

# Document technique de l'AMA – TD2016NA-FR

Document n° :	TD2016NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

## 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 la procédure de confirmation pour l'analyse et les rapports des résultats pour les 19-norstéroïdes apparentés à la nandrolone par les laboratoires.

La détection de l'*usage* de la nandrolone (19-nortestostérone) et d'autres 19-norstéroïdes (par ex. 19-norandrostènedione, 19-norandrostènediol) est basée principalement sur l'identification du *métabolite* urinaire majeur, la 19-norandrostérone (19-NA) à une concentration (obtenue par hydrolyse avec la  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli*) supérieure à la limite de décision (LD), telle qu'elle est documentée dans le Document technique sur les limites de décision pour la quantification confirmatoire de substances à seuil (TDDL) [1]. Plus d'un *métabolite* des norstéroïdes administrés peuvent être détectés dans des *échantillons* d'urine et être rapportés [par exemple la 19-norétiocholanolone (19-NE)], mais il suffit, pour rapporter un *résultat d'analyse anormal (RAA)*, de procéder à l'identification et à la quantification de la 19-NA 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 Procédure de confirmation**

#### 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/ou que la 19-NA détectée n'est pas d'origine endogène (par ex. par analyse par GC/C/IRMS).

La procédure de confirmation mise en œuvre pour déterminer la concentration de 19-NA dans l'*échantillon* doit inclure les caractéristiques suivantes :

- un étalon interne deutérié (par ex. le 19-NA-glucuronide) ;
- si la concentration de 19-NA dans l'*échantillon* est estimée inférieure ou égale à 15 ng/mL durant la procédure d'analyse initiale : une courbe de calibration sur une gamme appropriée encadrant la concentration estimée de l'analyte dans l'*échantillon* ;
- si la concentration de 19-NA dans l'*échantillon* est estimée supérieure à 15 ng/mL durant la procédure d'analyse initiale : une calibration à un seul point à 15 ng/mL ;

## Document technique de l'AMA – TD2016NA-FR

Document n° :	TD2016NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

- l'utilisation d'échantillons contrôle de qualité (CQ) négatifs et positifs appropriés.

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

- Chaque analyse par GC/C/IRMS doit inclure :
  - une urine CQ négative : valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  de 19-NA et du composé endogène de référence (CER) dans l'intervalle des valeurs endogènes normales (à savoir supérieures à  $-27\text{‰}$ ), avec une différence entre les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\Delta\delta$ ) du CER et de 19-NA inférieure à  $3\text{‰}$ ; et
  - une urine CQ positive : valeur  $\delta^{13}\text{C}$  dans l'intervalle des valeurs endogènes normales (à savoir supérieures à  $-27\text{‰}$ ) avec un  $\Delta\delta$  entre le CER et la 19-NA supérieur à  $3\text{‰}$ .

Ces contrôles doivent être soumis à la même procédure de préparation que la partie aliquote de l'*échantillon*.
- L'analyse GC/C/IRMS doit inclure la confirmation de l'identité du pic de 19-NA<sup>1</sup>.

## 2.2 Contrôles supplémentaires

### 2.2.1 Contrôle pour la noréthistérone et la grossesse

La 19-NA peut être excrétée à de faibles concentrations comme *métabolite* mineur de la noréthistérone [3], un agent progestatif dont l'usage est permis et qui est présent dans certains contraceptifs oraux, ainsi que pendant la grossesse. C'est pourquoi, 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 :

- une analyse de l'usage de contraceptifs basés sur la noréthistérone (par ex. détection de tétrahydronoréthistérone), et si celle-ci est négative
- un test de grossesse [par exemple basé sur la quantification de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) urinaire]

### 2.2.2 Contrôle pour la déméthylation

En outre, mais rarement, la 19-NA peut être produite à faibles concentrations dans des *échantillons* d'urine par la 19-déméthylation de l'androstérone (A) [4]. La réaction étant plus efficace avec le  $5\beta$ -isomère (à savoir la 19-NE), de tels *échantillons* présentent un ratio de 19-NA sur 19-NE inhabituel (à savoir 19-NA/19-NE inférieur à 3,0), qui est également inférieur au ratio de leurs précurseurs

---

<sup>1</sup> Par exemple, confirmation par analyse GC/MS effectuée dans des conditions de chromatographie comparables. Le but est de produire un chromatogramme présentant 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 ces deux techniques sont attendues.

## Document technique de l'AMA – TD2016NA-FR

Document n° :	TD2016NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

urinaires A/E (androstérone/étiocholanolone) respectifs<sup>2</sup>. Cette formation endogène possible de la 19-NA peut être vérifiée par l'analyse GC/C/IRMS [5, 6].

### 2.2.3 Contrôles GC/C/IRMS

Une analyse par GC/C/IRMS doit être effectuée dans les cas suivants<sup>3</sup>:

- *échantillons* 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/mL<sup>4</sup>.

