

## Hormones stéroïdes et dopage

B. Le Bizec\*, F. Bryand\*\*, F. André\*

### POINTS FORTS

Le Comité international olympique (CIO) pilote un réseau de laboratoires et leur donne un agrément en fonction des résultats qu'ils obtiennent aux analyses circulaires organisées à intervalles réguliers.

Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse permet d'allier sensibilité (détection d'ultra-traces) et spécificité (signal identifié sans ambiguïté).

Les difficultés actuelles des laboratoires se situent davantage au niveau de la différenciation entre les substances synthétiques et les substances hormonales naturelles, les deux exemples les plus évidents étant la testostérone et la 19-nortestostérone.

Les modifications chimiques apportées à partir de la testostérone ont eu pour objectif d'augmenter l'index thérapeutique, c'est-à-dire le rapport entre

pouvoirs anabolisant et androgénique.

Pour faire face à la demande thérapeutique en hormones sexuelles, on dispose a priori de trois possibilités : l'extraction, l'hémisynthèse et la synthèse totale.

Les premiers stéroïdes anabolisants synthétiques ont été la méthyltestostérone, la mestanolone et le méthandriol, tous préparés par Ruzicka et al., en 1935.

La matrice biologique la plus utilisée pour mener à bien le contrôle de l'usage illégal des stéroïdes anabolisants demeure l'urine, même si d'autres matrices telles que les phanères sont aujourd'hui suggérées en complément.

Les contrôles sur le territoire français sont réalisés sous la tutelle du ministère de la Jeunesse et des Sports, avec le soutien des fédérations ; ils

sont pratiqués aussi bien pendant les compétitions que pendant l'entraînement.

L'échantillon urinaire doit suivre, avant toute mesure par spectrométrie de masse, des étapes d'extraction des métabolites de l'urine, l'hydrolyse des conjugués par une enzyme adaptée et enfin, une ou des étapes de purification sur des colonnes SPE.

Pour cela, chaque série d'échantillons comporte, généralement, des urines supplémentées, des échantillons blancs, un standard, et la série d'échantillons à analyser.

Un certain nombre de précautions sont prises pour limiter les risques de faux négatifs (ne pas trouver un métabolite alors qu'il est présent) et interdire les faux positifs (conclure qu'un métabolite est présent alors qu'il ne l'est pas).

Dès l'origine, pour survivre, l'homme a dû utiliser sa force face à l'animal ou à ses rivaux. Petit à petit, ces attitudes de survie ont évolué vers des pratiques sportives, des Olympiades grecques aux jeux Olympiques (JO) que nous connaissons aujourd'hui. Pour ces compétiteurs descendants de traditions guerrières,

seules la victoire et la performance importaient, si bien que, longtemps, les questions les plus basiques, sans parler des plus métaphysiques que nous nous posons aujourd'hui sur le dopage, n'étaient même pas évoquées. Alors que l'histoire des stéroïdes anabolisants commence juste avant la Seconde Guerre mondiale, leur utilisation

dans le sport date du début des années 50. L'interdiction des anabolisants n'est intervenue qu'en 1974 avec une première campagne de contrôle lors des JO de Montréal en 1976, alors que, pour la testostérone, les premiers contrôles ont été opérés en 1984 aux JO de Los Angeles. Ces pratiques utilisant les stéroïdes comme

\* Laberca, école nationale vétérinaire, Nantes.

\*\* Football club de Nantes-Atlantique, Centre José-Arribas, La Chapelle-sur-Erdre.

stimulants de croissance musculaire ne se sont pas limitées aux sportifs. En effet, les courses de chevaux et les animaux de rente sont également touchés par ces procédés. À de rares exceptions près, les mêmes stéroïdes sont utilisés. Dans les trois cas de figure, le contrôle de leur utilisation illégale est organisé autour d'un réseau de laboratoires. Dans le cadre sportif, le Comité international olympique (CIO) pilote ce réseau et donne un agrément à chacune des structures analytiques en fonction des résultats qu'elle obtient aux analyses circulaires organisées à intervalles réguliers. Les principales méthodes utilisées sont fondées sur la recherche de ces substances illégales dans les urines, et accessoirement dans le sang ou au niveau capillaire, des principaux métabolites de stéroïdes anabolisants par spectrométrie de masse (SDM). Cette technique, généralement couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou encore à la chromatographie liquide haute performance (CLHP), allie sensibilité (les concentrations détectées sont inférieures au ng/ml d'urine) et spécificité, les analytes sont identifiés sans ambiguïté. Ces deux propriétés permettent respectivement de limiter au maximum le risque de faux négatifs (tous les fraudeurs peuvent être confondus) et de faux positifs (aucun innocent n'est mis en cause). Les difficultés actuelles des laboratoires se situent davantage au niveau de la différenciation entre les substances synthétiques et les substances hormonales naturelles, les deux exemples les plus évidents étant la testostérone et la 19-nortestostérone. Deux voies analytiques sont toujours d'actualité. La première, qui est souvent sujette à contestation, est l'approche strictement quantitative ; il s'agit alors de la mesure brute de la concentration des métabolites, ou de la détermination d'un rapport de concentration entre métabolites. La seconde approche, beaucoup plus récente, consiste en la mesure de la composition isotopique en  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  des métabolites de ces stéroïdes naturels, paramètre qui est foncièrement

différent selon que la molécule est endogène ou exogène. Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI) semble, à l'heure actuelle, la solution idéale pour mettre en évidence ce type de pratique dopante. Il existe, malgré la sophistication de cette technique analytique, des parades telles que l'injection de testostérone enrichie en  $^{13}\text{C}$  pour masquer une prise exogène, ou encore l'injection de gonadotrophine chorionique (hCG), hormone qui stimule le testicule à sécréter de la testostérone, ce qui a pour conséquence de rendre transparente, en termes de rapport isotopique, cette fraude.

