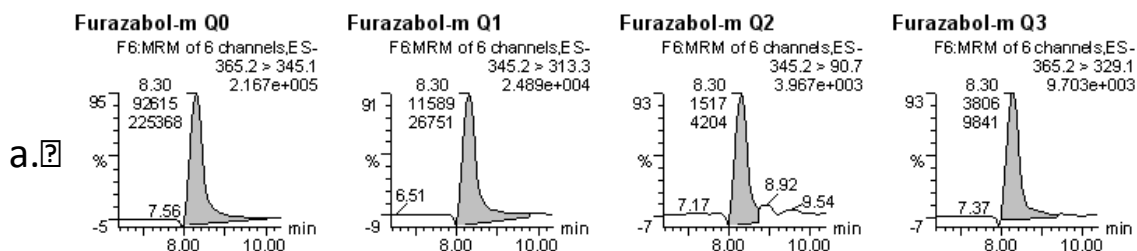
Les 3 stéroïdes analysés présentent un signal pour chacune des 4 transitions intégrées dans la méthode SRM. Le furazabol-m a le meilleur profil avec des pics bien définis et relativement intenses, un bruit de fond bas et peu d'interférences (Figure 21a). Seule la transition Q2 montre un S/N plus faible avec un petit pic de contamination à 6,5 min. Cependant il est résolu temporairement par rapport au pic du stéroïde ce qui montre qu'il n'interfère pas avec le signal recherché. Si l'on compare ces résultats avec ceux de l'urine synthétique pour le même stéroïde, on voit que les transitions sont plus intenses et mieux définies. Cela est dû à la concentration plus importante du composé lors des analyses en matrice urinaire par rapport à l'urine synthétique (20 ng/mL contre 10 ng/mL, respectivement). Le fluoxymestérone-m présente des chromatogrammes plus contaminés (Figure 21b). Les transitions Q0 et Q3 possèdent les plus grands pics d'interférence, qui sont dus à des composés ayant des transitions communes avec le composé d'intérêt mais n'éluant pas en même temps. Ces transitions correspondent à une perte de -20 Da ( $373.4 > 353.2$  pour Q0 et  $353.4 > 333.2$  pour Q3) ce qui représente un départ de HF. Certaines molécules présentes dans l'urine ayant le même  $m/z$  que les ions précurseurs ([fluoxy-m+F]<sup>+</sup>) de ces 2

transitions peuvent récupérer un fluorure lors de la rencontre avec le flux de la seringue contenant la solution d'anion et se déprotomer avec perte de HF, aboutissant à un fragment à - 20 Da. Elles apparaissent ainsi sur le chromatogramme du fluoxymestérone-m (Figure 21b, ellipses rouges). Bien que ces contaminations soient importantes, elle ont un temps de rétention bien distinct de celui du stéroïde et n'entravent pas la détection du composé. Enfin, la 6-oxo-androsténendione donne un signal correct pour ses 4 transitions avec cependant un bruit de fond assez élevé. On remarque également un dédoublement du pic du stéroïde qui a été étudié plus en détails (cf : Annexe G page 152). Les expériences réalisées pour expliquer ce phénomène n'ont pas abouti à des conclusions satisfaisantes.

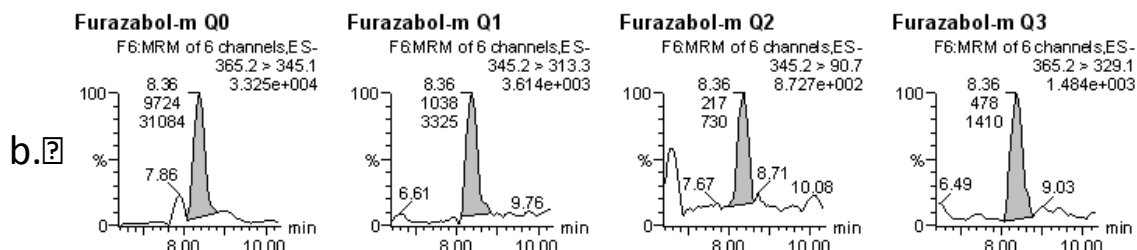
### **3.3.2. Gamme de dilution**

Par la suite, les échantillons ont été préparés avec différentes concentrations afin d'évaluer la sensibilité de la méthode. Les tests ont été réalisés sur des solutions urinaires à 20, 10, et 5 ng/mL, ainsi qu'un standard à 20 ng/mL préparé en solvant et ne passant pas par la procédure « Hydrolyse et SPE » (Figure 22).

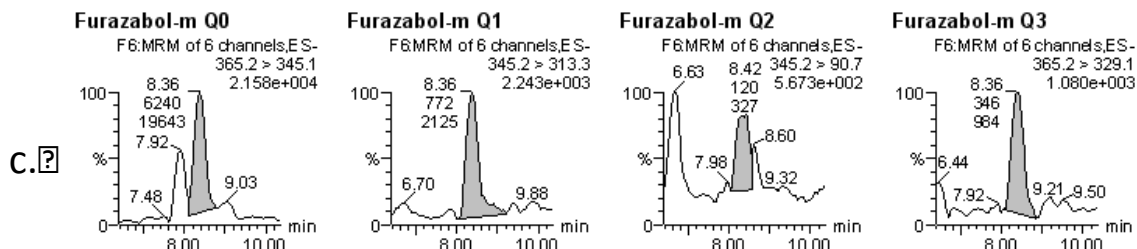
Name: 20150204\_LC\_001, ID: fura-M STD 20ng/mL, Date: 04-Feb-2015



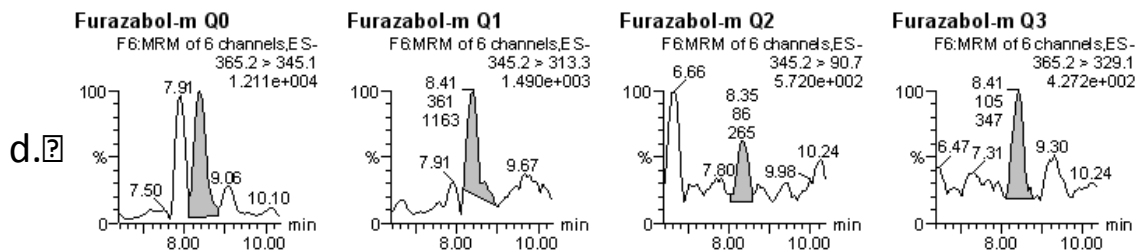
Name: 20150204\_LC\_003, ID: fura-M 20ng/mL urine, Date: 04-Feb-2015



Name: 20150204\_LC\_004, ID: fura-M 10ng/mL urine, Date: 04-Feb-2015



Name: 20150204\_LC\_005, ID: fura-M 5ng/mL urine, Date: 04-Feb-2015



**Figure 22.** Analyse en LC-MS/MS (a) d'un standard de furazabol-m à 20 ng/mL, et d'une gamme de solutions de furazabol-m en matrice urinaire après traitement « Hydrolyse et SPE » à (b) 20 ng/mL, (c) 10 ng/mL et (d) 5 ng/mL.

Les chromatogrammes du standard préparé en solvant sont excellents ce qui montre qu'il n'y pas eu de dysfonctionnement de l'instrument lors des analyses (Figure 22a). La comparaison de l'échantillon en matrice urinaire à 20 ng/mL (même concentration que le standard) montre que les intensités sont plus faibles du fait de : i) la procédure de préparation d'échantillon qui n'assure pas une extraction totale du stéroïde (pertes lors de la SPE notamment) et ii) l'effet de la matrice qui augmente le bruit de fond (donc diminue S/N) et peut provoquer un effet de suppression d'ionisation par la présence de contaminants (Figure 22b). Le signal reste néanmoins très bon et tout à fait exploitable pour l'identification du



composé :  $t_r$  constant pour les 4 transitions et S/N élevé (à part pour Q2). La diminution en concentration provoque une diminution attendue du signal mais le ratio signal-sur-bruit reste tout à fait correct (Figure 22c). A 5 ng/mL, les transitions n'ont plus S/N > 3. On note que la transition Q2 est celle qui donne le signal le plus faible et où les interférences y sont les plus grandes. La transition Q0 est également contaminée par un très grand pic à 7,9 min (Figure 22c et 22d). Q0 correspond au fragment obtenu par le départ de HF, ce qui explique la plus grande contamination comme expliqué précédemment pour le fluoxymestérone-m.

Les mêmes gammes ont été réalisées pour le fluoxymestérone-m et la 6-oxo-androsténendione et sont consultables en Annexe H page 157. Les mêmes tendances sont observées pour ces deux composés avec des intensités plus faibles pour les signaux SRM et un bruit de fond un peu plus important.

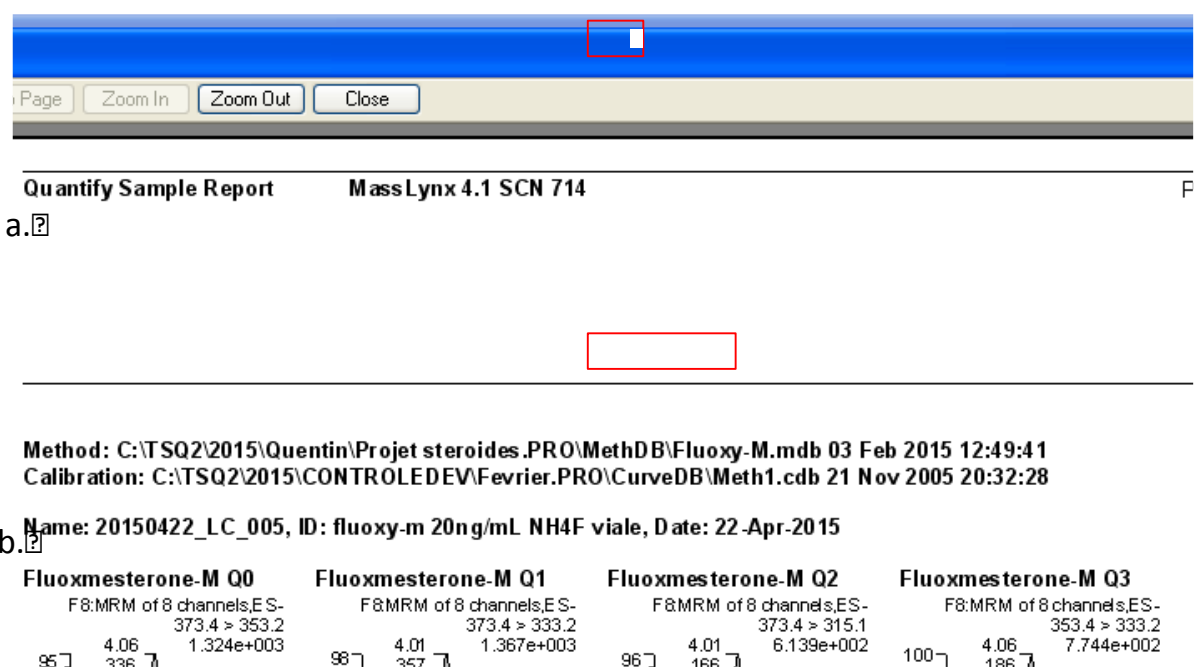
### 3.3.3. Ajustements expérimentaux

Les résultats obtenus à ce point ne sont pas mauvais, mais il faut rappeler que si la MRPL officielle déterminée par l'AMA est fixée à 5 ng/mL, une méthode n'est validée que si elle atteint une LOD de 2,5 ng/mL. Ainsi, il est nécessaire de modifier certains paramètres expérimentaux pour que la méthode d'attachement anionique atteigne des LODs plus basses de façon à ce qu'elle remplisse les conditions fixées. Pour cela plusieurs aspects de la procédure ont été étudiés successivement.

#### *Ajout et concentration de la solution de NH<sub>4</sub>F*

Jusqu'à ce point, la solution de NH<sub>4</sub>F contenue dans une seringue était mélangée à l'échantillon en sortie de colonne grâce à un montage en « T ». Deux problèmes sont apparus : i) un manque de praticité du montage : il faut remplir la seringue régulièrement et on ne peut donc pas passer de nombreux échantillons à la suite les uns des autres, ii) les effets de mélange dans le « T » et la différence de débit (10 µL/min pour la seringue et 400 µL/min pour la LC) rendent la quantité d'anion ajoutée peu reproductible. Une solution a été d'introduire l'anion en amont de la colonne en le mélangeant directement avec l'échantillon lors de la dernière étape de sa préparation. Ainsi le fluorure est présent dans les vials et il n'est plus nécessaire de recourir au montage en « T ». Cela permet également l'analyse consécutive d'un nombre illimité d'échantillons. Le signal obtenu est également légèrement augmenté mais sans différence significative à l'erreur expérimentale près.

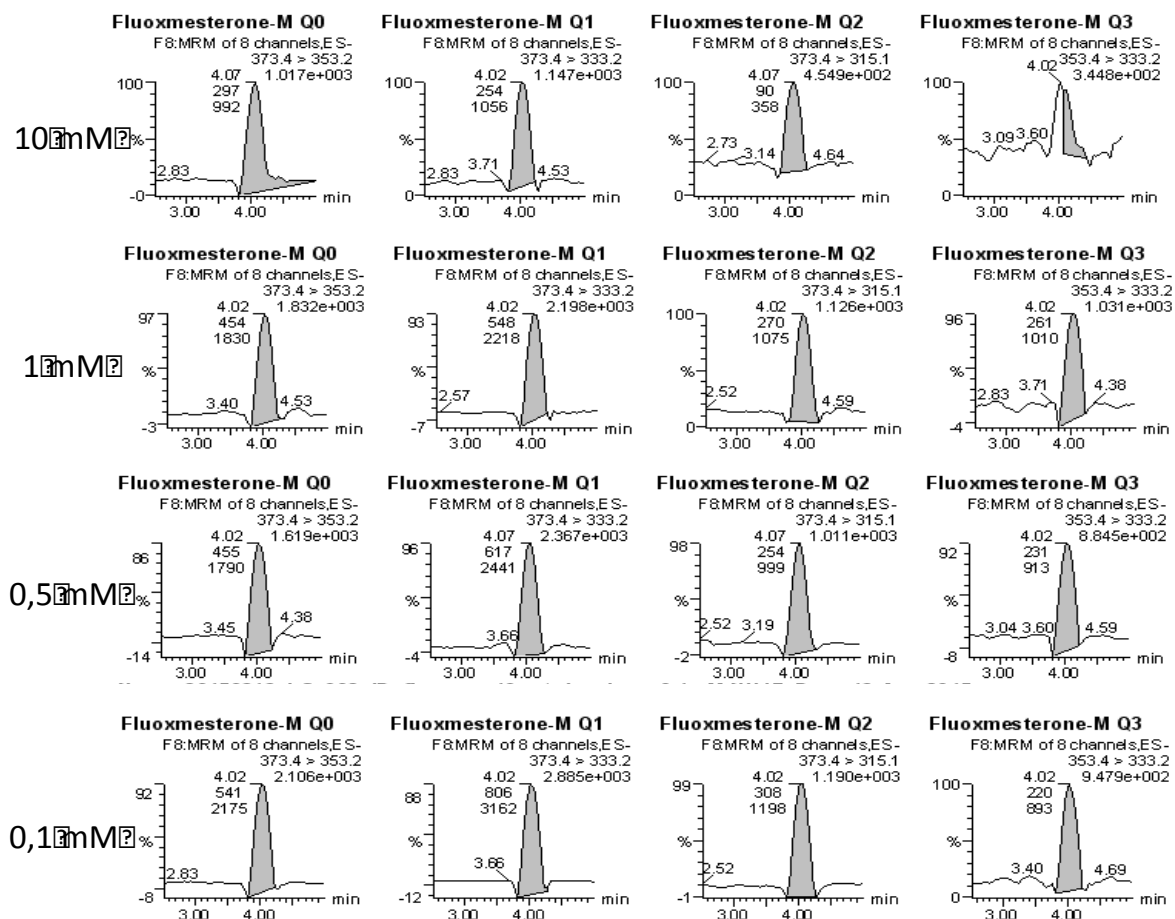
L'ajout de l'anion dans la vial marque les premiers tests où le NH<sub>4</sub>F est introduit avant la colonne ouvrant un questionnement sur la stabilité des adduits stéroïde-fluorure lors de la séparation chromatographique. Cet aspect a été étudié lors des expériences sur la LOD en LC en fonction de la concentration d'anion (§1.2.3. de ce chapitre), et le risque de la dissociation des adduits fluorés dans la colonne (et donc une baisse du signal final) est bien réel. Une alternative contournant ce problème a alors été testée : l'intégration du fluorure directement dans la phase mobile de LC. L'utilisation de fluorure dans la phase mobile de LC a été reportée dans la littérature pour d'autres applications.<sup>219,220</sup> Les solvants H<sub>2</sub>O et MeOH sont préparés avec 1 mM de NH<sub>4</sub>F permettant ainsi un apport uniforme en anion tout au long de l'analyse. Une étude comparative du signal obtenu pour une solution de fluoxymestérone-m à 20 ng/mL lorsque l'anion est dans la vial ou dans la phase mobile a été effectuée (Figure 23).



**Figure 23.** Comparaison des transitions SRM d'une solution de 20 ng/mL de fluoxymestérone-m avec le fluorure présent dans (a) la vial ou (b) la phase mobile.

On note une augmentation du signal d'un facteur environ 3 lorsque l'anion est présent dans la phase mobile (Figure 23b). De plus, le bruit de fond de l'ensemble des transitions (notamment visible sur Q2) est diminué. Un autre facteur important est que les deux formes du stéroïde (adduit fluoré et espèce déprotonée) éluent au même temps de rétention à 4,0 min. Le contraire aurait été problématique puisqu'il aurait été nécessaire de créer des méthodes indépendantes pour un même stéroïde, compliquant les analyses et augmentant le temps de calcul du système informatique. En considérant l'amélioration des performances, l'anion est conservé dans la phase mobile pour la suite des expériences. Le test a été réalisé à une

concentration de 1 mM qui a été choisie suite à une publication O. Yanes *et al.* dans laquelle il est déterminé que cette valeur est optimale lors de leurs analyses.<sup>219</sup> Dans le but de maximiser le signal, d'autres concentrations ont été testées de façon à garantir l'optimisation de toutes les conditions expérimentales. Un échantillon de 10 ng/mL de fluoxymestérone-m en solvant a été analysé en LC-MS/MS avec une phase mobile contenant successivement 10 mM, 1 mM, 0,5 mM, et 0,1 mM de NH<sub>4</sub>F (Figure 24).



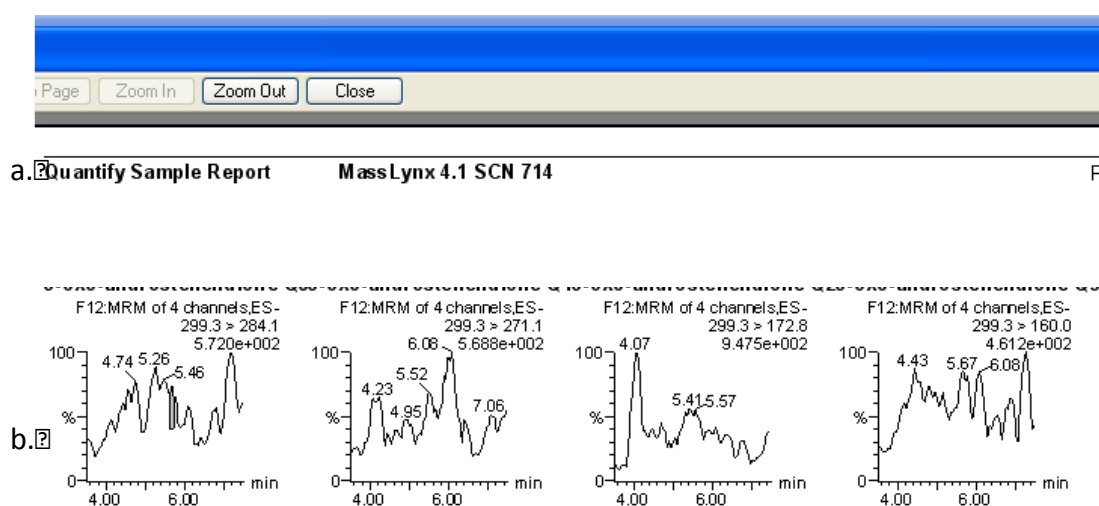
**Figure 24.** Comparaison du signal des transitions SRM d'un échantillon de 10 ng/mL de fluoxymestérone-m analysé en LC-MS/MS avec différentes concentrations de NH<sub>4</sub>F dans la phase mobile de LC.

A l'observation de l'aspect général des transitions et de l'intensité des signaux, il apparaît que l'anion permet d'obtenir un signal optimal (i.e. intensité la plus élevée, peu de bruit de fond) lorsqu'il est à la concentration de 0,1 mM dans la phase mobile. Des concentrations plus élevées d'anion provoquent un bruit de fond plus important et donc une détection moins efficace du stéroïde. Cette conclusion est à mettre en relation avec l'étude de l'optimisation d'anion en LC discutée précédemment. Les expériences présentées au §1.2.3.

de ce chapitre montraient que des concentrations importantes de fluorure permettaient d'obtenir un signal élevé pour le stéroïde. Nous voyons ici qu'une concentration trop élevée d'anion permet effectivement d'obtenir une intensité plus importante pour le stéroïde, mais cela entraîne aussi une augmentation notable du bruit de fond. Ainsi, la valeur 0,1 mM de fluorure offre un bon compromis entre un bon signal pour l'analyte et une limitation du bruit de fond.

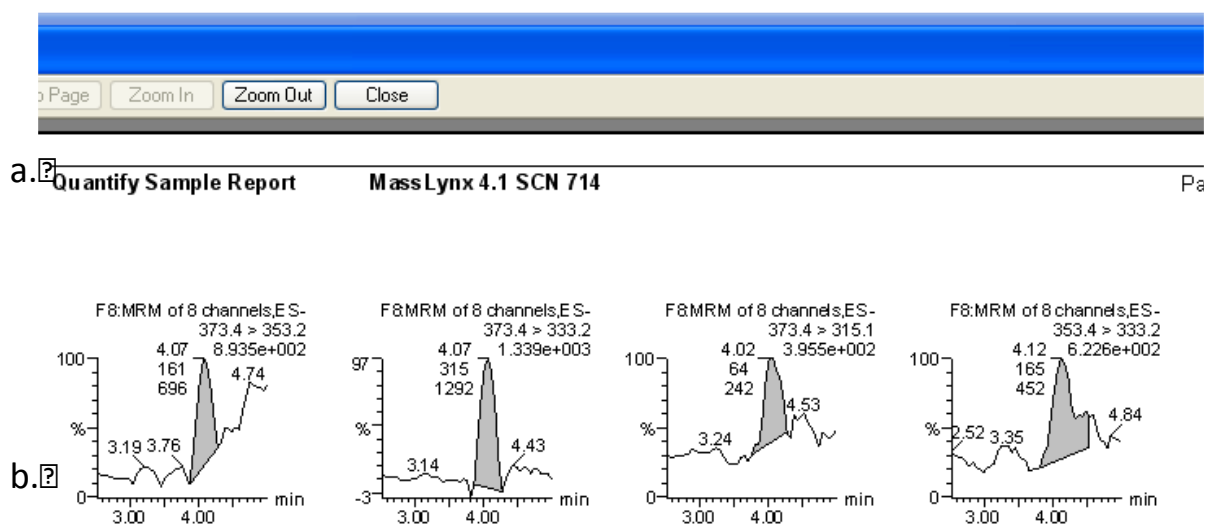
### *Méthode de préparation d'échantillon*

La procédure « Hydrolyse et SPE » se démarque par un bon équilibre entre la rapidité d'exécution et la capacité de purification. Cependant c'est une procédure qui vise à préparer les échantillons pour du screening où les exigences sont plus basses (il ne faut par exemple qu'une seule transition SRM pour identifier le stéroïde). Dans le cas d'une méthode de confirmation qui demande 3-4 transitions et une identification sans ambiguïté il est nécessaire d'analyser un échantillon le plus propre possible. Dans cette optique deux autres méthodes de préparation d'échantillon ont été évaluées : l'une basée sur des extractions liquide-liquide (« Hydrolyse et LLE ») et l'autre sur une SPE puis une LLE (« SPE, hydrolyse et LLE »). Les détails étape par étape de ces procédures sont consultables en Annexe C page 145. Des échantillons de 6-oxo-androsténendione et fluoxymestérone-m à 20 ng/mL ont été préparés en matrice urine et purifiés avec la méthode « Hydrolyse et LLE » (Figure 25). L'anion est présent dans la phase mobile à 0,1 mM.