De surcroît, un laboratoire peut effectuer une analyse GC/C/IRMS sur des *échantillons* lorsque les concentrations de 19-NA sont inférieures à la LD, comme stipulé dans un accord existant avec l'autorité chargée des *contrôles*, ou sur demande de l'autorité chargée des *contrôles* ou de l'AMA. Dans de tels cas, une analyse GC/C/IRMS positive révélant la présence de 19-NA d'origine exogène constitue une preuve suffisante pour rapporter un RAA.

Les laboratoires qui n'ont pas la capacité analytique d'effectuer l'analyse GC/C/IRMS pour la 19-NA doivent faire transférer les *échantillons* dont l'analyse GC/C/IRMS est obligatoire à un autre laboratoire ayant la capacité d'effectuer cette analyse.

Du fait qu'il est possible de rencontrer des préparations de norstéroïdes ayant une signature isotopique du carbone (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) proche de celle des stéroïdes urinaires humains endogènes, le résultat de l'analyse GC/C/IRMS de la 19-NA produite peut ne pas indiquer clairement son origine exogène (par ex.  $\delta_{19-NA} = -24\text{‰}$ ). C'est pourquoi, dans les *échantillons* provenant de femmes non enceintes ou d'hommes, lorsque la concentration de 19-NA est supérieure à la LD et que le résultat de l'analyse GC/C/IRMS est négatif (c'est-à-dire n'est pas cohérent avec une origine exogène de la 19-NA) ou n'est pas concluant, le laboratoire déterminera le ratio 19-NA/19-NE sur la base des signaux relatifs découlant de l'analyse GC/MS. Ce ratio peut servir d'indicateur possible de l'administration de 19-norstéroïdes [6].

### 2.3 Procédure de confirmation de l'*échantillon* « B »

- Dans tous les cas où le RAA pour l'*échantillon* « A » repose sur les résultats d'une analyse GC/C/IRMS, la procédure de confirmation de l'*échantillon* « B »

<sup>2</sup> En l'absence d'inhibiteurs de la 5 $\alpha$ -réductase (à savoir le finastéride).

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

ii- 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 $\text{‰}$  ( $u_{c\text{Max}}$ ).

<sup>4</sup> 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 – TD2016NA-FR

Document n°:	TD2016NA-FR	Version n°:	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

pour les *échantillons* nécessite également l'analyse GC/C/IRMS (et la confirmation de l'identité du pic de 19-NA, mais pas sa quantification) ;

- Dans tous les autres cas, la procédure de confirmation de l'*échantillon* « B » nécessite l'identification et la quantification de la 19-NA rapportée.
- Cependant, lorsque la concentration de 19-NA dépasse 15 ng/mL, une calibration à un seul point à 15 ng/mL et la confirmation de l'identité du pic de 19-NA suffisent.

### **3.0 Interprétation**

#### 3.1 Seuil ajusté

Si et seulement si un *échantillon* d'urine a une gravité spécifique (GS) mesurée supérieure à 1,020 (telle que déterminée en laboratoire), 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 pour la 19-NA applicable aux *échantillons* ayant une GS de 1,020 ou inférieure est publiée dans le TDDL [1]. Dans les cas où la GS est supérieure à 1,020, la LD doit être calculée pour le résultat individuel de 19-NA à partir du S ajusté en fonction de la GS et la bande de garde ajustée correspondante (à savoir l' $U_{c \text{ Max}}$ ) sera appliquée au S ajusté à la GS conformément au TDDL [1]. Par conséquent, la LD ajustée doit être incluse dans le rapport d'analyse du laboratoire.

### **4.0 Rapports**

Le laboratoire doit rapporter les résultats de 19-NA détectés dans un *échantillon* provenant d'hommes ou de femmes (voir sections 3.1 et 3.2 ci-dessus) dans les conditions ci-après :

#### **A. *Échantillons* de femmes enceintes :**

**En aucun cas il ne sera fait référence à la grossesse d'une sportive dans un rapport.**

- *Résultat d'analyse anormal (RAA)*

## Document technique de l'AMA – TD2016NA-FR

Document n° :	TD2016NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

- *Échantillons* pour lesquels les résultats de l'analyse par GC/C/IRMS (voir section 2.2.3 et note de bas de page 4 ci-dessus) sont cohérents avec une origine exogène de la 19-NA.  
[Les résultats de la détermination de la 19-NA<sup>5</sup> et de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse<sup>6</sup>.]
- *Résultat atypique (RA)*
  - *Échantillons* dont la concentration de 19-NA est supérieure à 15 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2.3 ci-dessus) ne sont pas concluants ou ne sont pas cohérents avec une origine exogène de la 19-NA.  
[Les résultats de la détermination de la 19-NA<sup>5</sup> et de l'analyse GC/C/IRMS<sup>6</sup> doivent être inclus dans le rapport d'analyse.]
- « Aucune détection de *substance* ou *méthode interdite* recherchée » :
  - Aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée dans l'*échantillon*, et
  - *Échantillons* pour lesquels la concentration de 19-NA est égale ou inférieure à 15 ng/mL et où l'analyse GC/C/IRMS n'a pas été effectuée, n'est pas concluante ou n'est pas cohérente (voir note de bas de page 4 à la section 2.2.3 ci-dessus) avec l'origine exogène de la 19-NA.

