

Détection de la testostérone par IRMS

Docteur Corinne BUISSON

**Département des analyses de l'Agence française de lutte contre le dopage
(Laboratoire de Châtenay-Malabry)**

I. Présentation du laboratoire et réglementation

Le département d'analyses de l'AFLD procède aux analyses d'échantillons urinaires et, dans quelques cas, de plasma. Il se divise en quatre sections : la section logistique et technique, la section contrôle et développement chimie, la section recherche et développement biologie et la section recherche et développement chimie, où sont effectuées les analyses spécialisées par IRMS et les analyses de peptides. Le laboratoire est accrédité par l'organisme français d'accréditation (COFRAC) et par l'AMA. Dans la liste des interdictions de l'AMA figurent les agents anabolisants comme la testostérone, ainsi que les méthodes (facilitation du transfert d'oxygène) et substances interdites dans certains sports. Parmi les agents anabolisants, il faut distinguer les stéroïdes anabolisants androgènes exogènes, c'est-à-dire non présents dans l'organisme, et endogènes, comme la testostérone. Les analyses IRMS sont effectuées dans la catégorie des anabolisants endogènes.

II. Procédure d'analyse des anabolisants

L'échantillon subit une première phase de dépistage rapide. En cas de détection d'anabolisants exogènes, l'échantillon est ré-extrait pour une confirmation qualitative et quantitative. Pour les anabolisants endogènes, il faut procéder à une mesure de concentration au regard des seuils autorisés. Si les concentrations relevées dépassent le seuil, l'analyse IRMS est effectuée. Il existe cinq critères de décision : rapport testostérone/épitestostérone (T/E) supérieur à 4, concentrations en épitestostérone, testostérone supérieures à 200 nanogrammes par millilitre, concentration en androstérone, étiocolanolone supérieures à 10 000 nanogrammes par millilitre, concentration en DHEA supérieure à 100 nanogrammes par millilitre, concentration en 19-norandrostérone entre 2 et 10 nanogrammes par millilitre, concentration en boldénone entre 20 et 30 nanogrammes par millilitre.

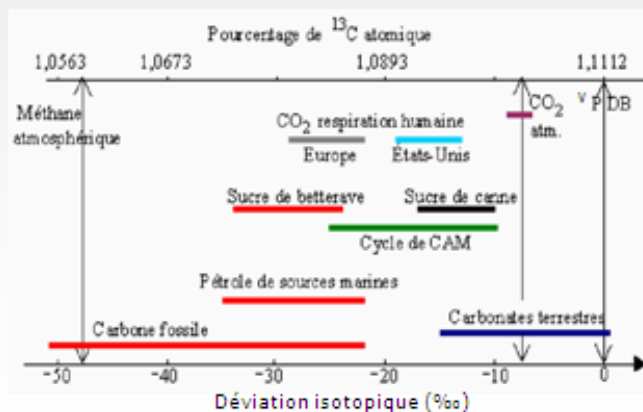
III. Analyse d'échantillons urinaires par GC/C/IRMS

Il s'agit de déterminer si les molécules détectées dans les urines sont d'origine endogène ou issues d'une administration exogène. La première solution consistant à conclure sur la base de concentrations et d'un seuil à ne pas dépasser ne peut être envisagée car elle conduit à des contestations systématiques. La deuxième solution consiste à doser la teneur en ^{13}C (carbone 13) des molécules d'intérêt pour évaluer l'origine endogène ou exogène de celles-ci, via le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

La teneur en carbone 13 est exprimée à travers la déviation isotopique : le rapport carbone 13/carbone 12 d'une molécule est exprimé par rapport à une référence internationale à laquelle est assignée la valeur de 0. C'est pourquoi les déviations isotopiques exprimées sont négatives, les molécules considérées comportant moins de carbone 13 que la référence.

