

Détection de surcharge en créatine par analyse RMN ^1H des urines

Creatine supplementation detected by ^1H NMR urinalysis

**Bernard CARTIGNY⁽¹⁾, Nathalie AZAROUAL⁽²⁾, Laurence MILLE-HAMARD⁽³⁾,
Michel IMBENOTTE⁽⁴⁾, Pascal KINTZ⁽⁵⁾, Gaston VERMEERSCH⁽²⁾,
Michel LHERMITTE^(1,4)**

(1) Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette - 59045 LILLE Cedex

(2) Laboratoire d'Application RMN

(3) Laboratoire d'Études de la Motricité Humaine

(4) Laboratoire de Toxicologie, Université de Lille 2 - 59000 LILLE

(5) Institut de Médecine Légale - 67000 STRASBOURG - FRANCE

*Auteur à qui adresser la correspondance : Michel LHERMITTE, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, avenue du Pr Leclercq - 59037 LILLE Cedex
Tél : 33 3 20 44 49 63 - e-mail : mlhermitte@chru-lille.fr

(Reçu le 12 juin 2000 ; accepté le 27 juillet 2000)

RÉSUMÉ

La créatine est un composé important du métabolisme énergétique musculaire. En effet, elle se transforme de façon réversible en phosphocréatine qui permet de maintenir la concentration en ATP. Elle se retrouve dans le sang et son excrétion urinaire physiologique est faible. Une corrélation existe entre charge en créatine et performances sportives, surtout pour des efforts intenses et intermittents. Son excrétion urinaire est alors majorée. L'objectif de ce travail est de tester l'applicabilité de la spectroscopie RMN proton pour la mise en évidence et la quantification de surcharges en créatine. La limite de détection de la créatine dans l'urine est de 10 $\mu\text{mol/L}$ (1,31 mg/L) et la durée de l'analyse de 10 min. Après des suppléments relativement faibles : 2,1 g en une prise, une étude cinétique a permis la mise en évidence d'une élimination précoce, entre 1 et 6 heures après l'ingestion, avec un maximum situé vers 20 mmol/L (2,62 g/L). Les concentrations urinaires en créatinine ont aussi été déterminées par RMN ^1H .

MOTS-CLÉS

Créatine, surcharge, urine, RMN ^1H , créatinine.

SUMMARY

Creatine is a main compound for muscular energetic metabolism leading to phosphocreatine, maintaining high ATP levels. Creatine is found in blood and excreted in small quantities in urine. Creatine supplementation and athletic performances are correlated, particularly for intensive and intermittent efforts. Its urinary excretion is then increased and an original method, based upon ^1H NMR spectroscopy is presented for its identification and dynamic quantitation. Detection limit of creatine in urine is 10 $\mu\text{mol/L}$ (1.31 mg/L) and analysis time 10 min. After a single oral supplementation of 2.1 g, a kinetical investigation reveals a maximum concentration at 20 mmol/L (2.62 g/L), observed between 1 and 6 hours after ingestion. Determinations of creatinine levels are also presented, and applicability of ^1H NMR is discussed.

KEY-WORDS

Creatine, supplementation, urine, ^1H NMR, creatinine.

Introduction

La créatine ou N-(aminoiminométhyl)-N-méthyl-glycocolle, de n° C.A.S. (57-00-1) est un composé d'importance primordiale pour maintenir des réserves énergétiques musculaires. Par l'intermédiaire d'une créatine kinase (E.C. 2.7.3.2.), elle donne de la créatine phosphate. Cette réaction est réversible et, chez l'homme, environ 95 % de la créatine totale est localisée dans le muscle squelettique où elle existe sous deux formes : libre et phosphorylée. Cette dernière fait partie du groupe des phosphagènes, composés réservoirs de phosphate à haute énergie. Dans les conditions physiologiques, les phosphagènes permettent au muscle de maintenir ses concentrations en ATP, lorsque celui-ci est utilisé pour la contraction musculaire. La phosphocréatine facilite également la translocation de l'ATP à l'intérieur de la cellule musculaire (1).