Nous rappellerons dans cet article quelles sont les principaux stéroïdes anabolisants potentiellement utilisés aujourd'hui, en revenant sur leur structure et leur synthèse chimique. Nous poursuivrons par leur devenir dans l'organisme, en essayant de démontrer que la connaissance de leur métabolisme est un gage d'efficacité des contrôles antidopage. Nous envisagerons enfin l'organisation du contrôle, du prélèvement de l'échantillon aux méthodes analytiques mises en œuvre.

## Stéroides anabolisants : structures et synthèse

### Structures

Cette classe de substances comprend des composés chimiques qui sont apparentés de par leur structure ou leur activité à l'hormone mâle, la testostérone. Les modifications chimiques apportées à partir de la testostérone ont eu pour objectif d'augmenter l'index thérapeutique, c'est-à-dire le rapport entre pouvoirs anabolisant et androgénique. Alors que, par définition, il est de 1 pour la testostérone, il est de 6 pour la nandrolone phénylpropionate et de 20 pour le stanozolol. Un grand nombre de stéroïdes anabolisants de synthèse dérivent de la testostérone par alkylation en position  $17\alpha$  : la  $17\alpha$ -méthyltestostérone, le méthandriol ( $17\alpha$ -

méthyl-5-androstène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol), la boldénone (17 $\beta$ -hydroxy-7 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -diméthyl-androst-4-en-3-one) ou la mestanolone (17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-3-androstanone). Cette réaction permet d'augmenter l'activité orale du dérivé (figure 1, p. 55). Une autre famille de stéroïdes anabolisants très efficace dérive de la testostérone par réduction de la liaison en C-1,2 : c'est le cas de la boldénone (17 $\beta$ -hydroxy-androsta-1,4-dien-3-one), de ses esters et du dianabol (17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-androsta-1,4-dien-3-one). D'autres composés sont obtenus par halogénéation en position C-4 et C-9 : c'est l'exemple de la 4-chlorotestostérone, de la déhydrochlorométhyltestostérone (déshydrogénation en C-1,2, 17 $\alpha$ -méthylation) ou de la fluoxymestérone (9 $\alpha$ -fluoro-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-androst-4-en-3-one). La modification du cycle A de la testostérone a été mise à profit pour aboutir à de puissants anabolisants : le stanozolol dont la structure comporte un cycle pyrazolique accolé au cycle A (17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-androstano[3,2-c]pyrazole), l'oxandrolone (substitution du C-2 par un atome d'oxygène) ou l'oxymétholone (C-2 substitué par un hydroxyméthylène). Les 19-norstéroïdes sont différents de la testostérone par l'absence d'un méthyle en C-19. Les plus usuels sont la 19-nortestostérone (nandrolone), ses esters (décanoate, phénylpropionate, undécanoate...), la noréthandrolone (17 $\alpha$ -éthyl-19-nortestostérone) et la noréthandrone (17 $\alpha$ -méthyl-19-nortestostérone). Enfin, la déshydrogénation sur plusieurs cycles et l'absence de méthyle en C-19 conduisent aux 19-norstéroïdes triéniques, dont la trenbolone, son ester acétate, et la 17 $\alpha$ -allyltrenbolone. Une liste non exhaustive des stéroïdes anabolisants ayant figuré ou figurant sur la liste des substances et procédés dopants est donnée dans le [tableau I](#).

### Synthèse

Pour faire face à la demande thérapeutique en hormones sexuelles, on dispose a priori de trois possibilités : l'extraction, l'hémi-

