

Dopage : l'analyse dans tous ses états

Le contrôle des produits anabolisants de type testostérone : bien comprendre la détection

Marie-Florence Grenier-Loustalot

Les stéroïdes sont contrôlés dans les urines par des techniques de chromatographie en phase gazeuse (GC) – pour la séparation des composés –, couplées à la spectrométrie de masse (MS) – pour la caractérisation et la quantification des espèces présentes.

Ces contrôles urinaires se font en deux étapes. On procède d'abord à un balayage, étape de dépistage rapide et sensible permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Étant donné l'imagination et la « boîte de Pandore » actuelle, cinq procédures basées sur la technique GC/MS sont nécessaires pour détecter en première lecture des traces ou ultratracés d'environ 250 produits interdits.

Dans le cas d'un tracé et de résultats sortant de la normalité, donc susceptible d'être positif, on réalise une seconde analyse. Il s'agit toujours d'une confirmation par les mêmes techniques de GC-MS.

Il est relativement facile de détecter des produits synthétiques natifs et/ou leurs métabolites non naturels dans les urines. En revanche, les stéroïdes endogènes (que l'on fabrique dans son corps) comme la testostérone, posent un véritable problème. En effet, l'affirmation d'un dopage à la testostérone, ce n'est pas de trouver cette hormone, ce qui est normal, mais de déterminer sa quantité ainsi que ses origines (endogène et/ou exogène).

Actuellement, la GC/MS permet de déterminer le rapport testostérone (T) sur épitestostérone (E) qui est un isomère de la testostérone. Ce rapport est de 4. Si ce seuil est dépassé, le dopage peut être suspecté, mais on ne peut l'affirmer de manière absolue puisque la méthode ne permet pas d'affirmer que l'on est en présence d'un produit exogène.

Pour ôter cette ambiguïté, nous avons développé il y a quelques années au Service Central d'Analyse du CNRS, une autre approche, complémentaire de la première analyse, basée sur la spectrométrie de masse isotopique du carbone. Il s'agit de la détermination du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ permettant de déterminer l'origine de la testostérone urinaire : naturelle (endogène) ou pharmaceutique (exogène). Cette différence dans l'abondance isotopique du carbone vient du fait que la testostérone naturelle humaine est biosynthétisée par l'organisme, le précurseur étant le cholestérol, alors que la testostérone pharmaceutique est obtenue par hémisynthèse à partir des stéroïdes végétaux. La mesure isotopique ne se limite donc pas à la testostérone mais s'applique aussi à d'autres stéroïdes intervenant dans la chaîne métabolique comme précurseurs (cholestérol, déhydroépiandrostérone, androstènediol) ou comme métabolites (androstènediols).

La première étape de cette méthode consiste en l'extraction des stéroïdes urinaires (extraction en phase

solide sur C18, suivie de l'hydrolyse enzymatique, d'une extraction en phase liquide par l'éther et d'une extraction en phase solide sur gel de silice) suivie d'une purification. Cette dernière a été abordée suivant trois approches différentes : chromatographie liquide en phase inverse C18, acétylation puis chromatographie liquide sur phase inverse C18, ou chromatographie d'immunoaffinité.

La seconde étape est l'analyse isotopique du carbone réalisée par GC/C/IRMS (« gas chromatography/combustion/isotope radio mass spectrometry ») des stéroïdes acétylés. Il s'agit du couplage en ligne de la chromatographie en phase gazeuse (séparation des molécules à étudier), de la combustion (transformation de la molécule en CO_2) et ensuite de l'ionisation et de la séparation à l'aide d'un spectromètre magnétique des ions correspondant aux différents isotopomères du CO_2 . Après détection, le traitement des signaux correspondants permet d'obtenir avec une grande précision les valeurs du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, dont la notation standard est exprimée en δ pour mille par rapport à une référence internationale.

La nature de l'alimentation a une influence capitale sur la valeur du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des stéroïdes. Néanmoins, cette influence ne fausse pas les résultats : l'analyse isotopique se faisant à différents niveaux de la biosynthèse des stéroïdes, toute variation importante de ce rapport signifierait un apport exogène de testostérone. Les stéroïdes précurseurs (cholestérol, déhydroépiandrostérone, androstènediol) servent en quelque sorte « d'étalons internes » et leurs valeurs sont propres à chaque individu.

Cette analyse permet de détecter la prise pendant quelques jours – avantage important en comparaison à l'analyse du rapport T/E – et d'affirmer la présence d'un produit anabolisant d'origine pharmaceutique. Elle est appliquée actuellement par les laboratoires accrédités comme le Laboratoire national de dépistage du dopage (LNDD) à Châtenay-Malabry.



Marie-Florence Grenier-Loustalot

est directrice du Service Central d'Analyse du CNRS*.

* Service Central d'Analyse du CNRS, Échangeur de Solaize, BP 22, 69390 Vernaison.

Tél. : 04 78 02 22 00. Fax : 04 78 02 41 74.
Courriel : mf.grenier-loustalot@sca.cnrs.fr