

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

Stéroïdes anabolisants androgéniques endogènes Mesures et rapports

1.0 Introduction

Le présent Document technique (DT) a pour but d'harmoniser les approches relatives aux mesures et aux rapports des stéroïdes anabolisants androgènes endogènes (SAAE) dans l'urine, y compris les données soutenant le module stéroïdien du Passeport biologique de l'athlète (PBA) ou « profil stéroïdien ».

Les concentrations de SAAE et leurs rapports forment le « profil stéroïdien » urinaire qui peut être modifié par suite de l'administration de formes synthétiques de SAAE, notamment de testostérone (T), de ses précurseurs [par exemple l'androsténediol, l'androsténédione et la prastérone (déhydroépiandrostérone ou DHEA)], ou de ses *métabolites* actifs [dihydrotestostérone (DHT)], ainsi que de l'épitestostérone (E).

Le module stéroïdien du PBA utilise le modèle adaptatif pour identifier un résultat de passeport atypique (RPA), qui déclenche la réalisation de procédures de confirmation. Il sert également à appliquer des *contrôles* ciblés intelligents envers le *sportif* sur une base longitudinale. De plus, un « profil stéroïdien » anormal (obtenu à partir d'un seul *échantillon* d'urine) ou un « profil stéroïdien longitudinal » atypique (comprenant des valeurs obtenues à partir d'une série de « profils stéroïdiens » recueillies pendant un certain temps) peut être un moyen de poursuivre une violation des règles antidopage (VRA).

Les *contrôles* et les rapports de SAAE suivent une procédure en deux temps: une procédure d'analyse initiale vise à estimer le « profil stéroïdien » dans l'*échantillon* du *sportif*. Une procédure de confirmation ultérieure est effectuée lorsque le « profil stéroïdien » estimé constitue un RPA, tel que déterminé par le modèle adaptatif, ou représente un résultat de « profil stéroïdien suspect » (PSS).

La procédure de confirmation inclut la quantification des *marqueurs* du « profil stéroïdien » telle que décrite dans le présent DT ainsi que l'analyse par chromatographie gazeuse – combustion – spectrométrie de masse des rapports isotopiques (GC-C-IRMS) qui est étudiée dans un DT distinct (TDIRMS) [1].

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

1.1 Le « profil stéroïdien »

Chaque *échantillon* d'urine doit être analysé en vue de déterminer son « profil stéroïdien ».

Aux fins du présent DT, le « profil stéroïdien » est composé des *marqueurs* suivants (en tant que contenu stéroïdien libre obtenu à partir de la fraction stéroïdienne libre plus ceux libérés par la fraction conjuguée après hydrolyse par glucuronidase- β à partir de *E.coli*):

- androstérone (A),
- étiocholanolone (Etio),
- 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol),
- 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol),
- testostérone (T),
- épitestostérone (E),

ainsi que les ratios suivants :

- ratio de la testostérone à l'épitestostérone (T/E),
- ratio de l'androstérone à la testostérone (A/T),
- ratio de l'androstérone à l'étiocholanolone (A/Etio),
- ratio de 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol à 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol/5 β Adiol),
- ratio de 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol à l'épitestostérone (5 β Adiol/E).

L'administration de SAAE peut modifier un ou plusieurs des *marqueurs* et/ou ratios du « profil stéroïdien » urinaire, entraînant une hausse ou une baisse des concentrations et/ou des ratios de paires spécifiques de *métabolites* stéroïdiens [2-4].

En outre, la modification du « profil stéroïdien » urinaire peut être due à un certain nombre de raisons, notamment, mais pas uniquement:

- l'administration d'autres stéroïdes anabolisants (par ex. stanozolol),
- l'administration de gonadotrophine chorionique humaine (hCG) chez les hommes,
- l'administration d'inhibiteurs de la 5 α -réductase (par ex. finastéride),
- une importante consommation d'alcool (éthanol),

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- l'administration de kétoconazole ou d'autres composés similaires ;
l'utilisation d'agents masquants (par ex.. probénécide), ou
- la croissance microbienne.

2.0 Procédure d'analyse initiale

Dans la procédure d'analyse initiale, le laboratoire doit utiliser une méthode validée dans l'urine qui convient pour estimer les *marqueurs* du « profil stéroïdien » dans la plage de valeurs déterminée chez les hommes et les femmes.

La procédure d'analyse initiale est réalisée sur une seule partie aliquote.