Les concentrations et l'importance énergétique de la créatine et de la phosphocréatine dépendent du type de fibre musculaire. Pour des activités sportives demandant des durées de contraction musculaire relativement courtes, les fibres de type II sont les plus sollicitées. Leur principale source d'énergie initiale est alors la phosphocréatine. Le renouvellement quotidien de la phosphocréatine à partir de la créatine chez un homme de 70 kg a été estimé à environ 2 g (2).

Dans le métabolisme humain, la créatine provient de l'acide guanidino-acétique (ou glycoamine) qui est méthylé grâce à une N-méthyl transférase (E.C. 2.1.1.2.). Le guanidino-acétate vient lui-même de la conjugaison de l'arginine et du glycoamine grâce à une amidino transférase (E.C. 2.1.4.1.). La créatine et la phosphocréatine peuvent se cycliser de façon non enzymatique pour former la créatinine, ou 2-amino-1,5-dihydro-1-méthyl-4-H-imidazol-4-one [C.A.S. n° (60-27-5)]. On retrouve la créatine, non seulement dans le muscle mais aussi dans le sang, et une faible quantité de créatine est constamment excrétée dans les urines. D'après Yasuda (3), cette excrétion urinaire atteint $0,19 \pm 0,003$ mmol/L, soit 24,6 mg/L en moyenne, alors que l'excrétion urinaire de créatinine sur 24 heures est importante et proportionnelle à la masse musculaire.

Différents facteurs peuvent influencer sur la quantité de créatine disponible. Dans certaines pathologies, comme la dystrophie musculaire progressive, de grandes quantités de créatine sont éliminées par voie urinaire. Une baisse de la concentration en créatine provoque une fatigue musculaire et une diminution de la vitesse maximale de raccourcissement des fibres (4, 5).

Inversement, il est possible d'augmenter le stock de créatine musculaire par supplémentation alimentaire (viande, poisson), ou directe en créatine (6). Un effet positif de charge en créatine sur les performances sportives a été observé par différents auteurs (7, 8), surtout dans le cas d'efforts intenses et intermittents retrouvés dans des sports tels que le tennis, l'aviron, le football. Des sportifs peuvent consommer entre 10 et 20 g de créatine par jour (9). Cette supplémentation entraîne une augmentation significative de l'élimination urinaire en créatine. Maganaris et Maughan (8) ont observé qu'après administration de 10 g de créatine par jour pendant 5 jours, chaque volontaire en excréta 18 g par voie urinaire. Burke et coll. (10) ont étudié la cinétique d'élimination urinaire de la créatine et de la créatinine chez deux athlètes ayant ingéré 0,1 g/kg de masse corporelle. Cette étude cinétique leur a permis de montrer la précocité d'élimination, car le pic de concentration en créatine est atteint après 2 à 3 heures, avec retour aux valeurs de base vers 13 à 14 heures.

La créatine peut être dosée par des méthodes de chromatographie liquide haute performance CLHP (11, 12), mais le développement de la détection par spectrométrie de masse (SM) a permis d'en améliorer la sensibilité et la spécificité. Yasuda et coll. (3) ont déterminé la créatine, mais aussi la créatinine et la glycoamine en CLHP/SM en mode ionisation chimique. Plus récemment, Burke et coll. (10) ont séparé et mesuré la créatine et la créatinine par électrophorèse capillaire et détection UV.

La spectroscopie RMN ¹H offre pour la détection de ce type de composés de nombreux avantages. En particulier, elle n'est pas destructrice : les échantillons urinaires sont analysés tels quels (hormis l'ajustement du pH de l'échantillon). Elle est rapide puisqu'en général il faut dix à quinze minutes pour avoir un rapport signal sur bruit suffisant (13, 14). Chinayon et coll. (15) l'ont d'ailleurs appliquée pour la quantification de la créatinine urinaire. L'objectif de ce travail est donc de vérifier l'applicabilité de la RMN ¹H pour la mise en évidence et la quantification de la créatine en cas de surcharge.

Matériel et méthodes

Instruments et réactifs

Les analyses en RMN ¹H ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DPX 300 MHz. Le dosage colorimétrique de la créatinine a été effectué sur un automate Olympus AU 600 (Olympus, Rungis, France) en utilisant la réaction de Jaffé.