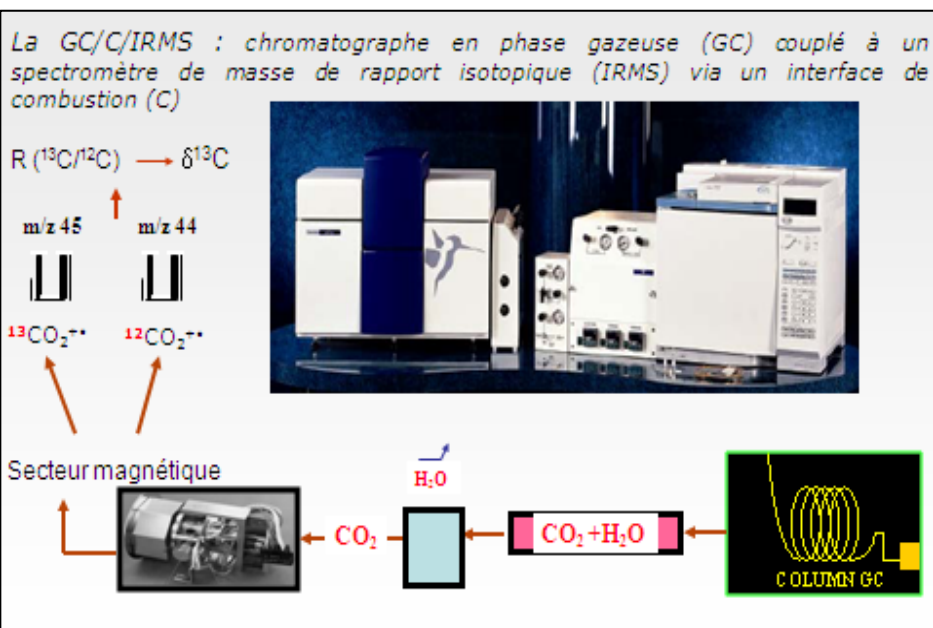
Notions isotopiques, détermination de la teneur en ^{13}C :

$$\text{Déviation isotopique (‰)} : \delta_{\text{VPDB}}^{13}\text{C} = \frac{(R_{\text{échantillon}} - R_{\text{VPDB}})}{R_{\text{VPDB}}} \times 10^3$$



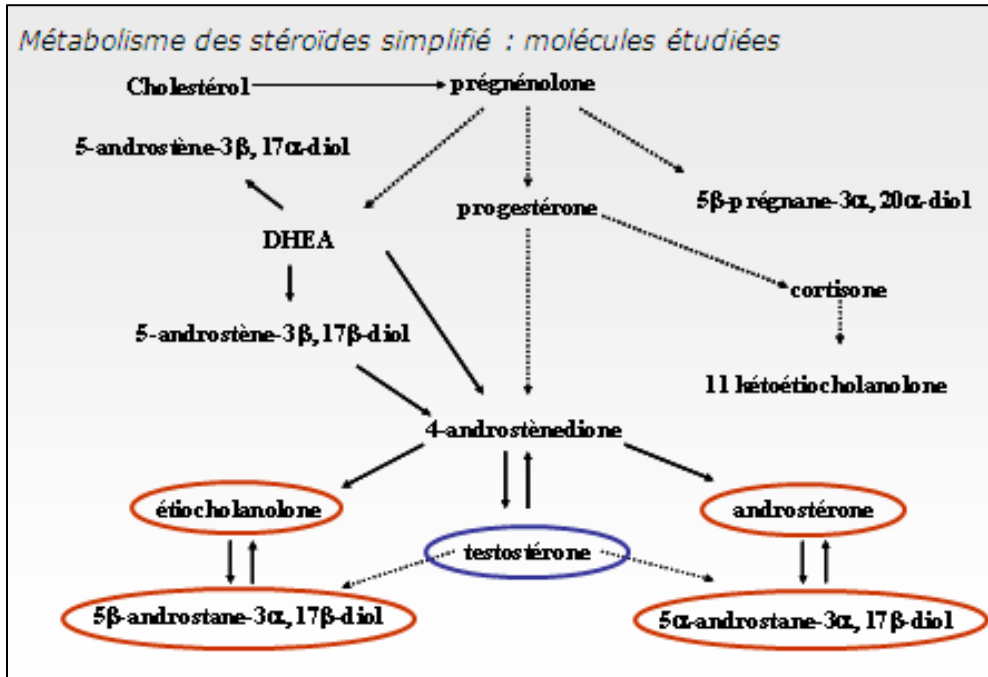
Notions isotopiques, détermination de la teneur en ^{13}C

L'appareil utilisé pour la mesure est un chromatographe en phase gazeuse (GC) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (IRMS) via une interface de combustion (C) : la GC/C/IRMS. L'appareil sépare les molécules, puis les brûle pour les transformer en CO_2 et H_2O . Après élimination de l'eau, le CO_2 entre dans le spectromètre de masse. La masse 44 correspond au CO_2 comportant un atome de carbone 12, la masse 45 correspond au CO_2 comportant un atome de carbone 13. Un logiciel calcule le rapport isotopique ainsi que la déviation isotopique.