**Figure 25.** Transitions SRM suite à l'analyse d'échantillons de (a) fluoxymestérone-m et (b) 6-oxo-androsténendione à 20 ng/mL en matrice urine préparés avec la méthode « Hydrolyse et LLE ».

Les résultats d'analyses montrent que la technique de préparation d'échantillon basée uniquement sur des séparations liquide-liquide ne convient pas pour la détection des stéroïdes avec l'attachement anionique. Cette constatation n'est pas surprenante puisque bien que la préparation soit la plus rapide de celles testées, la purification est très faible et il reste beaucoup d'interférences dans la matrice. Ainsi, aucun signal n'est obtenu pour les deux composés, et le bruit de fond est extrêmement élevé (Figure 25). La méthode « Hydrolyse et LLE » n'est donc pas retenue. La seconde méthode testée repose sur deux procédures d'extraction : une SPE avant l'hydrolyse enzymatique et une LLE après. On attend de cette méthode des échantillons plus propres du fait de la double extraction des stéroïdes. Afin de tester cette hypothèse, une comparaison a été effectuée en préparant deux échantillons de fluoxymestérone-m en urine à 10 ng/mL, l'un avec la méthode « Hydrolyse et SPE » et l'autre avec la méthode « SPE, hydrolyse et LLE » (Figure 26). L'anion est présent dans la phase mobile à 0,1 mM.



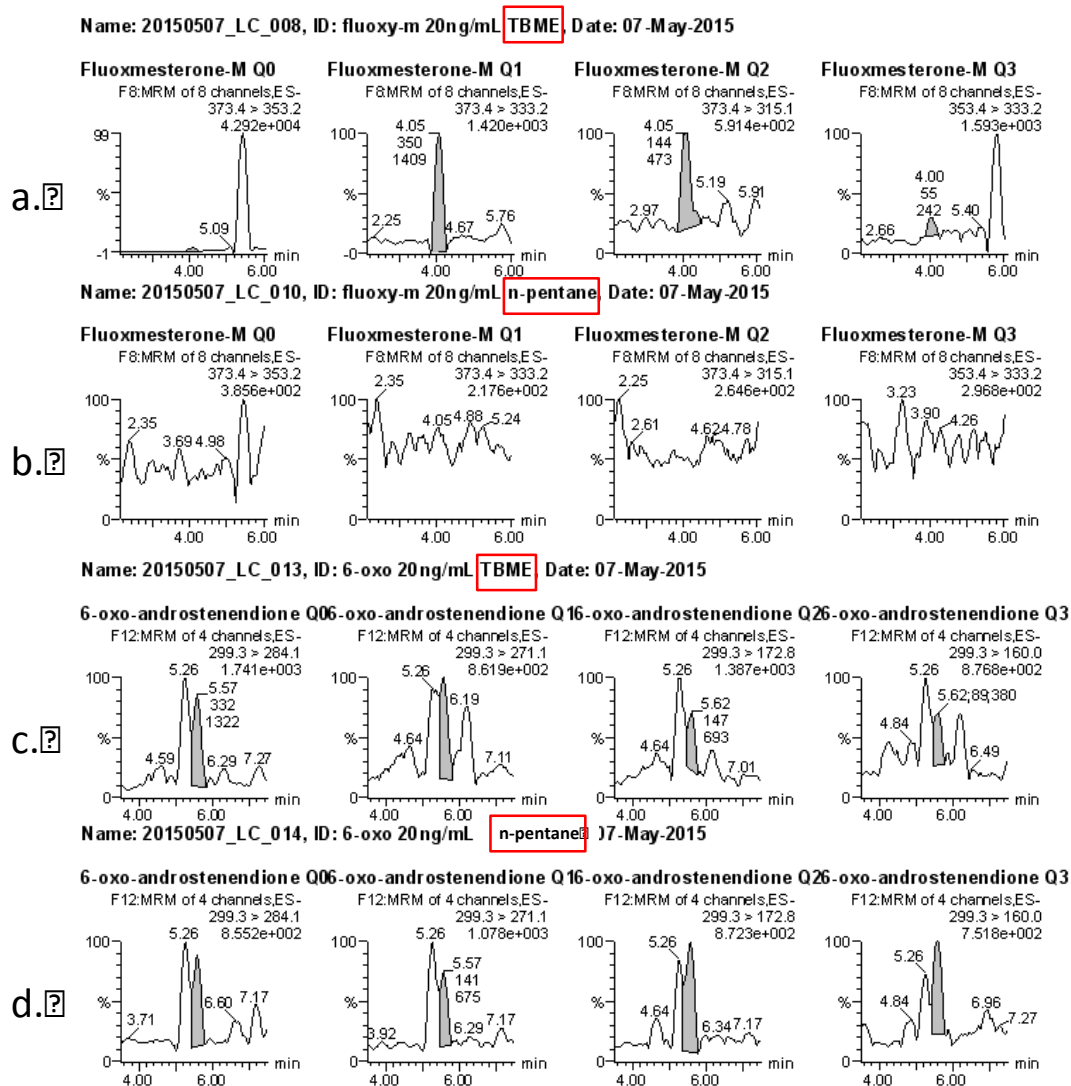
**Figure 26.** Transitions SRM d'échantillons de fluoxymestérone-m à 10 ng/mL en matrice urinaire préparés avec la méthode (a) « hydrolyse et SPE » et (b) « hydrolyse, SPE et LLE ».

Les chromatogrammes obtenus avec les deux méthodes de préparation n'ont pas un aspect satisfaisant et l'intensité des transitions est faible. La technique « Hydrolyse et SPE » ayant fait ses preuves dans les expériences précédentes il apparaît que la mauvaise qualité des résultats est due à des problèmes instrumentaux ponctuels. Les tests sont effectués sur des échantillons préparés en même temps et analysés le même jour dans les mêmes conditions. Ainsi les résultats obtenus, bien que peu satisfaisants de manière absolue, permettent une comparaison relative des deux méthodes. De ce fait les expériences ne sont pas répétées

malgré les problèmes rencontrés. On voit néanmoins une amélioration de l'information lorsque l'on utilise la méthode « SPE, hydrolyse et LLE », notamment pour la transition Q1. Cette méthode présente en effet plusieurs avantages :

- La double purification par SPE et LLE permet de retirer la grande majorité des interférences dans l'échantillon.
- A la différence de la méthode « Hydrolyse et SPE », la SPE se fait avant l'hydrolyse enzymatique par la  $\beta$ -glucuronidase ce qui permet une meilleure sélectivité et la diminution de résidus dans l'échantillon à la suite à la digestion.
- La filtration par centrifugation avant la mise en vial pour la LC permet une nouvelle fois de se débarrasser des impuretés résiduelles

L'inconvénient majeur de la technique « SPE, hydrolyse et LLE » est le temps de préparation assez important. Cependant il n'est pas dépendant du nombre d'échantillons (à part à l'étape de mise à pH et la SPE, mais qui est automatisée) offrant ainsi la possibilité de préparer une grande quantité d'échantillons à la fois. Il est à noter que cette méthode est utilisée pour les stéroïdes analysés en confirmation, ce qui correspond au but de ces travaux et est donc plus adaptée pour le développement de la procédure d'analyse utilisant l'attachement anionique. Pour l'étape de LLE, deux solvant sont conseillés : le méthyl *tert*-butyl éther (TBME) dans lequel la quasi-totalité des stéroïdes étudiés est soluble mais qui récupère également des impuretés, ou le n-pentane qui est beaucoup plus sélectif (échantillon plus propre) mais ne permet pas à tous les stéroïdes d'être extraits. Ces deux solvants ont été testés pour l'extraction du fluoxymestérone-m et de la 6-oxo-androsténendione (Figure 27). L'anion est présent dans la phase mobile à 0,1 mM.



**Figure 27.** Transitions SRM d'un échantillon de fluoxymestérone-m à 20 ng/mL en matrice urinaire extrait par LLE avec du (a) TBME ou (b) n-pentane et d'un échantillon de 6-oxo-androsténendione à 20 ng/mL en matrice urinaire extrait par LLE avec du (c) TBME ou (d) n-pentane.

En ce qui concerne le fluoxymestérone-m il apparaît clairement que le n-pentane n'est pas une option pour l'extraction liquide-liquide : le stéroïde a un coefficient de partition trop faible avec ce solvant (il reste donc dans sa matrice actuelle et n'est pas du tout extrait), aucune transition n'est observée (Figure 27b). Le TBME permet au contraire de l'extraire et produit des chromatogrammes corrects malgré la présence de quelques fortes interférences, notamment pour Q0 (Figure 27a). Pour la 6-oxo-androsténendione on observe du signal lors des analyses résultant des extractions par les 2 solvants (Figure 27c et 27d). Le choix se porte donc sur la qualité des résultats obtenus. On voit que, comme attendu, le n-pentane produit des chromatogrammes avec moins d'interférences et un meilleur signal, ce qui est expliqué

par le fait que c'est un solvant plus sélectif avec qui les composés indésirables vont avoir un coefficient de partition faible. Pour la 6-oxo-androsténendione, le solvant LLE choisi est donc le n-pentane.

#### *Usure de la colonne de LC*

Le dernier aspect étudié pour maximiser les performances de la méthode est l'évaluation de l'altération de la colonne. En effet, la colonne LC peut subir une dégradation au fil des échantillons et sur la durée. C'est un problème d'autant plus pertinent que l'anion présent dans la phase mobile peut provoquer un vieillissement prématuré de la colonne. Un même échantillon de 10 ng/mL de fluoxymestérone-m a donc été testé sur la colonne Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> ayant servi à l'ensemble des expériences (9 mois et environ 250-300 injections) et une colonne identique n'ayant jamais servi à l'exception de son conditionnement pour sa mise en service. Les résultats (Figure 28) montrent que l'utilisation d'une colonne neuve entraîne seulement une très légère augmentation du signal. On observe également un faible déplacement du temps de rétention du composé. Des aspects intéressants de cette expérience sont que : i) la colonne n'est pas dégradée par la présence continue d'anion dans la phase mobile (pas de déplacement important du  $t_r$ , de perte majeure de signal, ou d'élargissement ou de déformation des pics) et ii) bien qu'il y ait une petite amélioration du signal du composé d'intérêt avec une colonne neuve la différence n'est pas importante (environ 1,2 fois les intensités de l'ancienne colonne) ce qui montre la robustesse de la colonne face à l'usure dans les conditions de la méthode.

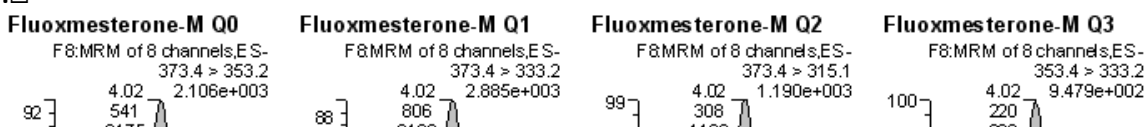




a.

Method: C:\TSQ2\2015\Quentin\Projet steroïdes.PRO\MethDB\Fluoxym-M.mdb 03 Feb 2015 12:49:41  
 Calibration: C:\TSQ2\2015\CONTROLEDEV\Fevrier.PRO\CurveDB\Meth1.cdb 21 Nov 2005 20:32:28

b. Name: 20150813\_LC\_002, ID: fluoxym-m 10ng/mL solvant 0,1mM NH4F, Date: 13-Aug-2015



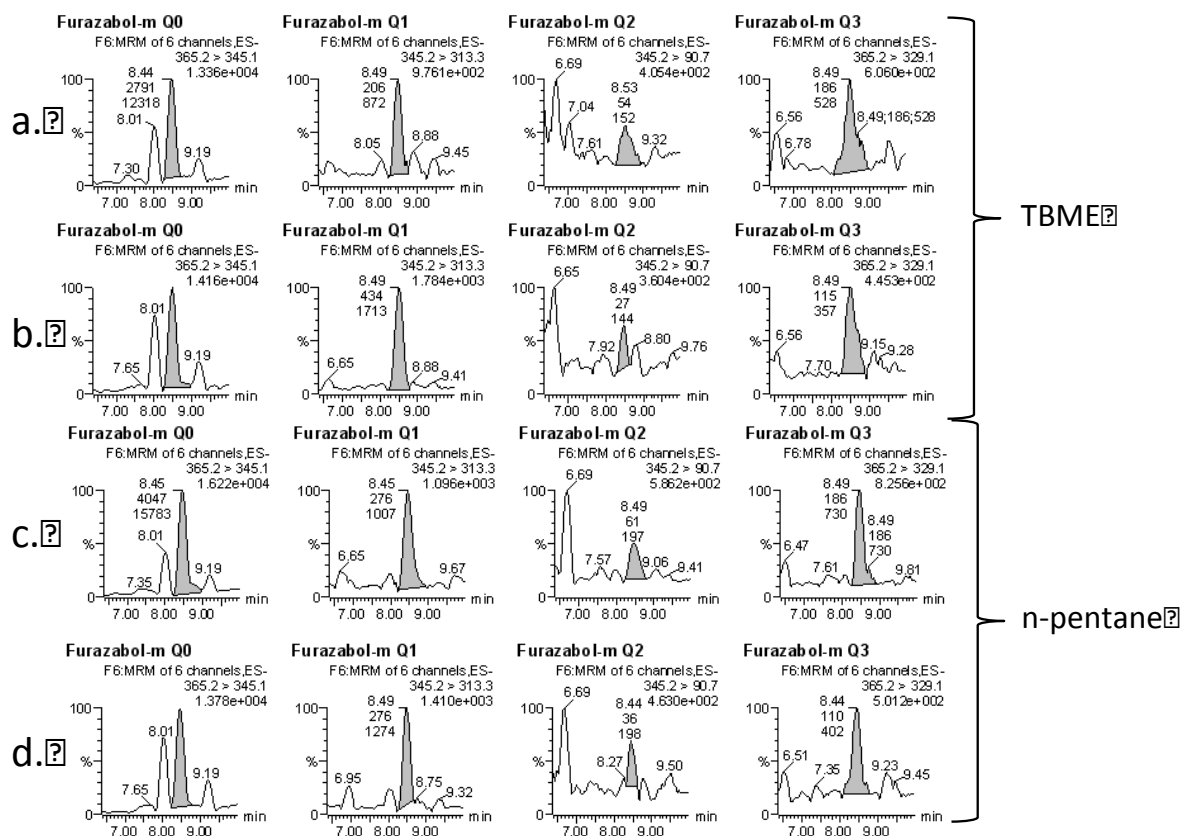
**Figure 28.** Transitions SRM d'un échantillon de fluoxymestérone 10 ng/mL en solvant sur un colonne LC Zorbax Eclipse (a) usagée ou (b) neuve.

## 4. Validation de la méthode SRM basée sur l'attachement anionique

Chaque paramètre d'analyse a été optimisé et étudié de façon à obtenir un signal maximal et des informations significatives pour l'identification des stéroïdes. La dernière étape pour la mise en place de la méthode SRM basée sur l'attachement anionique est sa validation, i.e. l'évaluation de ses performances (LOD, sélectivité, répétabilité, effet de matrice, etc) pour s'assurer de sa robustesse.

### 4.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction permet d'évaluer les pertes lors de la procédure de préparation d'échantillon. Expérimentalement, on compare un échantillon surchargé en stéroïde qui subit l'ensemble de la procédure à un autre échantillon où seule la matrice est préparée, et l'on surcharge en stéroïde (à la même concentration que le premier échantillon) juste avant l'analyse par LC-MS/MS. La comparaison des signaux obtenus pour les deux échantillons permet de déterminer le rendement de la procédure d'extraction. Les résultats de ce test pour des échantillons de furazabol-m à 10 ng/mL extraits avec TBME ou n-pentane sont présentés Figure 29.



**Figure 29.** Comparaison des signaux SRM observés pour des échantillons de furazabol-m à 10 ng/mL avec surcharge en stéroïde extrait au TBME (a) après et (b) avant la procédure de préparation d'échantillon, et extrait au n-pentane (c) après et (d) avant la procédure d'extraction.

Si l'observation des transitions individuelles permet d'évaluer la qualité du signal, pour le calcul du rendement d'extraction il est plus pertinent de considérer l'ensemble du signal obtenu. Les intensités en compte d'ion total sont donc présentées dans le Tableau 10.

**Tableau 10.** Intensité du signal d'échantillons de furazabol-m à 10 ng/mL surchargés avant ou après la procédure d'extraction.

Solvant	TBME		n-pentane	
	Post-extraction	Pré-extraction	Post-extraction	Pré-extraction
Intensité (TIC)	$1,13 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$	$1,42 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$

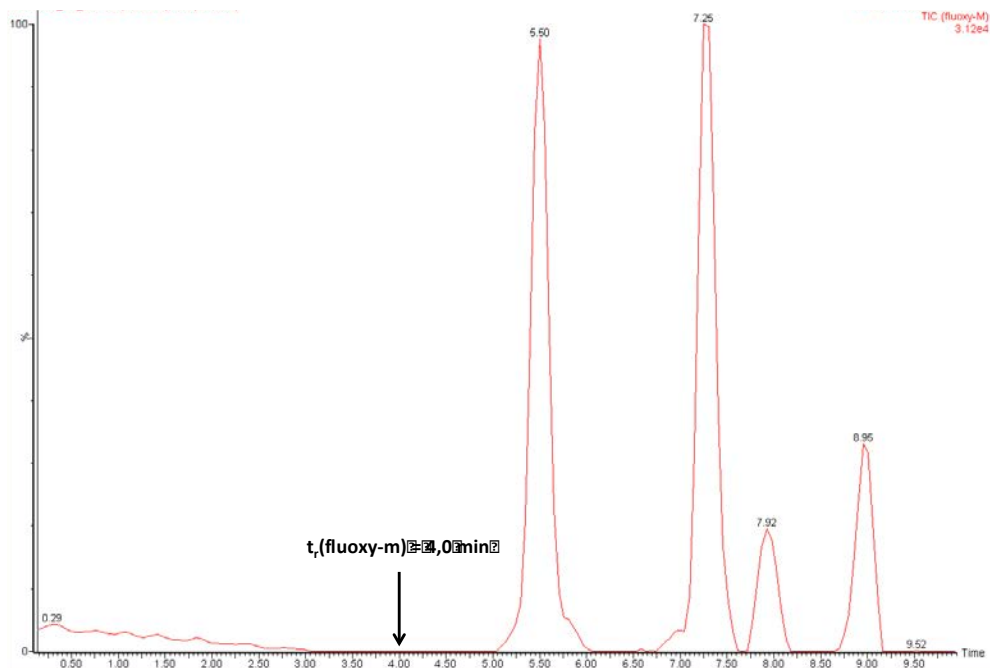
On obtient un rendement d'extraction de 111% pour le TBME et de 85% pour le n-pentane. La valeur obtenue pour le n-pentane, qui est un solvant très sélectif, est très satisfaisante et l'observation des transitions montre que ce solvant peut être utilisé dans la procédure de préparation d'échantillon. Le rendement pour le TBME était attendu à une

valeur plus élevée que celle du n-pentane puisque le TBME est moins sélectif et récupère à la fois plus d'analyte mais aussi d'impuretés. Cependant une valeur supérieure à 100% est le signe d'une erreur expérimentale ou d'une fluctuation du signal du composé lors de l'analyse. Ce résultat confirme cependant que les pertes liées à la procédure de préparation d'échantillon sont faibles. Dans le cas du furazabol-m il est donc possible de choisir entre le TBME et le n-pentane pour la LLE.

#### 4.2. Effet de matrice

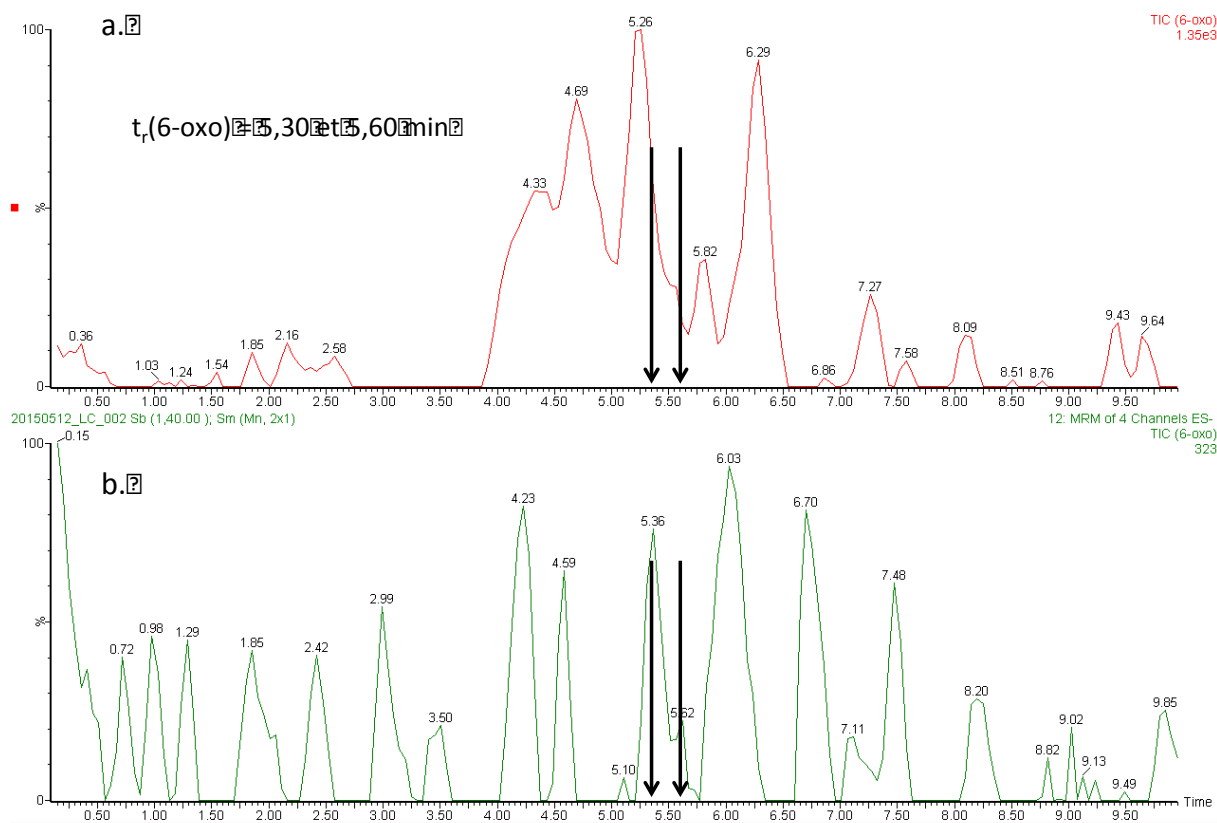
Comme il a été évoqué à plusieurs reprises dans les paragraphes précédents, une matrice complexe comme l'urine peut poser de nombreux problèmes lors d'une analyse à des concentrations faibles (analyte de l'ordre de plusieurs unités de ng/mL). On trouve dans l'urine un grand nombre de composés allant de la petite molécule organique aux protéines à des concentrations extrêmement variables. La haute sélectivité de la LC-MS/MS ne garantit pas l'élimination efficace des interférences liées aux impuretés endogènes. De ce fait, les analyses par ESI peuvent être affectées par des effets de suppression d'ionisation causés par la présence de la matrice. Ce phénomène est appelé « effet matrice » et peut être responsable de données erronées et non reproductibles.<sup>221</sup>

Afin d'évaluer l'effet matrice sur la détection des stéroïdes d'intérêt, un protocole décrit dans la littérature a été appliqué.<sup>222</sup> Un blanc d'urine a été préparé selon la méthode « SPE, hydrolyse et LLE » et injecté en LC. A l'aide d'un montage en « T » (cf : Schéma 28 page 107), une solution de stéroïde introduite à l'aide d'une seringue rencontre le flux de la LC contenant l'échantillon d'urine. On obtient ainsi un signal où le composé est toujours présent et qui varie en fonction des impuretés présentes dans la matrice. Si la matrice ne contient aucune interférence, on aboutit donc à une ligne plate correspondant au signal de stéroïde étant détecté en continu. Toute déviation de cette ligne continue correspond à un composé de la matrice interférant avec les transitions du stéroïde étudié. Cette expérience a été réalisée avec le fluoxymestérone-m à 10 ng/mL dans la seringue et une extraction de l'urine avec TBME (Figure 30).



