

L'affaire Balco, ou quand le couplage LC/MS s'impose dans le contrôle antidopage

Résumé Au cours des années 1990, les constructeurs de spectromètres de masse mettent sur le marché des appareils permettant d'effectuer en routine des analyses où les méthodes séparatives en phase liquide sont directement reliées à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS). Ces nouveaux outils au service de l'analyse chimique offrent des moyens accrus pour mieux dépister des fraudes, notamment pour lutter contre le dopage sportif. La détection de la tétrahydrogestrinone (THG) au Laboratoire d'analyse olympique de l'Université de Californie à Los Angeles révéla ces nouvelles possibilités en dévoilant au grand jour une substance illicite présumée invisible lors des contrôles officiels.

Mots-clés Chimie analytique, impact sociétal, LC/MS/MS, antidopage, tétrahydrogestrinone, Balco.

Abstract **The Balco affair, or when LC/MS coupling is essential in doping control**

During the years 1990, mass spectrometer manufacturers introduced new instruments that could routinely perform liquid-phase separation methods (LC) directly coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). These new tools provided increased means to better detect frauds, in particular doping in sport. The detection of tetrahydrogestrinone (THG) at the University of California's Olympic Analysis Laboratory in Los Angeles revealed these new possibilities by unveiling an allegedly unseen illicit substance under conventional urine athlete controls.

Keywords Analytical chemistry, societal impact, LC/MS/MS, anti-doping control, tetrahydrogestrinone, Balco.

L'impact de la chimie analytique sur la société

Les méthodes d'analyse chimique étendent les moyens de perception humains pour évaluer l'environnement, au-delà des cinq sens fondamentaux [1]. L'introduction de nouveaux appareils et des protocoles méthodologiques qui leur sont liés modifie souvent cette perception, avec parfois des conséquences sociétales importantes, par exemple dans le domaine économique, légal ou comportemental. Deux exemples ont été décrits précédemment dans *L'Actualité Chimique*, l'un concernait l'identification de traces de benzène dans l'eau de Perrier en 1991 [2], l'autre celle du stanozolol ainsi que l'un de ses métabolites dans l'urine de Ben Johnson, le finaliste déchu de l'épreuve du 100 m des Jeux olympiques de Séoul en 1988 [3]. Dans les deux cas, le déclencheur de l'affaire fut une simple analyse au moyen d'un équipement pour le couplage en ligne de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC/MS).

L'exemple qui suit concerne aussi la lutte antidopage. Il survient alors que les méthodes de contrôle du dopage par les laboratoires accrédités par le Comité international olympique (CIO), basées sur le couplage GC/MS/MS, atteignent leurs limites. D'autres moyens devenaient nécessaires pour dépister les nouvelles formes de fraudes qui avaient émergé à la fin des années 1990. Des molécules pharmaceutiques légales furent parfois détournées de leur usage à des fins de dopage sportif, par exemple des diurétiques utilisés entre autres dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, l'hypertension et l'insuffisance rénale. Certains, tel le furosémide, augmentent les volumes urinaires et diluent ainsi les molécules dopantes en dessous de leur seuil de détection. D'autres, au contraire, tel le probénécide, retardent le passage des anabolisants dans les urines avant les analyses.

Il y eut également des molécules de synthèse conçues spécifiquement pour échapper aux contrôles des laboratoires

accrédités, habituellement qualifiées de « designer drugs » tant dans des articles en anglais qu'en français. Celle dont il est question ici fit grand bruit au tournant des années 2000. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse simple (LC/MS) ou en tandem (LC/MS/MS) s'affirma à cette occasion comme un moyen efficace de confondre des fraudeurs qui pensaient avoir absorbé des dopants indécélables.

« The clear », un produit de synthèse distribué par le laboratoire Balco à des fins de dopage

L'affaire est décrite en détail dans d'innombrables sources documentaires (voir entre autres [4-5]). Ses prémisses se résument ainsi : le laboratoire Balco (Bay Area Laboratory Co-operative) était un établissement situé dans la banlieue de San Francisco, fondé par Victor Conte, un nutritionniste autoproclamé, dépourvu de diplômes universitaires. Ce laboratoire était censé effectuer des analyses de sang ou d'urine, mais son activité majeure était de fournir des compléments alimentaires, notamment à des sportifs de renom à la fin des années 1990. Dès 2002, un agent fédéral du fisc, Jeff Novitsky, particulièrement opiniâtre et tenace, va s'intéresser de près à un possible trafic de substances dopantes, notamment une, surnommée « the clear », réputée être indécélable par le protocole d'analyse des laboratoires accrédités par le CIO [5].

