

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n°:	TD2015NA-FR	Version n°:	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

HARMONISATION DE L'ANALYSE ET DES RAPPORTS RELATIFS AUX 19-NORSTÉROÏDES APPARENTÉS À LA NANDROLONE

1.0 Introduction

Le présent document a été rédigé en vue d'harmoniser l'analyse et les rapports relatifs aux 19-norstéroïdes apparentés à la nandrolone par les laboratoires.

La détection de l'utilisation de la nandrolone et d'autres 19-norstéroïdes est basée principalement sur l'identification du *métabolite* urinaire majeur, la 19-norandrostérone (19-NA) à une concentration (obtenue par hydrolyse avec β -glucuronidase) supérieure à la limite de décision (LD), telle qu'elle est documentée dans le Document technique LD (TDDL) [1]. Plus d'un *métabolite* des norstéroïdes administrés peuvent être détectés et signalés [par exemple la 19-norétiocholanolone (19-NE)], mais il suffit, pour signaler un *résultat d'analyse anormal*, de procéder à l'identification et à la quantification de la 19-NA comme *métabolite* et de démontrer, si nécessaire, qu'elle n'est pas d'origine endogène.

Dans certaines circonstances décrites ci-après, des analyses et rapports supplémentaires peuvent être exigés.

2.0 Analyse

2.1 Identification et quantification

Outre la nécessité de respecter les critères d'identification décrits dans le Document technique IDCR [2], le laboratoire doit démontrer que la concentration de 19-NA est supérieure à la LD définie dans le TDDL [1] et, si nécessaire, que la 19-NA détectée n'est pas d'origine endogène (par analyse par GC/C/IRMS).

La méthode de quantification mise en œuvre pour calculer la concentration de 19-NA doit inclure les caractéristiques suivantes :

- un étalon interne deutérié (par exemple le d₄-19-NA-glucuronide) ;
- une courbe de calibration sur une gamme appropriée encadrant la concentration estimée de l'analyte dans l'*échantillon* (quand la concentration est inférieure ou égale à 15 ng/mL) ou une calibration à un seul point à 15 ng/mL (quand la concentration est supérieure à 15 ng/mL) ;
- l'utilisation d'échantillons contrôle de qualité (CQ) négatifs et positifs appropriés.

La méthode GC/C/IRMS doit inclure les caractéristiques suivantes :

- Chaque lot d'*échantillons* analysé par GC/C/IRMS doit inclure une urine CQ négative (valeurs $\delta^{13}\text{C}$ de la 19-NA et du composé endogène de référence – CER – dans l'intervalle des valeurs naturelles) et une urine CQ positive

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n° :	TD2015NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

[différence entre les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ ($\Delta\delta$) du CER et de la 19-NA supérieure à 3‰]. Ces contrôles doivent être soumis à la même procédure de préparation que la partie aliquote de l'échantillon. L'analyse doit inclure la confirmation de l'identité du pic de la 19-NA (par exemple par analyse par GC/MS effectuée dans des conditions de chromatographie comparables. Le but est de produire un chromatogramme ayant des profils de pics similaires afin que les spectres puissent être utilisés pour identifier le(s) pic(s) en question. Des différences mineures de temps de rétention entre les deux techniques sont attendues).

2.2 Contrôles supplémentaires

La 19-NA est excrétée à de faibles concentrations comme *métabolite* mineur de la noréthistérone, un agent progestogène dont l'usage est permis et qui est présent dans certains contraceptifs oraux, ainsi que pendant la grossesse. De plus, la 19-NA peut être produite dans de rares *échantillons* d'urine, à des niveaux similaires, par 19-déméthylation *in situ* de l'androstérone (A).

Lorsque la concentration de 19-NA mesurée dans un *échantillon* d'urine provenant d'une femme est supérieure à la LD, le laboratoire doit effectuer des tests de grossesse [par exemple basés sur la quantification de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) urinaire]] et pour l'usage de contraceptifs basés sur la noréthistérone (par exemple détection de la tétrahydronoréthistérone).