L'acide 3-triméthylsilyl 2, 2', 3, 3'- tétradeutéropropionique (TSP-d₄) est fourni par Eurisotop (Saint Aubin, France). Les standards de créatine, créatinine, sarcosine, glycofolle et acide guanidino acétique proviennent de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Méthodes

500 µL d'urine ajustés à pH 5,00 sont introduits sans aucun autre traitement dans un tube RMN de 5 mm de diamètre. Dans ce tube est ensuite inséré un capillaire contenant une solution titrée de TSP-d₄ dans D₂O. Le TSP-d₄ sert de référence pour les déplacements chimiques ($\delta = 0,00$ ppm) et permet la quantification des composés urinaires par intégration de l'aire des pics. Une séquence de présaturation est appliquée pour diminuer le signal de l'eau. En général, 128 accumulations ont été réalisées sur une largeur spectrale de 3200 Hz. Avant transformation de Fourier, une fonction exponentielle est appliquée, correspondant à un élargissement de 0,3 Hz. L'utilisation du logiciel 1D WIN NMR de Bruker a servi au traitement des données.

La quantification de la créatine et de la créatinine est réalisée uniquement sur les signaux correspondant aux groupements méthyle. Ceux attribuables aux groupements méthylène sont moins adaptés pour l'intégration car ils ne correspondent qu'à deux protons, et étant proches du pic de l'eau, ils peuvent être affectés par la présaturation utilisée pour diminuer le signal de l'eau. Des urines témoins ont été supplémentées par des concentrations de créatine et de créatinine ajoutées à raison de 1, 2, 4, 8, 10 et 20 mmol/L

Créatine

La créatine n'étant pas autorisée à la vente en France, le produit a été acheté aux Etats-Unis. Il est constitué de gélules dosées à 700 mg de créatine monohydratée et commercialisées par les Laboratoires Twin (New York).

Supplémentation et prélèvements biologiques

Dans le cadre de l'étude, les échantillons d'urine ont été recueillis chez trois volontaires sains ayant ingéré 2,1 g de créatine en une prise. Les recueils urinaires ont été réalisés à 1, 3, 6, 12, 24, 36 et 48 heures après ingestion. Les différents prélèvements urinaires ont été ajustés à pH 5,00 et congelés jusqu'à l'analyse.

Résultats et Discussion

La créatine analysée par RMN ¹H présente deux singulets caractéristiques, l'un à 3,03 ppm, correspondant au groupement méthyle, et l'autre résonnant à 3,92 ppm et attribué au groupement méthylène.

La créatinine, toujours présente en concentration relativement importante dans l'urine, a une structure cyclique proche de la créatine. En RMN ¹H, elle présente aussi deux singulets à 3,04 et 4,17 ppm, correspondant respectivement à ses groupements méthyle et méthylène. Par conséquent, les signaux des deux méthyle de la créatine et de la créatinine sont mal séparés à pH 6,00 ou à des valeurs de pH supérieures.

Contrairement aux signaux de la créatine, de déplacements chimiques indépendants du pH, ceux de la créatinine varient. Après essais de différentes valeurs de pH, l'ajustement des urines à pH 5,00 avant analyse permet de bien distinguer le signal du groupement méthyle de la créatinine (figure 1). On peut également observer des composés endogènes de l'urine comme le citrate, l'alanine ou l'acide lactique.

L'analyse d'urines normales surchargées en créatine et créatinine montre que la linéarité des courbes d'étalonnage pour chaque composé est bien vérifiée, avec une forte significativité (respectivement $r^2 = 0,9997$ et $0,9986$).

La quantification portant sur le groupement méthyle, la limite de détection a pu être estimée à 10 µmol/L (1,31 mg/L) et la limite de quantification à 30 µmol/L (3,93 mg/L).