En 2003, cette pression sur le laboratoire Balco pousse Trevor Graham, précédemment entraîneur de l'athlète Marion Jones, à prendre contact de manière anonyme avec l'agence antidopage américaine, située dans le Colorado, et à lui faire parvenir une seringue utilisée, ramassée dans un vestiaire et supposée avoir contenu « the clear ». Un extrait au méthanol du contenu de la seringue est ensuite transmis à Don H. Catlin, directeur du Laboratoire d'analyse olympique de l'Université de



Figure 1 - Don H. Catlin en 2005 dans son laboratoire au « Anti-Doping Research Institute » de l'Université de Californie (Los Angeles). À gauche de la photo : un appareil LC/MS/MS du fabricant Sciex utilisé pour détecter la tétrahydrogestrinone (THG). Photo par Jeff Minton (jeff@jeffminton.com), avec permission d'Oliver Catlin (ocatlin@bscg.org), DR.

Californie à Los Angeles, un laboratoire créé à l'occasion des Jeux olympiques de 1984 dans cette ville (figure 1).

Une recherche sur Google en décembre 2019 avec les seuls termes « affaire Balco + THG » conduit à plus de 35 000 occurrences. Inutile de les résumer tant elles sont nombreuses. L'éclairage que nous donnons ici est différent. Comme précédemment [3], il met en exergue le protocole expérimental et l'instrumentation innovante en spectrométrie de masse adoptée avec succès. Plusieurs publications scientifiques de Don H. Catlin et ses collaborateurs décrivent minutieusement comment la substance contenue dans la seringue, *a priori* inconnue et non détectable, put être identifiée, puis la méthode analytique mise au point pour l'identifier dans l'urine. Ceci est exposé de manière rigoureuse dans *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [6], et dans un style « grand public » dans *Chemical Engineering News* [7] puis dans les pages A d'*Analytical Chemistry* [8], deux publications de l'American Chemical Society qui souhaitait mettre en lumière le travail remarquable de Don H. Catlin.

Le mauvais résultat de l'analyse GC/MS

La méthode identique à celle pratiquée lors des Jeux olympiques de 1988 à Séoul, appliquée à l'extrait de la seringue après préparation exhaustive de dérivés per-triméthylsilylés, conduit à une forêt de plus d'une trentaine de signaux

chromatographiques, tous non identifiables, à l'exception d'un seul, estimé être une impureté du produit majeur. Si une substance est présente dans la seringue, elle est bien indécélable par les laboratoires accrédités par le CIO pour l'analyse des stéroïdes anabolisants. Par chance, un spectre de masse clair est obtenu en ne faisant rien d'autre que d'analyser directement la solution, sans préparer de dérivés volatils. Un stéroïde donne parfois un spectre de masse interprétable sous ionisation électronique (EI) s'il présente une structure capable de stabiliser le site initial d'ionisation, tel un cycle aromatique ou un cycle pyrazole, et que l'on dispose d'une quantité suffisante et non de traces [3]. L'analyse directe de la solution inconnue dans un appareil GC/MS quadripolaire à basse résolution révèle un signal chromatographique majeur et un ion moléculaire à m/z 312,2. La mesure de la masse exacte m/z 312,2080 par GC/MS à haute résolution suggère la formule élémentaire $C_{21}H_{28}O_2$. Les fragmentations sont semblables à celles de deux stéroïdes déjà connus comme anabolisants interdits, avec en commun une structure conjuguée 4,9,11-triène 3-one : la trenbolone et la gestrinone (figure 2). L'ensemble de ces résultats oriente vers l'hypothèse d'un dérivé tétrahydrogéné de la gestrinone, abrégé en THG, que confirment la synthèse et les données analytiques par RMN, GC, LC et MS.