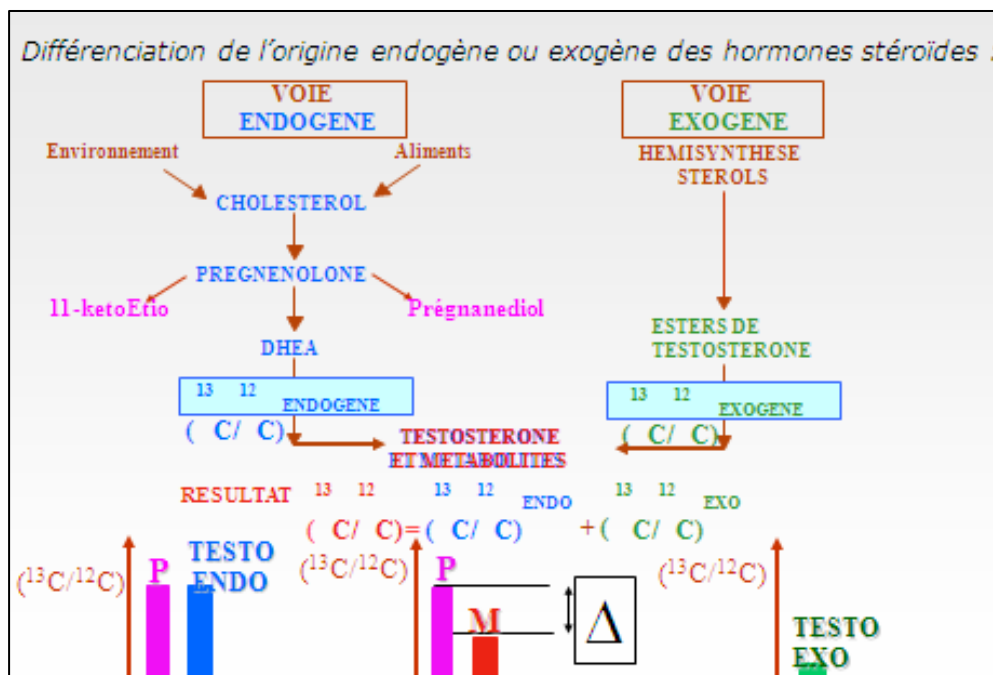
La GC/C/IRMS : chromatographe en phase gazeuse (GC) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (IRMS) via un interface de combustion (C)

Nous nous intéressons plus particulièrement à la testostérone, qui présente quatre principaux métabolites.



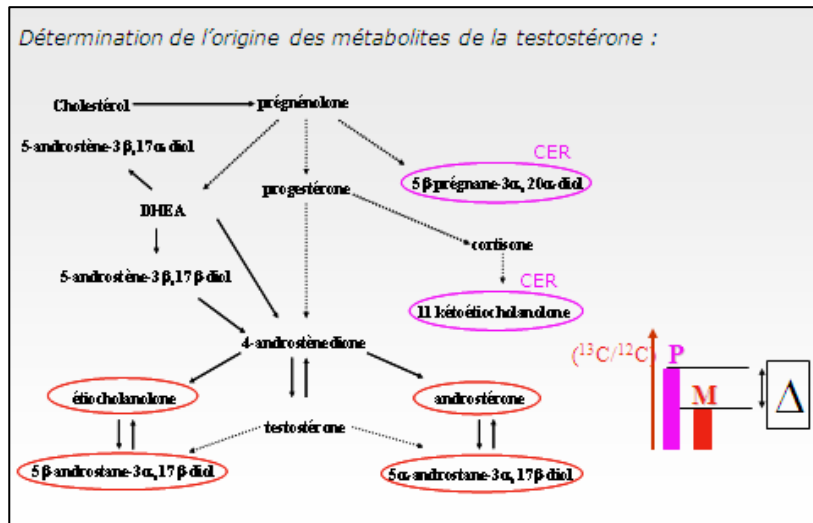
Métabolisme des stéroïdes simplifié : molécules étudiées