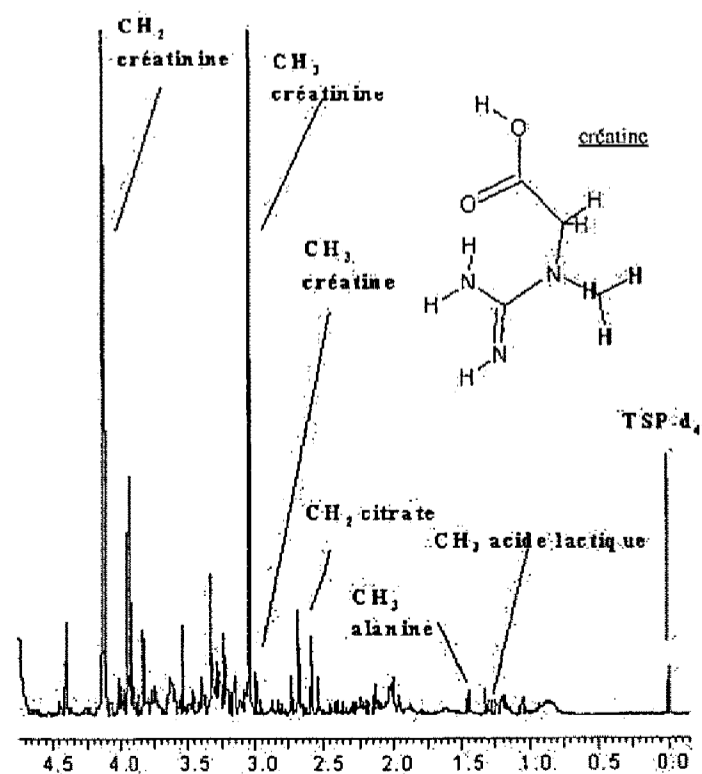


Figure 1 : Spectre RMN ¹H 300MHz d'un échantillon d'urine à T₀ ajusté à pH 5.

L'analyse des urines après administration orale de créatine montre qu'une partie importante de la créatine est rapidement excrétée. La figure 2 montre le spectre RMN ¹H à T₀ + 6 heures et la figure 3 à T₀ + 36 heures des urines de l'un des volontaires. La créatine, présente sous forme d'un petit signal, augmente fortement jusqu'à 19 mmol/L à T₀ + 6 heures, pour revenir à une valeur proche de la valeur initiale à T₀ + 36 heures.

Pour un sujet déterminé, le regroupement des concentrations en créatine et en créatinine, mesurée à la fois par la méthode de Jaffé et par spectroscopie RMN ¹H, est présenté Figure 4. La créatine présente bien une évolution continue, avec un maximum à 19 mmol/L, observé 6 heures après l'ingestion, puis un retour aux valeurs de base vers 0,2 mmol/L. Il est intéressant d'observer un bon parallélisme entre les valeurs de créatinine obtenues suivant les deux méthodes, les résultats RMN ¹H étant légèrement supérieurs à ceux de la technique de Jaffé.

Les concentrations urinaires en créatine mesurées après administration orale aux trois volontaires sont regroupées dans la figure 5. On peut observer :

(i) qu'il existe bien un pic de concentration, avec retour à la normale vers 24 heures, (ii) que la concentration maximale se situe vers 20 mmol/L, (iii) que l'excrétion de créatine est relativement rapide, car ce pic peut varier entre 1 et 6 heures selon les sujets.

La précocité d'élimination signalée par Burke et coll. (10) est bien retrouvée. Si les valeurs de base sont sem-

blables à celles publiées par Yasuda et coll. (3), soit 0,19 ± 0,03 mmol/L, il n'en est pas de même pour les valeurs maximales reportées dans d'autres études. Dans ces dernières, les suppléments étaient plus importantes et variaient de 0,1 à 0,25 g/kg de masse corporelle.

La spectroscopie RMN ¹H permet donc la détection de créatine et de son métabolite, la créatinine, dont la concentration n'augmente pas après surcharge.