**Figure 30.** Chromatogramme TIC montrant l'effet de la matrice extraite au TBME sur le fluoxymestérone-m à 10 ng/mL.

On observe des contaminations très abondantes à des temps de rétention de 5,50 min, 7,25 min, 7,92 min, et 8,95 min. Ces signaux sont très intenses et montrent que des espèces présentes dans la matrice répondent aux transitions du fluoxymestérone-m. Cependant les temps de rétention observés pour ces interférences sont éloignés de celui du stéroïde et celles-ci ne créent donc pas d'effet de suppression de signal lorsque le fluoxymestérone-m élué de la colonne (d'où le suivi en mode TIC). L'effet matrice est ici clairement visible mais ne pose de pas de problème pour l'analyse de ce composé. L'expérience est répétée avec la 6-oxo-androsténendione à 10 ng/mL avec deux échantillons de la matrice : une fois extrait avec du TBME et l'autre avec du n-pentane (Figure 31).

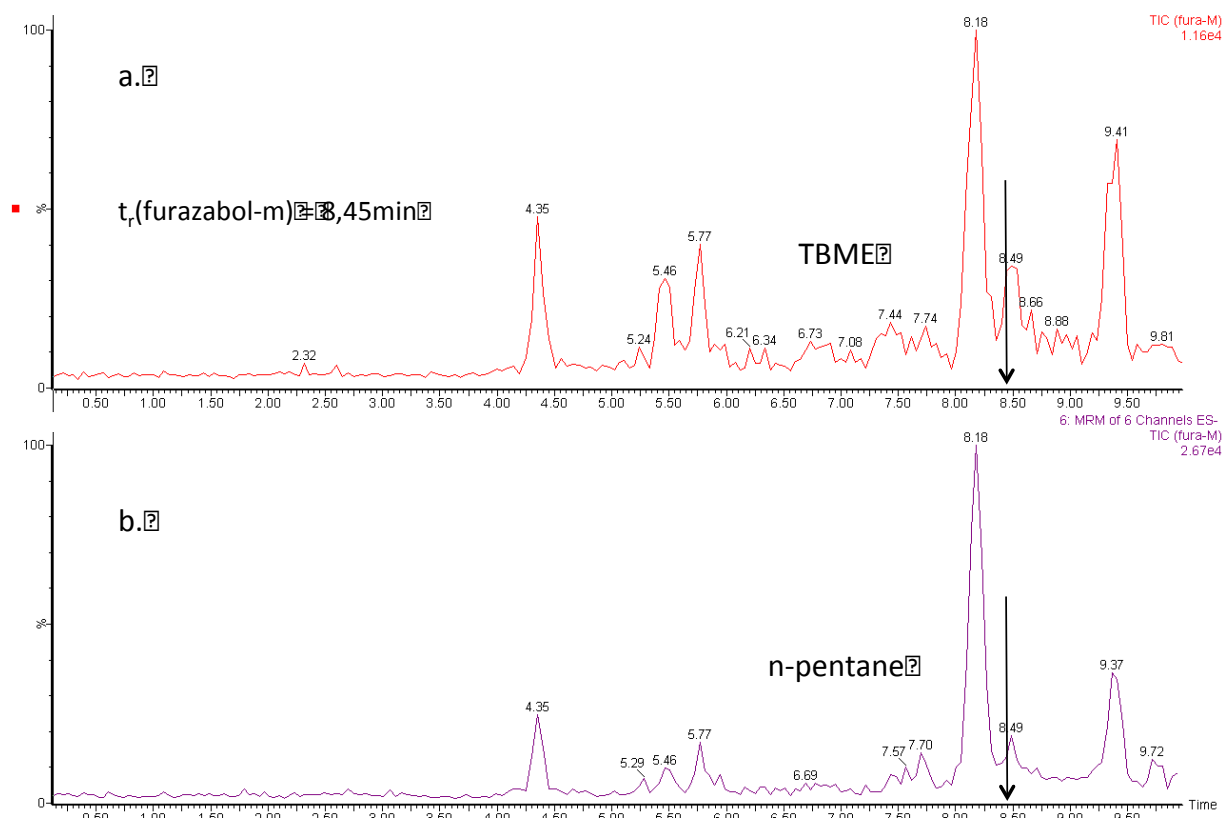


**Figure 31.** Chromatogramme TIC montrant l'effet de la matrice extraite au (a) TBME et (b) n-pentane sur la 6-oxo-andronsténendione à 10 ng/mL. Les flèches indiquent les temps de rétention du signal dédoublé de la 6-oxo-androsténendione.

Le cas de la 6-oxo-androsténendione est intéressant puisqu'il apporte non seulement des informations sur l'effet matrice mais également sur l'influence du solvant d'extraction lors de l'étape de LLE. On peut voir que lorsque la matrice a été préparée et extraite avec le TBME, le signal observé est important ce qui dénote la présence de contaminants dans la matrice qui se fragmentent de manière identique au stéroïde, induisant du signal pour les transitions sélectionnées (Figure 31a). Il faut noter que ces interférences sont bien moins intenses que celles observées avec le fluoxymestérone-m. Un pic d'interférence matricielle important élué à 5,26 min soit quasiment en même temps que le premier pic de la 6-oxo lors de l'extraction TBME. Cela pose problème puisque la présence de ce contaminant peut induire une suppression de l'ionisation du stéroïde et réduire son signal, donc la sensibilité de la méthode. Si l'on s'intéresse au chromatogramme obtenu avec la matrice extraite au n-pentane (Figure 31b), on voit que le signal est très homogène (la représentation est normalisée ce qui peut induire en erreur mais un compte d'ion total (Total Ion Count, TIC) de 323 correspond essentiellement à du bruit de fond) et que la matrice ne crée pas d'interférences avec la détection du stéroïde. Cela prouve encore une fois la sélectivité du n-pentane qui,

lorsqu'il peut être utilisé, produit des échantillons beaucoup plus propres. Comme la 6-oxo-androsténendione est extraite avec le n-pentane elle ne subit pas non plus d'effet matrice.

Enfin la même procédure a été répétée pour le furazabol-m à 10 ng/mL. Deux échantillons de matrice sont extraits respectivement avec TBME et n-pentane pour l'injection en LC (Figure 32).



**Figure 32.** Chromatogrammes montrant l'effet de la matrice extraite au (a) TBME et (b) n-pentane sur le furazabol-m à 10 ng/mL.

On voit que la matrice a un effet prononcé sur la réponse du furazabol-m avec un grand nombre de pics d'interférences sur les chromatogrammes. Les profils sont très similaires que l'extraction soit réalisée avec le TBME ou le n-pentane, cependant on peut noter que le pic de contamination coïncidant avec le temps d'éluion du stéroïde (8,49 min) est plus faible dans le cas du n-pentane. Ce solvant est donc plus adapté lors de l'étape de LLE pour réduire l'effet matrice lors des analyses du furazabol-m. Il est à noter que l'interférence éluant à 9,41 min est généralement observée dans la transition Q0 du composé mais que celui-ci donne un signal assez intense pour compenser l'effet matrice.

Ces expériences montrent que la méthode employée au niveau de la préparation d'échantillon et le choix des transitions SRM permettent d'éviter des effets indésirables liés à la présence d'une matrice complexe. Cet avantage est également le résultat de l'utilisation de l'ESI en mode négatif qui ionise plus difficilement les molécules et aboutit à un bruit de fond souvent moins élevé qu'en mode positif.

#### **4.3. Détermination de la « capacité d'identification »**

La capacité d'identification est définie comme la combinaison du temps de rétention et des abondances relatives pour un stéroïde donné analysé avec la méthode à valider. Ces facteurs sont caractéristiques de l'identité du stéroïde et la méthode doit donc permettre d'obtenir les mêmes valeurs pour chacun d'entre eux d'une analyse à l'autre. Pour tester la reproductibilité des résultats obtenus, 20 échantillons contenant 15 ng/mL de furazabol-m sont préparés à partir d'urines de densités variables, représentant la distribution statistique trouvée naturellement chez l'humain. Les densités sont comprises entre 1,002 et 1,029. Sur les 20 urines analysées, 18 d'entre elles ont donné des résultats exploitables. Les deux autres ont une transition qui n'a pas donné de signal, empêchant les données de ces échantillons d'être significatives.

##### *Répétabilité du temps de rétention chromatographique*

La tolérance fixée par l'AMA pour les temps de rétention est de  $\pm 2\%$  ou  $\pm 0,1$  min (le plus petit des deux). L'analyse des données obtenues pour les 18 échantillons montre une variation des  $t_r$  entre 8,40 min et 8,49 min avec une moyenne de 8,45 min (cf : Tableau 17 Annexe I page 159). En appliquant la fourchette définie par l'AMA, on obtient une limite inférieure de 8,35 min et une limite supérieure de 8,55 min. Tous les  $t_r$  sont donc bien inclus dans la tolérance fixée. Le coefficient de variation est de 0,3 % pour cette expérience. La répétabilité du temps de rétention pour le furazabol-m est donc validée.

##### *Intensités relatives des transitions SRM*

Un des critères d'identification d'un stéroïde en contrôle antidopage est la stabilité des intensités relatives entre les différents ions obtenus par fragmentation. On compare l'intensité relative des ions à partir de la transition la plus intense, dans ce cas 365 > 345. Les tolérances fixées par l'AMA sont présentées dans le Tableau 11.

**Tableau 11.** Tolérances fixées par l'AMA pour les intensités relatives des transitions SRM en validation de méthode.<sup>223</sup>

Tolérance AMA		
Abondance relative	Tolérance (%)	
>50%	10	absolue
25 - 50	20	relatif
1 - 25	5	absolue

La première transition étudiée est 345 > 313. Les valeurs obtenues sont comprises entre 6,4 et 11,1 % et l'intensité relative moyenne de 9,2 % par rapport à 365 > 345. L'application de la tolérance de l'AMA (5 % en absolu) conduit à une fourchette comprise entre 4,2 et 14,2 %. Une nouvelle fois les valeurs expérimentales sont donc bien incluses dans les limites de validation. Pour la seconde transition 365 > 329, les résultats obtenus sont également conformes avec une moyenne à 4,1 % de l'intensité de la transition la plus intense. L'ensemble des données obtenues peut être consulté Tableau 18 Annexe I page 159.

#### *Déviati on standard relative de l'abondance*

Le dernier paramètre étudié pour la capacité d'identification est le coefficient de variation de l'abondance des ions fragments. Les valeurs sont de 34 % ( $m/z$  354), 42 % ( $m/z$  313) et 40 % ( $m/z$  329). Bien qu'il n'existe pas de tolérance définie pour ce critère, il est généralement accepté qu'une déviation standard relative de 20 % est acceptable pour une validation. On voit donc que les valeurs obtenues ici sont assez élevées et traduisent une variation importante du signal d'un échantillon à un autre. Cependant la stabilité des intensités relatives des transitions et le fait que les 18 échantillons ont permis d'identifier le composé montrent tout de même l'applicabilité de cette méthode pour la capacité d'identification.

#### **4.3. Calcul de la limite de décision $CC\alpha$**

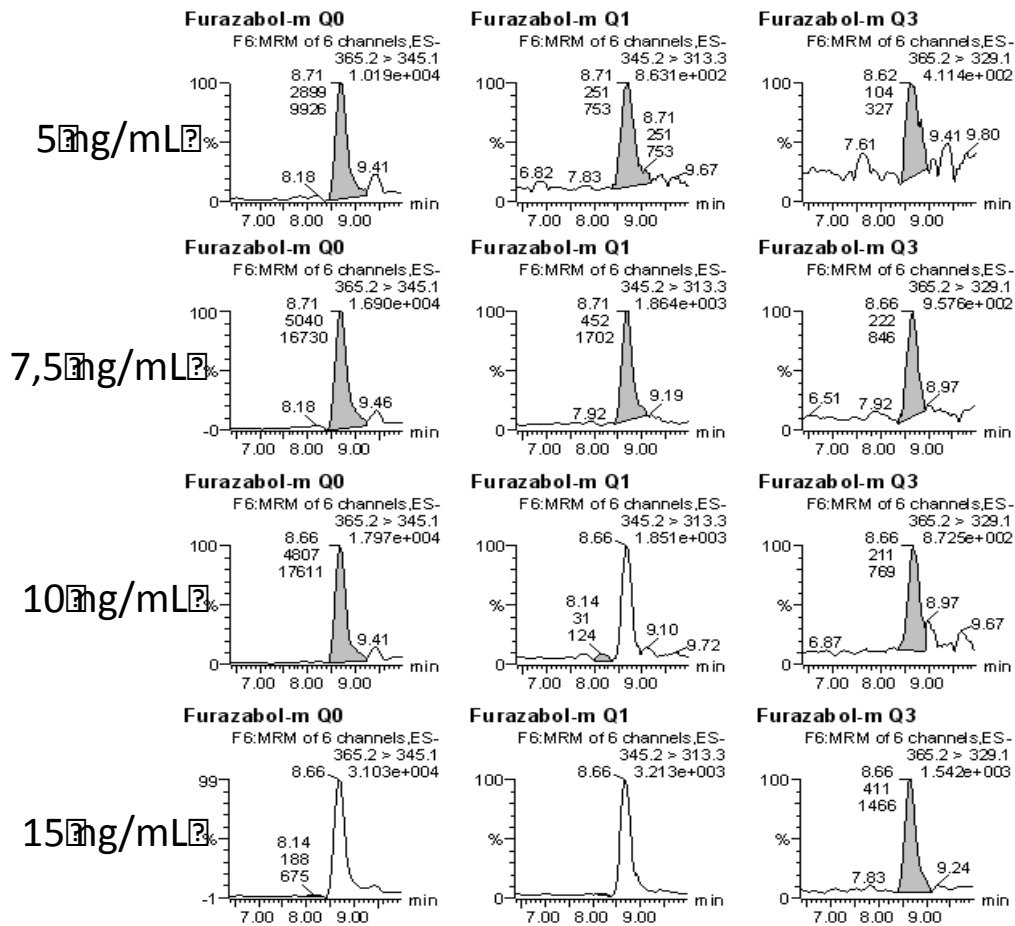
Plusieurs méthodes statistiques existent pour évaluer de la sensibilité d'une méthode analytique. Le choix s'est porté sur la détermination de la limite de décision,  $CC\alpha$ , qui détermine le niveau de concentration le plus bas auquel la méthode peut distinguer avec une certitude  $1-\alpha$  égale à 99% si une substance est présente dans un échantillon.<sup>224</sup> La valeur  $\alpha$  est prise égale à 1% et représente la probabilité de faux « non-conformes » ou « faux positif ». Un faux positif est lorsqu'on obtient un signal pour un composé qui n'est pas présent dans l'échantillon, à cause d'interférences de la matrice par exemple. Concrètement,  $\alpha = 1\%$  veut



dire qu'à la concentration  $CC\alpha$  trouvée, il y a statistiquement 99% de confiance que le stéroïde est détecté si présent dans l'échantillon. Expérimentalement, cette valeur est déterminée par l'analyse de 20 témoins négatifs (urine) et une gamme d'étalonnage du stéroïde effectuée selon 0 fois, 0,5 fois, 1 fois, 1,5 fois, 2 fois et 2,5 fois la MRPL pour le composé en question (dans ce cas 5 ng/mL). Le test est réalisé avec le furazabol-m avec une gamme d'étalonnage à 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; et 15 ng/mL.

#### *Traitement des données*

Pour chaque échantillon d'urine analysé, un bruit de fond moyen statistique est calculé sur une plage temporelle correspondant à 3 fois la largeur du pic de l'analyse à sa base (une largeur de pic avant et une après). Cette opération est effectuée 3 fois pour les 20 urine : une fois pour chaque transition SRM, car elles donnent chacune un bruit de fond différent. On relève ensuite les abondances de chaque transition SRM du composé pour toutes les concentrations de la gamme d'étalonnage. Ces résultats sont entrés dans une feuille de calcul qui permet d'établir les valeurs de  $CC\alpha$ , ainsi que la linéarité de la réponse pour chaque transition du composé. Les transitions obtenues pour la gamme d'étalonnage (Figure 33) ont révélé que l'échantillon à 2,5 ng/mL n'a pas donné de signal (non-inclus dans la figure). Aux autres concentrations, le stéroïde donne une réponse élevée pour l'ensemble de ses transitions. On note un léger décalage du temps de rétention lors de ces analyses, en comparaison de celui normalement observé (8,45 minutes). L'étalon en solvant analysé avant ces tests présente également cette caractéristique, et l'on peut donc exclure un mauvais rééquilibrage de la colonne entre chaque échantillon.



**Figure 33.** Transitions SRM des échantillons de furazabol-m pour la gamme d'étalonnage servant au calcul des CC $\alpha$  analysés par LC-MS/MS avec la méthode de chromatographie présentée en Annexe D Tableau 15.

### Résultats

Les bruits de fond statistiques pour les 3 transitions obtenus avec les 20 échantillons d'urine sont compilés dans le Tableau 12.

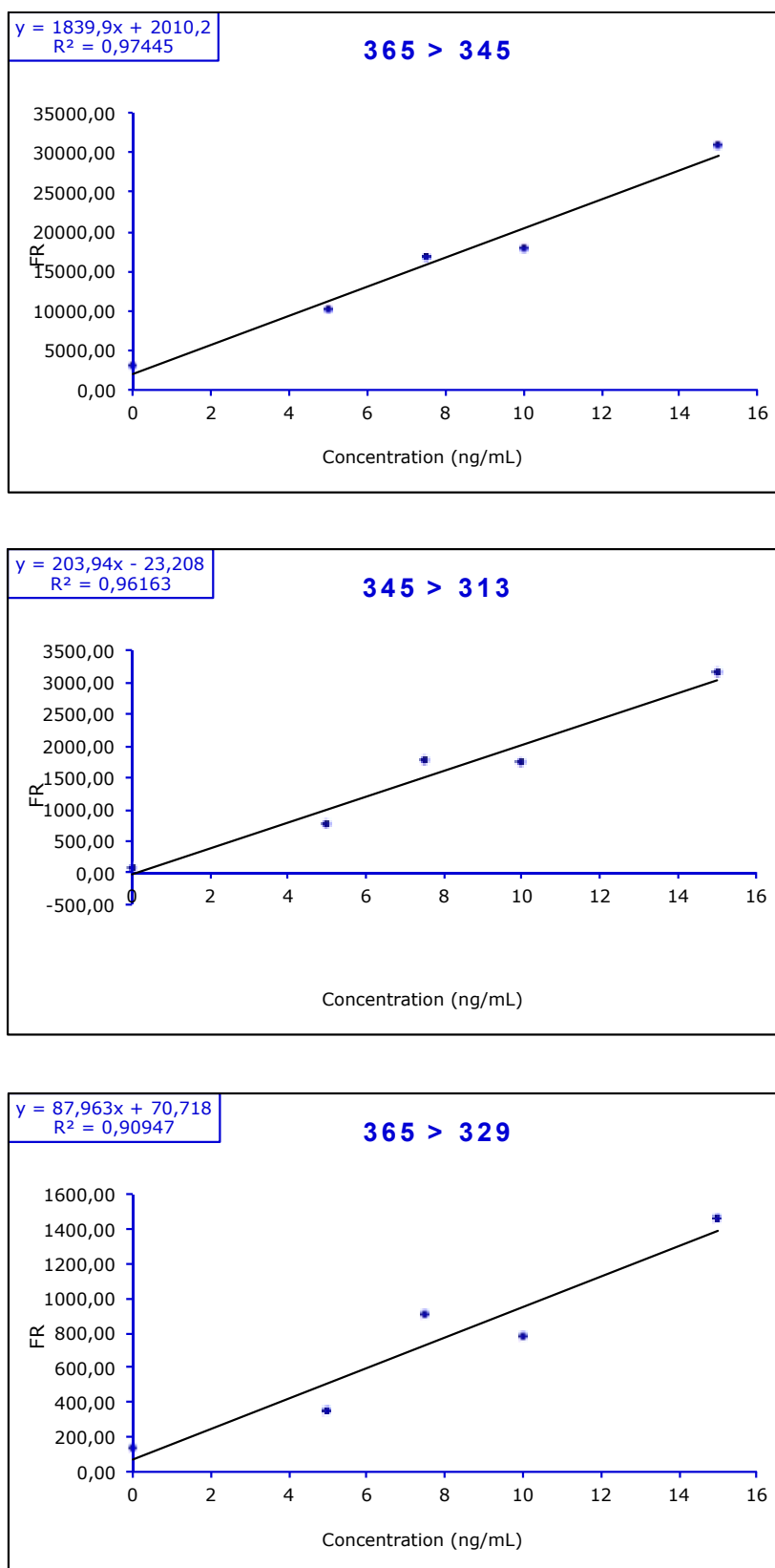
**Tableau 12.** Données expérimentales et calcul pour la détermination du CC $\alpha$  pour les transitions SRM du furazabol-m. FR = facteur de réponse.

	densité	epitesto-d3 ion du SI ?	365 > 345		345 > 313		365 > 329	
			Bruit	FR	Bruit	FR	Bruit	FR
U1	1,002	1	281	281,0500	51	50,7000	86	86,35000
U2	1,006	1	860	859,5000	60	60,4000	114	114,00000
U3	1,010	1	524	523,9500	79	78,5000	89	88,55000
U4	1,011	1	410	409,5000	98	98,0200	122	122,10000
U5	1,012	1	331	330,5000	47	47,4000	42	42,30000
U6	1,013	1	2 447	2447,1000	64	63,6900	127	126,75000
U7	1,014	1	563	562,5000	46	45,7500	96	96,00000
U8	1,016	1	1 165	1165,2200	33	33,2000	225	224,80000
U9	1,017	1	2 150	2149,8500	72	71,7500	141	141,00000
U10	1,019	1	795	794,7500	78	78,2400	91	90,50000
U11	1,020	1	3 800	3800,0000	107	106,5000	124	124,20000
U12	1,021	1	1 254	1254,4000	102	102,1500	136	136,40000
U13	1,021	1	3 125	3124,5500	87	86,5000	73	73,35000
U14	1,022	1	4 553	4553,3500	131	130,8000	137	136,80000
U15	1,023	1	9 595	9595,0000	97	96,8000	262	261,75000
U16	1,024	1	1 737	1737,0000	68	67,6000	51	51,45000
U17	1,026	1	3 720	3720,2000	103	103,2000	120	119,66000
U18	1,027	1	8 730	8729,5500	87	86,9000	397	396,80000
U19	1,027	1	12 475	12475,4000	60	60,0300	327	327,24000
U20	1,029	1	662	662,2000	71	70,5000	112	112,22000
Moyenne du bruit : FR( $\mu$ N)			2958,77850		76,93150		143,61100	
Ecart type du bruit : sN			3455,79042		24,57128		90,93952	

Resultat du calcul de CC $\alpha$  : CC $\alpha$  =  ng/mL  ng/mL  ng/mL

Plusieurs remarques peuvent être tirées de ces données. Tout d'abord il faut noter que le calcul des valeurs de CC $\alpha$  tient normalement compte de la réponse du standard interne présent dans les échantillons. Dans le cas de cette analyse, les résultats obtenus pour l'épitéstostérone-d<sub>3</sub> n'ont pas permis de reporter les abondances de ce composé. Les calculs ont donc été effectués en prenant une valeur de 1 pour la réponse du SI (i.e. il n'est pas pris en compte). Si l'on s'intéresse aux valeurs obtenues, on peut remarquer que la transition 365 > 345 est celle qui donne à la fois le meilleur signal pour le furazabol-m, mais aussi le plus de bruit de fond, notamment à cause de la présence d'un important pic de contamination à 9,4 mon (déjà observé lors des expériences d'effet matrice). Pour cette raison on obtient le CC $\alpha$  le plus élevé des 3 transitions avec une valeur de 4,38 ng/mL. Cela reste une très bonne performance qui est conforme au signal observé pour les transitions SRM à 5 ng/mL (Figure 33). Pour les deux autres transitions, les CC $\alpha$  sont beaucoup plus bas bien que le signal du composé le soit également. Cela est dû au très faible bruit de fond relevé dans les échantillons matrices, et ne sont pas représentatifs des LODs réelles. Cela est prouvé par le fait qu'aucun signal n'est obtenu pour l'échantillon de la gamme d'étalonnage à 2,5 ng/mL.