Dans la voie endogène, l'hormone stéroïde mère (le cholestérol), subit une série de transformations successives jusqu'à la testostérone, mais le rapport isotopique demeure constant. En revanche, dans la voie exogène, la testostérone est issue de stérols végétaux naturellement appauvris en carbone 13.



Différenciation de l'origine endogène ou exogène des hormones stéroïdes

L'administration de cette testostérone dans l'organisme entraîne donc une différence de teneur en carbone 13 entre les métabolites de la testostérone et les composés endogènes de référence (CER) situés sur des voies métaboliques différentes (prégnanediol, 11-kétoétiocholanolone).



Détermination de l'origine des métabolites de la testostérone

Il est ainsi possible de mesurer cette différence, l'apauvrissement isotopique. Lorsque celui-ci est supérieur à 3 ‰, nous pouvons conclure à une administration exogène. Il existe également un seuil en l'absence de CER.

Il arrive parfois que l'apauvrissement isotopique ne soit significatif que pour un des quatre métabolites de la testostérone, alors que le rapport T/E est supérieur à 4. Il arrive également qu'en dépit d'un rapport T/E inférieur à 4, un apauvrissement isotopique supérieur à 3 ‰ soit détecté pour l'un des métabolites.

	Bu		Echantillon		
	$\Delta\%$	$\Delta\% + 0.3\%$	$\Delta\%$	$\Delta\% - 0.3\%$	
Etio - 11 Kétoétio	-0.53	-0.03	-0.83	-1.43	Echantillon négatif
Andro - 11 Kétoétio	-0.10	0.93	0.13	-0.47	
5 β Adiol - 5 β Pdiol	-0.69	1.21	0.45	-0.31	
5 α Adiol - 5 β Pdiol	-0.80	0.79	-0.01	-0.81	

	Bu		Echantillon		
	$\Delta\%$	$\Delta\% + 0.3\%$	$\Delta\%$	$\Delta\% - 0.3\%$	
Etio - 11 Kétoétio	-0.53	-8.98	-9.78	-10.38	Echantillon anormal
Andro - 11 Kétoétio	0.00	-7.31	-8.31	-9.11	
5 β Adiol - 5 β Pdiol	-1.15	-9.38	-10.38	-11.18	
5 α Adiol - 5 β Pdiol	-0.77	-9.92	-10.72	-11.52	

Analyse d'échantillons urinaires : quelques résultats atypiques

Echantillon anormal

	Bu		Echantillon		
	$\Delta\%$	$\Delta\% + 0.3\%$	$\Delta\%$	$\Delta\% - 0.3\%$	
Etio - 11 Kétoétio	-0.56	-1.52	-2.32	-3.12	T/E = 4.2
Andro - 11 Kétoétio	-0.53	-2.85	-3.65	-4.45	
5 β Adiol - 5 β Pdiol	-0.28	-1.86	-2.66	-3.46	
5 α Adiol - 5 β Pdiol	-1.87	-6.15	-6.95	-7.75	

Echantillon anormal

	Bu		Echantillon		
	$\Delta\%$	$\Delta\% + 0.3\%$	$\Delta\%$	$\Delta\% - 0.3\%$	
Etio - 11 Kétoétio	-0.75	-0.63	-1.43	-2.23	T/E < 4
Andro - 11 Kétoétio	0.13	0.16	-0.64	-1.44	
5 β Adiol - 5 β Pdiol	-0.35	-0.65	-1.45	-2.25	
5 α Adiol - 5 β Pdiol	-1.32	-4.16	-4.96	-5.76	