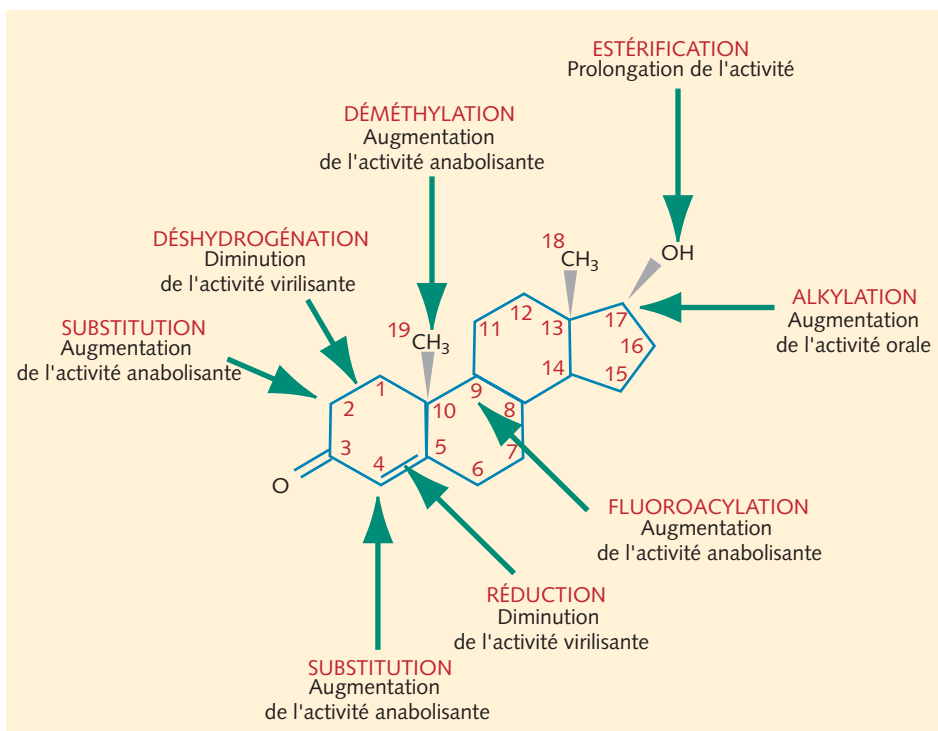


Figure 1. Positions des fonctions sur le squelette androstane sur lesquelles une action chimique provoque une modification de l'activité anabolisante ou virilisante.

Tableau I. Liste non exhaustive de stéroïdes anabolisants ayant figuré ou figurant sur la liste des substances et procédés dopants interdits par le ministère de la Jeunesse et des Sports.

Androisoxazole	Mésabolone	Oxymestérone
Androstanolone	Mestanolone	Oxymétholone
Bolandiol	Mestérolone	Penmestérol
Bolastérone	Métandiénone	Propétandrol
Boldénone	Métérolone	Quinbolone
Bolénol	Méthandriol	Silandrone
Bolmantalate	Méthylandrostandiol	Stanozolol
Chlordrolone	Méthyltestostérone	Clostébol
Cloxostestostérone	Métribolone	Stenbolone
Déhydrochlorméthyltestostérone	Mibolérone	Testolactone
Drostanolone	Nandrolone	Testostérone
Éthylestrénol	Norbolénone	Tibolone
Fluoxymestérone	Norclostébol	Tiomestérone
Formébolone	Noréthandrolone	Trenbolone
Furazabol	Oxabolone	Trestolone
Mébolazine	Oxandrolone	Zéranol

synthèse et la synthèse totale. Les hormones stéroïdes se trouvent dans la plupart des organismes vivants d'où elles peuvent être extraites et purifiées (la testostérone

dans les testicules de taureau par Laquer en 1930, l'androstérone dans l'urine d'homme par Butenandt en 1931). Néanmoins, cette approche possède deux limitations rédhibi-

toires, dans notre cas la restriction de la production aux stéroïdes naturels mais également le non-réalisme du procédé à l'échelle industrielle, puisque les concentrations hormonales dans les glandes, tissus ou autres liquides biologiques, sont extrêmement faibles. La seconde approche consiste à tirer profit de molécules dont la structure est proche sans être identique à celle devant être synthétisée et qui peuvent être apportées en grande quantité par la nature. Ces molécules sont, par exemple, le cholestérol et les sels biliaires (règne animal) ou encore le stigmastérol, le sitostérol ou les sapogénines (règne végétal). Les réactions chimiques conduisant aux stéroïdes désirés doivent conserver la stéréochimie originelle du squelette. La dernière approche consiste en la synthèse totale de la structure recherchée. L'avantage est évident pour les composés type 19-nor ou encore triénique (trenbolone-like) qui sont difficiles à obtenir par hémisynthèse, mais la difficulté principale réside dans le contrôle de la stéréochimie des différents intermédiaires de synthèse. Les premiers stéroïdes anabolisants synthétiques ont été la méthyltestostérone, la mestanolone et le méthandriol, tous préparés par Ruzicka et al. en 1935. Ensuite vinrent la nandrolone (Birch, 1950), la méthandiénone (Vischer et al., 1955), la boldénone (Meystre et al., 1956), la chlorotestostérone (Camerino et al., Ringold et al., 1956), la fluoxymestérone (Herr et al., 1956), la noréthandrolone (Colton et al., 1957), le stanozolol (Clinton et al., 1959), la bolastérone (Campbell et Babcock, 1959), la 4-chlorodéhydro-méthyltestostérone (Schubert et al., 1960) et la trenbolone (Velluz et al., 1963).

## Les métabolites marqueurs

La matrice biologique la plus utilisée pour mener à bien le contrôle de l'usage illégal des stéroïdes anabolisants demeure l'urine, même si d'autres matrices telles que les phanères sont aujourd'hui suggérées en complément. Alors que dans les matrices