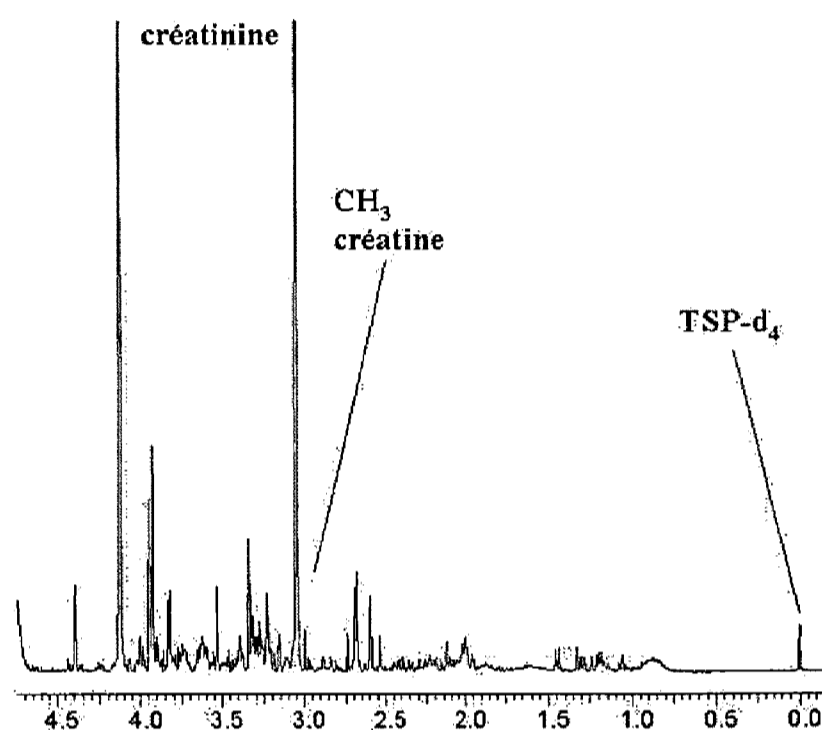


Figure 3 : Spectre RMN ¹H 300MHz d'un échantillon d'urine prélevé à T₀ + 36heures ajusté à pH 5.

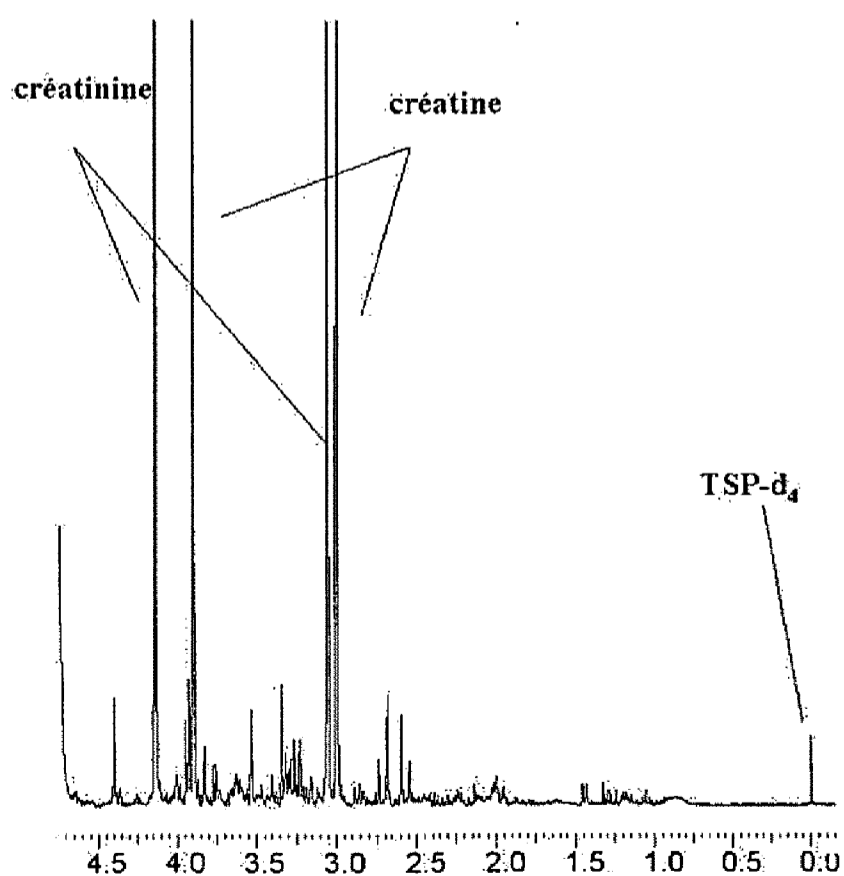


Figure 2 : Spectre RMN ¹H 300MHz d'un échantillon d'urine prélevé à T₀ + 6heures ajusté à pH 5.