2.1 Caractéristiques de la méthode

- Il convient d'utiliser la chromatographie gazeuse combinée à la spectrométrie de masse (GC-MS ou GC-MS/MS) des dérivés TMS (groupes kéto et hydroxyle).
- Les normes de calibration ou une courbe de calibration doivent être incluses dans chaque séquence de l'analyse.
- Au moins deux *échantillons* de contrôle de qualité d'urine (CQ) contenant des concentrations représentatives basses et élevées des *marqueurs* du « profil stéroïdien » doivent être inclus dans chaque séquence de l'analyse.
- L'hydrolyse enzymatique doit être effectuée avec de la β -glucuronidase purifiée d'*E. coli* (les mélanges de *H. pomatia* ne sont pas acceptables).
- L'intégralité de l'hydrolyse des stéroïdes urinaires glucuroconjugués doit être vérifiée avec du A-glucuronide marqué par isotopes (ou une alternative équivalente scientifiquement reconnue).
- L'intégralité de l'opération de dérivation doit être vérifiée par le contrôle des dérivés mono-O-TMS c/ di-O-TMS de A.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- Si nécessaire, le volume¹ de la partie aliquote de l'*échantillon* peut être ajusté en fonction de sa gravité spécifique (GS) et du sexe du *sportif*.
- Les ratios T/E doivent être déterminés à partir des ratios des aires de pics chromatographiques ou des hauteurs de pics corrigées².
- La linéarité de la méthode, établie durant la validation de la méthode, doit couvrir les plages de concentration de *marqueurs* normalement constatées chez les hommes et les femmes – la limite de quantification (LQ) pour T et E ne doit pas dépasser 2 ng/mL³.
- L'incertitude de mesure combinée standard relative [$u_c(\%)$] pour la détermination de A, Etio, 5 α Adiol, 5 β Adiol, T et E, telle qu'estimée durant la validation de la méthode de la procédure d'analyse initiale, ne doit pas dépasser 30% à la LQ respective;
 - Pour des valeurs de concentration à cinq fois la LQ, l' $u_c(\%)$ ne doit pas dépasser 20% pour A et Etio ou 25% pour les Adiol;
 - L' $u_c(\%)$ pour les déterminations de T et E ne doit pas dépasser 20% lorsque les concentrations de stéroïdes sont supérieures à 5 ng/mL;
 - L' $u_c(\%)$ pour les déterminations des ratios T/E calculés à partir des aires de pics ou des hauteurs de pics chromatographique corrigées ne doit pas dépasser 15% lorsque les concentrations de T et E sont supérieures à 5 ng/mL; pour des concentrations de T ou E inférieures, l' $u_c(\%)$ pour les déterminations T/E ne doit pas dépasser 30%.

¹ Des niveaux bien plus faibles de T et E sont généralement présents dans les *échantillons* féminins ainsi que dans les *échantillons* à faible GS; c'est pourquoi des volumes plus importants de parties aliquotes peuvent être nécessaires pour une mesure fiable.

² Rapports de hauteurs de pics ou des aires de pics T et E corrigées par rapport à un calibre ou à une courbe de calibration (même masse ou même transition d'ions examinée pour les deux stéroïdes).

³ La LQ doit être déterminée comme la concentration la plus faible pouvant être mesurée avec le critère d'incertitude établi pour le *marqueur* donné du « profil stéroïdien » en appliquant la procédure d'analyse initiale.

La LQ pour T, E, A, Etio, 5 α Adiol et 5 β Adiol doit être signalée une fois dans *ADAMS* par le laboratoire. Les valeurs LQ doivent être actualisées dans *ADAMS* chaque fois qu'un changement significatif est apporté à la méthode d'analyse.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- La preuve d'une dégradation microbienne [par ex. présence de 5 α -androstanedione (5 α -AND) et de 5 β -androstanedione (5 β -AND)] et la présence d'inhibiteurs de la 5 α -réductase (par ex. finastéride), des *métabolites* de l'éthanol ainsi que de la kétoconazole (et des substances similaires) doivent être contrôlées.

2.2. Rapport de « profil stéroïdien » à partir de la procédure d'analyse initiale

A l'issue de la procédure d'analyse initiale, le laboratoire doit signaler dans *ADAMS* le « profil stéroïdien » de l'échantillon, y compris :

- la GS de l'échantillon,
- les concentrations de T, E (voir tableau 1), A, Etio, 5 α Adiol and 5 β Adiol (sans ajustement pour la GS de l'échantillon)^{4, 5},
- le ratio T/E (voir tableau 1)⁶,
- les résultats du dépistage pour des signes de contamination microbienne (par ex. ratio de 5 α -androstanedione à l'androstérone -

⁴ En signalant le « profil stéroïdien » dans *ADAMS*, le laboratoire doit signaler les valeurs des concentrations de T, E, A, Etio, 5 α Adiol et 5 β Adiol, ainsi que le ratio T/E tel que mesurés (sans correction pour la GS de l'urine ni correction à un nombre spécifique de chiffres significatifs). Une correction automatique des valeurs signalées à 2 chiffres significatifs sera apportée dans *ADAMS* si l'on applique le modèle adaptatif du PBA au « profil stéroïdien longitudinal » du *sportif*.