**Tableau II. Métabolites marqueurs recherchés pour quelques stéroïdes anabolisants.**

Stéroïde anabolisant	Molécule(s) marqueur(s)	Conjugaison
Boldénone	Boldénone	Oui
	5β-androst-1-ène-17β-ol-3-one	Oui
Clostébol	4-chloro-androst-4-ène-3α-ol-17-one	Oui
Mestanolone	17α-méthyl-5α-androstane-3α,17β-diol	Oui
Mestérolone	1α-méthyl-5α-androstan-3α-ol-17-one	Oui
Métandiénone	17-épimétandiénone	Libre
	6β-hydroxyméthandiénone	Libre
	17α-méthyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Oui
	17β-méthyl-5β-androst-1-ène-3α,17α-diol	Oui
Méthandriol	17α-méthyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Oui
Méthyltestostérone	17α-méthyl-5α-androstane-3α,17β-diol	Oui
	17α-méthyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Oui
	17α-méthyl-5β-androstane-3α,17β-diol	Oui
Nandrolone	5α-estran-3α-ol-17-one	Oui
	5β-estran-3α-ol-17-one	Oui
Noréthandrolone	17α-éthyl-5β-estrane-3α,17β-diol	Oui
Oxandrolone	Oxandrolone	Libre
	Épioxandrolone	Libre
Oxymestérone	Oxymestérone	Oui
Stanozolol	3'-hydroxystanozolol	Oui + libre
	3'-hydroxy-17-épistanozolol	Libre
	4β-hydroxystanozolol	Oui
	16β-hydroxystanozolol	Oui

capillaires la démonstration d'une fraude repose sur l'identification de la molécule telle qu'elle a été administrée (même lorsqu'il s'agit d'esters), dans l'urine, ce sont au contraire les métabolites résultant des transformations hépatiques qui seront retenus comme indicateur d'une administration illégale (**tableau II**). Même si les principales réactions enzymatiques hépatiques sont connues, beaucoup d'énergie a été déployée pour élucider le métabolisme des principaux stéroïdes anabolisants. La connaissance du métabolisme de la testostérone a servi de modèle à l'étude des produits de biotransformation des autres stéroïdes anabolisants de type androgénique. En effet, les enzymes opérant les transformations sur la testostérone sont également efficaces sur d'autres composés stéroïdiens, à condition qu'ils possèdent des groupes similaires et des configurations équivalentes.

## Métabolites de phase I

Les réactions de phase I convertissent les stéroïdes en des composés plus polaires qui seront généralement moins toxiques et plus facilement éliminés par l'organisme.

### ● Métabolisme du cycle A

Les stéroïdes de type 3-céto-4-ène sont sujets à la réduction non réversible de la double liaison C-4,5, qui conduit à deux isomères de configuration 5α et 5β. La quantité relative dans l'urine des isomères 5α- et 5β- dépend de la structure du stéroïde : à titre d'illustration, les 3-céto-androsta-1,4-diène (boldénone et dianabol) ne produisent pas d'isomères 5α-. Des modifications sur le cycle D influencent également fortement l'activité des deux enzymes : alors que pour la testostérone le rapport entre les isomères 5α/5β est de 1:6, celui des équivalents 17-cétoniques est de 1:1. Après réduction de la double liaison en

C-4,5, la cétone en 3 des isomères 5α- est rapidement réduite par une 3α- ou 3β-hydroxystéroïd déshydrogénase. Pour la testostérone, après administration orale ou intramusculaire, l'isomère 3α,5α est principalement produit ; c'est aussi le cas des stéroïdes à fonction alcool de type secondaire en position 17. La réduction de la cétone en position 3 d'un 5β-stéroïde conduit presque complètement à une structure 3α-hydroxy ; la formation d'isomère 3β-hydroxy n'a pas été démontrée. Pour les structures de type 3-céto-androst-1,4-diène, l'hydrogénation de la double liaison C-1,2 a été observée en particulier pour le dianabol. Le phénomène inverse a été remarqué pour certains stéroïdes, en l'occurrence l'obtention d'une structure 1,2-déshydrogénée ; c'est le cas de la fluoxymestérone qui conduit d'abord à une structure 6β-hydroxy, puis en faible quantité à un métabolite 1,2-déhydro. Ce phénomène est assez marginal et ne touche pas, en général, les autres stéroïdes.

### ● Métabolisme du cycle B

L'hydroxylation en position 6β est particulièrement fréquente. Le phénomène devient même marqué lorsque les stéroïdes sont alkylés en position 17α-, voire très prononcé lorsqu'ils possèdent une insaturation en C-1,2 (dianabol) ou un atome de fluor en position 9 (fluoxymestérone).

### ● Métabolisme du cycle C

Les réactions d'hydroxylation sur le cycle C sont beaucoup moins fréquentes. Plusieurs travaux conduits sur le dianabol et le stanozolol ont permis de suggérer une hydroxylation en position 12, sans certitude sur la stéréochimie 12α- ou 12β-.

### ● Métabolisme du cycle D

L'une des voies métaboliques les mieux connues des 17β-hydroxystéroïdes est l'oxydation enzymatique par une 17β-hydroxystéroïd déshydrogénase de leur groupe alcool secondaire en position 17. Les 17-céto métabolites sont quantitativement les composés excrétés en plus grande quantité, cela pour la testostérone, la boldénone, la 4-chlorotesto-

stérolone et la nandrolone. L'excrétion de métabolites  $17\alpha$ -hydroxylés est également observée. Alors que ce phénomène est très marqué dans certaines espèces (ovins, bovins), il est restreint chez l'homme à des structures bien spécifiques telles que la trenbolone. On suppose que cet isomère est obtenu par réduction de la forme oxydée  $17$ -céto par l'intermédiaire d'une probable  $17\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase. Pour la testostérone (T), bien que de la  $17\alpha$ -testostérone soit excrétée, il semblerait qu'elle soit d'origine endogène (origine gonadique), car l'administration de testostérone ne conduit pas à l'augmentation de la concentration urinaire d'épitéstérone (E). C'est pourquoi les méthodes de dépistage d'usage de ce stéroïde s'appuient sur la surveillance du rapport [T]/[E] dans l'urine ; lorsqu'il y a prise de testostérone, [T] augmente, [E] reste globalement constante. Les autres réactions concernant le cycle D sont l'hydroxylation en position 16 ; les isomères sont de nature variable et dépendent de la structure originale du stéroïde.