La linéarité de la réponse du signal est également un facteur important pour la validation de la méthode, et les données obtenues ont permis d'évaluer ce facteur (Figure 34).



**Figure 34.** Linéarité de la réponse du furazabol-m pour la gamme d'étalonnage étudiée.

On voit sur les tracés du facteur de réponse du stéroïde en fonction de la concentration de surcharge dans l'échantillon que la réponse est linéaire pour l'ensemble des transitions ( $R^2 > 0,9$ ). Il peut néanmoins être noté que la linéarité diminue avec l'intensité du signal de la transition : la transition  $365 > 329$  est celle qui a les facteurs de réponse les plus faibles, et elle a également le coefficient de corrélation le plus bas.

Cette étude de 20 matrices et de la gamme d'étalonnage a permis de mettre en lumière les bonnes performances de la méthode pour l'analyse du furazabol-m, tant au niveau des limites de détection que de la linéarité de la réponse du composé en fonction de la concentration. Le manque de données du standard interne est à prendre en compte et il faut mettre en perspective ces résultats. Néanmoins, on voit ici une des forces de l'utilisation du mode négatif de l'ESI : bien que le signal pour l'analyte soit plus faible qu'il ne pourrait l'être en positif, l'efficacité d'ionisation plus faible de ce mode permet également de réduire considérablement le bruit de fond et de garder des rapports signal-sur-bruit très bons jusqu'à des concentrations basses.

## **5. Conclusions de l'étude**

Les résultats obtenus au cours de ce doctorat montrent que l'attachement anionique est un bon candidat pour répondre aux problématiques posées par l'analyse des stéroïdes en contrôle antidopage. L'utilisation du fluorure d'ammonium dans la phase mobile en LC-MS/MS offre non seulement une solution pour ioniser ces composés faiblement acides ou basiques en ESI négatif, mais permet également d'obtenir des voies de fragmentations aboutissant à la caractérisation des analytes.

Nous avons vu que la méthode de confirmation basée sur l'attachement anionique est applicable dans les conditions standards de contrôle antidopage : les techniques de préparation d'échantillons sont utilisées en routine à l'AFLD et la méthode a été développée sur les instruments déjà présents au laboratoire. A l'exception du fluorure d'ammonium, tous les autres produits utilisés proviennent également de l'AFLD. L'ajout de l'anion se fait lors de la préparation de la phase mobile de LC et n'augmente pas la durée du processus analytique. Nous voyons donc que la mise en place de cette méthode est facile et peut tout à fait s'intégrer dans les stratégies analytiques des laboratoires antidopage.

En ce qui concerne les performances de la méthode, il a été démontré que l'attachement anionique a permis de réduire les LODs obtenues pour les composés les plus

difficiles (comme le furazabol-m), bien que les valeurs puissent être encore améliorées pour être totalement conformes aux exigences définies par l'AMA. Cependant, les autres paramètres de validation de méthode qui ont été testés ont tous été respectés pour les composés étudiés (fluoxytestérone-m, 6-oxo-androstènedione et furazabol-m), qu'il s'agisse du rendement d'extraction, de l'effet matrice, de la répétabilité des temps de rétention et intensités relatives des transitions SRM. Des améliorations sont cependant nécessaires, notamment sur le nombre de stéroïdes validés pour cette méthode. L'optimisation de certains paramètres plus fins qui n'ont pas pu être explorés ici (par exemple le pH de la phase mobile de LC) pourrait également conduire à une augmentation de la sensibilité de la méthode afin d'atteindre les MRPL et LODs imposées par l'AMA.

En conclusion, l'attachement anionique est une technique prometteuse pour l'analyse des SAA en contrôle antidopage, qui a déjà fait ses preuves sur certains composés et peut aboutir à une alternative robuste pour les molécules s'ionisant mal en LC-MS/MS avec quelques développements supplémentaires.

# Conclusion

Les travaux de ce doctorat ont mis en lumière plusieurs aspects de l'attachement anionique en spectrométrie de masse ESI négatif.

L'étude fondamentale de ce phénomène a été effectuée dans un premier temps afin de mieux appréhender les considérations de régiosélectivité lorsqu'un anion est mis en mélange avec un stéroïde bifonctionnel. Des études précédentes ont montré que l'utilisation de fluorure et d'acétate conduisait à des décompositions régiospécifiques de la pregnénolone, prouvant ainsi que selon l'anion utilisé le site d'attachement sur l'analyte n'était pas le même. Le fluorure s'attache sélectivement sur les protons portés par le cycle D du stéroïde (groupement cétone), alors que l'acétate vient interagir préférentiellement avec les protons du cycle A (groupement hydroxyle). Nous avons sélectionné un stéroïde bifonctionnel (la pregnénolone réduite) qui possède deux groupements chimiques identiques de type hydroxyle. Le choix de ce composé traduit la volonté d'étudier le comportement de l'attachement anionique lorsque les sites d'attachement ont des valeurs d'acidité en phase gazeuse distinctes mais proches. La décomposition CID de la pregnénolone réduite et de son analogue quadruplement deutéré a produit des résultats intéressants avec l'obtention de fragments spécifiques à la pregnénolone réduite qui ne sont pas observés lors de la fragmentation de la pregnénolone. L'analyse des résultats du composé deutéré en mélange avec le fluorure a révélé que certains fragments découlaient d'une déprotonation du cycle D du stéroïde (où les atomes de deutérium sont localisés), avec l'intégration de deutérium dans les fragments. Au contraire, certains ions fragments ne comportent aucun atome de deutérium, indiquant que leur décomposition a pour origine le cycle A. Le fluorure s'attache donc de manière non-sélective au cycle A ou D de la pregnénolone réduite, montrant qu'un certain différentiel entre les valeurs de  $G_A$  des groupes fonctionnels est nécessaire pour que l'attachement soit régiosélectif.

Des calculs théoriques d'acidité en phase gazeuse sont venus renforcer ces considérations expérimentales. En effet, les valeurs obtenues ont permis de conclure que dans le cas de la pregnénolone, le fluorure s'attache sur le site portant le proton le plus labile, c'est à dire celui en position  $\alpha$  du groupe cétone. Dans le cas de la pregnénolone réduite et de la 5- $\alpha$ -pregnane, les modifications structurelles de ces composés induisent une « uniformisation » des valeurs de  $G_A$  pour les groupes fonctionnels et les différences ne sont pas assez grandes pour provoquer une régiosélectivité de l'attachement anionique. Pour valider l'hypothèse que le fluorure et l'acétate s'attachent sur deux sites différents, nous avons essayé de produire une espèce où les deux anions sont présents simultanément, mais sans succès.



Par la suite, une étude de l'applicabilité de l'attachement anionique pour l'amélioration de la détection des stéroïdes anabolisants androgènes en contrôle antidopage a été effectuée en collaboration avec l'AFLD. Une liste de SAA présentant des difficultés d'ionisation en LC-MS/MS a été sélectionnée pour évaluer l'apport de l'attachement anionique pour la détection de ces composés difficiles. Les analyses préliminaires ont révélé que parmi les anions testés, le fluorure présente les meilleures performances pour la plus grande variété de composés, bien que l'hydrogénocarbonate ait montré de bons résultats pour quelques stéroïdes. Dans le but de développer une méthode globale et applicable pour une majorité de SAA le fluorure a donc été choisi comme candidat pour tous les tests postérieurs.

Les premières expériences de LOD instrumentale ont révélé l'intérêt de l'ajout d'anion dans les solutions d'échantillons, comme montré par les LOD obtenues en ESI- et F<sup>-</sup> qui sont au moins égale (ou plus basses) que celles obtenues en ESI+ et ESI- sans additif pour les mêmes composés, qu'ils présentent des difficultés d'ionisation ou non. Ces expériences ont également permis d'observer que l'acidité du stéroïde étudié influe sur l'espèce majoritairement formée : les composés faiblement acides (pour le fluoxymestérone-m) se déprotonent plus facilement et l'espèce [M-H]<sup>-</sup> est abondante. Au contraire, pour les stéroïdes très peu acides, l'ajout du fluorure permet d'ioniser le composé via la formation d'un adduit [M+F]<sup>-</sup> où le proton reste partagé entre la molécule et l'anion.

Chaque stéroïde de la liste a été étudié en MS et MS/MS afin de définir les conditions optimales de cône de désolvation et d'énergie de collision pour maximiser les signaux obtenus. Ces valeurs ont permis la création d'une méthode SRM basée sur des transitions intenses et spécifiques pour chaque stéroïde. La suite de l'optimisation s'est ensuite portée sur les paramètres expérimentaux de la méthode LC-MS/MS : gradient LC, méthode de préparation d'échantillons, ajout et concentration de l'anion. Il a été montré que les meilleures performances sont obtenues lorsque le fluorure est présent dans les solvants de la phase mobile à 0,1 mM (et c'est également la configuration la plus facile à mettre en place expérimentalement).

Enfin, des tests de validation de méthode ont été conduits pour le furazabol-m, un composé particulièrement difficile à ioniser. Le rendement d'extraction de la procédure de préparation d'échantillons est élevé et montre que les solvants/procédures choisis pour la SPE et la LLE sont adaptés et spécifiques. L'évaluation de l'effet matrice a cependant révélé que les contaminants présents naturellement dans l'urine ne sont pas purifiés en totalité par les

extractions et peuvent perturber l'ionisation des analytes. Pour les 3 composés étudiés (furazabol-m, fluoxymestérone-m, et 6-oxo-androsténendione), les résultats montrent que l'effet matrice n'est pas prépondérant aux temps d'élution visés. Les expériences de capacité d'identification réalisées ont montré que la méthode développée est reproductible pour le temps de rétention et les intensités relatives des transitions SRM d'un échantillon à l'autre. Enfin, la détermination du  $CC\alpha$  pour les 3 transitions du furazabol-m a conduit à des valeurs inférieures à 5 ng/mL, même en prenant en compte un important pic d'interférence matricielle. De manière générale les expériences de validation, bien que partiellement incomplètes du fait de l'absence de résultats pour le standard interne, montrent la robustesse de la méthode et ouvrent des perspectives très intéressantes pour l'application de l'attachement anionique pour la détection des stéroïdes difficilement ionisables en LC-MS/MS.

En conclusion, l'attachement anionique se présente comme à la fois comme un phénomène fondamental intéressant permettant de déclencher des décompositions régiospécifiques sur des composés bifonctionnels, mais a également un intérêt applicatif dans sa capacité à ioniser des composés pas ou peu acides. Cette propriété en fait un bon candidat pour la détection des stéroïdes en LC-MS/MS pour le contrôle antidopage, et peut avec quelques développements supplémentaires, devenir une méthode alternative de choix pour les composés ne répondant pas aux méthodes classiques utilisées en confirmation.

# **Annexes**

## Annexe A : Description des composés utilisés

### *Solvants*

Tous les solvants utilisés pour ces travaux sont de qualité HPLC ou supérieure. Le méthanol utilisé au CSOB provient de Sigma-Aldrich ; celui de l'AFLD est acheté chez Biosolve ou VWR. Le n-pentane et TBME proviennent de la société Biosolve. L'eau ultrapure (H<sub>2</sub>O milli-Q) à résistance de 18,2 MΩ est produite par un système Integral 10 commercialisé par Millipore.

### *Stéroïdes*

La prégnenolone et 5- $\alpha$ -prégnane-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol ont été achetées chez Sigma-Aldrich. La d<sub>4</sub>-17,21,21,21-prégnenolone deutérée a été obtenue de Cambridge Isotopes.

Tous les autres stéroïdes utilisés ont été achetés par l'AFLD, et sont livrés avec un certificat d'analyse confirmant la structure et la pureté du composé. Les stéroïdes sont conservés sous forme de solution mère dans du méthanol ou de l'éthanol à -20°C. Les composés étudiés sont les suivants :

- 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-1-en-3-one (1-testostérone),
- 17 $\beta$ -4,17-dihydroxy-17-méthylandrost-4-en-3-one (oxymestérone),
- 1-méthylène-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-one (métabolite de la méténolone),
- 7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (métabolite de la bolastérone),
- 6 $\beta$ -hydroxy-fluoxymestérone (métabolite de la fluoxymestérone),
- 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androsta-2,3-furazan-17 $\beta$ -ol (furazabol),
- 16 $\beta$ -hydroxy-furazabol (métabolite du furazabol),
- 13-éthyl-17-hydroxy-18,19-dinorpregn-4-en-3-one (norboléthone),
- 13 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diéthyl-5 $\alpha$ -gonane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (métabolite de la norbolethone),
- 7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diméthyltestostérone (calustérone)
- 7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (métabolite de la calustérone),
- 4-chloro-6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-androsta-1,4-dièn-3-one (métabolite du turinabol),
- d<sub>3</sub>-epitestostérone, d<sub>4</sub>-5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-one (d<sub>4</sub>-adrostérone),
- androst-4-ène-3,6,17-trione (6-oxo-androsténendione).

### *Autres produits*

Tous les produits utilisés sont de qualité analytique ou plus pure (méthanol absolu). Le fluorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{F}$ ), l'acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ), l'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ), l'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), et l'hydroborure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

L'enzyme  $\beta$ -glucuronidase (*E.Coli*) est achetée chez Roche Applied Science.

## **Annexe B : Procédure de préparation d'un échantillon en solvant de 6-oxo-androsténedione à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour introduction par HPLC**

- Prélèvement de 40  $\mu\text{L}$  de la solution diluée à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et introduction dans un tube à essai 13x75 mm
- Si l'anion n'est pas présent dans la phase mobile, ajout de 10  $\mu\text{L}$  de 200 mM  $\text{NH}_4\text{F}$
- Evaporation dans un bain à sec avec soufflettes à azote jusqu'à séchage complet
- Reprise du résidu dans 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  70/30
- Agitation par vortex
- Transfert dans un flacon

## **Annexe C : Détails expérimentaux des procédures de préparation d'échantillons**

### *« Hydrolyse et SPE »*

- Introduction de 4 mL d'urine dans un tube à essai 16x100 mm
- Ajout de 10  $\mu\text{L}$  d'épitéstostérone- $\text{d}_3$  (standard interne)
- Ajout de la surcharge de stéroïde à la concentration désirée
- Mise à  $\text{pH} = 7$  en utilisant du papier  $\text{pH}$  0-14 et des solutions diluées de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- Ajout de 1 mL de tampon  $\text{pH} = 6,5$
- Ajout de 2 gouttes de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase

- Incubation à 55°C pendant 60 minutes (hydrolyse)
- Retour des échantillons à température ambiante
- Ajout de 100 µL de tampon pH = 11
- Mise à pH = 9 avec du papier pH 7-14 et des solutions diluées de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CH<sub>3</sub>COOH
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 5 minutes
- Transfert du surnageant (4 mL) dans un tube à essai 12x100 mm
- Extraction par SPE sur Gilson ASPEC avec la méthode LCH (Tableau 13a)
- Evaporation à sec à l'azote dans un bain à sec à 60°C à soufflettes
- Reconstitution dans 150 µL de phase mobile LC à t = 0
- Conditionnement dans des flacons polypropylène 200 µL à sertir

Tout ajout est suivi d'une agitation par vortex pendant au moins 2 secondes.

#### « Hydrolyse et LLE »

Comme précédemment, l'ajout de toute substance dans l'échantillon est suivi par une agitation par vortex.

- Prise d'essai de 4 mL d'urine dans un tube à essai 13x100 mm
- Ajout du standard interne à la concentration souhaitée
- Ajout de la surcharge de stéroïde à la concentration souhaitée
- Ajustement à pH = 7 avec du papier pH 7-14 et des solutions diluées de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CH<sub>3</sub>COOH
- Ajout de 1 mL de tampon pH = 6,5
- Ajout de 2 gouttes de l'enzyme β-glucuronidase
- Incubation à 55°C pendant 60 minutes (hydrolyse)
- Ajout de 100 µL de tampon pH = 11
- Mise à pH = 9 avec du papier pH 7-14 et des solutions diluées de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CH<sub>3</sub>COOH
- Ajout de 3 mL de TBME
- Extraction pendant 10 minutes par rolling
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 5 minutes
- Récupération de la phase organique grâce à une pipette pasteur et transfert dans un tube à essai 13x100

- Seconde extraction, récupération de la phase organique et regroupement avec la première obtenue.
- Evaporation à sec jusqu'à séchage complet
- Reprise dans 150 µL de phase mobile (composition initiale du gradient)
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 1 minute
- Transfert des 150 µL dans un filtre à centrifuger
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 1 minute
- Conditionnement en flacon pour injection

« *SPE, hydrolyse et LLE* »

- Prise d'essai de 4 mL d'urine dans un tube à essai 13x100 mm
- Ajout du standard interne à la concentration souhaitée
- Ajout de la surcharge de stéroïde à la concentration souhaitée
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 5 minutes
- Transfert du surnageant dans un tube à essai 13x100
- Extraction par SPE sur Gilson ASPEC avec la méthode I-EX-05C (Tableau 13b), récupération dans un tube à vis 13x100 mm
- Evaporation jusqu'à séchage complet dans un bain à sec à 60°C sous soufflettes d'azote
- Ajout de 1 mL de tampon pH = 6,5
- Ajout de 2 gouttes de β-glucuronidase
- Incubation à 55°C pendant 60 minutes (hydrolyse)
- Retour à température ambiante
- Ajout de 100 µL de tampon pH = 11
- Mise à pH = 9 avec du papier pH 7-14 et des solutions diluées de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CH<sub>3</sub>COOH
- Ajout de 4 mL du solvant d'extraction dans le tube (TBME ou n-pentane selon le stéroïde à analyser)
- Extraction pendant 10 minutes (rolling)
- Centrifugation à 4000 tr/min pendant 2 minutes
- Récupération de la phase organique à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube 13x75
- Evaporation jusqu'à séchage complet
- Reconstitution dans 150 µL de phase mobile LC (composition initiale du gradient)

- Centrifugation pendant 1 minute à 4000 tr/min
- Transfert dans un filtre individuel à centrifuger
- Centrifugation 1 minute à 4000 tr/min
- Conditionnement en vial 200 µL à sertir

*Programmes SPE sur les machines ASPEC*

Deux méthodes SPE ont été utilisées pour la préparation des stéroïdes en urine : « LCH » et « I-Ex-05C ».

**Tableau 13.** Détail des étapes effectuées lors de la SPE sur Gilson ASPEC avec la méthode (a) « LCH » et (b) « I-Ex-05C ». Les cartouches contiennent une phase stationnaire C<sub>18</sub>.

**a.**

<b>Etape</b>	<b>Solvant/Fluide</b>	<b>Volume/Temps</b>	<b>Débit (mL/min)</b>
<i>Rinçage aiguille</i>	Eau ultra pure	2 mL	20
<i>Conditionnement cartouche</i>	Méthanol	2 mL	4
<i>Conditionnement cartouche</i>	Eau ultra pure	2 mL	8
<i>Dépôt de l'échantillon</i>	Echantillon	5,5 mL	2
<i>Rinçage aiguille</i>	Eau ultra pure	6 mL	20
<i>Rinçage cartouche</i>	Mélange eau/méthanol 90/10 (v/v)	2 mL	4
<i>Séchage</i>	Azote	3 min	
<i>Rinçage cartouche</i>	Cyclohexane	3 mL	6
<i>Séchage</i>	Azote	2 min	
<i>Elution</i>	TBME	6 mL	3



b.

Étape	Solvant/Fluide	Volume/Temps	Débit (mL/min)
<i>Rinçage aiguille</i>	Eau ultra pure	2 x 2 mL	40
<i>Conditionnement cartouche</i>	Ethanol	3 mL	4
<i>Conditionnement cartouche</i>	Eau ultra pure	3 mL	8
<i>Dépôt de l'échantillon</i>	Echantillon	4,5 mL	2
<i>Rinçage cartouche</i>	Eau ultra pure	4 mL	4
<i>Séchage</i>	Azote	3 min	
<i>Rinçage cartouche</i>	Cyclohexane	4 mL	2
<i>Elution</i>	Ethanol	2 mL	3
<i>Elution</i>	Ethanol	2 mL	3
<i>Rinçage aiguille</i>	Ethanol	2 x 2 mL	6

## Annexe D : Détails expérimentaux de LC

*Caractéristiques des colonnes utilisées*

**Tableau 14.** Caractéristiques des colonnes LC.

	Zorbax SB-C <sub>8</sub>	Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub>
<i>Type de phase</i>	Inverse (C <sub>8</sub> )	Inverse (C <sub>8</sub> )
<i>Dimensions</i>	2,1x100 mm	4,6x150 mm
<i>Granulométrie</i>	1,8 µm	5 µm
<i>Plateaux théoriques</i>	17998	9000
<i>Sélectivité</i>	1,52	1,58 – 1,66
<i>K'</i>	2,84	0,97

Les valeurs de plateaux théoriques, de K' et la sélectivité sont basées sur un test de performance fourni par le constructeur. Elles sont données dans un but de comparaison des performances des deux colonnes, les valeurs absolues ne s'appliquant pas aux expériences réalisées dans ces travaux.

**Tableau 15.** Gradient d'eau (A) et de méthanol (B) pour la séparation des stéroïdes en LC-MS/MS. Le débit utilisé est de 0,4 mL/min.

Zorbax SB-C <sub>8</sub>			Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub>		
Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B
0	50	50	0	30	70
7	35	65	3	20	80
9	15	85	12	0	100
10	0	100	13	0	100
11	50	50	14	30	70
13	50	50	17	30	70

Les lignes sur fond gris correspondent au rinçage et à l'équilibrage de la colonne et sont des étapes nécessaires lors de l'analyse de plusieurs échantillons à la suite dans une même séquence.