Une analyse par GC/C/IRMS doit être effectuée dans les cas suivants¹:

- pour tout *échantillon* d'urine dont la concentration de 19-NA mesurée est entre la LD et 10 ng/mL, sauf en cas de grossesse ou d'usage de la noréthistérone ;
- en cas de grossesse, quand la concentration de 19-NA mesurée dans l'*échantillon* d'urine est supérieure à 15 ng/mL².

¹ Pour rejeter l'hypothèse d'une formation endogène de 19-NA, les critères suivants, basés sur l'application d'une analyse par GC/C/IRMS, doivent être remplis simultanément :

i- La valeur $\delta^{13}\text{C}$ de la 19-NA est en dehors des valeurs de référence normalement mesurées chez les humains (c'est-à-dire qu'elle est inférieure à -27‰), et

ii- La valeur $\Delta\delta$ entre le composé endogène de référence (CER) [par exemple A ou le prégnandiol (PD)] et la 19-NA, $\Delta\delta = \delta_{\text{CER}} - \delta_{19\text{-NA}}$, est supérieure à 3‰, et

iii- L'incertitude standard combinée (u_c) associée à la détermination des valeurs $\delta^{13}\text{C}$, telle qu'elle a été estimée par le laboratoire lors de la validation de la méthode GC/C/IRMS, n'est pas supérieure à 1,0‰ ($u_{c\text{Max}}$).

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n° :	TD2015NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

De surcroît, un laboratoire peut effectuer une analyse GC/C/IRMS pour la 19-NA sur des *échantillons* lorsque les concentrations de 19-NA sont inférieures à la LD, après consultation de l'autorité chargée des *contrôles*, ou sur demande de l'autorité chargée des *contrôles* ou de l'AMA.

Les laboratoires qui n'ont pas la capacité analytique d'effectuer l'analyse GC/C/IRMS pour la 19-NA doivent faire analyser l'*échantillon* par un autre laboratoire ayant cette capacité.

2.3 Procédure de confirmation de l'échantillon « B »

- Les procédures de confirmation d'échantillons « B » pour les *échantillons* d'hommes et de femmes non enceintes nécessitent seulement l'identification et la quantification (pour les *échantillons* aux concentrations de 19-NA inférieures ou égales à 15 ng/mL) de la 19-NA signalée.
- Pour les femmes enceintes aux valeurs urinaires de 19-NA supérieures à 15 ng/mL², la procédure de confirmation de l'échantillon « B » nécessite l'analyse par GC/C/IRMS, y compris la confirmation de l'identité du pic de la 19-NA.

3.0 Interprétation

3.1 Seuil ajusté

Si et seulement si un *échantillon* d'urine a une gravité spécifique (GS, mesurée au laboratoire) supérieure à 1,020, le seuil (S) doit être ajusté pour prendre en compte la GS de l'*échantillon* à l'aide de la formule suivante :

$$S_{\text{ajusté}} = [(GS_{\text{échantillon}} - 1) / (1,020 - 1)] \times S$$

3.2 Limite de décision pour la 19-NA

La LD, établie pour la 19-NA, est publiée dans le TDDL [1]. Si la GS est supérieure à 1,020, la LD doit être calculée pour le résultat individuel à la 19-NA à partir du S ajusté en fonction de la GS, en conformité avec le TDDL [1]. Par conséquent, la LD ajustée doit être utilisée pour déterminer si un *résultat d'analyse atypique* va être rapporté pour l'*échantillon* et celle-ci doit être incluse dans le rapport d'analyse du laboratoire.

² En cas de grossesse, quand la concentration de 19-NA mesurée dans un *échantillon* d'urine est entre la LD et 15 ng/mL, l'analyse IRMS peut également être effectuée pour vérifier l'origine endogène de la 19-NA.

