

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR DE ANNABA

FACULTE DE MEDECINE

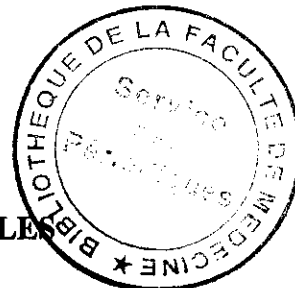
DEPARTEMENT DE PHARMACIE



THESE POUR L'OBTENTION

DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES MEDICALES

EN CHIMIE ANALYTIQUE

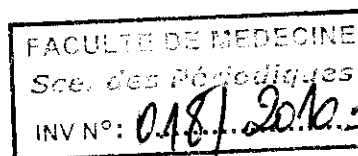


« MISE AU POINT DE TECHNIQUES DE DOSAGE PAR CPG
DES PRODUITS DOPANTS (STIMULANTS ET AGENTS
ANABOLISANTS) ET LEURS METABOLITES DANS LES
LIQUIDES BIOLOGIQUES »

Présentée et Soutenue par : **Youcef HADEF**

Sous la Direction de : **Pr. Jacques KALOUSTIAN, Faculté de Pharmacie, Marseille**

Membres du jury



Président : **Pr. Rachid DENINE, Faculté de Médecine, Alger**

Examineur : **Pr. Mohamed MAAMAR, Faculté de Médecine, Alger**

Examineur : **Pr. Nacéra CHAFFAI, Faculté de Médecine, Annaba**

Invité : **Pr. Abdelhafid FRIDJAT**

UBM / Fac Médecine , A.U : 2007/2008

Tables des matières page

Introduction générale.....	01
-----------------------------------	-----------

PARTIE I

Chapitre I : Rappels théoriques sur les stéroïdes

1. Les stéroïdes : généralités.....	04
2. Stéroïdes androgènes.....	05
2.1. Métabolisme.....	05
2.2. Pharmacologie.....	09
2.3. Indications thérapeutiques.....	10
2.4. Utilisation dans le sport.....	10
2.5. Toxicité des substances dopantes.....	11
2.6. Règlementations et méthodes d'analyse	12

Chapitre II : Rappels théoriques sur les stimulants

Introduction.....	14
-------------------	----

Stimulants du système nerveux central

1. Caféine et dérivés.....	15
1.1. Introduction	15
1.2. Métabolisme et propriétés pharmacocinétiques de la caféine.....	16
1.3. Modifications pharmacocinétiques.....	18
1.4. Mode d'action et propriétés pharmacologiques des bases xanthiques.....	19
1.5. Indications thérapeutiques des bases xanthiques.....	22
1.6. Toxicité.....	23
1.7. Caféine et sport	23
1.8. Méthodes de dosage des bases xanthiques dans les milieux biologiques.	24
2. Cocaïne.....	26
2.1. Généralités.....	26
2.2. Métabolisme.....	26
2.3. Pharmacologie.....	28

2.4. Indication thérapeutique et toxicité.....	28
2.5. Cocaïne et sport.....	30

Amines sympathomimétiques

Généralités.....	32
1. Ephédrine et ses dérivés.....	34
1.1. Introduction.....	34
1.2. Propriétés pharmacologiques	35
1.3. Indications thérapeutiques et toxicité	35
1.4. Ephédrine et sport- Règlements	36
2. Fenfluramine	37
2. 1. Introduction.....	37
2. 2. Pharmacocinétique.....	37
2. 3. Pharmacologie.....	38
2. 4. Toxicité.....	39
2. 5. Méthodes de dosage dans les milieux biologiques.....	40
3. Phentermine.....	41
3. 1. Introduction.....	41
3. 2. Métabolisme.....	41
3. 3. Pharmacologie et mécanisme d'action.....	42
3. 4. Indications thérapeutiques et toxicité	42
4. Les β_2 -agonistes.....	43
4. 1. Introduction.....	43
4. 2. Métabolisme	43
4. 3. Pharmacologie.....	43
4. 4. Indications thérapeutiques et toxicité.....	44
4. 5. Les β_2 -agonistes et sport.....	45