### Métabolites de phase II

Ces réactions contrôlées enzymatiquement sont des réactions de conjugaison visant à faciliter l'élimination des résidus de l'organisme. Elles se traduisent par le couplage du stéroïde avec un acide sulfurique ou glucuronique. Certains stéroïdes anabolisants sont excrétés non conjugués ; c'est le cas de l'oxandrolone et de ses métabolites, de certains métabolites du dianabol, ou encore de la fluoxymestérone. Les  $3\alpha$ -hydroxy métabolites sont majoritairement conjugués avec l'acide glucuronique, quelle que soit la configuration  $5\alpha$ - ou  $5\beta$ -. Les structures  $3\beta$ -hydroxy sont, quant à elles, plutôt conjuguées avec l'acide sulfurique. Les groupes  $17\beta$ -hydroxy secondaires sont fréquemment glucurono-conjugués, alors que les groupes tertiaires le sont moins du fait de l'encombrement stérique. Des travaux récents ont néanmoins démontré l'existence pour la fluoxymestérone et le dianabol de conjugués glucuronides, même si, quantitativement, ce phénomène est marginal. Même si elle n'est

pas une voie privilégiée, la sulfo-conjugaison des groupes  $17\beta$  est possible. Sur des groupes de type tertiaire, il est observé une dégradation du conjugué dans l'urine qui aboutit à la formation de produits de déshydratation mais également du  $17$ -épimère.

## Contrôle : organisation et méthodes

### Organisation

Les contrôles sur le territoire français sont réalisés sous la tutelle du ministère de la Jeunesse et des Sports (MJS), avec le soutien des fédérations (figure 2). Ils sont pratiqués aussi bien pendant les compétitions que pendant l'entraînement. Sur le site, la fédération doit prévoir des locaux appropriés au bon déroulement du contrôle, dési-

gner un délégué officiel qui assistera le médecin contrôleur et désigner le mode de sélection des individus contrôlés (classement, tirage au sort). Le médecin contrôleur, agréé et assermenté par le MJS, est destinataire d'un ordre de mission renseignant sur les détails techniques du contrôle dont il a la responsabilité, le matériel de prélèvement fourni en France par le laboratoire national de dépistage du dopage de Châtenay-Malabry (LNDD) et les imprimés officiels. L'urine recueillie (2 x 70 ml au minimum) est répartie dans deux flacons notés A (destiné au dépistage) et B (réservé à la contre-expertise, si suspicion il y a) ; ceux-ci sont fermés, introduits dans des enveloppes codées et scellées. Un procès-verbal destiné au MJS, à la fédération nationale du sport concerné, à la Commission nationale de lutte contre le

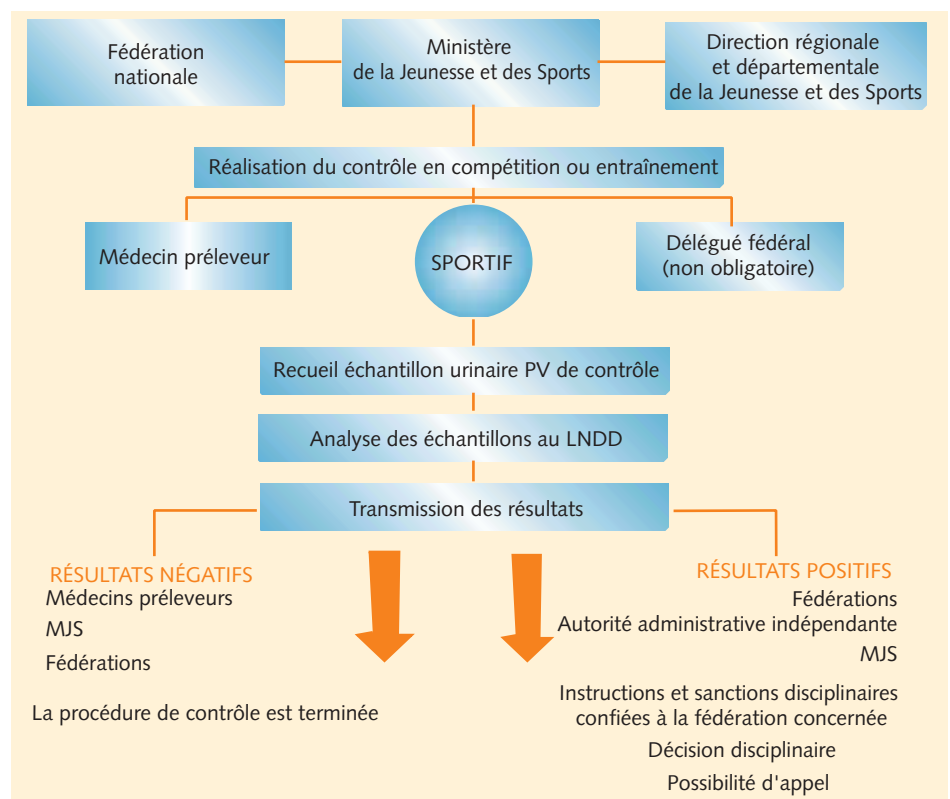


Figure 2. Modalités du contrôle antidopage.