Les protocoles habituels ne pouvaient pas déceler la THG

Le groupement -OH en position 17 est stériquement encombré par le groupement éthyle voisin (figure 2), ce qui diminue sa réactivité vis-à-vis d'agents silylants. De plus, un alcool tertiaire est moins réactif à ce type de réaction qu'un alcool primaire ou secondaire. Tout concourt à rendre difficile d'en obtenir un dérivé triméthyl silyl, permettant à la THG d'échapper aux méthodes d'analyse des laboratoires accrédités et d'entretenir sa réputation d'être indécélable. La trentaine de pics inconnus s'explique par des dégradations fréquentes au cours d'étapes de préparation de dérivés silylés, créant de nombreux artéfacts. En clair, la préparation de dérivés volatils par silylation complexifie l'analyse au lieu de la simplifier. Le terme « designer drug » comme résultat d'une conception élaborée est ici abusif, car le chimiste Patrick Arnold a effectué une simple hydrogénation catalytique en une étape sur une molécule connue et qu'il était facile de se procurer, la gestrinone étant un médicament utilisé pour traiter l'endométriose (figure 3) [9].

La solution pour doser la THG : le couplage LC/MS/MS

Analyser directement la THG par GC/MS, sans en préparer un dérivé volatil, n'est possible que si l'on en dispose d'une quantité suffisante. À l'état de traces, la THG est trop

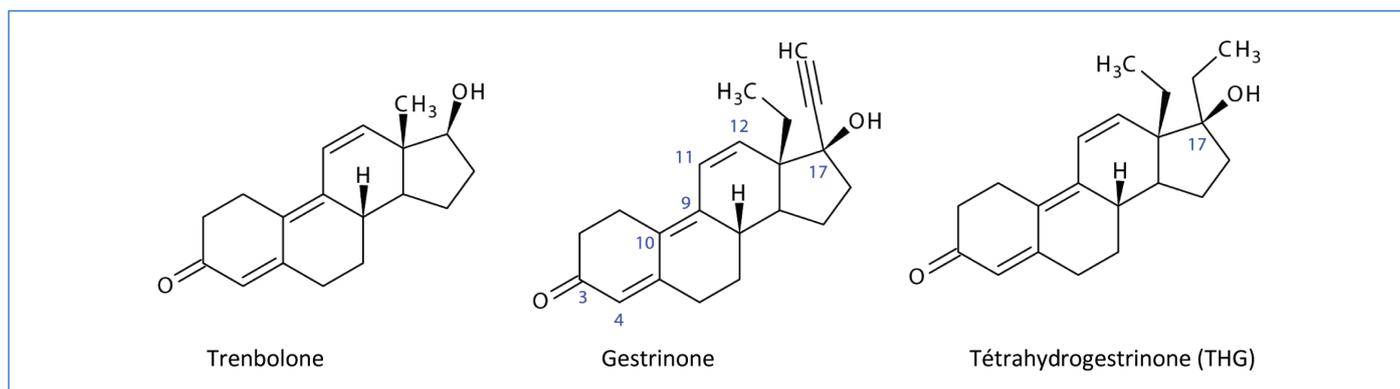


Figure 2 - Stéroïdes anabolisants de la famille triène 4,9,11 3-one.

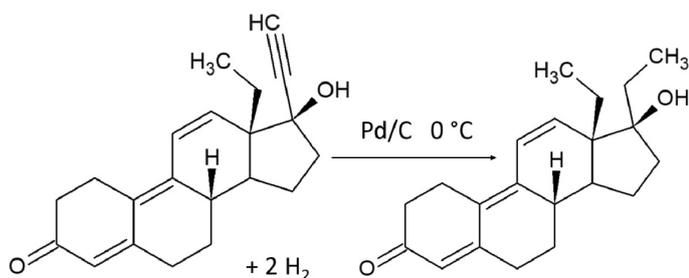


Figure 3 - Synthèse de la tétrahydrogestrinone.

polaire pour ne pas être retenue de manière irréversible par la colonne chromatographique. Avec un appareil pour le couplage LC/MS/MS, tel celui à gauche sur la *figure 1*, l'analyse se simplifie. La THG ($M = 312$) se protone facilement par ionisation électrospray (ESI) en mode positif. Elle forme un ion abondant ($MH^+ = 313$), dissocié ensuite dans la chambre de collision de l'appareil en deux fragments caractéristiques (m/z 241 et 159) sur lesquels s'appuie le dosage.