Chapitre III : Notions théoriques : Plans d'expériences

Introduction	46
1. Méthodologie des plans d'expériences.....	47
1.1. Définition.....	47
1.2. Aperçu Historique.....	47
2. Formalisation du problème.....	48

2.1. Définir le problème.....	48
2.2. Déterminer les objectifs.....	48
2.3. Définir les sorties (réponses).....	49
2.4. Définir les entrées (facteurs).....	49
2.5. Domaine expérimental.....	50
3. Choix d'une stratégie.....	52
3.1. L'efficacité des plans d'expériences.....	52
3.1.1. Plan à un seul facteur à la fois	52
3.1.2. Plan factoriel complet.....	53
3.1.3. Plan fractionnaire orthogonal.....	54
3.1.4. Autres plans	56
3.2. Construction du plan d'expérimentation.....	56
3.2.1. Choix de la stratégie expérimentale.....	56
3.2.2. Choix du modèle.....	56
3.2.3. Choix de la matrice d'expériences.....	57
3.2.4. Définir le domaine expérimental	58
4. Analyses et résultats.....	58
4.1. Acquisition progressive des résultats.....	58
4.2. Analyse statistique des résultats.....	59
4.3. Analyse graphique des résultats.....	63
4.4. Validation des hypothèses et recherche de solutions au problème.....	64
4.5. Désirabilité.....	64
Conclusion.....	67

PARTIE II

Application des plans d'expériences dans l'optimisation de la séparation par CPG-SM et de dérivatisation des anabolisants et stimulants

Chapitre I : Evaluation de la stabilité thermique des produits dopants par DSC avant analyse par CPG/SM

Introduction	68
1. Partie expérimentale.....	69
1.1. Solvants et réactifs.....	69

1.2. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse thermique	69
1.3. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse par CPG/SM.....	71
1.4. Conditions expérimentales de la dérivation avant analyse par CPG/SM	71
2. Résultats.....	72
2.1. Analyse thermique.....	72
2.2. Analyse par CPG/SM.....	75
3. Discussion	77
4. Conclusion.....	81

Chapitre II : Optimisation de la séparation par CPG-SM de l'éphédrine et de ses dérivés

Introduction.....	82
1. Partie expérimentale.....	83
1.1. L'éphédrine et ses dérivés.....	83
1.2. Solvants et réactifs de dérivation.....	83
1.3. Préparation des solutions étalons.....	83
1.4. Procédé de la dérivation.....	84
1.5. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse par CPG/SM.....	84
2. Plan d'expériences.....	85
2.1. Criblage des facteurs.....	85
2.1.1. Facteurs-Modalités-Domaine expérimental.....	85
2.1.2. Modèle empirique.....	86
2.1.3. Construction du plan d'expériences.....	87
2.1.4. Résultats et discussion.....	89
2.1.4.1. Dérivation.....	89
2.1.4.2. Criblage des facteurs.....	93
2.1.5. Conclusion.....	101
2.2. Optimisation- Plans à surfaces de réponses.....	103
2.2.1. Introduction.....	103
2.2.2. Facteurs-Modalités-Domaine expérimental.....	103
2.2.3. Modèle empirique.....	104
2.2.4. Construction du plan d'expériences.....	104
2.2.5. Résultats et discussion.....	106

2.2.6 Conclusion.....	116
-----------------------	-----

Chapitre III : Optimisation de la séparation par CPG-SM des β_2 -agonistes, codéine et cocaïne

Introduction	117
1. Partie expérimentale.....	118
1.1. Réactifs et solvants.....	118
1.2. Préparation des solutions étalons.....	118
1.3. Procédé de la dérivation.....	119
1.4. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse par CPG/SM.....	119
2. Plan d'expériences.....	121
2.1. Criblage des facteurs.....	121
2.1.1. Résultats et discussion.....	122
2.1.2. Conclusion.....	125
2.2. Optimisation- Plans à surfaces de réponses.....	126
2.2.1. Introduction.....	126
2.2.2. Expérimentation.....	126
2.2.3 Résultats et discussion.....	127
2.2.4 Conclusion	133