dopage (CNLD) et au sportif sanctionne la séance de prélèvements. Les deux échantillons sont envoyés au LNDD qui réalise le dépistage sur l'échantillon A, transmet les résultats au MJS, au président de la fédération et à la CNLD. Si l'analyse de l'échantillon se révèle négative, la procédure de contrôle antidopage est terminée. En cas de résultats positifs, le LNDD informe la fédération concernée, l'autorité administrative indépendante et le MJS. Une fois le sportif identifié, la procédure disciplinaire est mise en œuvre. L'athlète est en droit de demander une contre-expertise dans un délai de 8 jours à réception de la notification fédérale ; cette analyse est pratiquée sur l'échantillon B. Si la contre-analyse confirme le premier résultat, le sportif est convoqué devant la commission disciplinaire fédérale de lutte contre le dopage. S'il est sanctionné, le sportif peut faire appel devant la même commission ; en cas de confirmation de la décision, la sanction s'applique immédiatement.

## Méthodes

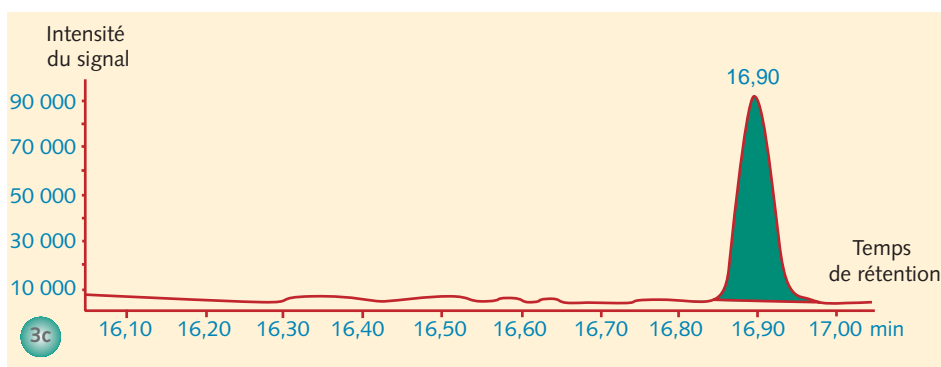
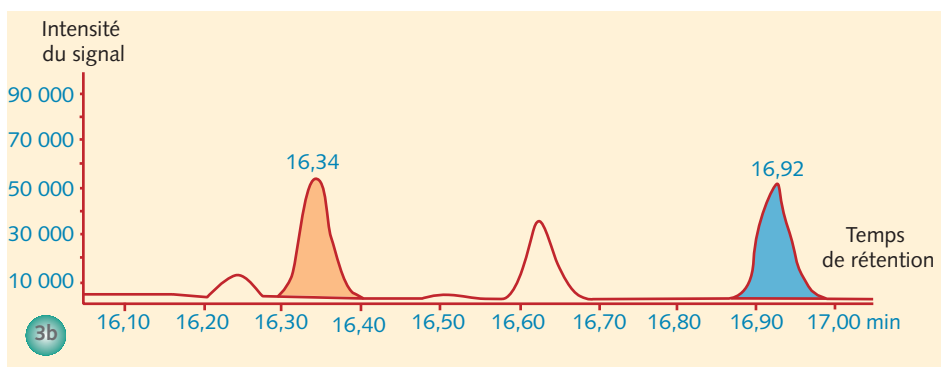
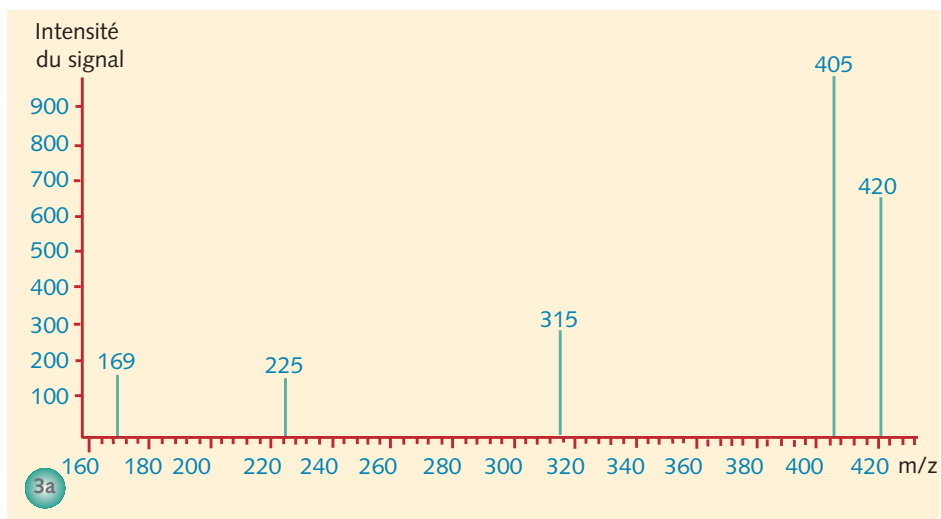
Les premières approches analytiques fondées sur des méthodes radio-immunologiques et développées dans les années 70, bien que très sensibles, ne prenaient pas en considération le métabolisme extensif des stéroïdes chez l'homme. Étant donnée la faible période pendant laquelle le composé parent est détectable après administration, la bonne efficacité du contrôle passe par le suivi des marqueurs les plus abondants consécutifs à l'administration du stéroïde. Pour détecter sans limite ces métabolites, le couplage de la CPG et de la spectrométrie de masse s'est imposé, dès 1984, comme la technique de choix. La combinaison des colonnes capillaires, des filtres de masse de paillasse de type quadripolaire et l'informatique a rendu possible la détection de concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/ml. La quête d'une sensibilité toujours plus importante et d'une spécificité du signal toujours plus poussée a conduit les laboratoires à utili-