⁵ Toute concentration mesurée au-dessous de la LQ doit être signalée comme « -1 » par le laboratoire. Lorsque le signal de pic chromatographique pour E ne peut pas être détecté (en d'autres termes est inférieur au seuil de détection de l'essai), la concentration de E sera signalée comme « -2 » (voir tableau 1).

⁶ Dans *ADAMS*, les valeurs des quatre autres ratios (A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol et 5 α Adiol/E) sont automatiquement calculées après le signalement du « profil stéroïdien » par le laboratoire.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- $5\alpha\text{AND}/A$, ratio de 5β -androstanedione à l'étiocolanone - $5\beta\text{AND}/\text{Etio}$)⁷,
- la présence ou l'absence dans l'échantillon de substances susceptibles d'altérer le « profil stéroïdien »⁷, et
 - la validité du « profil stéroïdien » de l'échantillon doit être signalée sous forme de « oui » ou « non ».

Dans les cas où le laboratoire analyse deux (2) *échantillons* ou plus qui sont reliés à une seule phase de prélèvement d'*échantillons* venant du même *sportif*, le laboratoire signalera le « profil stéroïdien » de chacun des *échantillons* analysés.

Si, comme déterminé durant la procédure d'analyse initiale, aucune *substance* ou *méthode interdite* n'est détectée dans l'échantillon, le laboratoire signalera le « profil stéroïdien » de l'échantillon dans *ADAMS* tout en indiquant pour les résultats d'analyse la mention « il n'a été détecté aucune *substance* ni *métabolite* ni *marqueur* d'une *méthode interdite* figurant sur le menu d'analyse ».

Si, en revanche, le laboratoire confirme la présence d'une *substance* ou *méthode interdite*, le laboratoire continuera à signaler le « profil stéroïdien » de l'échantillon dans *ADAMS* comme déterminé durant la procédure d'analyse initiale, tout en rapportant l'échantillon comme un *résultat d'analyse anormal* (ou un *résultat atypique*, selon le cas) pour la *substance* ou la *méthode interdite* détectée.

2.2.1 Validité (du « profil stéroïdien ») de l'échantillon

La validité de l'échantillon doit être signalée dans *ADAMS* sous forme de « oui » ou de « non ».

Le laboratoire signalera la validité de l'échantillon comme :

- a) « **Non** » : **uniquement si l'échantillon présente des signes de dégradation importante**, tels que déterminés par :

⁷ Un *échantillon* qui présente des signes de dégradation microbienne ou qui contient l'une (quelconque) des substances susceptibles de provoquer une altération du « profil stéroïdien » peut ne pas convenir pour être inclus dans le « profil stéroïdien longitudinal ». Ces résultats doivent être examinés par l'unité de gestion du passeport de l'athlète (UGPA) durant le processus de gestion des résultats au moment d'évaluer les données d'analyse pour l'échantillon et d'évaluer les états pathologiques ou confondants susceptibles d'avoir eu une incidence sur les résultats d'analyse du *sportif*.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- $5\alpha\text{AND}/A \geq 0,1$ et/ou $5\beta\text{AND}/\text{Etio} \geq 0,1$.

b) « **Oui** » : **dans toutes les autres situations**, notamment :

- Lorsque la concentration de T et/ou de E est inférieure à la LQ du laboratoire, mais que son signal de pic chromatographique reste mesurable et que le ratio T/E peut être déterminé à partir des aires de pics chromatographiques ou des hauteurs de pics corrigées². La valeur calculée du ratio T/E sera rapportée dans *ADAMS* alors que la concentration de T et/ou de E, le cas échéant, sera rapportée comme « -1 » (tableau 1)⁵.
- Lorsque le ratio T/E ne peut pas être déterminé à partir des ratios des aires de pics chromatographiques ou des hauteurs de pics corrigées² du fait que le signal de pic chromatographique pour T et/ou pour E n'est pas détectable (en d'autres termes est inférieur à la limite de détection de l'essai)⁸ :
 - si le signal de pic chromatographique pour T ne peut pas être détecté, la concentration de T et la valeur T/E seront rapportées comme « -1 » (tableau 1). Un commentaire doit être inclus dans le rapport d'analyse dans *ADAMS* pour indiquer que le ratio T/E n'a pas pu être mesuré du fait que la concentration de T était inférieure au seuil de détection de l'essai ;
 - si le signal de pic chromatographique pour E ne peut pas être détecté, la concentration de E sera rapportée comme « -2 » et le ratio T/E sera calculé sur la base de la valeur LQ du laboratoire pour E (par ex. si la concentration de T est de 6 ng/mL alors que E ne peut pas être détecté, et que la LQ du laboratoire pour E est de 1,5 ng/mL, le ratio T/E sera rapporté comme 4,0) (tableau 1). Un commentaire doit être inclus dans le rapport d'analyse dans *ADAMS* pour indiquer que le ratio T/E n'a pas pu être mesuré avec précision du fait que la concentration de E était inférieure au seuil de détection de l'essai ;