Chapitre IV : Optimisation multivariable d'un procédé de dérivation pour la détermination simultanée de neuf stéroïdes anabolisants par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Introduction	134
1. Partie expérimentale.....	135
1.1. Les stéroïdes anabolisants.....	135
1.2. Solvants et réactif de dérivation.....	136
1.3. Préparation des solutions standard.....	136
1.4. Procédure de dérivation.....	137
1.5. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse par CPG/SM.....	137
1.6. Logiciel.....	138
1.7. Plan d'expériences.....	138
2. Résultats et discussions.....	139

3. Conclusion.....	155
--------------------	-----

PARTIE III

Validation des méthodes de dosage des anabolisants et des stimulants dans les liquides biologiques (urines)

Chapitre I

Protocole de validation des méthodes de quantification

Introduction.....	156
1. Choix de la méthode de dosage et traitement de l'échantillon biologique (urines).....	156
2. Procédure de validation.....	157
2.1. Exactitude, Linéarité, Fidélité.....	157
2.1.1. Linéarité et exactitude.....	159
2.1.2. Fidélité.....	163
2.2. Sensibilité.....	165
2.3. Limite de détection.....	166
2.4. Limite de quantification.....	167

Chapitre II : Validation de la méthode de dosage par CPG-SM de neuf stéroïdes anabolisants dans les urines

Introduction.....	168
1. Partie expérimentale.....	168
1.1. Réactifs et solvants.....	168
1.2. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse par CPG-SM.....	168
1.3. Préparation des solutions de travail.....	169
1.4. Préparation d'urines chargées.....	169
1.5. Procédure d'extraction.....	170
2. Résultats et discussion.....	171
2.1. Analyse des solutions standards et extrait urinaire.....	171
2.2. Validation de la méthode de dosage de l'estradiol.....	172
2.3. Validation de la méthode de dosage de l'androstérone.....	187
2.4. Validation de la méthode de dosage de la testostérone.....	193

2.5. Validation de la méthode de dosage de la nandrolone.....	199
2.6. Validation de la méthode de dosage de la boldénone.....	205
2.7. Validation de la méthode de dosage de l'épitéstostérone.....	211
2.8. Validation de la méthode de dosage de la nandrolone propionate.....	217
2.9. Validation de la méthode de dosage de la testostérone propionate.....	223
2.10. Validation de la méthode de dosage de la dydrogestérone.....	229
3. Discussion.....	235
4. Conclusion.....	237

Chapitre III : Validation de la méthode de dosage par CPG-SM de la caféine et ses dérivés dans les urines

Introduction.....	238
1. Partie expérimentale.....	239
1.1. Réactifs et solvants.....	239
1.2. Appareillage et protocole expérimental de l'analyse par CPG-SM.....	239
1.3. Préparation des solutions de travail et des urines chargées.....	239
1.4. Procédure d'extraction.....	241
2. Résultats.....	242
2.1. Analyse des solutions standards et extrait urinaire.....	242
2.2. Validation de la méthode de dosage de la caféine.....	243
2.3. Validation de la méthode de dosage de la théobromine.....	249
2.4. Validation de la méthode de dosage de la théophylline.....	255
2.5. Validation de la méthode de dosage de la 8-chlorothéophylline.....	261
2.6. Validation de la méthode de dosage de la proxiphylline.....	267
3. Discussion.....	273
4. Conclusion.....	274

Chapitre IV : Validation de la méthode de dosage par CPG-SM des β_2 -agonistes, de la codéine, et de la cocaïne et de son métabolite dans les urines

Introduction.....	275
1. Partie expérimentale.....	275
1.1. Réactifs et solvants.....	275
1.2. Dérivatisation et méthode de dosage par CPG-SM.....	275