## Annexe E : Procédure de réduction de la d<sub>4</sub>-prégnénone

La réaction qui permet de réduire le groupe cétone de la prégnénone-d<sub>4</sub> en hydroxyle a été effectuée selon la méthode décrite dans une publication par Stastna *et al.*<sup>225</sup> La procédure est la suivante : la prégnénone-d<sub>4</sub> solide (16,7 mg, 52 µmol) est placée dans un tube de polypropylène de 1,5 mL et dissoute dans 0,85 mL d'un mélange 2 :1 (v/v) MeOH/THF. Le mélange est agité par vortex jusqu'à dissolution complète du composé. On ajoute ensuite 1,9 mg de NaBH<sub>4</sub>, ce qui provoque immédiatement un dégagement gazeux. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante par vortex pendant 10 minutes. La réaction est quenchée par l'ajout de 3,5 µL de solution aqueuse de HCl à 5 %, provoquant à nouveau un dégagement gazeux. Lorsque celui-ci s'arrête, cela marque la fin de la réaction. On obtient une concentration finale du stéroïde réduit de 61,0 mM. L'analyse de la solution est effectuée sans purification supplémentaire.

## Annexe F : Paramètres pour les calculs théoriques d'acidité en phase gazeuse

Les calculs ont été effectués en utilisant les programmes GAUSSIAN 09.<sup>226</sup> L'optimisation de la géométrie est réalisée avec la fonction B3LYP<sup>227,228</sup> couplée à la base de valence séparée Def2-SVP.<sup>229</sup> Les énergies ponctuelles sont obtenues par l'emploi de la même base fonctionnelle Def2-TZVP. Le protocole mis en place par Ho and Coote<sup>230</sup> a été employé pour le calcul des acidités en phase gazeuse des stéroïdes. La précision de l'approche informatique est évaluée par la comparaison des GA calculées pour certaines molécules sélectionnées avec les valeurs expérimentales trouvées dans la littérature. Les données sont présentées dans le Tableau 13. L'accord entre l'expérience et la théorie est très bon : les GA calculées montrent une déviation standard d'environ 5 kJ/mol.

**Tableau 16.** Acidités en phase gazeuse (kcal/mol) calculées et expérimentales de molécules sélectionnées.

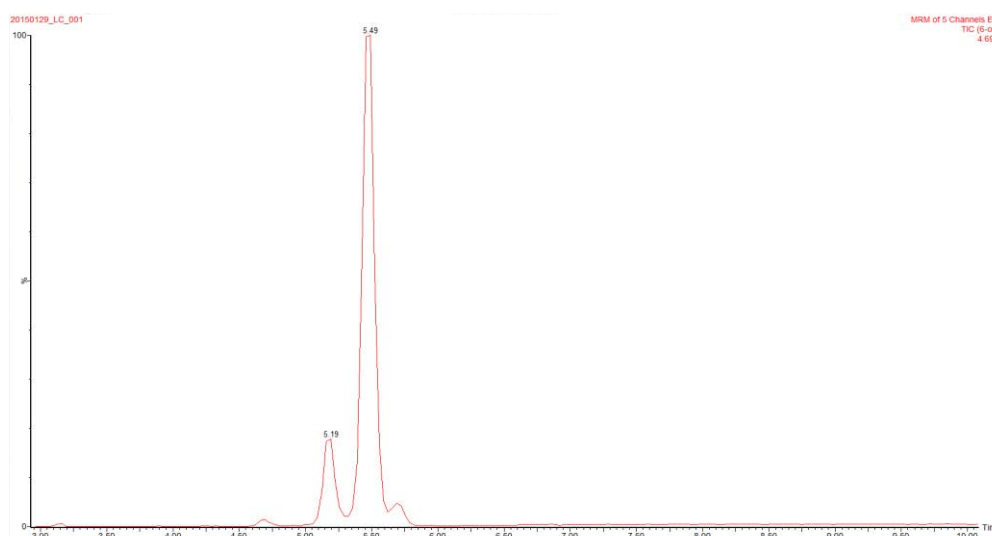
	Acidité en phase gazeuse (kcal/mol)	
	Calculé <sup>a</sup>	Expérimental <sup>b</sup>
Acide acétique	341,4	341,1
4-méthyl-Benzèneméthanol	362,8	363,9
2,4-diméthyl-3-Pentanol	364,1	364,1
2,2-diméthyl-1-Propanol	366,7	366,0
Alcool isopropylique	370,6	368,7
Phénol	342,0	342,3
Acide propanoïque	339,9	340,4
Alcool vinylique	348,6	359,0
Propen-2-ol	349,3	361,9
Alcool 4-méthyl-Phénylméthylque	362,5	363,1
Alcool Phénylméthylque	362,0	363,4
t-butyl	365,2	365,3
Cycloheptane	369,0	366,1
n-propanol	370,8	369,4
t-butanol	369,5	368,1
1,3-Benzènediol	340,9	339,8
4-Isopropylphénol	339,5	340,0

<sup>a</sup> Obtenu au niveau B3LYP/Def2-TZVP//B3LYP/Def2-SVP de théorie.

<sup>b</sup> Obtenu du NIST (P.J. Linstrom and W.G. Mallard, Eds., NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>, 07/09/14)

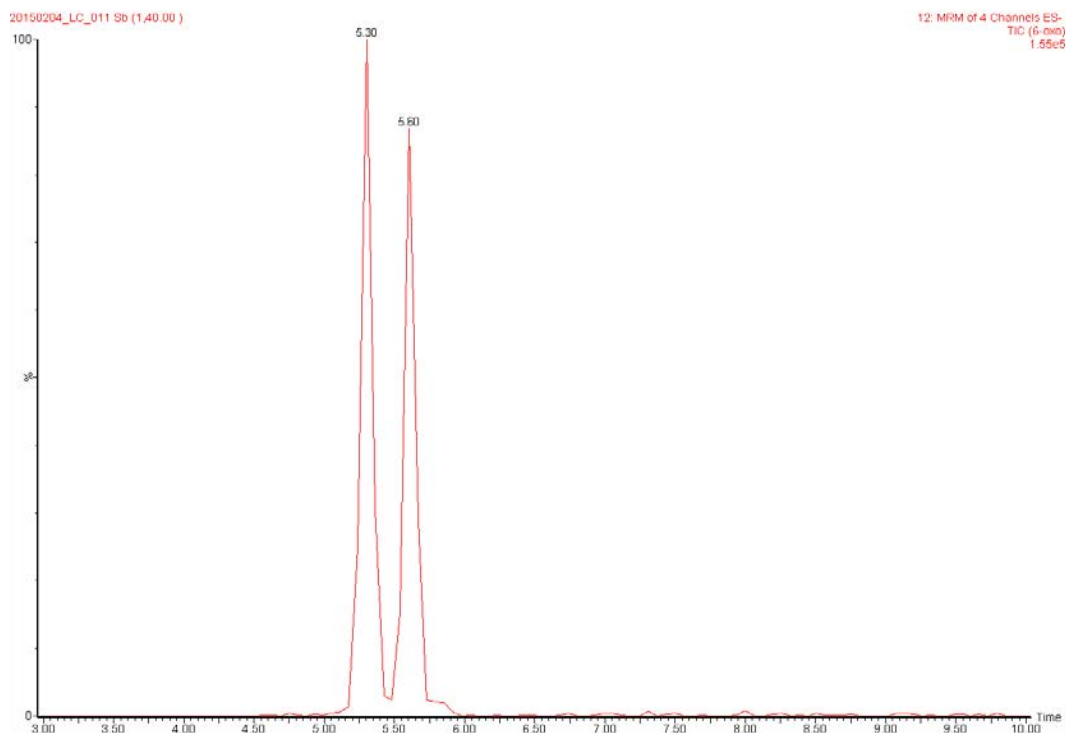
## Annexe G : Etude de la 6-oxo-androstènedione

La 6-oxo-androstènedione est un stéroïde qui a été rajouté tardivement à la liste des composés posant des difficultés d'analyse avec les méthodes de routine de l'AFLD. L'optimisation des tensions de cône et transitions SRM a révélé un composé donnant un signal intense et des fragments abondants. La première analyse par LC-MS/MS (Figure 35) a également été encourageante avec un beau profil chromatographique.



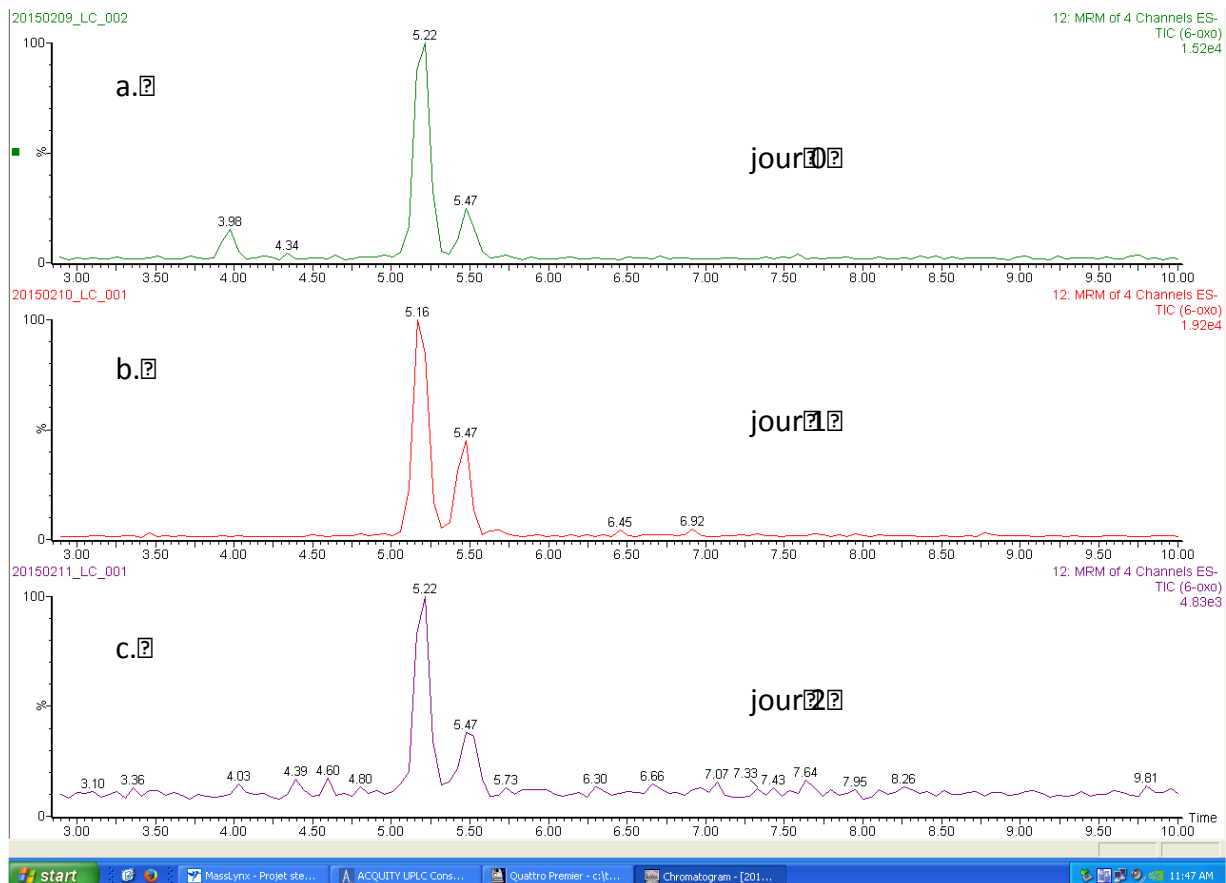
**Figure 35.** Chromatogramme de la 6-oxo-androstènedione à 20 ng/mL en solvant obtenu par analyse LC-MS/MS.

On remarque un pic satellite à 5,19 minutes proche du pic principal mais son intensité est faible. Les analyses suivantes ont posé plus de problèmes puisque ce pic secondaire a pris de l'importance puisque, lors de la deuxième analyse du même échantillon en LC-MS/MS, les intensités relatives des deux pics étaient égales (Figure 36).



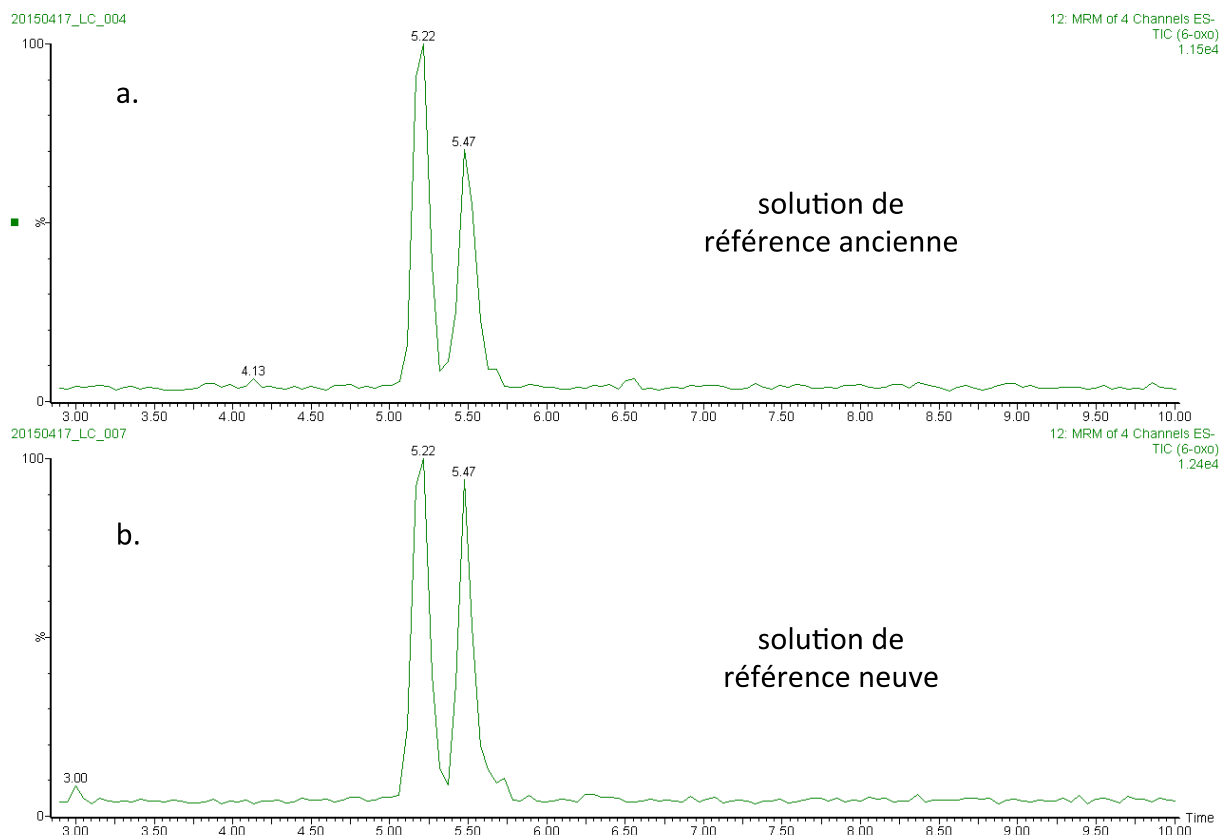
**Figure 36.** Deuxième chromatogramme de la 6-oxo-androstènedione à 20 ng/mL en solvant obtenu par analyse LC-MS/MS.

Les spectres de masse correspondant aux deux pics observés sont parfaitement identiques et les ions précurseurs se fragmentent de la même manière pour les 4 transitions suivies. A partir d'un échantillon contenant un seul stéroïde on obtient donc deux composés qui sont séparés par LC, isobares, et produisant les mêmes fragments en CID. La première hypothèse envisagée pour expliquer ce phénomène a naturellement été celle d'une dégradation du produit avec le temps lorsqu'il est conservé dans un solvant. Des tests ont donc été réalisés sur un échantillon fraîchement préparé de 6-oxo-androstènedione avec une analyse chaque jour pendant 3 jours (Figure 37).



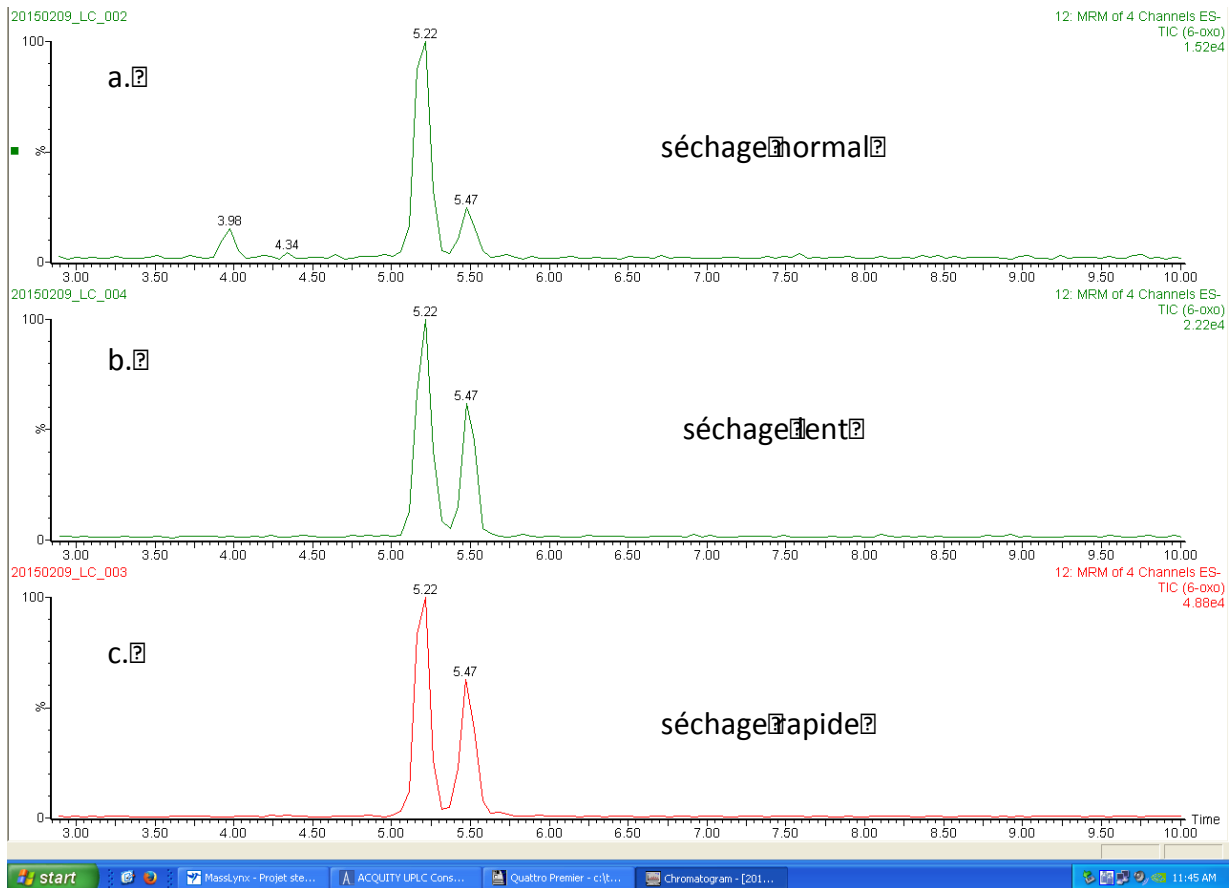
**Figure 37.** Analyses LC-MS/MS d'un échantillon de 6-oxo-androstènedione (a) le jour de la préparation, (b) après 1 jour, (c) après 2 jours.

De manière surprenante, l'échantillon venant d'être préparé a donné un profil à l'opposé de ce qui avait été vu précédemment : c'est le pic à 5,2 min qui donne le plus de signal, alors que le second n'est qu'à environ 25% de son intensité. Les analyses suivantes ont révélé que la détection devient plus mauvaise avec le temps, mais il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'âge de l'échantillon et les intensités relatives des deux pics sur une période de quelques jours. L'AFLD possède des solutions de référence pour chaque stéroïde dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  à partir desquels sont prélevées quelques millilitres qui constituent à leur tour des solutions mères pour la préparation des échantillons. Ces dernières sont conservées à  $-4^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs mois. L'étape suivante a été de comparer le profil d'un échantillon préparé à partir d'une solution mère ancienne et un autre préparé à partir d'un prélèvement frais de la solution de référence à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le but est d'évaluer si la conservation à des températures plus chaudes a une influence sur le profil (Figure 38).



**Figure 38.** Analyses LC-MS/MS d'un échantillon de 6-oxo-androstènedione préparé à partir d'une solution de référence (a) ancienne ou (b) neuve.

Dans le chromatogramme obtenu pour la solution de référence fraîche les deux pics ont une intensité quasiment égale alors qu'à partir de la solution plus ancienne le second pic (5,47 min) est à environ 70 % du premier. Cela montre que si il semble y avoir une légère influence de la fraîcheur de la solution mère, cet effet n'est pas déterminant puisque le deuxième pic n'est pas majoritaire (au contraire ce qui a été observé Figure 35) même avec une référence sortant du stockage à -20°C. L'hypothèse de la dégradation avec le temps a donc été mise de côté. L'éventuelle dégradation du composé n'est pas temporelle mais elle pourrait être thermique. L'étape de séchage sous azote se fait dans des bains à sec à 60°C et le temps de séchage a été varié pour évaluer son effet (Figure 39).



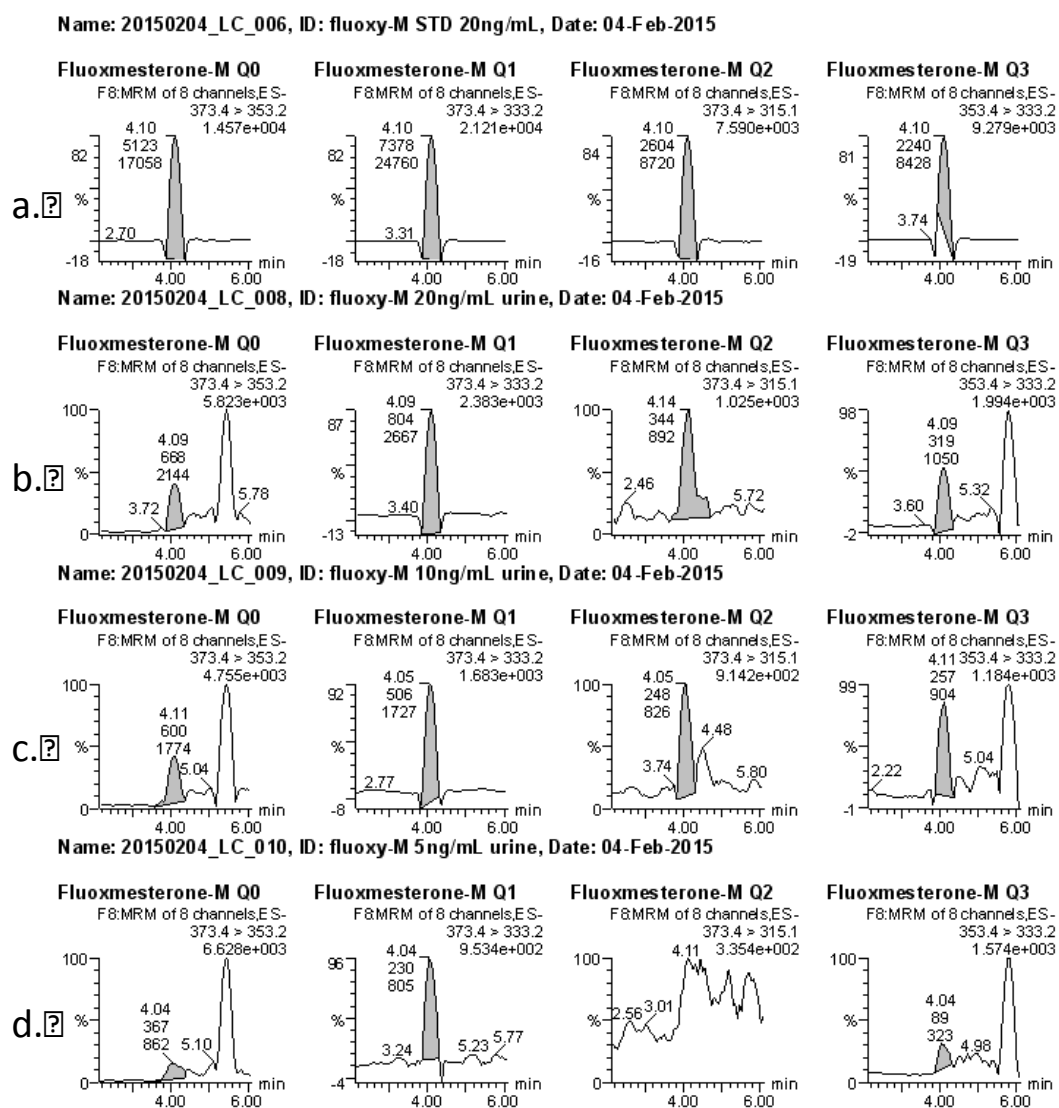
**Figure 39.** Analyses LC-MS/MS d'un échantillon de 6-oxo-androsténendione avec temps de séchage (a) normal, (b) lent ou (c) rapide.