Après l'identification du contenu de la seringue, une méthode fut mise au point sur l'animal pour détecter la THG, selon un protocole classique en toxicologie. Dans une première étape, des urines de singes de genre babouin sont recueillies. Ces urines « blanches » sont dopées à quantités croissantes connues du stéroïde visé. La THG en solution dans un solvant pur, par exemple de l'acétonitrile, et la même quantité de THG en solution dans de l'urine blanche ne donnent pas le même signal de détection en raison de ce qui est appelé l'« effet de matrice », généralement un signal atténué dans l'urine. Dans une seconde étape, la molécule de THG est administrée à l'animal par injection intraveineuse et par injection intramusculaire. Au cours du métabolisme, elle est excrétée dans l'urine sous forme de glucuronides. L'analyse se simplifie comparée aux méthodes utilisant le couplage GC/MS ; il faut toujours extraire et hydrolyser les glucuronides de la THG, mais il suffit ensuite d'analyser directement la THG libérée par LC/MS/MS, sans devoir préparer un dérivé par un agent silylant, cause majeure de l'échec des protocoles GC/MS.

Il faudrait modérer le rôle du couplage LC/MS/MS utilisé ici, car l'API 300 constitué d'un ensemble de filtres quadripolaires de faible résolution n'aurait pas permis à lui seul d'identifier la THG. Il ne pouvait que donner sa masse moléculaire à une décimale près, un résultat insuffisant pour conduire à une formule chimique élémentaire, puis à une structure moléculaire. Les autres moyens analytiques du laboratoire étaient nécessaires pour baliser le chemin à suivre par l'appareil LC/MS/MS pour retrouver la THG dans une matrice complexe. Toutefois, les articles relatant l'affaire Balco illustrée d'une photo du Dr. Don H. Catlin ([6-8] et *figure 1*) le montrent toujours posant au côté d'un appareil LC/MS/MS, traduisant ainsi le rôle crucial de cet instrument.

Des conséquences dévastatrices pour les fautifs

Le couplage LC/MS/MS venait ainsi de faire une entrée brillante dans le domaine du dépistage du dopage et dévoilait dès lors la présence de la THG dans les échantillons d'urine d'athlètes contrôlés au terme d'épreuves sportives. Comme pour les deux histoires racontées précédemment [2-3], la déflagration fut planétaire. Parmi les 550 échantillons d'urine d'athlètes qui avaient été conservés, vingt furent déclarés positifs, notamment celles d'athlètes de renommée mondiale dont les carrières furent altérées, voire interrompues. Parmi