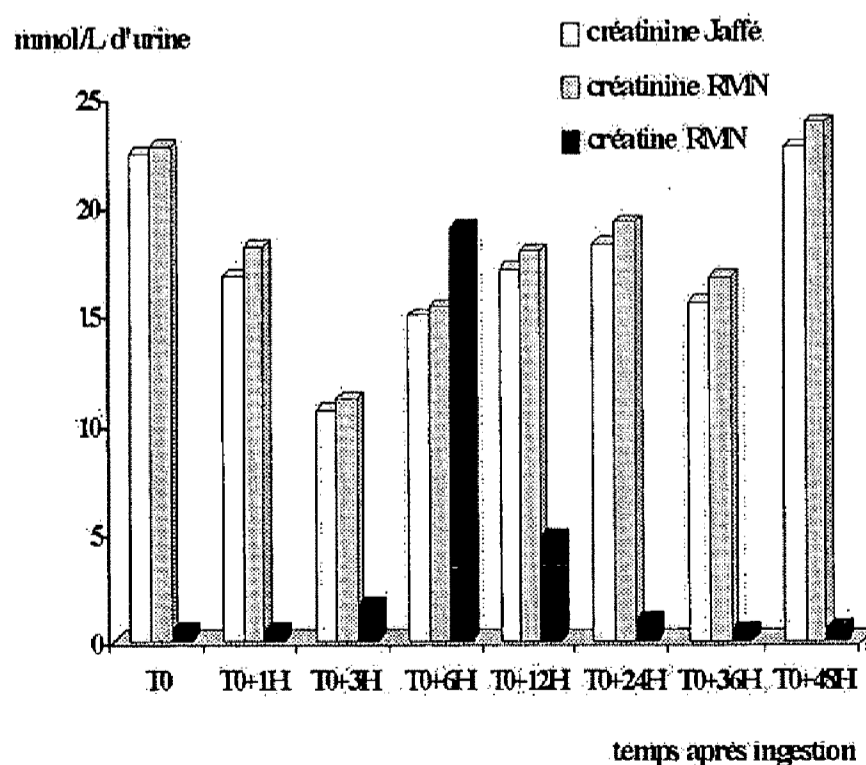


Figure 4 : Évolution en fonction du temps des concentrations en créatinine, mesurées par la méthode de Jaffé et par RMN ¹H 300MHz et des concentrations en créatine déterminées par RMN ¹H 300MHz.

Élimination urinaire
(mmol créatine/L)

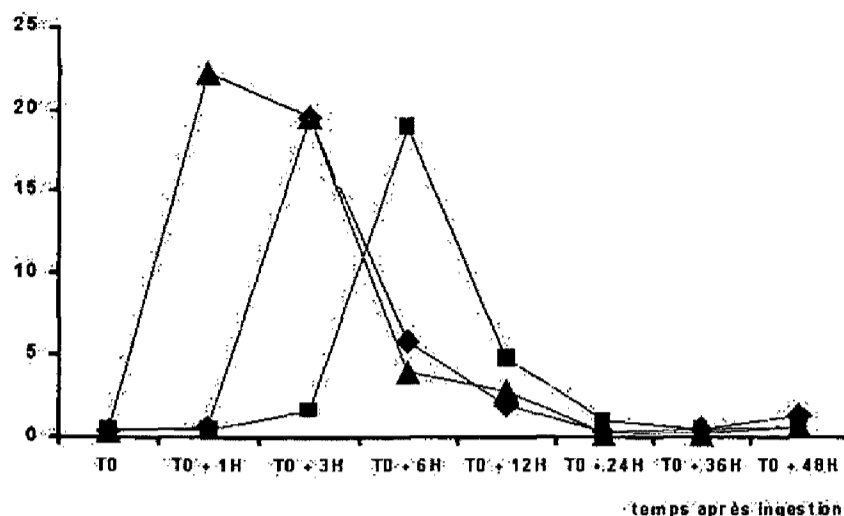


Figure 5 : Cinétique d'excrétion urinaire de créatine après charge orale chez trois sujets sains.