⁸ Lorsque la mesure d'un *marqueur* du « profil stéroïdien » n'est pas possible, par exemple, pour cause de dilution, d'interférences de matrice inhabituelles, d'inhibition de l'hydrolyse enzymatique ou de dérivation incomplète, le laboratoire doit répéter l'analyse avec une procédure alternative et validée de préparation de l'*échantillon* (par ex. extraction en phase solide, extraction avec un solvant différent ou autre procédure équivalente).

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- si les signaux de pics chromatographiques pour T et pour E ne peuvent pas être détectés, la concentration de T et la valeur T/E seront rapportées comme « -1 », alors que la concentration de E sera rapportée comme « -2 » (tableau 1). Un commentaire doit être inclus dans le rapport d'analyse dans *ADAMS* pour indiquer que le ratio T/E n'a pas pu être mesuré du fait que les concentrations de T et de E étaient inférieures au seuil de détection de l'essai.
- Lorsque d'autres *marqueurs* du « profil stéroïdien » ne peuvent pas être mesurés avec précision (notamment concentrations inférieures à la LQ de l'essai)⁸. Dans de tels cas, la concentration du ou des *marqueur(s)* affecté(s) négativement sera rapportée comme « -1 »⁵ alors que la validité de l'*échantillon* sera rapportée comme « oui ».
- Une contamination microbienne moins importante sera rapportée dans *ADAMS*, alors que la validité de l'*échantillon* sera rapportée comme « oui » :
 - ratio 5α AND/A et/ou entre 0,05 et 0,1,
 - ratio 5β AND/Etio entre 0,05 et 0,1.
- Lorsque le laboratoire signale un *résultat d'analyse anormal* ou un *résultat atypique* pour une *substance interdite* susceptible d'altérer le « profil stéroïdien » (par ex. un stéroïde anabolisant, l'hormone hCG chez les hommes, un diurétique ou un agent masquant)⁷.
- Lorsque le laboratoire détecte la présence dans l'*échantillon* d'autres substances susceptibles de provoquer une altération du « profil stéroïdien »^{7, 9}.

⁹ Il est obligatoire que le laboratoire analyse au moins la présence de *métabolites* conjugués de l'éthanol par ex. l'éthanol glucuronide (EtG), des inhibiteurs de la 5α réductase et du kétoconazole durant la procédure d'analyse initiale et rapporte la concentration estimée d'EtG si elle dépasse 5 µg/mL (sans qu'il soit nécessaire de rapporter l'incertitude de mesure). De plus, l'analyse de ces substances doit également être incluse dans la procédure de confirmation des résultats de « profil stéroïdien » atypiques ou suspects.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

Tableau 1. Résumé des conditions à remplir pour rapporter des concentrations T et E et le ratio T/E.

Concentration de T	Concentration de E	Ratio T/E
Signal de pic chromatographique de T mesuré à la LQ ou au-dessus. $[T] \geq LQ_{(T)}$ Rapporter T telle que mesurée	Signal de pic chromatographique de E mesuré à la LQ ou au-dessus $[E] \geq LQ_{(E)}$ Rapporter E telle que mesurée	Rapporter T/E comme déterminé à partir des hauteurs/aires de pics corrigées
	Signal de pic chromatographique de E détecté, mais inférieur à la LQ $LD(E) \leq [E] < LQ_{(E)}$ Rapporter E comme « -1 »	
	Signal de pic chromatographique de E non détecté. $[E] < LD_{(E)}$ Rapporter E comme « -2 »	Rapporter T/E comme T/LQ_(E) <i>Remarque dans le rapport d'analyse :</i> Le ratio T/E n'a pas pu être mesuré avec précision du fait que la concentration de E était inférieure au seuil de détection de l'essai
Signal de pic chromatographique de T détecté, mais inférieur à la LQ. $LD_{(T)} \leq [T] < LQ_{(T)}$ Rapporter T comme « -1 »	Signal de pic chromatographique de E mesuré à la LQ ou au-dessus. $[E] \geq LQ_{(E)}$ Rapporter E telle que mesurée	Rapporter T/E comme déterminé à partir des hauteurs/aires de pics corrigées
	Signal de pic chromatographique de E détecté, mais inférieur à la LQ $LD(E) \leq [E] < LQ_{(E)}$ Rapporter E comme « -1 »	
	Signal de pic	Rapporter T/E comme « - »