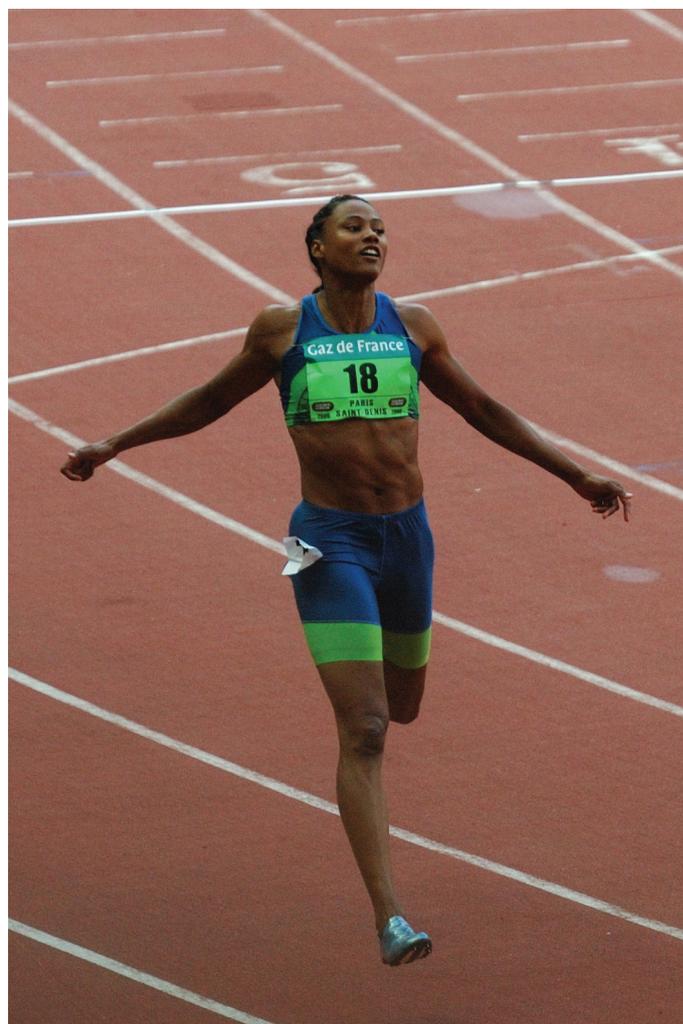


Figure 4 - Marion Jones remporte la finale du 100 m au meeting Gaz de France, Paris Saint-Denis, le 8 juillet 2006. Photo : Wikipédia, licence cc-by-sa-2.0, Thomas Faivre-Duboz.

les plus connues [5] : Barry Bonds (baseball), C.J. Hunter (lancer de poids), et les sprinters Kelli White, Dwain Chambers, Tim Montgomery, Regina Jacobs et Marion Jones. Cette dernière, vainqueur entre autres courses de la finale du 100 m au meeting Gaz de France en 2006 (*figure 4*), rendit en 2007 les trois médailles d'or et les deux médailles de bronze qu'elle avait remportées aux Jeux olympiques de Sydney en 2000. Tous les acteurs de Balco furent condamnés, soit à des peines de prison ferme, soit avec sursis, et à de fortes amendes, que ce soient les dirigeants (Vicor Conte, James Valente), le chimiste Patrick Arnold, les entraîneurs (Greg Anderson, Remi Korchemny), et également Trevor Graham, le lanceur d'alerte ayant expédié la seringue qui avait tout déclenché.

Une pause dans le combat entre la lance et le bouclier, mais pas une fin

Dans les années qui suivirent l'affaire Balco, le couplage LC/MS/MS devint un appareillage présent dans tous les laboratoires de dépistage du dopage humain ou animal, en particulier en France au Laboratoire d'analyses de l'Agence française de lutte contre le dopage (AFLD) (voir *encadré*). Leurs performances ont été continuellement améliorées au cours de la dernière décennie, dans toutes les parties essentielles de l'instrumentation, pour un coût croissant, dans une fourchette allant actuellement de 100 à 600 k€. Dans les années 2000, la spectrométrie de masse à haute résolution

Le département des analyses de l'AFLD en quelques chiffres

Anciennement dénommé Laboratoire national de dépistage du dopage (LNDD), le Laboratoire d'analyses de l'Agence française de lutte contre le dopage (AFLD) est situé de longue date dans le parc du Centre de ressources, d'expertise et de performance sportive (CREPS) Ile-de-France à Châtenay-Malabry (Essonne). Il sera prochainement relocalisé au premier semestre 2023 sur le campus de la Faculté des sciences d'Orsay, dans le bâtiment 409, afin d'être prêt pour les Jeux olympiques et paralympiques de 2024 à Paris.

Les informations fournies par Michel Audran, qui dirigea le laboratoire d'analyses de 2017 à 2019, donnent une idée de l'importance des méthodes séparatives couplées à la spectrométrie de masse (GC/MS et LC/MS) dans la lutte contre le dopage sportif. Le parc instrumental inclut quatorze appareils GC/MS et onze appareils LC/MS, toutes techniques de spectrométrie de masse confondues – basse résolution, haute résolution (HRMS), analyses en tandem (MS/MS), analyses isotopiques.

En 2019, le laboratoire emploie 40 personnes. Il est à même de dépister plus de 650 substances, dont un tiers par GC/MS et deux tiers par LC/MS. Au dernier pointage annuel, 12 000 analyses d'urine et 3 000 analyses de sang y ont été pratiquées. Le nombre d'analyses réalisées et de substances dépistées croît chaque année. Depuis septembre 2019, le laboratoire est dirigé par le Suédois Magnus Ericsson.



Exemples d'équipements LC/MS/MS au Laboratoire d'analyses de l'AFLD à Châtenay-Malabry.