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n° :	TD2015NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

4.0 Rapports

Le laboratoire doit signaler les résultats à la 19-NA pour les *échantillons* d'urine provenant d'hommes ou de femmes contenant une concentration supérieure à la LD (voir sections 3.1 et 3.2 ci-dessus) dans les conditions ci-après :

A. *Échantillons* de femmes enceintes :

- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA supérieures à 15 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) ne sont pas cohérents avec une origine endogène de la 19-NA détectée doivent être signalés comme *résultat d'analyse anormal* à la 19-NA³. Les résultats de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse⁴.
- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA supérieures à 15 ng/mL, pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) sont cohérents avec une origine endogène de la 19-NA détectée et dans lesquels aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée doivent être signalés comme « aucune détection de *substance* ou *méthode interdite* recherchée ».
- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA égales ou inférieures à 15 ng/mL et dans lesquels aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée doivent être signalés comme « aucune détection de *substance* ou *méthode interdite* recherchée ». Toutefois, si une analyse GC/C/IRMS (voir note de bas de page 2 à la section 2.2 ci-dessus) est effectuée sur un tel *échantillon* et si ses résultats ne sont pas cohérents avec une origine endogène de la 19-NA détectée, l'*échantillon* doit être signalé comme *résultat*

³ Les concentrations de 19-NA signalées doivent être exprimées de la façon suivante :

- Quand la concentration de 19-NA est supérieure à 15 ng/mL, aucune quantification n'est exigée lors de la procédure de confirmation. Une calibration à un seul point à 15 ng/mL est suffisante. La concentration estimée doit être exprimée comme « >15 ng/mL » sans qu'il soit nécessaire de signaler la valeur estimée.

- Quand la concentration de 19-NA est entre la LD et 15 ng/mL, une quantification est exigée lors de la procédure de confirmation. La valeur confirmée doit être exprimée comme concentration moyenne de déterminations en triplicata, avec au plus deux chiffres significatifs (un résultat entre 2 et 10 serait signalé, par exemple, comme « 5,1 ng/mL ». Un résultat entre 10 et 15 serait signalé comme « 13 ng/mL »).

Quoi qu'il en soit, conformément au TDDL [1], le laboratoire doit signaler la LD pour la 19-NA et l'incertitude-type combinée (u_c) estimée par le laboratoire à la limite du seuil.

⁴ Le rapport d'analyse GC/C/IRMS doit inclure un commentaire indiquant que les résultats GC/C/IRMS sont cohérents avec une origine exogène de la 19-NA, avec les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ de la 19-NA et du CER ainsi qu'avec l' u_c exprimée en unités.

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n° :	TD2015NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

d'analyse anormal à la 19-NA³. Les résultats de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse⁴.

Dans tous ces cas, il ne sera pas fait mention de l'état de grossesse de la *sportive*.

B. *Échantillons* de femmes qui prennent de la noréthistérone :

- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA supérieures à 10 ng/mL doivent être signalés comme *résultat atypique* à la 19-NA³. Un commentaire doit être ajouté au rapport d'analyse, décrivant le résultat à la 19-NA ainsi que le résultat qui démontre l'usage de la noréthistérone (par exemple « la 19-norandrostérone (19-NA) a été détectée dans l'*échantillon* à la concentration X³. La tétrahydronoréthistérone, un *métabolite* de la noréthistérone, a également été détectée dans l'*échantillon* ») ;
- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA égales ou inférieures à 10 ng/mL et dans lesquels aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée doivent être signalés comme « aucune détection de *substance* ou *méthode interdite* recherchée » sans plus de commentaire (il ne doit pas être fait mention de l'usage de la noréthistérone).