1.3. Préparation des solutions de travail.....	275
1.4. Préparation des urines chargées.....	276
1.5. Mise au point de la procédure d'extraction.....	276
2. Résultats.....	278
2.1. Extraction en phase solide et analyse chromatographique.....	278
2.2. Validation de la méthode de dosage du clenbutérol.....	280
2.3. Validation de la méthode de dosage du salbutamol.....	286
2.4. Validation de la méthode de dosage de la cocaïne.....	292
2.5. Validation de la méthode de dosage de la benzoylecgonine.....	298
2.6. Validation de la méthode de dosage de la codéine.....	304
3. Discussion.....	310
4. Conclusion.....	311
 Chapitre V : Validation de la méthode de dosage par CPG-SM	
de l'éphédrine et ses dérivés dans les urines	
Introduction.....	312
1. Partie expérimentale.....	312
1.1. Réactifs et solvants.....	312
1.2. Dérivatisation et méthode de dosage par CPG-SM.....	312
1.3. Préparation des solutions de travail.....	312
1.4. Préparation des urines chargées.....	313
1.5. Procédure d'extraction.....	313
2. Résultats et discussion.....	314
2.1. Extraction en phase solide et analyse chromatographique.....	314
2.2. Validation de la méthode de dosage de la phentermine.....	316
2.3. Validation de la méthode de dosage de la fenfluramine.....	322
2.4. Validation de la méthode de dosage de la noréphédrine.....	328
2.5. Validation de la méthode de dosage de l'éphédrine.....	334
2.6. Validation de la méthode de dosage de la pseudoéphédrine.....	340
2.7. Conclusion.....	346
Conclusion générale.....	347
Bibliographie.....	350
Annexes.....	370

« MISE AU POINT DE TECHNIQUES DE DOSAGE PAR CPG DES PRODUITS DOPANTS (STIMULANTS ET AGENTS ANABOLISANTS) ET LEURS METABOLITES DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES »

Résumé

Le but de notre travail est de mettre au point des techniques de dosage par CPG-SM des produits dopants (stéroïdes anabolisants et stimulants) et de leurs métabolites dans les urines.

L'étude de la stabilité thermique de 17 produits dopants par l'utilisation de la DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) et leur analyse par CPG-SM sous la forme libre et sous la forme dérivée triméthylsilylé (TMS), nous a permis de déterminer le comportement de chaque substance dans les différentes conditions chromatographiques.

L'application des plans d'expériences (criblage et surfaces de réponses) dans l'optimisation de la séparation par CPG-SM de l'éphédrine et de ses dérivés, des β 2-agonistes ainsi que l'optimisation de la réaction de dérivatisation des stéroïdes anabolisants, nous a permis de définir les facteurs les plus influents et de prévoir à partir des modèles mathématiques déduits, l'optimum de chaque facteur.

Une optimisation multicritères a été ensuite effectuée en appliquant une fonction de désirabilité et a permis de déterminer l'optimum de chaque facteur pour la séparation simultanée de chaque groupe de substances stimulantes ainsi que l'optimum de la réaction de dérivatisation qui correspond à une température de 85 °C et un temps de réaction de 24 minutes.

Le temps d'analyse des différentes méthodes de dosage par CPG-SM optimisées a été raccourci. Ces méthodes permettent de doser simultanément et de façon spécifique les différents groupes de substances (anabolisants et stimulants).

Les rendements obtenus des extractions sont satisfaisants.

Les résultats de l'étude de la validation des méthodes de dosage par CPG-SM appliquée pour les différents groupes de substances montrent que ces méthodes sont fiables et reproductibles.

Discipline / CHIMIE ANALYTIQUE

Mots Clés

Stéroïdes anabolisants, Stimulants, CPG-SM, Stabilité thermique, Optimisation, Plan d'expériences, Plan de criblage, Plan de surfaces de réponses, Validation

Directeur de Thèse : Pr. Jacques KALOUSTIAN

Laboratoire de Chimie Analytique / Faculté de Pharmacie Marseille, France

Auteur : Youcef HADEF

Laboratoire de Chimie Analytique / Faculté de Médecine,
Université BADJI Mokhtar / Annaba, Algérie