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

	<p>chromatographique de E non détecté.</p> <p>$[E] < LD_{(E)}$</p> <p>Rapporter E comme « -2 »</p>	<p>1 »</p> <p><i>Remarque dans le rapport d'analyse :</i></p> <p>Le ratio T/E n'a pas pu être mesuré avec précision du fait que les concentrations de T et de E n'ont pas pu être mesurées</p>
<p>Signal de pic chromatographique de T non détecté.</p> <p>$[T] < LD_{(T)}$</p> <p>Rapporter T comme « -1 »</p>	<p>Signal de pic chromatographique de E mesuré à la LQ ou au-dessus</p> <p>$[E] \geq LQ_{(E)}$</p> <p>Rapporter E telle que mesurée</p>	<p>Rapporter T/E comme « -1 »</p> <p><i>Remarque dans le rapport d'analyse :</i></p> <p>Le ratio T/E n'a pas pu être mesuré avec précision du fait que la concentration de T était inférieure au seuil de détection de l'essai</p>
	<p>Signal de pic chromatographique de E détecté, mais inférieur à la LQ</p> <p>$LD_{(E)} \leq [E] < LQ_{(E)}$</p> <p>Rapporter E comme « -1 »</p>	<p>Rapporter T/E comme « -1 »</p> <p><i>Remarque dans le rapport d'analyse :</i></p> <p>Le ratio T/E n'a pas pu être mesuré avec précision du fait que les concentrations de T et de E n'ont pas pu être mesurées</p>
	<p>Signal de pic chromatographique de E non détecté.</p> <p>$[E] < LD_{(E)}$</p> <p>Rapporter E comme « -2 »</p>	<p>Rapporter T/E comme « -1 »</p> <p><i>Remarque dans le rapport d'analyse :</i></p> <p>Le ratio T/E n'a pas pu être mesuré avec précision du fait que les concentrations de T et de E étaient inférieures au seuil de détection de l'essai</p>

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

3.0 Procédure de confirmation

Les procédures de confirmation pour l'administration exogène de SAAE incluent la quantification par GC-MS ou GC-MS/MS et les analyses GC-C-IRMS du ou des *marqueur(s)* pertinent(s) du « profil stéroïdien ». Les analyses GC-C-IRMS sont examinées dans un Document technique distinct, le TDIRMS [1].

« Demande de procédure de confirmation pour RPA »

Après que le laboratoire a rapporté le « profil stéroïdien » de l'échantillon dans ADAMS, le modèle adaptatif génère une notification « demande de procédure de confirmation pour RPA » lorsque les critères suivants sont remplis:

- 1) l'échantillon est apparié à un formulaire de contrôle du dopage (FCD) dans ADAMS, ce qui permet l'inclusion automatique du « profil stéroïdien » de l'échantillon dans le passeport stéroïdien du sportif,
 - 2) il existe déjà un « profil stéroïdien longitudinal » du sportif dans ADAMS,
 - 3) le rapport T/E de l'échantillon est anormal, tel que déterminé par le modèle adaptatif, si on le compare aux valeurs T/E longitudinales précédentes du sportif.
- À réception de la notification « demande de procédure de confirmation pour RPA » pour un ratio T/E anormal par le biais d'ADAMS, le laboratoire confirmera T, E¹⁰ et le ratio T/E par GC-MS ou GC-MS/MS et analysera les *marqueurs* du « profil stéroïdien » par GC-C-IRMS (se reporter au TDIRMS [1]).
 - Le modèle adaptatif déterminera également les valeurs anormales des autres ratios du « profil stéroïdien » (A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol, 5 α Adiol/E). Cependant, dans de tels cas, le laboratoire ne recevra pas une notification automatique « demande de procédure de confirmation pour RPA » par le biais d'ADAMS. A la place, l'unité de gestion du passeport de l'athlète (UGPA) indiquera à l'autorité de contrôle si l'échantillon doit être soumis à des procédures de confirmation. C'est pourquoi, dans de tels cas, le laboratoire recevra une demande de

¹⁰ Pour les valeurs T/E, seul T doit être confirmé si les niveaux de concentration de E ou le volume de l'échantillon ne sont pas suffisants.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

l'autorité de contrôle avant de réaliser la ou les procédure(s) de confirmation¹¹.