C. *Échantillons* d'hommes ou de femmes (non compris dans les sections A. ou B.) :

- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA supérieures à 10 ng/mL doivent être signalés comme *résultat d'analyse anormal* pour la 19-NA³. Pour les femmes, un commentaire doit être ajouté, expliquant que des tests de grossesse et pour la noréthistérone ont été effectués et que les résultats ne sont pas cohérents avec l'une ou l'autre de ces conditions (par exemple « la détection de la 19-NA n'est pas cohérente avec une grossesse ou la prise de noréthistérone »).
- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA égales ou inférieures à 10 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) ne sont pas cohérents avec une origine endogène de la 19-NA détectée doivent être signalés comme *résultat d'analyse anormal* à la 19-NA^{3, 5} et les résultats de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse⁴.
- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA égales ou inférieures à 10 ng/mL, pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) sont cohérents avec une origine endogène de la 19-NA détectée et dans lesquels aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée doivent être signalés comme « aucune détection de *substance* ou *méthode interdite* recherchée ». Un

⁵ Un résultat positif à l'analyse GC/C/IRMS constitue la preuve de l'origine exogène de la 19-NA détectée, quelle que soit la concentration de 19-NA dans l'*échantillon*. Un résultat GC/C/IRMS positif est valable même si la concentration de 19-NA dans l'*échantillon* est inférieure à la LD.

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n° :	TD2015NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

commentaire doit être ajouté, décrivant le résultat à la 19-NA et expliquant que le résultat de l'analyse GC/C/IRMS est cohérent avec la production endogène de 19-NA (par exemple « *la 19-norandrostérone (19-NA) a été détectée dans l'échantillon à la concentration X^3 et les résultats de l'analyse GC/C/IRMS indiquent que le résultat à la 19-NA peut être cohérent avec une production endogène* »).

- Les *échantillons* contenant des concentrations de 19-NA situées entre la LD et 10 ng/mL et pour lesquels l'analyse GC/C/IRMS obligatoire (voir section 2.2 ci-dessus) n'est pas concluante doivent être signalés comme des *résultats atypiques* pour la 19-NA³. Un commentaire doit être ajouté, décrivant le résultat à la 19-NA et expliquant que l'analyse GC/C/IRMS n'était pas concluante (par exemple en raison de la présence de composés interférents ou de tout autre facteur empêchant une mesure GC/C/IRMS fiable). Les résultats de l'analyse GC/C/IRMS seront inclus dans le rapport d'analyse⁶.

5.0 Références

1. Document technique TDDL de l'AMA: limites de décision pour la quantification confirmatoire des substances de seuil.
[https://www.wada-ama.org/fr/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A30](https://www.wada-ama.org/fr/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A30)
2. Document technique TDIDCR de l'AMA: critères minimaux pour la confirmation par chromatographie-spectrométrie de masse de l'identité des analytes à des fins de contrôle du dopage.
[https://www.wada-ama.org/fr/ressources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A30](https://www.wada-ama.org/fr/ressources/search?f[0]=field_resource_collections%3A30)
3. Grosse J, Anielski P, Hemmersbach P, Lund H, Mueller RK, Rautenberg C, Thieme D. Formation of 19-norsteroids by *in situ* demethylations of endogenous steroids in stored urine samples. *Steroids* 2005; 70: 499-506.
4. Hebestreit M, Flenker U, Fuschöller G, Geyer H, Güntner U, Mareck U, Piper T, Thevis M, Ayotte C, Schänzer W. Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry. *Analyst* 2006; 131:1021-6.
5. Walker CJ, Cowan DA, James VHT, Lau JCY, Kicman AT. Doping in sport—1. Excretion of 19-norandrosterone by healthy women, including those using contraceptives containing norethisterone. *Steroids* 2009; 74: 329-35.
6. Guay C, Goudreault D, Schänzer W, Flenker U, Ayotte C. Excretion of norsteroids' phase II metabolites of different origin in human. *Steroids* 2009; 74: 350-8.

⁶ Le rapport d'analyse GC/C/IRMS doit inclure un commentaire indiquant le caractère non concluant de l'analyse GC/C/IRMS, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ pour la 19-NA et le CER ainsi que les u_c associées exprimées en unités.

Document technique de l'AMA – TD2015NA-FR

Document n° :	TD2015NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} septembre 2015

Annexe A – Diagramme pour les résultats à la 19-NA