Une nouvelle fois aucune tendance ne se dégage des chromatogrammes. Le temps de séchage semble avoir un effet mineur lorsqu'il est plus long ou plus court que ce qui est normalement utilisé lors de la procédure mais n'influe pas de manière directe sur les intensités relatives des pics.

D'autres tests n'ont pas été effectués afin de mieux comprendre le comportement de ce stéroïde par faute de temps. Un paramètre plausible permettant d'expliquer le phénomène observé pourrait être l'influence du pH des solutions avec lesquelles la 6-oxo est en contact (dans le flacon et phase mobile notamment). D'autres stéroïdes ont également présenté des dédoublements de pics lors du développement de leur méthode de confirmation à l'AFLD, problème corrigé en adaptant le pH.

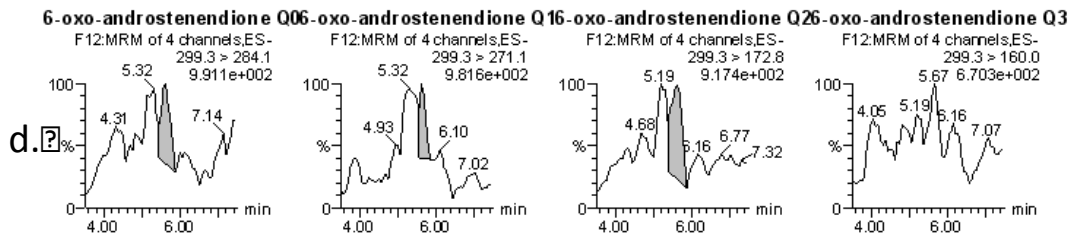
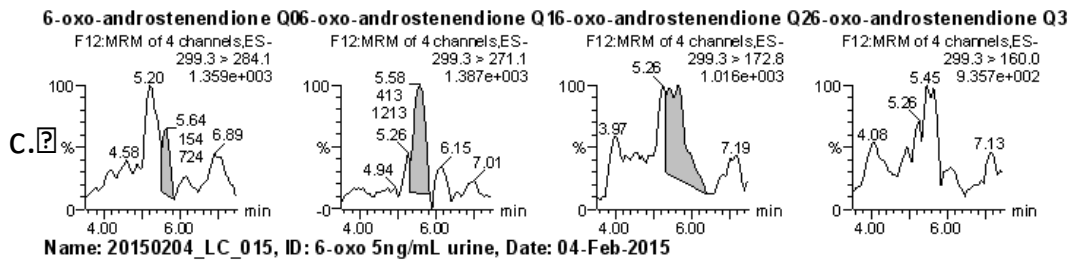
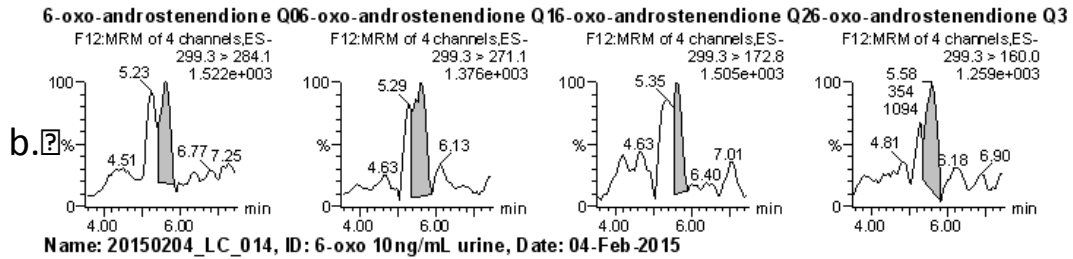
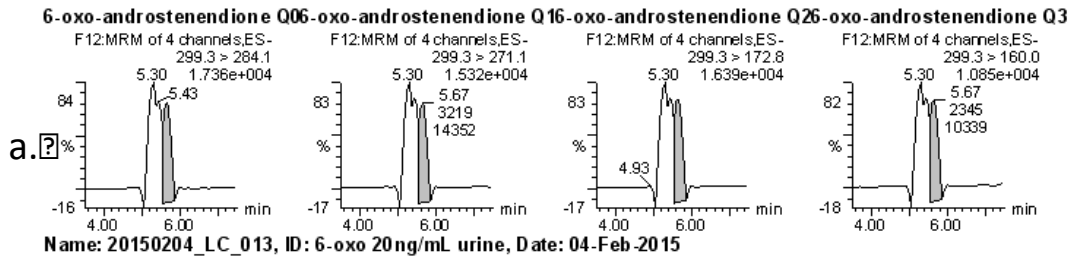


## Annexe H : Analyses LC-SRM des gammes de dilutions pour le fluoxymestérone-m et la 6-oxo-androstènedione



**Figure 40.** Analyse en LC-MS/MS (a) d'un standard de fluoxymestérone-m à 20 ng/mL, et d'une gamme de solutions de fluoxymestérone-m en matrice urinaire après traitement LCH à (b) 20 ng/mL, (c) 10 ng/mL, et (d) 5 ng/mL.

Name: 20150204\_LC\_011, ID: 6-oxo STD 20ng/mL, Date: 04-Feb-2015



**Figure 41.** Analyse en LC-MS/MS (a) d'un standard de 6-oxo à 20 ng/mL, et d'une gamme de solutions de 6-oxo en matrice urinaire après traitement LCH à (b) 20 ng/mL, (c) 10 ng/mL, et (d) 5 ng/mL.

## Annexe I : Résultats et calculs pour la détermination de la capacité d'identification du furazabol-m

**Tableau 17.** Données obtenues pour l'étude de la répétabilité du temps de rétention chromatographique du furazabol-m.

Témoïn surchargé	densité	Composé 1
		tr (min)
U1	1,002	8,40
U2	1,006	8,40
U3	1,010	8,40
U4	1,012	8,45
U5	1,014	8,40
U6	1,016	8,45
U7	1,017	8,44
U8	1,018	8,45
U9	1,019	8,44
U10	1,020	8,44
U11	1,021	8,44
U12	1,021	8,49
U13	1,022	8,49
U14	1,023	8,44
U15	1,024	8,49
U16	1,026	8,44
U17	1,027	8,49
U18	1,029	8,49
	Moyenne	8,45
	<b>Limite haute</b>	<b>8,55</b>
	<b>Limite basse</b>	<b>8,35</b>

**Tableau 18.** Données obtenues pour l'étude de la répétabilité des intensités relatives des transitions SRM du furazabol-m.

Témoïn surchargé	densité	345	313		329	
		Abond	Abond	Ratio	Abond	Ratio
U1	1,002	8 493	803	9,5	407	4,8
U2	1,006	23 585	2 623	11,1	1 175	5,0
U3	1,010	17 015	1 661	9,8	693	4,1
U4	1,012	31 673	3 263	10,3	1 341	4,2
U5	1,014	18 026	1 890	10,5	716	4,0
U6	1,016	17 205	1 179	6,9	732	4,3
U7	1,017	22 998	2 139	9,3	994	4,3
U8	1,018	19 532	1 902	9,7	670	3,4
U9	1,019	11 411	1 061	9,3	449	3,9
U10	1,020	15 261	1 481	9,7	521	3,4
U11	1,021	10 489	845	8,1	509	4,9
U12	1,021	13 735	1 245	9,1	568	4,1
U13	1,022	20 485	1 615	7,9	1 128	5,5
U14	1,023	17 961	1 523	8,5	648	3,6
U15	1,024	17 753	1 658	9,3	613	3,5
U16	1,026	14 023	1 194	8,5	397	2,8
U17	1,027	12 780	819	6,4	490	3,8
U18	1,029	9 838	1 086	11,0	475	4,8
	Moyenne	16 792	1 555	9,2	696	4,1
	<b>Limite haute</b>			<b>14,2</b>		<b>6,2</b>
	<b>Limite basse</b>			<b>4,2</b>		<b>2,1</b>

## Table des Schémas

<b>Schéma 1.</b> (a) Structure carbonée commune aux stéroïdes et nomenclature des carbones, (b) cycle oestrane, (c) cycle androstane, (d) cycle prégneane. ....	14
<b>Schéma 2.</b> Phase I de métabolisation de la méthyltestostérone. ....	17
<b>Schéma 3.</b> Fonctionnalisation de la testostérone par le BSTFA conduisant à un stéroïde triméthylsilylé compatible avec une analyse GC-MS. ....	22
<b>Schéma 4.</b> Principe de l'attachement anionique avec formation (a) d'une espèce déprotonée et/ou (b) d'un adduit. ....	32
<b>Schéma 5.</b> Principe d'une extraction liquide-liquide. ....	37
<b>Schéma 6.</b> Principe de l'extraction sur phase solide. ....	38
<b>Schéma 7.</b> Principe de la chromatographie en phase liquide. (A) : injection de l'échantillon, (B) séparation dans la colonne avec une rétention dépendant des propriétés physico-chimiques des composés, (C) élution du premier composé, (D) élution du second composé. ....	44
<b>Schéma 8.</b> Représentation des différentes étapes pour une analyse en MS ainsi que les 3 parties principales d'un spectromètre de masse. La source d'ionisation peut être sous vide ou à pression atmosphérique. ....	47
<b>Schéma 9.</b> Principe d'une source ESI opérée en mode positif. ....	50
<b>Schéma 10.</b> Principaux designs d'une source ESI. (a) source en ligne (b) source orthogonale, (c) source en Z. <sup>179</sup> ....	51
<b>Schéma 11.</b> Principe de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire. <sup>185</sup> ....	53
<b>Schéma 12.</b> Principe d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (balayage d'ion produit). ....	55
<b>Schéma 13.</b> Principe d'une analyse SRM. ....	56
<b>Schéma 14.</b> Principe de fonctionnement d'un détecteur électromultiplicateur. ....	57
<b>Schéma 15.</b> (a) Rappel de la numérotation des carbones sur le squelette stéroïdien et (b) réaction de réduction de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone. ....	61
<b>Schéma 16.</b> Voies de dissociation possibles pour un adduit anionique de stéroïde. M représente le stéroïde neutre et A <sup>-</sup> l'anion. ....	64
<b>Schéma 17.</b> Proposition de mécanisme pour la perte de 3 Da observée lors de la fragmentation de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite. ....	66
<b>Schéma 18.</b> Proposition de mécanisme pour la perte de 17 Da à partir de l'ion <i>m/z</i> 318 observée lors de la fragmentation de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite. ....	67
<b>Schéma 19.</b> Mécanisme proposé pour la perte de 36 Da à partir de l'ion <i>m/z</i> 318 observée lors de la fragmentation de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite conduisant à la formation de <i>m/z</i> 285. ....	67
<b>Schéma 20.</b> Proposition de mécanisme pour la formation de l'ion fragment <i>m/z</i> 126 lors de la fragmentation de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite. ....	68
<b>Schéma 21.</b> Mécanisme proposé pour la formation de l'ion fragment <i>m/z</i> 45 obtenu par décomposition de l'adduit fluoré de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone. ....	69
<b>Schéma 22.</b> Mécanisme proposé pour la formation de l'ion fragment <i>m/z</i> 109 lors de la fragmentation de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite passant par une réaction retro Diels-Alder. ....	70
<b>Schéma 23.</b> Structure de la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol. ....	72
<b>Schéma 24.</b> Mécanisme proposé pour les transitions du fluoxymestérone-m. ....	98
<b>Schéma 25.</b> Mécanismes proposés pour les transitions du furazabol-m. ....	99
<b>Schéma 26.</b> (a) Rappel de la nomenclature du squelette carboné des stéroïdes, (b) structures des stéroïdes étudiés pour la détermination des LODs instrumentales, (c) stabilisation de la base conjuguée de la calustérone après déprotonation. ....	102
<b>Schéma 27.</b> Structure de l'épitestostérone-glucuronide. ....	104

<b>Schéma 28.</b> Montage expérimental des analyses préliminaires par LC-MS/MS.....	108
<b>Schéma 29.</b> Structure de la calustérone-m et bolastérone-m, des stéroïdes isomères.....	110
<b>Schéma 30.</b> Rappel des structures des 3 stéroïdes étudiés en matrice urinaire.....	114

## Table des Figures

<b>Figure 1.</b> Représentation de la surface d'une bille de silice dans une colonne de chromatographie phase inverse C <sub>8</sub> . <sup>149</sup> .....	45
<b>Figure 2.</b> Abbé Nollet montrant la forme spécifique d'un liquide passant à travers un capillaire électrifié. <sup>172</sup> .....	48
<b>Figure 3.</b> Spectres de masse pour la pregnénolone réduite en mélange avec un ratio molaire 1:100 de (a) NH <sub>4</sub> F et (b) NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO .....	62
<b>Figure 4.</b> Spectres MS/MS CID de l'ion adduit issu de la pregnénolone réduite avec (a) CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> et (b) F <sup>-</sup> , et (c) de la d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnenolone réduite avec F <sup>-</sup> . Les énergies de fragmentation sont optimisées pour l'obtention d'une intensité maximale du pic <i>m/z</i> 43/45..	63
<b>Figure 5.</b> Spectres de fragmentation CID de l'adduit fluoré de (a) la pregnénolone et (b) la d <sub>4</sub> -pregnénolone. Reproduit de la référence 109. <sup>124</sup> .....	65
<b>Figure 6.</b> Spectres obtenus par fragmentation CID de la 5- $\alpha$ -pregnane avec (a) NH <sub>4</sub> F et (b) NH <sub>4</sub> OAc. ....	73
<b>Figure 7.</b> Acidités calculées en phase gazeuse ( $\Delta G_{\text{acide}}$ ) en kJ/mol de (a) la pregnénolone réduite, (b) pregnénolone réduite, et (c) la 5- $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol obtenues au niveau de théorie B3LYP/Def2TZVP//B3LYP/Def2-SVP. Les doubles valeurs pour la pregnénolone réduite correspondent aux stéréochimies R ou S sur le site 20. ....	74
<b>Figure 8.</b> Spectre MS d'une solution de 10 $\mu$ M d <sub>4</sub> -17,21,21,21-pregnénolone réduite en présence de NH <sub>4</sub> F et NH <sub>4</sub> OAc en ratio 100:1 avec le stéroïde. ....	77
<b>Figure 9.</b> Intensité du signal (a) de la norbolétone-m déprotonée et (b) de l'adduit fluoré en fonction de la concentration d'anions. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur les mesures en triplicat.....	85
<b>Figure 10.</b> Intensité du signal (a) du furazabol-m déprotoné et (b) de l'adduit fluoré en fonction de la concentration de fluorure. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur les mesures en triplicat.....	87
<b>Figure 11.</b> Spectres MS de la calustérone-m analysée (a) sans anion, avec un ratio molaire stéroïde:F <sup>-</sup> de (b) 1:8 et (c) 1:100. ....	89
<b>Figure 12.</b> Intensité du signal du fluoxymestérone-m déprotoné et de l'adduit fluoré en fonction de la concentration de fluorure après séparation LC. Les barres d'erreur représentent la déviation standard sur les mesures en triplicat. ....	90
<b>Figure 13.</b> Spectres MS de l'épitéstostérone-d <sub>3</sub> à différentes valeurs de tension de cône : (a) 20 V, (b) 30 V, (c) 40 V, et (d) 70 V.....	92
<b>Figure 14.</b> Spectres de fragmentation CID de l'épitéstostérone-d <sub>3</sub> à différentes énergies de collision : (a) 30 eV, (b) 35 eV, (c) 40 eV, et (d) 45 eV. ....	94
<b>Figure 15.</b> Intensité du signal de [M-H] <sup>-</sup> de l'épitéstostérone-glucuronide en présence d'hydroxyde. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur les mesures en triplicat.....	105
<b>Figure 16.</b> Intensité du signal de (a) [M+Cl] <sup>-</sup> et (b) [M+NO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> de l'épitéstostérone-glucuronide. Les barres d'erreur représentent la déviation standard sur les mesures en triplicat. ....	106
<b>Figure 17.</b> Chromatogramme d'une solution de 125 ng/mL d'oxymestérone dans MeOH/H <sub>2</sub> O 10/90 (v/v) analysée en LC-MS/MS. ....	108
<b>Figure 18.</b> Chromatogrammes du mélange de 10 stéroïdes en solvant à 100 ng/mL analysés par LC-MS/MS avec une injection de 20 $\mu$ L et un débit de phase mobile de 0,4 mL/min (Tableau 15 Annexe D). ....	110
<b>Figure 19.</b> Chromatogrammes du mélange de 10 stéroïdes en solvant à 100 ng/mL analysés par LC-MS/MS après le changement de colonne.....	112

<b>Figure 20.</b> Transitions SRM du (a) furazabol-m et (b) fluoxymestérone-m à 10 ng/mL en matrice d'urine synthétique. ....	113
<b>Figure 21.</b> Transitions SRM obtenues par LC-MS/MS de solutions à 20 ng/mL de (a) furazabol-m, (b) fluoxymestérone-m, et (c) 6-oxo-androsténendione en matrice urinaire après préparation par la méthode « hydrolyse et SPE ». ....	115
<b>Figure 22.</b> Analyse en LC-MS/MS (a) d'un standard de furazabol-m à 20 ng/mL, et d'une gamme de solutions de furazabol-m en matrice urinaire après traitement « Hydrolyse et SPE » à (b) 20 ng/mL, (c) 10 ng/mL et (d) 5 ng/mL. ....	117
<b>Figure 23.</b> Comparaison des transitions SRM d'une solution de 20 ng/mL de fluoxymestérone-m avec le fluorure présent dans (a) la vial ou (b) la phase mobile. ....	119
<b>Figure 24.</b> Comparaison du signal des transitions SRM d'un échantillon de 10 ng/mL de fluoxymestérone-m analysé en LC-MS/MS avec différentes concentrations de NH <sub>4</sub> F dans la phase mobile de LC. ....	120
<b>Figure 25.</b> Transitions SRM suite à l'analyse d'échantillons de (a) fluoxymestérone-m et (b) 6-oxo-androsténendione à 20 ng/mL en matrice urine préparés avec la méthode « Hydrolyse et LLE ». ....	121
<b>Figure 26.</b> Transitions SRM d'échantillons de fluoxymestérone-m à 10 ng/mL en matrice urinaire préparés avec la méthode (a) « hydrolyse et SPE » et (b) « hydrolyse, SPE et LLE ». ....	122
<b>Figure 27.</b> Transitions SRM d'un échantillon de fluoxymestérone-m à 20 ng/mL en matrice urinaire extrait par LLE avec du (a) TBME ou (b) n-pentane et d'un échantillon de 6-oxo-androsténendione à 20 ng/mL en matrice urinaire extrait par LLE avec du (c) TBME ou (d) n-pentane. ....	124
<b>Figure 28.</b> Transitions SRM d'un échantillon de fluoxymestérone 10 ng/mL en solvant sur une colonne LC Zorbax Eclipse (a) usagée ou (b) neuve. ....	126
<b>Figure 29.</b> Comparaison des signaux SRM observés pour des échantillons de furazabol-m à 10 ng/mL avec surcharge en stéroïde extrait au TBME (a) après et (b) avant la procédure de préparation d'échantillon, et extrait au n-pentane (c) après et (d) avant la procédure d'extraction. ....	127
<b>Figure 30.</b> Chromatogramme TIC montrant l'effet de la matrice extraite au TBME sur le fluoxymestérone-m à 10 ng/mL. ....	129
<b>Figure 31.</b> Chromatogramme TIC montrant l'effet de la matrice extraite au (a) TBME et (b) n-pentane sur la 6-oxo-androsténendione à 10 ng/mL. Les flèches indiquent les temps de rétention du signal dédoublé de la 6-oxo-androsténendione. ....	130
<b>Figure 32.</b> Chromatogrammes montrant l'effet de la matrice extraite au (a) TBME et (b) n-pentane sur le furazabol-m à 10 ng/mL. ....	131
<b>Figure 33.</b> Transitions SRM des échantillons de furazabol-m pour la gamme d'étalonnage servant au calcul des CC $\alpha$ analysés par LC-MS/MS avec la méthode de chromatographie présentée en Annexe D Tableau 15. ....	135
<b>Figure 34.</b> Linéarité de la réponse du furazabol-m pour la gamme d'étalonnage étudiée. ...	137
<b>Figure 35.</b> Chromatogramme de la 6-oxo-androsténendione à 20 ng/mL en solvant obtenu par analyse LC-MS/MS. ....	153
<b>Figure 36.</b> Deuxième chromatogramme de la 6-oxo-androsténendione à 20 ng/mL en solvant obtenu par analyse LC-MS/MS. ....	154
<b>Figure 37.</b> Analyses LC-MS/MS d'un échantillon de 6-oxo-androsténendione (a) le jour de la préparation, (b) après 1 jour, (c) après 2 jours. ....	155
<b>Figure 38.</b> Analyses LC-MS/MS d'un échantillon de 6-oxo-androsténendione préparé à partir d'une solution de référence (a) ancienne ou (b) neuve. ....	156
<b>Figure 39.</b> Analyses LC-MS/MS d'un échantillon de 6-oxo-androsténendione avec temps de séchage (a) normal, (b) lent ou (c) rapide. ....	157

<b>Figure 40.</b> Analyse en LC-MS/MS (a) d'un standard de fluoxymestérone-m à 20 ng/mL, et d'une gamme de solutions de fluoxymestérone-m en matrice urinaire après traitement LCH à (b) 20 ng/mL, (c) 10 ng/mL, et (d) 5 ng/mL. ....	158
<b>Figure 41.</b> Analyse en LC-MS/MS (a) d'un standard de 6-oxo à 20 ng/mL, et d'une gamme de solutions de 6-oxo en matrice urinaire après traitement LCH à (b) 20 ng/mL, (c) 10 ng/mL, et (d) 5 ng/mL.....	159