« Demande de procédure de confirmation pour profil stéroïdien suspect »

Le laboratoire reçoit une notification automatique « demande de procédure de confirmation pour profil stéroïdien suspect » par le biais d'ADAMS si:

- 1) *l'échantillon* est apparié à un FCD dans ADAMS, mais il n'existe aucun « profil stéroïdien longitudinal » du *sportif* dans ADAMS (en d'autres termes, il s'agit du premier *échantillon* dans le passeport stéroïdien du *sportif*), ou
l'échantillon ne peut pas être apparié à un FCD dans ADAMS dans les quatorze (14) jours civils suivant la réception de *l'échantillon* par le laboratoire, de sorte que le « profil stéroïdien » de *l'échantillon* ne peut pas être traité par le modèle adaptatif dans ADAMS,
et
- 2) le « profil stéroïdien » de *l'échantillon* remplit **l'un quelconque** des critères suivants:
 - rapport T/E (calculé à partir des aires de pics ou des hauteurs de pics chromatographiques corrigées) supérieur à 4,0,
 - rapport A/T inférieur à 20,
 - rapport 5 α Adiol/5 β Adiol supérieur à 2,4,
 - concentration de T ou de E (ajustée pour la GS¹²) supérieure à 200 ng/mL chez les hommes ou supérieure à 50 ng/mL chez les femmes,
 - concentration de A ou d'Etio (ajustée pour la GS¹²) supérieure à 10.000 ng/mL,
 - concentration de 5 α Adiol (ajustée pour la GS¹²) supérieure à 250 ng/mL chez les hommes ou supérieure à 150 ng/mL chez les femmes, combinée à un rapport 5 α Adiol/E supérieur à 10 chez les hommes ou chez les femmes.

¹¹ Ou conformément à l'accord conclu entre le laboratoire et l'autorité de contrôle.

¹² Les concentrations sont ajustées à une GS d'urine de 1,020 sur la base de l'équation suivante (stéroïdes libres et hydrolysés glucuroconjugués)

$$\text{Conc}_{\text{corr}} = \text{Conc}_{\text{mesurée}} * (1,020 - 1)/(GS - 1)$$

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- À réception de la notification « demande de procédure de confirmation pour profil stéroïdien suspect », le laboratoire doit procéder à la ou aux procédure(s) de confirmation sauf si, une fois contactée, l'autorité de contrôle justifie par écrit dans les 7 jours civils que la ou les procédure(s) de confirmation n'est/ne sont pas nécessaire(s). La justification de la non réalisation de la procédure de confirmation peut inclure, par exemple, un ratio T/E naturellement élevé confirmé par des analyses précédentes, ou un ratio T/E situé entre 4,0 et 6,0 pour la première analyse relative au *sportif*.
- Si l'autorité de contrôle justifie que la confirmation n'est pas nécessaire, le laboratoire actualisera le rapport *ADAMS* pour l'*échantillon* avec une remarque indiquant que l'autorité de contrôle a estimé que la ou les procédure(s) de confirmation n'étai(en)t pas nécessaire(s), en joignant l'explication donnée par l'autorité de contrôle. Si l'autorité de contrôle ne peut pas justifier que la confirmation n'est pas nécessaire, le laboratoire procèdera aux analyses de confirmation.
- Dans les cas où le laboratoire reçoit des « demandes de procédure de confirmation pour *RPA* » ou des « demandes de procédure de confirmation pour profil stéroïdien suspect » pour deux (2) *échantillons* ou plus, en relation avec une seule phase de prélèvement d'*échantillons* venant du même *sportif*, le laboratoire, en consultation avec l'autorité de contrôle, donnera la priorité à la confirmation de l'*échantillon* présentant les niveaux de concentration les plus élevés des *marqueurs* du « profil stéroïdien ».
- Lorsque le laboratoire reçoit une « demande de procédure de confirmation pour *RPA* » ou une « demande de procédure de confirmation pour profil stéroïdien suspect » pour un *échantillon* pour lequel un ou plusieurs *résultat(s) d'analyse anormal/anormaux* a/ont été rapporté(s) pour d'autres *substances* ou *méthodes interdites*, le laboratoire consultera l'autorité de contrôle à propos de la nécessité de réaliser les procédures de confirmation pour les *marqueurs* du « profil stéroïdien ».
- Un laboratoire peut avoir conclu un accord contractuel avec l'autorité de contrôle en vue de réaliser des procédures de confirmation

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

lorsqu'un *échantillon* remplit l'un quelconque des critères d'analyse d'un « profil stéroïdien suspect » ou à la libre appréciation du laboratoire en fonction de son expertise.