ser après 1990 des spectromètres de masses plus sophistiqués. Les premiers s'appuient sur des filtres électromagnétiques qui autorisent l'acquisition haute résolution de l'information. Ce type d'enregistrement permet de n'avoir accès qu'aux signaux relatifs à la masse exacte des stéroïdes recherchés, donc à leur formule brute. Dotées d'une excellente sensibilité et d'une spécificité hors norme, ces spectromètres ont permis d'abaisser les limites de détection à des concentrations urinaires en dessous du ng/ml (ppb), tout en garantissant l'identité du résidu. Encore plus récemment, d'autres types de filtres de masse ont été utilisés pour le contrôle antidopage. Les premiers sont les systèmes triples quadripolaires qui consistent en la disposition en ligne de deux filtres de masse et d'une cellule de collision. Cet ensemble permet de fragmenter un stéroïde, de caractériser les morceaux correspondant de la molécule, de les fragmenter à nouveau et d'identifier finalement ces fragments. Cette technique d'acquisition, appelée également MS/MS, est particulièrement efficace pour les métabolites de stéroïdes, tant en spécificité de l'information (on accède à l'intimité de la molécule) qu'en sensibilité du signal (on détecte des concentrations urinaires inférieures à 100 pg/ml). La dernière approche retenue par les laboratoires a été l'utilisation de filtres de masse à trappes ioniques qui, pour certaines d'entre elles, permettent de répéter à l'infini, ou presque, le processus décrit pour les systèmes triples quadripolaires. La technique identifiée MS<sup>n</sup> permet, elle aussi, de travailler efficacement en dessous de la centaine de pg/ml. Toutes les techniques décrites jusqu'alors peuvent être couplées à la CPG (CPG-SDM), mais également à la CLHP (CLHP-SDM) ou à l'électrophorèse capillaire, ces deux dernières techniques autorisant l'analyse efficace de stéroïdes plus polaires ou thermolabiles (stanozolol ou trenbolone, par exemple).

Bien évidemment, l'échantillon urinaire doit suivre au préalable des étapes de pré-

paration. Ces dernières consistent en l'extraction des métabolites de l'urine (généralement via des colonnes d'extraction sur phase solide [SPE]), l'hydrolyse des conjugués par une enzyme adaptée (généralement la  $\beta$ -glucuronidase extraite d'*Escherichia coli*) et, enfin, une ou des étapes de purification sur des colonnes SPE dont la phase stationnaire peut être de nature variable. L'extrait est directement injecté en CLHP-SDM ou subit une réaction de dérivaison visant à protéger le stéroïde, s'il doit être dirigé vers un système CPG-SDM. Les précautions analytiques adoptées ont globalement le même objectif : assurer la qualité du résultat de l'essai. Pour cela, chaque série d'échantillons comporte généralement une ou des urines supplémentées, un ou des échantillons blancs (non supplémentés), un standard, et la série d'échantillons à analyser. Chaque urine comporte un étalon interne (analogue deutéré de préférence) introduit au début du processus analytique et un étalon externe à la fin de celui-ci. Toutes ces précautions permettent de limiter les risques de faux négatifs (ne pas trouver un métabolite alors qu'il est présent) et d'interdire les faux positifs (conclure qu'un métabolite est présent alors qu'il ne l'est pas). Des échantillons connus sont parfois introduits en aveugle dans la série d'analyses, et le laboratoire participe régulièrement à des essais interlaboratoires visant à mesurer le niveau de performance de celui-ci. Ce second contrôle organisé par le CIO aboutit à l'agrément ou non du laboratoire.

L'exemple de l'analyse urinaire des métabolites de la nandrolone, la 19-norandrostérone (19-NA) et la 19-norétiocholanolone (19-NE), par CPG-SDM est donné en *figure 3*. Ces deux molécules étant des isomères, leurs spectres de masse sont superposables lorsque l'ionisation de l'analyte est réalisé en impact électronique (*figure 3a*). L'ion moléculaire de ces deux stéroïdes est m/z 420 et les principaux fragments ont pour masse m/z



**Figure 3. Informations chromatographiques et spectrométriques des métabolites de la nandrolone chez l'homme.** a : spectre de masse de la 19-norandrostérone (19-NA) et de la 19-norétiocholanolone (19-NE) enregistré en impact électronique, filtre de masse quadripolaire ; b : chromatogramme d'ions ( $m/z$  405) de la 19-NA (temps de rétention TR = 16,34 mn) et de la 19-NE (TR = 16,92 mn) ; c : chromatogramme d'ions ( $m/z$  408) de la 19-NE-d3 (étalon interne de TR = 16,90 mn).