Conclusions

La créatine n'est pas un composé chimique couramment analysé en routine hospitalière. Ce travail montre que la spectroscopie RMN ^1H est applicable à sa détermination et à sa quantification. La méthode ne nécessite aucun protocole d'extraction ou de dérivation. Elle présente, dans le cas de ce composé, une limite de quantification aux environs de $30 \mu\text{mol/L}$ ($3,93 \text{ mg/L}$). Après surcharge, son élimination est rapide et demande donc des délais de prélèvement relativement courts pour atteindre une détection fiable.

Les caractéristiques spectrales RMN ^1H du singulet de la créatine permettent d'assurer de façon spécifique le suivi de ce composé, même en cas d'ingestion en association avec d'autres composés. De plus, elle peut permettre de suivre les évolutions de la créatinine, métabolite de la créatine. La spectroscopie RMN ^1H peut trouver sa place dans le cadre de la détection de cette substance interdite, la créatine, pouvant être prise par certains sportifs, seule ou en association avec d'autres composés interdits.

Références

- Bessman S.P., Geiger P.J., Transport of energy in muscle. *Science* 1981 ; 24 : 448-52.
- Balsom P.D., Söderlund K., Ekblom B., Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med.* 1994 ; 18 : 268-80.
- Yasuda M., Sugahara K., Zhang J., Ageta T., Nakayama K., Shuin T., Kodama H., Simultaneous determination of creatinine, creatine, and guanidinoacetic acid in human serum and urine using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997 ; 253 : 231-5.
- Hultman E., Greenhaff P.L., Ren J.-M., Söderlund K., Energy metabolism and fatigue during intense muscle contraction. *Biochem. Soc. Trans.* 1991 ; 19 : 347-53.
- Westerblad H., Lännergren J., Reduced maximal shortening velocity in the absence of phosphocreatine observed in intact fibres of *Xenopus* skeletal muscle. *J. Physiol.* 1995 ; 482 : 383-90.
- Harris R.C., Söderlund K., Hultman E., Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin. Sci.* 1992 ; 83 : 367-74.
- Rossiter H.B., Cannell E.R., Jakeman P.M. The effect of oral creatine supplementation on the 1000-m performance of competitive rowers. *J. Sports Sci.* 1996 ; 14 : 175-9.
- Maganaris C.N., Maughan R.J., Creatine supplementation enhances maximum isometric force and endurance capacity in resistance trained men. *Acta Physiol. Scand.* 1998 ; 163 : 279-87.
- Mujika I., Padilla S., Ibanez J., Izquierdo M., Gorostiaga E., Creatine supplementation and sprint performance in soccer players. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000 ; 32 : 518-25.
- Burke D.G., MacLean P.G., Walker R.A., Dewar P.J., Smith Palmer T., Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999 ; 732 : 479-85.
- Dunnett M., Harris R.C., Orme C.E., Reverse-phase ion-pairing high-performance liquid chromatography of phosphocreatine, creatine and creatinine in equine muscle. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1991 ; 51 : 137-41.
- Yang Y.D., Simultaneous determination of creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 1998 ; 12 : 47-9.
- Maschke S., Wahl A., Azaroual N., Crunelle V., Imbenotte M., Foulard M., Vermeersch G., Lhermitte M. ^1H NMR urinalysis for detecting fish-odour syndrome. *Clin. Chim. Acta* 1997 ; 263 : 139-46.
- Wahl A., Azaroual N., Imbenotte M., Mathieu D., Forzy G., Vermeersch G., Lhermitte M. Poisoning with methanol and ethylene glycol : ^1H NMR spectroscopy as an effective clinical tool for diagnosis and quantification. *Toxicology* 1998 ; 128 : 73-81.
- Chinayon S., Jinsart W., Pansin P., Eiam Ong S., Sitprija S., Sitprija V., Identification of urinary metabolites and quantitative measurement of creatinine by a proton nuclear magnetic resonance spectrometry. *J. Med. Assoc. Thai.* 1990 ; 73 : 508-13.