Dans de telles circonstances, le laboratoire peut procéder à la confirmation du « profil stéroïdien suspect » immédiatement sans attendre une « demande de procédure de confirmation pour RPA » ou une « demande de procédure de confirmation pour PSS » de la part d'ADAMS. Après avoir réalisé la ou les procédure(s) de confirmation, le laboratoire rapportera dans ADAMS le « profil stéroïdien » de l'échantillon tel que déterminé durant la procédure d'analyse initiale ainsi que les valeurs confirmées des *marqueurs* du « profil stéroïdien » et les résultats des analyses GC-C-IRMS. Par ailleurs, le laboratoire rapportera le résultat d'analyse de l'échantillon dans ADAMS (en tant que *résultat d'analyse anormal*, *résultat atypique* ou « il n'a été détecté aucune *substance interdite* ou de *métabolite* ou de *marqueur d'une méthode interdite* figurant au menu d'analyse ») sur la base des résultats de la procédure de confirmation GC-C-IRMS conformément au TDIRMS [1]).

3.1 Procédure de confirmation de quantification par GC-MS ou GC-MS/MS

Le laboratoire doit identifier (conformément au TDIDCR [5]) et quantifier les *marqueurs* pertinents d'un RPA ou d'un résultat de profil stéroïdien suspect dans une partie aliquote supplémentaire d'un *échantillon* par une méthode de quantification validée GC-MS ou GC-MS/MS adaptée à l'usage prévu.

- Le laboratoire doit confirmer les *marqueurs* anormaux (concentrations, T/E) du « profil stéroïdien » qui a déclenché le RPA ou le résultat de profil stéroïdien suspect avant de procéder à l'analyse GC-C-IRMS^{10, 13}.

¹³ À réception de la notification immédiate « demande de procédure de confirmation pour RPA » pour un ratio T/E anormal par le biais d'ADAMS, le laboratoire confirmera les concentrations de T et de E¹⁰, ainsi que le ratio T/E.

- Dans les cas de résultats anormaux pour d'autres rapports du « profil stéroïdien », le laboratoire confirmera les concentrations pertinentes des *marqueurs* du « profil stéroïdien » sur demande de l'autorité de contrôle¹¹.

Dans les cas de « de demandes de procédure de confirmation pour profil stéroïdien suspect », le laboratoire confirmera les concentrations pertinentes des *marqueurs* du « profil stéroïdien » qui

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- Si l'analyse par GC-C-IRMS doit être effectuée sur un *échantillon* présentant un « profil stéroïdien » normal à la demande de l'autorité de contrôle, de l'unité de gestion du passeport de l'athlète (UGPA) ou de l'AMA, le laboratoire consultera l'autorité compétente afin de déterminer quel(s) *marqueur(s)* du « profil stéroïdien » nécessite(nt) une quantification.

La procédure de confirmation permettra de déterminer la présence de *métabolite(s)* conjugué(s) d'éthanol (par ex. EtG), d'inhibiteurs de la 5 α -réductase (par ex. finastéride), de kétoconazole ainsi que les signes de dégradation microbienne y compris, par exemple, la présence de formes libres de T, 5 α AND ou 5 β AND.

3.1.1 Caractéristiques de la méthode pour la procédure de confirmation de quantification par GC-MS ou GC-MS/MS

Les exigences analytiques applicables sont les mêmes que celles présentées au point 2.1, moyennant les modifications suivantes:

- Les normes de calibration et les échantillons CQ d'urine contenant des niveaux représentatifs des *marqueurs* du « profil stéroïdien » seront inclus.
- L' $u_c(\%)$ ne doit pas être supérieure à 15% pour les déterminations de A, Etio, 5 α Adiol et 5 β Adiol à des concentrations représentant cinq fois la LQ respective.
- Pour les déterminations de T, E et des rapports T/E, l' $u_c(\%)$ ne doit pas être supérieure à 15% lorsque les concentrations de T et E dépassent 5 ng/mL.

3.1.2 Rapport des résultats émanant des procédures de confirmation

A l'issue de la réalisation d'une ou plusieurs procédure(s) de confirmation sur l'*échantillon* « A » ou « B »¹⁴, le laboratoire doit rapporter dans ADAMS :

ont produit le résultat suspect, ainsi que le ratio T/E, s'il est applicable (T/E>4,0), en consultation avec l'autorité de contrôle.

¹⁴ Lorsqu'un *résultat d'analyse anormal* est rapporté pour le(s) *marqueur(s)* du « profil stéroïdien » sur la base des résultats d'une analyse GC/C/IRMS effectuée sur l'*échantillon* « A », seule l'analyse GC-C-IRMS doit être répétée au cours de la procédure de confirmation de l'*échantillon* « B », le cas échéant. Se reporter au TDIRMS [1].