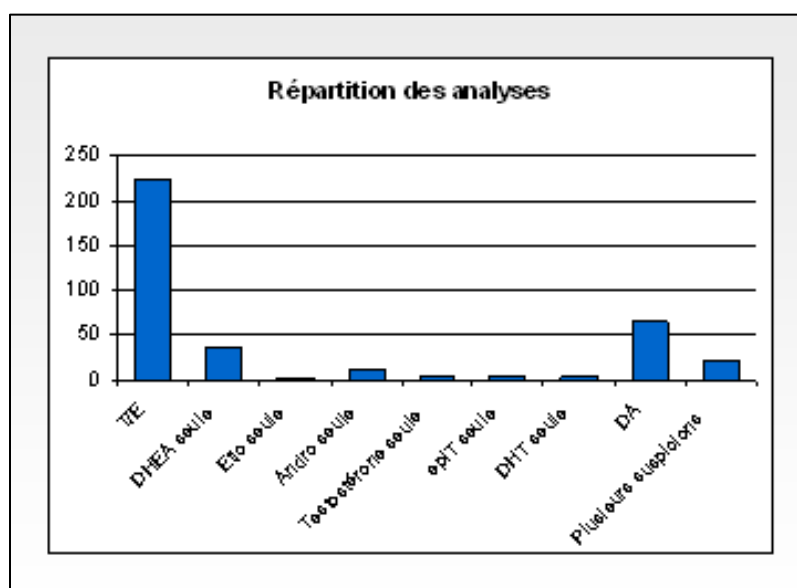
Quelques résultats atypiques

Depuis 2004, le nombre d'échantillons analysés chaque année par IRMS est passé de 57 à 310. En revanche, le nombre de résultats anormaux n'a pas connu d'augmentation significative.

Années	Nombre de confirmations par GC/C/IRMS réalisées	Résultats anormaux
2004	57	4
2005	156	13
2006	149	10
2007	342	8
2008	366	12
2009	310	8

Evolution du nombre d'analyses réalisées depuis 2004 au sein du laboratoire

La plupart des analyses effectuées l'ont été suite à la détection d'un rapport T/E supérieur à 4. Nous avons également été sollicités par des fédérations sur certains échantillons suspects.



Suspicion ayant conduit à des analyses IRMS en 2008

En 2009, 8 cas anormaux ont été identifiés, dont 3 en cyclisme et 2 en athlétisme. La testostérone semble être utilisée de plus en plus pour la récupération après un effort d'endurance.

L'analyse IRMS est une nécessité pour confirmer l'administration de testostérone ou d'un précurseur, car l'analyse ne peut se baser uniquement sur des seuils. Un nombre croissant de laboratoires s'équipent de cette technique. En 2009, on comptait 20 laboratoires sur les 34 accrédités, contre 11 sur 33 en 2007. L'IRMS ne sert pas seulement à analyser la testostérone : nous avons développé des méthodes de recherche de la nandrolone, de la boldénone, du formestane et des glucocorticoïdes.

Questions-réponses avec l'amphithéâtre

Professeur Jean-Yves PETIT, Unité de pharmacologie, Faculté de pharmacie de Nantes

La substance de référence utilisée est-elle la même pour chaque type de molécule étudié ?

Docteur Corinne BUISSON

Nous utilisons toujours le même CER : c'est une molécule se trouvant sur une voie métabolique différente de la testostérone, comme la 11-kétoétiocholanolone, qui se trouve sur la voie métabolique des corticoïdes. Cette molécule n'est pas affectée par une administration de testostérone.

Docteur Roland QUESTEL, médecin de la Fédération française du Sport universitaire

Comment expliquez-vous qu'une quantité d'urine de plus en plus importante soit demandée dans les contrôles ? C'est particulièrement difficile pour les athlètes féminines de faible poids.

Docteur Corinne BUISSON

Nous avons besoin de 20 millilitres d'urine pour le seul dépistage IRMS, étant données les faibles quantités moléculaires en jeu. Pour effectuer l'ensemble des analyses, un volume relativement important est nécessaire.

Docteur Gilbert ABOUSSOUAN, médecin fédéral de la Fédération Française de Danse

La DHEA passe-t-elle par le stade testostérone quand vous la détectez ?

Docteur Corinne BUISSON

Nous analysons les métabolites de la testostérone, même en cas de soupçon de prise de DHEA. Par ailleurs, la DHEA peut être analysée séparément.