## Table des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les substances interdites en 2015 <sup>3</sup> et leurs effets sur l'organisme. ....	12
<b>Tableau 2.</b> LOD obtenues en GC-MS par Jiménez <i>et al.</i> <sup>97</sup> pour les stéroïdes également étudiés dans ces travaux de thèse. ....	23
<b>Tableau 3.</b> Liste des stéroïdes étudiés lors des travaux de ce doctorat. ....	29
<b>Tableau 4.</b> Paramètres expérimentaux (source et analyseur) des 3 méthodes utilisées. ....	58
<b>Tableau 5.</b> Intensité (échelle de 1 à 5) des ions produits par différents stéroïdes en analyse avec ou sans fluorure et hydrogénocarbonate. Nd = non détecté.....	83
<b>Tableau 6.</b> Tensions de cône et transitions optimales pour les stéroïdes d'intérêt. Nd = non-détecté.....	95
<b>Tableau 7.</b> Limites de détection instrumentales (LOD) pour une variété de stéroïdes ionisés par ESI ou APPI en présence ou absence de NH <sub>4</sub> F. Les LOD sont présentées en ng/mL. Nd = non-détecté. ....	101
<b>Tableau 8.</b> Temps de rétention des stéroïdes sur la colonne Zorbax SB-C <sub>8</sub> dans les conditions présentées Tableau 15 Annexe D. ....	109
<b>Tableau 9.</b> Temps de rétention des stéroïdes sur la colonne Zorbax Eclipse XDB-C <sub>8</sub> . ....	111
<b>Tableau 10.</b> Intensité du signal d'échantillons de furazabol-m à 10 ng/mL surchargés avant ou après la procédure d'extraction. ....	127
<b>Tableau 11.</b> Tolérances fixées par l'AMA pour les intensités relatives des transitions SRM en validation de méthode. <sup>223</sup> ....	133
<b>Tableau 12.</b> Données expérimentales et calcul pour la détermination du CC $\alpha$ pour les transitions SRM du furazabol-m. FR = facteur de réponse.....	136
<b>Tableau 13.</b> Détail des étapes effectuées lors de la SPE sur Gilson ASPEC avec la méthode (a) « LCH » et (b) « I-Ex-05C ». Les cartouches contiennent une phase stationnaire C <sub>18</sub> .....	149
<b>Tableau 14.</b> Caractéristiques des colonnes LC. ....	150
<b>Tableau 15.</b> Gradient d'eau (A) et de méthanol (B) pour la séparation des stéroïdes en LC-MS/MS. Le débit utilisé est de 0,4 mL/min. ....	151
<b>Tableau 16.</b> Acidités en phase gazeuse (kcal/mol) calculées et expérimentales de molécules sélectionnées.....	152
<b>Tableau 17.</b> Données obtenues pour l'étude de la répétabilité du temps de rétention chromatographique du furazabol-m. ....	160
<b>Tableau 18.</b> Données obtenues pour l'étude de la répétabilité des intensités relatives des transitions SRM du furazabol-m. ....	160

# Bibliographie

1. WADA, Bref historique de l'antidopage. <https://http://www.wada-ama.org/fr/a-propos/bref-historique-de-lantidopage>: 2015.
2. WADA, Code mondial antidopage. <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-world-anti-doping-code-fr.pdf>: 2015.
3. WADA, The World Anti-Doping Code, The 2015 Prohibited List. <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-prohibited-list-fr.pdf>: 2015.
4. Bahrke, M. S.; Yesalis, C. E., Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, 4 (6), 614-620.
5. WADA, Antidoping testing figures. <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-2013-Anti-Doping-Testing-Figures-SPORT-REPORT.pdf>: 2013.
6. Maravelias, C.; Dona, A.; Stefanidou, M.; Spiliopoulou, C., Adverse effects of anabolic steroids in athletes. *Toxicol. Lett.* **2005**, 158 (3), 167-175.
7. Egner, I. M.; Bruusgaard, J. C.; Eftestol, E.; Gundersen, K., A cellular memory mechanism aids overload hypertrophy in muscle long after an episodic exposure to anabolic steroids. *J. Physiol.* **2013**, 591 (24), 6221-6230.
8. Ikeda, S.; Kamikawa, Y.; Ohwatashi, A.; Harada, K.; Yoshida, A., The effect of anabolic steroid administration on passive stretching-induced expression of mechano-growth factor in skeletal muscle. *Sci. World J.* **2013**, 313605, 6 pp.
9. Wendler, A.; Wehling, M., Translational research on rapid steroid actions. *Steroids* **2010**, 75 (8-9), 619-623.
10. Scarf, A. M.; Ittner, L. M.; Kassiou, M., The Translocator Protein (18 kDa): Central Nervous System Disease and Drug Design. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (3), 581-592.
11. Shackleton, C. H. L.; Honour, J. W., Simultaneous estimation of urinary steroids by semiautomated gas chromatography. Investigation of neo-natal infants and children with abnormal steroid synthesis. *Clin. Chim. Acta* **1976**, 69 (2), 267-83.
12. Simpson, A.; Saenger, P., Abnormal sexual differentiation: male pseudohermaphroditism (MPH) and abnormal steroid synthesis, metabolism and action. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1985**, 171 (Dev. Mech. Norm. Abnorm.), 175-206.
13. Leme de Souza, G.; Hallak, J., Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. *BJU Int.* **2011**, 108 (11), 1860-1865.
14. Hata, S.; Murakami, T., Classification and function of lipids by molecular structures. *Kagaku to Kyoiku* **2009**, 57 (8), 386-389.
15. IUPAC, Definitive rules for nomenclature of steroids. *Pure Appl. Chem.* **1972**, 31 (1), 285-322.
16. Kime, D. E., Steroid Nomenclature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1995**, 98 (2), 119-20.

17. Topol, I. A.; Tawa, G. J.; Caldwell, R. A.; Eissenstat, M. A.; Burt, S. K., Acidity of Organic Molecules in the Gas Phase and in Aqueous Solvent. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (42), 9619-9624.
18. Ervin, K. M., Experimental Techniques in Gas-Phase Ion Thermochemistry. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (2), 391-444.
19. Lias, S.; Bartmess, J., NIST Webbook : Gas-phase ion thermochemistry. <http://webbook.nist.gov/chemistry/ion/>; 1998.
20. Cumming, J. B.; Kebarle, P., Summary of gas phase acidity measurements involving acids AH. Entropy changes in proton transfer reactions involving negative ions. Bond dissociation energies D(A—H) and electron affinities EA(A). *Canadian J. Chem.* **1978**, *56* (1), 1-9.
21. Brauman, J. I.; Blair, L. K., Gas-phase acidities of alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (20), 5986-5992.
22. Hunter, E. P. L.; Lias, S. G., Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1998**, *27* (3), 413-656.
23. Robinson, M. S.; Polak, M. L.; Bierbaum, V. M.; DePuy, C. H.; Lineberger, W. C., Experimental Studies of Allene, Methylacetylene, and the Propargyl Radical: Bond Dissociation Energies, Gas-Phase Acidities, and Ion-Molecule Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (25), 6766-6778.
24. Liptak, M. D.; Shields, G. C., Accurate pKa Calculations for Carboxylic Acids Using Complete Basis Set and Gaussian-n Models Combined with CPCM Continuum Solvation Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (30), 7314-7319.
25. Wright, J. S.; Rowley, C. N.; Chepelev, L. L., A 'universal' B3LYP-based method for gas-phase molecular properties: bond dissociation enthalpy, ionization potential, electron and proton affinity and gas-phase acidity. *Mol. Phys.* **2005**, *103* (6-8), 815-823.
26. Burk, P.; Koppel, I. A.; Koppel, I.; Leito, I.; Travnikova, O., Critical test of performance of B3LYP functional for prediction of gas-phase acidities and basicities. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *323* (5-6), 482-489.
27. Ervin, K. M.; DeTuri, V. F., Anchoring the Gas-Phase Acidity Scale†. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (42), 9947-9956.
28. Famini, G. R.; Marquez, B. C.; Wilson, L. Y., Using theoretical descriptors in quantitative structure-activity relationships: gas phase acidity. *J. Chem. Soc.* **1993**, (4), 773-782.
29. Merrill, G. N.; Kass, S. R., Calculated Gas-Phase Acidities Using Density Functional Theory: Is It Reliable? *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (44), 17465-17471.
30. Leito, I.; Raamat, E.; Kütt, A.; Saame, J.; Kipper, K.; Koppel, I. A.; Koppel, I.; Zhang, M.; Mishima, M.; Yagupolskii, L. M.; Garlyauskayte, R. Y.; Filatov, A. A., Revision of the Gas-Phase Acidity Scale below 300 kcal mol<sup>-1</sup>. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (29), 8421-8424.
31. Gaillard, Y.; Vayssette, F.; Pépin, G., Compared interest between hair analysis and urinalysis in doping controls: Results for amphetamines, corticosteroids and anabolic steroids in racing cyclists. *Forensic Sci. Int.* **2000**, *107* (1-3), 361-379.
32. Schaenzer, W., Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.* **1996**, *42* (7), 1001-1020.

33. Zhang, D.; Shi, X.; Wang, Y., Role of drug metabolism in drug development. *Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing, China)* **2006**, *41* (11), 810-814, 857.
34. Gomez, C.; Fabregat, A.; Pozo, O. J.; Marcos, J.; Segura, J.; Ventura, R., Analytical strategies based on mass spectrometric techniques for the study of steroid metabolism. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *53*, 106-116.
35. Pozo, O. J.; Gomez, C.; Marcos, J.; Segura, J.; Ventura, R., Detection and characterization of urinary metabolites of boldione by LC-MS/MS. Part II: Conjugates with cysteine and N-acetylcysteine. *Drug Test. Anal.* **2012**, *4* (10), 786-797.
36. Fabregat, A.; Kotronoulas, A.; Marcos, J.; Joglar, J.; Alfonso, I.; Segura, J.; Ventura, R.; Pozo, O. J., Detection, synthesis and characterization of metabolites of steroid hormones conjugated with cysteine. *Steroids* **2013**, *78* (3), 327-336.
37. Gomez, C.; Pozo, O. J.; Marcos, J.; Segura, J.; Ventura, R., Alternative long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. *Steroids* **2013**, *78* (1), 44-52.
38. Pope, H. G., Jr.; Wood, R. I.; Rogol, A.; Nyberg, F.; Bowers, L.; Bhasin, S., Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* **2014**, *35* (3), 341-375.
39. Ahlgrim, C.; Guglin, M., Anabolics and cardiomyopathy in a bodybuilder: case report and literature review. *J. Card. Fail.* **2009**, *15* (6), 496-500.
40. Clark, B. M.; Schofield, R. S., Dilated cardiomyopathy and acute liver injury associated with combined use of ephedra, gamma-hydroxybutyrate, and anabolic steroids. *Pharmacotherapy* **2005**, *25* (5), 756-61.
41. Ferenchick, G. S., Association of steroid abuse with cardiomyopathy in athletes. *Am. J. Med.* **1991**, *91* (5), 562.
42. Fineschi, V.; Baroldi, G.; Monciotti, F.; Paglicci, R. L.; Turillazzi, E., Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2001**, *125* (2), 253-5.
43. Fisher, M.; Appleby, M.; Rittoo, D.; Cotter, L., Myocardial infarction with extensive intracoronary thrombus induced by anabolic steroids. *Br. J. Clin. Pract.* **1996**, *50* (4), 222-3.
44. Kennedy, C., Myocardial infarction in association with misuse of anabolic steroids. *Ulster Med. J.* **1993**, *62* (2), 174-6.
45. Kennedy, M. C.; Lawrence, C., Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med. J. Aust.* **1993**, *158* (5), 346-8.
46. McNutt, R. A.; Ferenchick, G. S.; Kirilin, P. C.; Hamlin, N. J., Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids. *Am. J. Cardiol.* **1988**, *62* (1), 164.
47. Shimada, Y.; Yoritaka, A.; Tanaka, Y.; Miyamoto, N.; Ueno, Y.; Hattori, N.; Takao, U., Cerebral infarction in a young man using high-dose anabolic steroids. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **2012**, *21* (8), 906.e9-11.
48. Kennedy, M. C.; Corrigan, A. B.; Pilbeam, S. T., Myocardial infarction and cerebral haemorrhage in a young body builder taking anabolic steroids. *Aust. N. Z. J. Med.* **1993**, *23* (6), 713.
49. Lau, D. H.; Stiles, M. K.; John, B.; Shashidhar; Young, G. D.; Sanders, P., Atrial fibrillation and anabolic steroid abuse. *Int. J. Cardiol.* **2007**, *117* (2), e86-7.

50. Furlanello, F.; Bentivegna, S.; Cappato, R.; De, A. L., Arrhythmogenic effects of illicit drugs in athletes. *Ital. Heart J.* **2003**, *4* (12), 829-37.
51. Sullivan, M. L.; Martinez, C. M.; Gallagher, E. J., Atrial fibrillation and anabolic steroids. *J. Emerg. Med.* **1999**, *17* (5), 851-7.
52. Ment, J.; Ludman, P. F., Coronary thrombus in a 23 year old anabolic steroid user. *Heart* **2002**, *88* (4), 342.
53. McCarthy, K.; Tang, A. T.; Dalrymple-Hay, M. J.; Haw, M. P., Ventricular thrombosis and systemic embolism in bodybuilders: etiology and management. *Ann. Thorac. Surg.* **2000**, *70* (2), 658-60.
54. Ferencick, G.; Schwartz, D.; Ball, M.; Schwartz, K., Androgenic-anabolic steroid abuse and platelet aggregation: a pilot study in weight lifters. *Am. J. Med. Sci.* **1992**, *303* (2), 78-82.
55. Ferencick, G. S., Anabolic/androgenic steroid abuse and thrombosis: is there a connection? *Med. Hypotheses* **1991**, *35* (1), 27-31.
56. Duclos, M., Doping with anabolic steroids. *Corresp. Metab., Horm., Diabetes Nutr.* **2011**, *15* (9-10), 331-334.
57. Zaugg, M.; Jamali, N. Z.; Lucchinetti, E.; Xu, W.; Alam, M.; Shafiq, S. A.; Siddiqui, M. A. Q., Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J. Cell. Physiol.* **2001**, *187* (1), 90-95.
58. Abu-Shakra, S.; Alhalabi, M. S.; Nachtman, F. C.; Schemidt, R. A.; Brusilow, W. S. A., Anabolic steroids induce injury and apoptosis of differentiated skeletal muscle. *J. Neurosci. Res.* **1997**, *47* (2), 186-197.
59. D'Ascenzo, S.; Millimaggi, D.; Di Massimo, C.; Saccani-Jotti, G.; Botre, F.; Carta, G.; Tozzi-Ciancarelli, M. G.; Pavan, A.; Dolo, V., Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol. Lett.* **2007**, *169* (2), 129-136.
60. Janjic, M. M.; Stojkov, N. J.; Andric, S. A.; Kostic, T. S., Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxide synthase 2) in adult rat Leydig cells following in vivo exposure. *Reprod. Toxicol.* **2012**, *34* (4), 686-693.
61. Estrada, M.; Varshney, A.; Ehrlich, B. E., Elevated Testosterone Induces Apoptosis in Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (35), 25492-25501.
62. Kanayama, G.; Kean, J.; Hudson, J. I.; Pope, H. G., Cognitive deficits in long-term anabolic-androgenic steroid users. *Drug Alcohol Depend.* **2013**, *130* (1-3), 208-214.
63. Pope, H. G., Jr.; Katz, D. L. In *Psychiatric effects of exogenous anabolic-androgenic steroids*, American Psychiatric Publishing, Inc.: 2003; pp 331-358.
64. Kanayama, G.; Hudson, J. I.; Pope, H. G., Jr., Illicit anabolic-androgenic steroid use. *Horm. Behav.* **2010**, *58* (1), 111-121.
65. Hall, R. C. W.; Hall, R. C. W.; Chapman, M. J., Psychiatric complications of anabolic steroid abuse. *Psychosomatics* **2005**, *46* (4), 285-90.
66. Talih, F.; Fattal, O.; Malone, D., Jr., Anabolic steroid abuse: psychiatric and physical costs. *Cleve. Clin. J. Med.* **2007**, *74* (5), 341-4, 346, 349-52.

67. Cole, J. C.; Smith, R.; Halford, J. C. G.; Wagstaff, G. F., A preliminary investigation into the relationship between anabolic-androgenic steroid use and the symptoms of reverse anorexia in both current and ex-users. *Psychopharmacology* **2003**, *166* (4), 424-429.
68. Rubinow, D. R.; Schmidt, P. J., Androgens, brain, and behavior. *Am. J. Psychiatry* **1996**, *153* (8), 974-84.
69. Daly, R. C.; Su, T. P.; Schmidt, P. J.; Pagliaro, M.; Pickar, D.; Rubinow, D. R., Neuroendocrine and behavioral effects of high-dose anabolic steroid administration in male normal volunteers. *Psychoneuroendocrinology* **2003**, *28* (3), 317-331.
70. Schmidt, P. J.; Berlin, K. L.; Danaceau, M. A.; Neeren, A.; Haq, N. A.; Roca, C. A.; Rubinow, D. R., The effects of pharmacologically induced hypogonadism on mood in healthy men. *Arch. Gen. Psychiatry* **2004**, *61* (10), 997-1004.
71. Almeida, O. P.; Waterreus, A.; Spry, N.; Flicker, L.; Martins, R. N., One year follow-up study of the association between chemical castration, sex hormones, beta-amyloid, memory and depression in men. *Psychoneuroendocrinology* **2004**, *29* (8), 1071-1081.
72. Choi, P. Y. L.; Parrott, A. C.; Cowan, D., High-dose anabolic steroids in strength athletes: Effects upon hostility and aggression. *Hum. Psy. Clin. Exp.* **1990**, *5* (4), 349-356.
73. Conacher, G. N.; Workman, D. G., Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. *Am. J. Psychiatry* **1989**, *146* (5), 679.
74. Pope, H. G., Jr.; Katz, D. L., Homicide and near-homicide by anabolic steroid users. *J. Clin. Psychiatry* **1990**, *51* (1), 28-31.
75. Pope, H. G., Jr.; Kouri, E. M.; Powell, K. F.; Campbell, C.; Katz, D. L., Anabolic-androgenic steroid use among 133 prisoners. *Compr. Psychiatry* **1996**, *37* (5), 322-7.
76. Dalby, J. T., Brief anabolic steroid use and sustained behavioral reaction. *Am. J. Psychiatry* **1992**, *149* (2), 271-2.
77. Schulte, H. M.; Hall, M. J.; Boyer, M., Domestic violence associated with anabolic steroid abuse. *Am. J. Psychiatry* **1993**, *150* (2), 348.
78. Stanley, A.; Ward, M., Anabolic steroids--the drugs that give and take away manhood. A case with an unusual physical sign. *Med. Sci. Law* **1994**, *34* (1), 82-3.
79. Zacharia, L. C.; Dubey, R. K.; Jackson, E. K., A gas chromatography/mass spectrometry assay to measure estradiol, catecholestradiols, and methoxyestradiols in plasma. *Steroids* **2004**, *69* (4), 255-261.
80. Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Gomez, M. J.; Malato, O.; Agueera, A.; Fernandez-Alba, A. R., Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047* (1), 129-135.
81. Ternes, T. A.; Andersen, H.; Gilberg, D.; Bonerz, M., Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (14), 3498-3504.
82. Ho, E. N. M.; Leung, D. K. K.; Wan, T. S. M.; Yu, N. H., Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120* (1-2), 38-53.

83. Athanasiadou, I.; Angelis, Y. S.; Lyris, E.; Georgakopoulos, C.; Athanasiadou, I.; Georgakopoulos, C., Chemical derivatization to enhance ionization of anabolic steroids in LC-MS for doping-control analysis. *Trends Anal. Chem.* **2013**, *42*, 137-156.
84. WADA, Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances. <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014MRPL-v1-Minimum-Required-Performance-Levels-EN.pdf>: 2014.
85. Vandenheuveel, W. J. A.; Smith, J. L.; Albers-Schoenberg, G.; Plazonnet, B.; Belanger, P. In *Derivatization and gas chromatography in the mass spectrometry of steroids*, Academic: 1973; pp 199-219.
86. Bowden, J. A.; Colosi, D. M.; Mora-Montero, D. C.; Garrett, T. J.; Yost, R. A., Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877* (27), 3237-3242.
87. Little, J. L., Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them. *J. Chromatogr. A* **1999**, *844* (1 + 2), 1-22.
88. Schoene, K.; Bruckert, H. J.; Steinhanses, J.; Koenig, A., Two stage derivatization with N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) and N-methyl-bis-(trifluoroacetamide) (MBTFA) for the gas-chromatographic analysis of OH-, SH- and NH-compounds. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1994**, *348* (5-6), 364-70.
89. Shareef, A.; Parnis, C. J.; Angove, M. J.; Wells, J. D.; Johnson, B. B., Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1026* (1-2), 295-300.
90. Nakamura, S.; Hwee Sian, T.; Daishima, S., Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2001**, *919* (2), 275-282.
91. Fine, D. D.; Breidenbach, G. P.; Price, T. L.; Hutchins, S. R., Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1017* (1-2), 167-185.
92. Rossi, S.-A.; Johnson, J. V.; Yost, R. A., Short-column gas chromatography/tandem mass spectrometry for the detection of underivatized anabolic steroids in urine. *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *23* (3), 131-139.
93. Fialkov, A. B.; Gordin, A.; Amirav, A., Extending the range of compounds amenable for gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr.* **2003**, *991* (2), 217-240.
94. Sweeley, C. C.; Horning, E. C., Microanalytical separation of steroids by gas chromatography. *Nature* **1960**, *187*, 144-5.
95. Horning, E. C.; Brooks, C. J.; Vanden Heuvel, W. J., Gas phase analytical methods for the study of steroids. *Adv. Lipid Res.* **1968**, *6*, 273-392.
96. Shackleton, C., Steroid analysis and doping control 1960-1980: Scientific developments and personal anecdotes. *Steroids* **2009**, *74* (3), 288-295.
97. Jimenez, C.; Ventura, R.; Segura, J., Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *767* (2), 341-351.

98. Matysik, S.; Schmitz, G., Determination of steroid hormones in human plasma by GC-triple quadrupole MS. *Steroids* **2015**, *99*, 151-154.
99. Impens, S.; Van Loco, J.; Degroodt, J. M.; De Brabander, H., A downscaled multi-residue strategy for detection of anabolic steroids in bovine urine using gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS3). *Anal. Chim. Acta* **2007**, *586* (1-2), 43-48.
100. Thevis, M.; Schaenzer, W., Performance enhancing substances in LC-MS/MS. *Nachr. Chem.* **2008**, *56* (9), 910-913.
101. Leinonen, A.; Kuuranne, T.; Kostainen, R., Liquid chromatography/mass spectrometry in anabolic steroid analysis - optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37* (7), 693-698.
102. Weinmann, W.; Stoertzel, M.; Vogt, S.; Svoboda, M.; Schreiber, A., Tuning compounds for electrospray ionization/in-source collision-induced dissociation and mass spectra library searching. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36* (9), 1013-1023.
103. Dong, M. W., The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. *LC GC Asia Pac.* **2013**, *16* (3), 24-29.
104. Siek, K.; Patrick, J. S.; Guice, E. A.; Amaya, S.; Binkley, J., High-throughput screening of abused steroids in urine using direct TOF-MS and LC-high-resolution TOF-MS with comprehensive ion fragmentation. *LCGC North Am.* **2012**, (Suppl.), 61-67.
105. Rauh, M.; Gröschl, M.; Rascher, W.; Dörr, H. G., Automated, fast and sensitive quantification of 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* **2006**, *71* (6), 450-458.
106. Rivier, L., Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *492* (1–2), 69-82.
107. Higashi, T.; Shimada, K., Derivatization of neutral steroids to enhance their detection characteristics in liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378* (4), 875-882.
108. Higashi, T.; Nishio, T.; Hayashi, N.; Shimada, K., Alternative Procedure for Charged Derivatization to Enhance Detection Responses of Steroids in Electrospray Ionization-MS. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55* (4), 662-665.
109. Pouzar, V.; Černý, I., Preparation and properties of 3-(O-(2-carboxyethyl))oxime derivatives of steroid hormones. *Steroids* **1996**, *61* (2), 89-93.
110. Liu, S.; Sjövall, J.; Griffiths, W. J., Analysis of oxosteroids by nano-electrospray mass spectrometry of their oximes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (6), 390-400.
111. Forsdahl, G.; Vatne, H. K.; Geisendorfer, T.; Gmeiner, G., Screening of testosterone esters in human plasma. *Drug Test. Anal.* **2013**, *5* (11-12), 826-833.
112. Regal, P.; Vázquez, B. I.; Franco, C. M.; Cepeda, A.; Fente, C., Quantitative LC–MS/MS method for the sensitive and simultaneous determination of natural hormones in bovine serum. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (24), 2457-2464.