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

- la GS de l'échantillon,
- les valeurs confirmées (par ex. concentrations, ratio T/E) des *marqueurs* du « profil stéroïdien », sans ajustement pour la GS de l'échantillon (tableau 1)^{5,6},
- l' u_c associée exprimée en unités,
- les résultats de confirmation par GC-C-IRMS (se reporter au TDIRMS [1]),
- les résultats confirmés de signes de contamination microbienne (par ex. 5 α AND/A, 5 β AND/Etio, T_{libre}, T_{total}¹⁵),
- la validité de l'échantillon (conformément à la section 2.2.1 ci-dessus)^{15, 16},
- la présence confirmée de *métabolite(s)* conjugués d'éthanol, d'inhibiteurs de la 5 α -réductase (par ex. finastéride), du kétoconazole ou de toute autre substance susceptible d'avoir altéré le « profil stéroïdien », le cas échéant. Le laboratoire doit rapporter les niveaux estimés confirmés d'EtG s'ils dépassent 5 μ g/mL (sans qu'il soit nécessaire de rapporter l'incertitude de mesure pour cette détermination).

A l'issue de la confirmation d'un RPA ou d'un PSS, le laboratoire doit actualiser le dossier des résultats d'analyse dans *ADAMS* pour l'échantillon (en tant que *résultat d'analyse anormal*, *résultat atypique* ou « il n'a été détecté aucune *substance interdite* ou *métabolite* ou *marqueur* d'une ou plusieurs *méthode(s) interdite(s)* figurant au menu d'analyse ») sur la base des résultats de la procédure de confirmation par GC-C-IRMS conformément au TDIRMS [1]).

3.3 Analyses supplémentaires : ester(s) stéroïdien(s) et ADN

Lorsque des *échantillons* de sang appariés ont été prélevés durant la même phase de prélèvement d'échantillons que des *échantillons* d'urine identifiés avec un « profil stéroïdien » atypique ou suspect, les laboratoires, en

¹⁵ Outre la détermination des rapports 5 α AND/A et 5 β AND/Etio en tant que signes de contamination microbienne, comme décrit à la section 2.2.1 pour la procédure d'analyse initiale, la détermination durant la procédure de confirmation d'un ratio élevé de testostérone libre par rapport à la testostérone totale ($T_{\text{libre}}/T_{\text{total}} > 0,05$) doit également invalider (le « profil stéroïdien » de) l'échantillon.

¹⁶ Le rapport de la validité de l'échantillon ne doit pas reposer sur les résultats de l'analyse de confirmation GC-C-IRMS.

Document technique de l'AMA – TD2016EAAS-FR

Document n°:	TD2016EAAS-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	16 septembre 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} janvier 2016

consultation avec l'autorité de contrôle, doivent envisager de procéder à une analyse afin de détecter la présence d'ester(s) stéroïdien(s) dans le sérum/plasma.

Il est recommandé que les analyses de confirmation pour les esters stéroïdiens dans le sérum/plasma soient effectuées avant l'analyse par GC-C-IRMS dans l'urine. La détection des esters stéroïdiens dans le sérum/plasma constitue également une démonstration sans équivoque de l'origine exogène du/des stéroïde(s). D'un autre côté, l'absence d'ester(s) stéroïdien(s) détectable(s) dans le sérum/plasma n'invalide pas un résultat GC-C-IRMS positif dans l'urine.

La réalisation d'analyses ADN peut également être envisagée afin d'établir, en liaison avec le « profil stéroïdien longitudinal » du *sportif*, l'origine individuelle du ou des *échantillon(s)*.

4.0 Références

1. Document technique TDIRMS de l'AMA (version actuelle): Détection de formes synthétiques de stéroïdes anabolisants androgéniques endogènes par GC-C-IRMS.

[https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A30](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A30)

2. Marec U., Geyer H. Opfermann G., Thevis M., Schänzer W. Factors influencing the steroid profile in doping control analyses. *J Mass Spectrom* **43**(7) :877-91, 2008.

3. Ayotte C. Detecting the administration of endogenous anabolic androgenic steroids. *Handb Exp Pharmacol*. **195** :77-98, 2010.

4. Kuuranne T., Saugy M. Baume N. Confounding factors and genetic polymorphism in the evaluation of individual steroid profiling. *Br J Sports Med*. **48**(10) :848-55, 2014.

5. Document technique TDIDCR de l'AMA (version actuelle): Critères minimum 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/en/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A30](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A30)