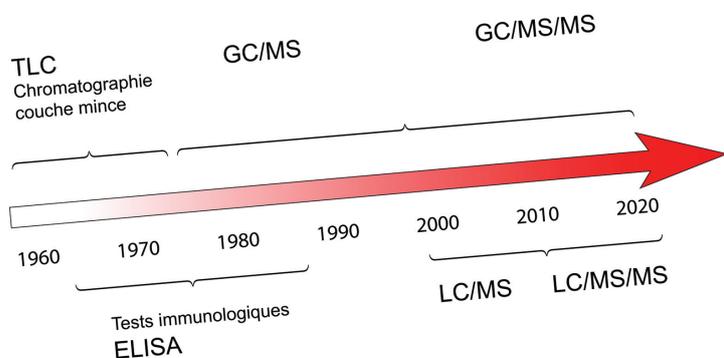


Figure 5 - Évolution des techniques d'analyse pour la détection des stéroïdes (d'après [11]).

était essentiellement pratiquée à l'aide d'appareils à secteurs électriques et magnétiques ; elle est remplacée de nos jours par des analyseurs à temps de vol ou des orbitraps.

Les méthodes GC/MS puis LC/MS permirent de tracer de nombreuses molécules xénobiotiques absorbées à des fins de dopage et de les bannir en les inscrivant dans les registres d'instances officielles du milieu sportif (figure 5), mais ce ne fut qu'une pause. D'autres voies furent explorées par les fraudeurs, telles les molécules naturellement présentes dans l'organisme et susceptibles d'accroître les performances sportives, par exemple l'érythropoïétine (EPO), ouvrant une nouvelle page dans la lutte antidopage [10].

L'auteur remercie Oliver Catlin, président et co-fondateur de Banned Substance Control Group (BSCG), pour la photo de son père en 2005, ainsi que Michel Audran, professeur émérite au Laboratoire de

biophysique et bioanalyse de l'Université de Montpellier et directeur du Laboratoire d'analyses de l'AFLD (2016-2019), pour ses conseils et données (photo de l'encadré).

- [1] Arpino P., La face cachée de la chimie analytique, in *Chimie et expertise : Sécurité des biens et des personnes*, M.-T. Dinh-Audouin, D. Olivier, P. Rigny (coord.), EDP Sciences/Fondation de la Maison de la Chimie, **2015**, p. 113-125, www.mediachimie.org/sites/default/files/expertise_p113.pdf
- [2] Arpino P., Voici 20 ans : Perrier ou l'analyse qui fit pschitt!, *L'Act. Chim.*, **2010**, *341*, p. 46-51.
- [3] Arpino P., Séoul 1988 : l'analyse qui renversa l'idole, *L'Act. Chim.*, **2017**, *422-423*, p. 9-14.
- [4] Balco scandal, *Wikipedia*, https://en.wikipedia.org/wiki/BALCO_scandal, consulté le 4 mars 2020.
- [5] Bourcier N., Affaire Balco sur la piste du dopage, *Le Monde* *2*, 6 août **2005**, p. 8.
- [6] Catlin D.H., Sekera M.H., Ahrens B.D., Starcevic B., Chang Y.-C., Hatton C.K., Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, *18*, p. 1245-1249.
- [7] Ritter S.K., Designer steroid rocks sport world, *Chem. Eng. News*, **2003**, *81*, p. 66-69.
- [8] Mukhopadhyay R., Catching the bad sports, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, p. 3963-3965.
- [9] Thomas E.J., Cooke I.D., Impact of gestrinone on the course of asymptomatic endometriosis, *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.*, **1987**, *294*, p. 272-274.
- [10] Leuenberger N., Reichel C., Lasne F., Detection of erythropoiesis-stimulating agents in human anti-doping control: past, present and future, *Bioanalysis*, **2012**, *4*, p. 1565-1575.
- [11] Decloedt A., Van Landschoot A., Vanhaecke L., Mass spectrometry for the detection of endogenous steroids and steroid abuse in (race) horses and human athletes, *Mass Spectrometry*, IntechOpen, **2017**, p. 229-251, doi: 10.5772/intechopen.68593.

Patrick ARPINO,

Ancien directeur de recherche au CNRS, ancien président de la division Chimie analytique de la Société Chimique de France (2000-2005), élu membre du Bureau du groupe Histoire de la chimie de la Société Chimique de France en mai 2020.

*patrick.arpino@chimieparistech.pls.eu
www.researchgate.net/profile/Patrick_Arpino