405, 315, 225 et 169. Le chromatogramme d'ions  $m/z$  405, particulièrement spécifique, est montré pour une urine supplémentée en 19-NA (16,34 mn) et en 19-NE (16,92 mn) (figure 3b). Le chromatogramme d'ions  $m/z$  408 de la 19-norétiocholanolone-d3 (étalon interne) permet d'assurer la qualité de l'analyse et de valider l'essai (figure 3c).

## Conclusion

Abusivement utilisés par les sportifs pour tenter d'accroître la masse, la force et la puissance musculaire, les stéroïdes anabolisants ont été et restent toujours un problème d'actualité dans le sport tel qu'il est pratiqué aujourd'hui. En effet, même si les techniques analytiques visant à dépister les résidus de stéroïdes anabolisants dans l'urine sont de plus en plus sophistiquées, avec une connaissance toujours meilleure du métabolisme de ces composés, la maîtrise toujours plus importante de leur extraction et de leur purification, et enfin l'amélioration presque quotidienne de la sensibilité et de la spécificité des instruments de mesure, il n'en demeure pas moins que le système de contrôle concède systématiquement une longueur de retard vis-à-vis de l'abnégation des athlètes fraudeurs et de l'ingéniosité de leur entourage. ●

## Références

1. De Mondenard JP. Historique et évolution du dopage. *Ann Toxicologie Anal* 2000 ; XII (1) : 5-18.
2. Schänzer W, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man : synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Analytica Chimica Acta* 1993 ; 275 : 23-48.
3. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem* 1996 ; 42 (7) : 1001-20.
4. Le Bizec B, Monteau F, Gaudin I, André F. Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosteroe in human urine. *J Chromatogr B* 1998 ; 723 : 157-72.

# Mise au point

## a u t o - t e s t

réponses page 82

### 1. Vrai ou faux ?

Le nombre et la qualité des publications que produit un laboratoire sont suffisants pour recevoir l'agrément du Comité international olympique (CIO) en vue de réaliser des analyses officielles dans le cadre du contrôle antidopage.

### 2. Vrai ou faux ?

L'homme est en mesure de produire de manière naturelle de la 19-norandrostérone et de la 19-norétioccholanolone, stéroïdes qui étaient connus jusqu'alors comme étant uniquement la résultante d'une administration de nandrolone.

### 3. Vrai ou faux ?

Le sang est autant utilisé que l'urine dans les contrôles antidopage.

### 4. Vrai ou faux ?

Aujourd'hui, la préparation de l'échantillon n'a plus grande importance puisque la spécificité de la spectrométrie de masse compense largement ces étapes longues et fastidieuses.

### 5. Vrai ou faux ?

La sensibilité de la spectrométrie de masse autorise aujourd'hui la détection de quelques picogrammes de stéroïdes, même dans des matrices biologiques aussi chargées que le sang ou l'urine.

6. Vous êtes le directeur d'un laboratoire : classer du plus au moins défavorable chacune des situations suivantes :

- a. un résultat faux négatif ;
- b. un résultat vrai négatif ;
- c. un résultat vrai positif ;
- d. un résultat faux positif.

7. Vous êtes à la place d'un sportif : classer du moins au plus favorable chacune des situations suivantes :

- e. un résultat faux négatif ;
- f. un résultat vrai négatif ;
- g. un résultat vrai positif ;
- h. un résultat faux positif.

## Abonnez-vous !

## Abonnez-vous !



À découper ou à photocopier

Merci d'écrire nom et adresse en lettres majuscules

Collectivité .....  
à l'attention de .....

Particulier ou étudiant

Dr, M., Mme, Mlle .....  
Prénom .....

Pratique :  hospitalière  libérale  autre.....

Adresse.....

Code postal .....

Ville .....

Pays.....

Tél.....

Avez-vous une adresse E-mail : oui  non

Si oui, laquelle : .....

Sinon, êtes-vous intéressé(e) par une adresse E-mail : oui  non

Merci de joindre votre dernière étiquette-adresse en cas de réabonnement, changement d'adresse ou demande de renseignements.

### Métabolismes-Hormones-Nutrition/Bimestriel/Tarif 2001

#### FRANCE / DOM-TOM / CEE

- 380 F collectivités (57,93 €)
- 300 F particuliers (45,73 €)
- 190 F étudiants\* (28,96 €)

\* joindre la photocopie de la carte

#### ÉTRANGER (autre que CEE)

- 500 F collectivités (91 \$)
- 420 F particuliers (76 \$)
- 310 F étudiants\* (56 \$)

\* joindre la photocopie de la carte

#### POUR RECEVOIR LA RELIURE

- 70 F avec un abonnement ou un réabonnement (10,67 €, 13 \$)
- 140 F par reliure supplémentaire (franco de port et d'emballage) (21,34 €, 26 \$)

#### MODE DE PAIEMENT

par carte Visa N° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
ou Eurocard Mastercard  
Signature : Date d'expiration | | | |

par virement bancaire à réception de facture

par chèque (à établir à l'ordre de Métabolismes-Hormones-Nutrition)

ALJAC - 62-64, rue Jean-Jaurès - 92800 Puteaux

Tél. : 01 41 45 80 00 - Fax : 01 41 45 80 25 - E-mail : contact@edimark.fr

Un justificatif de votre règlement vous sera adressé quelques semaines après son enregistrement.

MHN V. 2

Recevez régulièrement toutes nos parutions et bénéficiez de nos services