113. Pozo, O. J.; Van, E. P.; Deventer, K.; Delbeke, F. T., Ionization of anabolic steroids by adduct formation in liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42* (4), 497-516.
114. Pozo, O.; Van Eenoo, P.; Deventer, K.; Delbeke, F., Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389* (4), 1209-1224.
115. Andersen, D. W.; Linnet, K., Screening for Anabolic Steroids in Urine of Forensic Cases Using Fully Automated Solid Phase Extraction and LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* **2014**.
116. Keevil, B. G., Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *27* (5), 663-674.
117. Wozniak, B.; Matraszek-Zuchowska, I.; Zmudzki, J., LC-MS/MS fast analysis of androgenic steroids in urine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (10), 2965-2972.
118. Allende, F.; Solari, S.; Campino, C.; Carvajal, C. A.; Lagos, C. F.; Vecchiola, A.; Valdivia, C.; Baudrand, R.; Owen, G. I.; Fardella, C. E., LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Free Urinary Steroids. *Chromatographia* **2014**, *77* (7-8), 637-642.
119. Jeon, B.; Yoo, H.; Jeong, E.; Kim, H.; Jin, C.; Kim, D.; Lee, J., LC-ESI/MS/MS method for rapid screening and confirmation of 44 exogenous anabolic steroids in human urine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401* (4), 1353-1363.
120. Fabregat, A.; Pozo, O. J.; Marcos, J.; Segura, J.; Ventura, R., Use of LC-MS/MS for the Open Detection of Steroid Metabolites Conjugated with Glucuronic Acid. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (10), 5005-5014.
121. Galuska, C. E.; Hartmann, M. F.; Sanchez-Guijo, A.; Bakhaus, K.; Geyer, J.; Schuler, G.; Zimmer, K.-P.; Wudy, S. A., Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* **2013**, *138* (13), 3792-3801.
122. Xu, X.; Roman, J. M.; Issaq, H. J.; Keefer, L. K.; Veenstra, T. D.; Ziegler, R. G., Quantitative Measurement of Endogenous Estrogens and Estrogen Metabolites in Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (20), 7813-7821.
123. Marwah, A.; Marwah, P.; Lardy, H., Analysis of ergosteroids VIII: Enhancement of signal response of neutral steroidal compounds in liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analysis by mobile phase additives. *J. Chromatogr. A* **2002**, *964* (1-2), 137-151.
124. Rannulu, N. S.; Cole, R. B., 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* (9), 1558-1568.
125. Cai, Y.; Cole, R. B., Stabilization of anionic adducts in negative ion electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (5), 985-991.
126. Lee, J.-Y.; Kumar, J. R., Liquid-liquid extraction general principles - a review. *Chawon Rissaikuring* **2009**, *18* (6), 3-9.
127. Li, Q.; Liu, F.; Chen, L., Analysis of correlation between semi-volatile organic compound n-octanol/water partition coefficient and recoveries of liquid-liquid extraction. *Fenxi Ceshi Xuebao* **2014**, *33* (11), 1291-1295.

128. In, Y.; Chai, H. H.; No, K. T., A Partition Coefficient Calculation Method with the SFED Model. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45* (2), 254-263.
129. Bir, D., Partition coefficient calculation of selected terpenes and low molecular weight solvents between tall oil fatty acid and air and polydimethyl siloxane oil and air. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77* (2), 163-169.
130. Simpson, N., *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. CRC Press: 2000.
131. Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Foglia, P.; Samperi, R.; Stampachiachiere, S.; Ventura, S.; Lagana, A., Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* **2015**, Ahead of Print.
132. Ross, P.; Ax, O., Porous graphitized carbon for HPLC and solid-phase extraction (SPE). *LaborPraxis* **2000**, *24* (9), 28,30,32,34-35.
133. Watson, D. W.; Raynie, D. E.; Majors, R. E., Understanding and improving solid-phase extraction. *LCGC North Am.* **2014**, *32* (12), 908, 910, 912-915.
134. Nakov, N.; Mladenovska, K.; Labacevski, N.; Dimovski, A.; Petkovska, R.; Dimitrovska, A.; Kavrakovski, Z., Development and validation of automated SPE-LC-MS/MS method for determination of indapamide in human whole blood and its application to real study samples. *Biomed. Chromatogr.* **2013**, *27* (11), 1540-1546.
135. Huang, B.; Sun, W. W.; Li, X. M.; Yang, X. X.; Ren, D.; Wang, Y.; Pan, X. J., Simultaneous determination of progestogens, androgens, estrogens and phenols in water, sediment and biological samples by enolisation-silylation with ASE-GPC-SPE-GC/MS. *Anal. Methods* **2015**, *7* (15), 6139-6151.
136. Geyer, H.; Mareck-Engelke, U.; Nolteernsting, E.; Opfermann, G.; Donike, M. In *The matrix problem in calibration of the GC/MS for endogenous steroids. The search for an artificial urine*, SPORT und BUCH Strauss: 1995; pp 199-209.
137. Kamata, T.; Nishikawa, M.; Katagi, M.; Tsuchihashi, H., Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *796* (2), 421-427.
138. Yashin, Y. I.; Frolov, I. I., Liquid chromatography. Review. *Zh. Anal. Khim.* **1972**, *27* (5), 923-32.
139. Sionek, B. In *HPLC - selected aspects of theory*, Instytut Chemii i Techniki Jadrowej: 2010; pp 36-51.
140. Abdel-Khalik, J.; Björklund, E.; Hansen, M., 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* **2013**, *928*, 58-77.
141. Pesek, J. J.; Williamsen, E. J., Comparison of novel stationary phases. *J. Chromatogr. Libr.* **1995**, *57*, 371-401.
142. Lee, J.; Gan, H. T.; Abdul Latiff, S. M.; Chuah, C.; Lee, W. Y.; Yang, Y.-S.; Loo, B.; Ng, S. K.; Gagnon, P., Principles and applications of steric exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1270*, 162-170.
143. Rathore, K. S.; Gupta, P., An overview on ion exchange chromatography. *Int. J. Adv. Res. Pharm. Bio Sci.* **2012**, *2* (1-4), 55-64, 9 pp.

144. Queiroz, J. A.; Tomaz, C. T.; Cabral, J. M. S., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Biotechnol.* **2001**, *87* (2), 143-159.
145. Wilchek, M.; Chaiken, I., An overview of affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *147* (Affinity Chromatography), 1-6.
146. Sarzanini, C., Recent developments in ion chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *956* (1-2), 3-13.
147. Tonhi, E.; Collins, K. E.; Collins, C. H., High-performance liquid chromatographic stationary phases based on polysiloxanes with different chain lengths thermally immobilized on silica supports. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1119* (1-2), 135-139.
148. Himbert, F.; Dreux, M.; Pennanec, R.; Chaimbault, P.; Elfakir, C.; Lafosse, M., New active splitting device: An innovative approach for normal phase liquid chromatography - mass spectrometry. *Spectra Anal.* **2003**, *32* (235), 29-31.
149. Agilent Zorbax Eclipse XDB. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/Analytical-HPLC-UHPLC/ZORBAX-Eclipse-XDB/Pages/default.aspx>.
150. Glish, G. L.; Vachet, R. W., The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2* (2), 140-150.
151. de Hoffmann, E.; Stroobant, V.; Editors, *Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third Edition*. John Wiley & Sons, Ltd.: 2007; p 489 pp.
152. Anon, Mass spectrometry: Low-vacuum MS. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (1), 11A.
153. Owen, B. C.; Jarrell, T. M.; Schwartz, J. C.; Oglesbee, R.; Carlsen, M.; Archibold, E. F.; Kenttamaa, H. I., A Differentially Pumped Dual Linear Quadrupole Ion Trap (DLQIT) Mass Spectrometer: A Mass Spectrometer Capable of MS<sub>n</sub> Experiments Free From Interfering Reactions. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (23), 11284-11290.
154. Ji, H.-w.; Ding, X.-l.; Tao, G.-j., Screening of steroidal saponins from the bulbs of *Lilium brownii* var. *colchesteri* by combination of high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and electron impact mass spectrometry. *Sepu* **2001**, *19* (5), 403-406.
155. Raro, M.; Portoles, T.; Sancho, J. V.; Pitarch, E.; Hernandez, F.; Marcos, J.; Ventura, R.; Gomez, C.; Segura, J.; Pozo, O. J., Mass spectrometric behavior of anabolic androgenic steroids using gas chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization source. Part I: Ionization. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (6), 509-521.
156. Zhang, Y.; Tobias, H. J.; Brenna, J. T., Highly sensitive and selective analysis of urinary steroids by comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with positive chemical ionization quadrupole mass spectrometry. *Analyst* **2012**, *137* (13), 3102-3110.
157. Gao, W.; Stalder, T.; Foley, P.; Rauh, M.; Deng, H.; Kirschbaum, C., Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *928*, 1-8.
158. Jin, Z.; Daiya, S.; Kenttamaa, H. I., Characterization of nonpolar lipids and selected steroids by using laser-induced acoustic desorption/chemical ionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *301* (1-3), 234-239.

159. Hintikka, L.; Haapala, M.; Kuuranne, T.; Leinonen, A.; Kostiainen, R., Analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry with chlorobenzene as dopant. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1312*, 111-117.
160. Kostiainen, R.; Kauppila, T. J. In *Analysis of steroids by liquid chromatography - atmospheric pressure photoionization mass spectrometry*, AOCS Press: 2005; pp 472-487.
161. Chen, C.-H.; Bair, M.-J.; Hsu, C.-W.; Chiu, T.-C.; Hu, C.-C., Analysis of steroid hormones in human saliva by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Methods* **2015**, *7* (2), 486-489.
162. Son, J.; Cha, S., MALDI mass spectrometric analysis of nonderivatized steroids using cyclodextrin-supported 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35* (5), 1409-1412.
163. Johaenning, J.; Heinkele, G.; Precht, J. C.; Brauch, H.; Eichelbaum, M.; Schwab, M.; Schroth, W.; Muerdter, T. E., Highly sensitive simultaneous quantification of estrogenic tamoxifen metabolites and steroid hormones by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, Ahead of Print.
164. Nakajima, T.; Hayashi, H.; Kanda, M.; Tsuruoka, Y.; Hashimoto, T.; Matsushima, Y.; Yoshikawa, S.; Nagano, C.; Sasamoto, T.; Takano, I., Comprehensive determination and survey of 17 steroid hormones and their analogues in milk using LC-ESI-MS/MS. *Bull. Int. Dairy Fed.* **2014**, *472*, 73-82.
165. Musharraf, S. G.; Ali, A.; Khan, N. T.; Yousuf, M.; Choudhary, M. I.; Atta ur, R., Tandem mass spectrometry approach for the investigation of the steroidal metabolism: Structure-fragmentation relationship (SFR) in anabolic steroids and their metabolites by ESI-MS/MS analysis. *Steroids* **2013**, *78* (2), 171-181.
166. Jeon, B. W.; Yoo, H. H.; Jeong, E. S.; Kim, H. J.; Jin, C.; Kim, D. H.; Lee, J., LC-ESI/MS/MS method for rapid screening and confirmation of 44 exogenous anabolic steroids in human urine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401* (4), 1353-1363.
167. Gilbert, W., *De Magnete, Magnetisque Corporibus, et de Magno Magnete Tellure*. London, 1600.
168. Browne, T., *Pseudodoxia Epidemica*. London, 1646.
169. Gray, S., A letter to Cromwell Mortimer containing several experiments in electricity. *Philos. Trans.* **1731**, 37.
170. Gray, S., A letter concerning the electricity of water, from Mr. Stephen Gray to Cromwell Mortimer. *Philos. Trans.* **1731**, 37.
171. Dumont, Q.; Cole, R. B., Jean-Antoine Nollet: The father of experimental electrospray. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**.
172. Nollet, J.-A., *Recherches sur les causes particulières des phénomènes électriques*. Guerin & Delatour: Paris, 1754.
173. Dole, M., *My life in the golden age of America*. Vantage Press: 1989.
174. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B., Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49* (5), 2240-9.
175. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (3), 675-9.

176. Kebarle, P.; Verkerk, U. H., On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS). In *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc.: 2010; pp 1-48.
177. Rayleigh, L., XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine Series 5* **1882**, *14* (87), 184-186.
178. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A., On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (6), 2287-94.
179. Banerjee, S.; Mazumdar, S., Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 282574.
180. Brunnee, C., The ideal mass analyzer: fact or fiction? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *76* (2), 125-237.
181. Jones, E. B. In *Quadrupole, triple-quadrupole, and hybrid linear ion trap mass spectrometers for metabolite analysis*, John Wiley & Sons, Inc.: 2009; pp 123-157.
182. Guo, C.; Gao, W.; Huang, Z.; Zhu, H.; Fu, Z.; Dong, J.; Cheng, P.; Zhou, Z., Design and performance of a desktop time-of-flight mass spectrometer for analyzing metal ions. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2012**, *18* (4), 349-360.
183. Dawson, P. H., *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications*. Elsevier Science: 2013.
184. Miller, P. E.; Denton, M. B., The quadrupole mass filter: Basic operating concepts. *J. Chem. Ed.* **1986**, *63* (7), 617.
185. Chromservis, GC/MS-TOF Description. <https://http://www.chromservis.eu/i/gc-ms-tof-description?lang=EN>.
186. Iivonen, A.; Saintola, R.; Valli, K., Ion-guide quadrupole mass spectrometer. *Phys. Scr.* **1990**, *42* (2), 133-7.
187. McLuckey, S., Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3* (6), 599-614.
188. Armentrout, P. B.; Ervin, K. M.; Rodgers, M. T., Statistical Rate Theory and Kinetic Energy-Resolved Ion Chemistry: Theory and Applications. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (41), 10071-10085.
189. Cho, B.-K.; Koo, Y. D.; Kim, K.; Kang, M. J.; Lee, Y. Y.; Kim, Y.; Park, K. S.; Kim, K. P.; Yi, E. C., Determination of selected reaction monitoring peptide transitions via multiplexed production scan modes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28* (7), 773-780.
190. Kertesz, T. M.; Hall, L. H.; Hill, D. W.; Grant, D. F., CE50: Quantifying Collision Induced Dissociation Energy for Small Molecule Characterization and Identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (9), 1759-1767.
191. Chen, T.-C.; Fillmore, T. L.; Prost, S. A.; Moore, R. J.; Ibrahim, Y. M.; Smith, R. D., Orthogonal Injection Ion Funnel Interface Providing Enhanced Performance for Selected Reaction Monitoring-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (14), 7326-7331.
192. Caron, P.; Turcotte, V.; Guillemette, C., A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume. *Steroids* **2015**, Ahead of Print.

193. Khatri, N.; Gupta, A.; Taneja, R.; Bilandi, A.; Beniwal, P., A review on mass spectrometry detectors. *Int. Res. J. Pharm.* **2012**, *3* (10), 33-42.
194. Willard, H. H.; Merritt, L. L., Jr.; Dean, J. A., *Instrumental Methods of Analysis. 5th ed.* Van Nostrand: 1974; p 860 pp.
195. Park, S.; Baldelomar, E.; Park, K.; Sosebee, M.; White, A.; Yu, J., Measurement Of Gas Electron Multiplier (GEM) Detector Characteristics. *AIP Conf. Proc.* **2011**, *1336* (Application of Accelerators in Research and Industry), 193-196.
196. Busch, K. L., Detecting ions in mass spectrometers with the Faraday Cup. *Spectroscopy (Duluth, MN, U. S.)* **2011**, *26* (11), 12, 14-18.
197. Freudenthal, J.; Jacobs, F. W., High resolution mass spectrometry of complex mixtures using the photographic plate as detector. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1983**, *46*, 115-18.
198. Boernsen, K. O.; Bruin, G. J. M. In *A microplate scintillation counter as a new detector in high performance separation techniques for metabolism studies*, Radiocarbon: 2002; pp 35-40.
199. Mallard, W. G. L., P.J. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. <http://webbook.nist.gov>.
200. Blondel, C.; Cacciani, P.; Delsart, C.; Trainham, R., High-resolution determination of the electron affinity of fluorine and bromine using crossed ion and laser beam. *Phys. Rev. A: Gen. Phys.* **1989**, *40* (7), 3698-701.
201. Breuker, K.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R., Gas-phase basicities of deprotonated matrix-assisted laser desorption/ionization matrix molecules. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *184* (1), 25-38.
202. Cole, R. B.; Rannulu, N. S., Regioselective anion attachment leading to regiospecific decompositions of bifunctional steroids in negative ion electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (4), 558-562.
203. Longevialle, P., Ion-neutral complexes in the unimolecular reactivity of organic cations in the gas phase. *Mass Spectrom. Rev.* **1992**, *11* (3), 157-92.
204. Wang, W.; Cole, R. B., Enhanced Collision-Induced Decomposition Efficiency and Unraveling of Fragmentation Pathways for Anionic Adducts of Brevetoxins in Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (21), 8826-8838.
205. Ha, N. C.; Kim, M. S.; Lee, W.; Choi, K. Y.; Oh, B. H., Detection of large pKa perturbations of an inhibitor and a catalytic group at an enzyme active site, a mechanistic basis for catalytic power of many enzymes. *J Biol Chem* **2000**, *275* (52), 41100-6.
206. Silva, A. N.; Kong, X.; Hider, R., Determination of the pKa value of the hydroxyl group in the  $\alpha$ -hydroxycarboxylates citrate, malate and lactate by  $^{13}\text{C}$  NMR: implications for metal coordination in biological systems. *BioMetals* **2009**, *22* (5), 771-778.
207. Bartmess, J. E.; Scott, J. A.; McIver, R. T., Jr., Scale of acidities in the gas phase from methanol to phenol. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (20), 6046-56.
208. Pozo, O. J.; Van Thuyne, W.; Deventer, K.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T., Elucidation of urinary metabolites of fluoxymesterone by liquid chromatography- tandem mass spectrometry and gas chromatography- mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43* (3), 394-408.
209. Patiny, L.; Borel, A., ChemCalc: A Building Block for Tomorrow's Chemical Infrastructure. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (5), 1223-1228.

210. Guo, T.; Taylor, R. L.; Singh, R. J.; Soldin, S. J., Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *372* (1-2), 76-82.
211. Kushnir, M. M.; Neilson, R.; Roberts, W. L.; Rockwood, A. L., Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **2004**, *37* (5), 357-362.
212. Scigelova, M.; Makarov, A., Orbitrap mass analyzer - overview and applications in proteomics. *Pract. Proteomics* **2006**, *1* (1-2), 16-21.
213. Shi, L.; Yang, J.; Zhang, X.; Hou, H.; Hu, Q., Research progress of atmospheric pressure photoionization technique and its application. *Huaxue Fenxi Jiliang* **2014**, *23* (4), 99-103.
214. Doue, M.; Dervilly-Pinel, G.; Pouponneau, K.; Monteau, F.; Le Bizec, B., Analysis of glucuronide and sulfate steroids in urine by ultra-high-performance supercritical-fluid chromatography hyphenated tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (15), 4473-4484.
215. Jantti, S. E.; Hartonen, M.; Hilvo, M.; Nygren, H.; Hyotylainen, T.; Ketola, R. A.; Kostianen, R., Steroid and steroid glucuronide profiles in urine during pregnancy determined by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *802*, 56-66.
216. Pozo, O. J.; Van Eenoo, P.; Van Thuyne, W.; Deventer, K.; Delbeke, F. T., Direct quantification of steroid glucuronides in human urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1183* (1-2), 108-118.
217. Zhu, J.; Cole, R. B., Ranking of gas-phase acidities and chloride affinities of monosaccharides and linkage specificity in collision-induced decompositions of negative ion electrospray-generated chloride adducts of oligosaccharides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12* (11), 1193-1204.
218. Wang, H. M.; Loganathan, D.; Linhardt, R. J., Determination of the pKa of glucuronic acid and the carboxy groups of heparin by <sup>13</sup>C-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Biochem J* **1991**, *278* (Pt 3), 689-95.
219. Yanes, O.; Tautenhahn, R.; Patti, G. J.; Siuzdak, G., Expanding Coverage of the Metabolome for Global Metabolite Profiling. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (6), 2152-2161.
220. Fiers, T.; Casetta, B.; Bernaert, B.; Vandersypt, E.; Debock, M.; Kaufman, J.-M., 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: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *893-894*, 57-62.
221. Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L., Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr.* **2004**, *1058* (1-2), 61-66.
222. Peters, F.; Remane, D., Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (8), 2155-2172.
223. WADA, MINIMUM CRITERIA FOR CHROMATOGRAPHIC-MASS

#### SPECTROMETRIC CONFIRMATION OF THE IDENTITY OF ANALYTES

FOR DOPING CONTROL PURPOSES. [https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada\\_td2015idcr\\_minimum\\_criteria\\_chromato-mass\\_spectro\\_conf\\_en.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_td2015idcr_minimum_criteria_chromato-mass_spectro_conf_en.pdf): 2015.

224. Van Looc, J.; János, A.; Impens, S.; Fraselle, S.; Cornet, V.; Degroodt, J. M., Calculation of the decision limit ( $CC\alpha$ ) and the detection capability ( $CC\beta$ ) for banned substances: The imperfect marriage between the quantitative and the qualitative criteria. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *586* (1–2), 8-12.
225. Stastna, E.; Cerny, I.; Pouzar, V.; Chodounska, H., Stereoselectivity of sodium borohydride reduction of saturated steroidal ketones utilizing conditions of Luche reduction. *Steroids* **2010**, *75* (10), 721-725.
226. M. J. Frisch, G. W. T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, I. Gaussian, Wallingford CT, Gaussian 09, Revision D.01. **2009**.
227. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter* **1988**, *37* (2), 785-9.
228. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648-52.
229. Weigend, F.; Ahlrichs, R., Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7* (18), 3297-3305.
230. Ho, J.; Coote, M. L., First-principles prediction of acidities in the gas and solution phase. *Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1* (5), 649-660.



Résumé :

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, quis gravida magna mi a libero. Fusce vulputate eleifend sapien. Vestibulum purus quam, scelerisque ut, mollis sed, nonummy id, metus. Nullam accumsan lorem in dui. Cras ultricies mi eu turpis hendrerit fringilla. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; In ac dui quis mi consectetur.

Mots clés : [-----]

**[Titre de la thèse en anglais]**

Abstract :

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, quis gravida magna mi a libero. Fusce vulputate eleifend sapien. Vestibulum purus quam, scelerisque ut, mollis sed, nonummy id, metus. Nullam accumsan lorem in dui. Cras ultricies mi eu turpis hendrerit fringilla. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; In ac dui quis mi consectetur.

Keywords : [-----]