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

- *Résultat atypique (RA)*

<sup>5</sup> Les concentrations de 19-NA rapportées 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 pour confirmer la concentration de 19-NA estimée. Le résultat doit être exprimé comme « >15 ng/mL » sans qu'il soit nécessaire de rapporter la concentration estimée.

- Quand la concentration de 19-NA est déterminée comme située entre la LD et 15 ng/mL, une quantification utilisant une courbe de calibration est exigée lors de la procédure de confirmation. La concentration confirmée doit être exprimée comme concentration moyenne de déterminations en triplicata. La concentration moyenne rapportée doit être arrondie **à la baisse** jusqu'à un chiffre après la virgule (par ex. un résultat de 2,67 ng/mL sera rapporté comme « 2,6 ng/mL »).

Dans tous les cas, conformément au TDDL [1], le laboratoire doit rapporter la LD pour la 19-NA et l'incertitude-type combinée ( $u_c$ ) estimée par le laboratoire à la limite du seuil.

Lorsque la GS de l'*échantillon* est supérieure à 1,020, la valeur de la LD ajustée et la GS seront incluses dans le rapport d'analyse du laboratoire, par ex. « la concentration de 19-NA a été déterminée à  $x,x$  ng/mL, ce qui est supérieur à la LD de  $y,y$  ng/mL qui a été ajustée pour la GS mesurée de  $1,0zz$  ».

<sup>6</sup> 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 – TD2016NA-FR

Document n° :	TD2016NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

- *Échantillons* pour lesquels la concentration de 19-NA est supérieure à 10 ng/mL.

[Les résultats de la détermination de la 19-NA<sup>5</sup> doivent être inclus dans le rapport d'analyse. En outre, un commentaire doit être ajouté pour décrire le résultat démontrant l'utilisation de noréthistérone (par ex. « la 19-norandrostérone (19-NA) a été détectée dans l'*échantillon* à la concentration X ». La tétrahydronoréthistérone, un *métabolite* de la noréthistérone, a également été détectée dans l'*échantillon* »)].

- « Aucune détection de *substance* ou de *méthode interdite* recherchée »
  - Aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée dans l'*échantillon*, et
  - *Échantillons* pour lesquels la concentration de 19-NA est égale ou inférieure à 10 ng/mL.

**[Dans ce cas, aucune référence à l'usage de la noréthistérone ne doit être faite dans le rapport d'analyse].**

### **C. *Échantillons* d'hommes ou de femmes non enceintes et n'utilisant pas de noréthistérone**

- *Résultat d'analyse anormal (RAA)*
  - *Échantillons* dont la concentration de 19-NA est supérieure à 10 ng/mL.

[Les résultats de la détermination de la 19-NA<sup>5</sup> doivent être inclus dans le rapport d'analyse.]

En outre, 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* »).
  - *Échantillons* dont la concentration de 19-NA est égale ou inférieure à 10 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2.3 ci-dessus) ne sont pas concluants ou ne sont pas cohérents avec une origine exogène de la 19-NA, et où le ratio 19-NA/19-NE est supérieur à 3,0.

[Les résultats de la détermination de la 19-NA<sup>5</sup>, de l'analyse GC/C/IRMS et de la détermination du ratio 19-NA/19-NE doivent être inclus dans le rapport d'analyse. Un commentaire doit être ajouté pour expliquer que les résultats de l'analyse GC/C/IRMS n'ont pas été concluants (par ex. en raison de la présence de composés interférents

## Document technique de l'AMA – TD2016NA-FR

Document n°:	TD2016NA-FR	Version n°:	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

ou de toute autre facteur empêchant une mesure GC/C/IRMS fiable) ou ne sont pas cohérents avec une origine exogène de la 19-NA. En outre, pour les *sportives*, un commentaire doit être ajouté pour expliquer que des tests de grossesse et de noréthistérone ont été effectués et que le résultat n'est cohérent avec aucune de ces conditions (par exemple « *le résultat de la 19-NA n'est pas cohérent avec la grossesse ni avec l'usage de noréthistérone* »).

- « Aucune détection de *substance* ou de *méthode interdite* recherchée »
  - Aucune autre *substance interdite* ou *méthode interdite* n'a été confirmée dans l'*échantillon* et
  - *Échantillons* dont la concentration de 19-NA est égale ou inférieure à 10 ng/mL et pour lesquels l'analyse GC/C/IRMS obligatoire (voir section 2.2.3 ci-dessus) n'a pas été effectuée (si la concentration de la 19-NA est inférieure à la LD), n'est pas concluante ou n'est pas cohérente avec une origine exogène de la 19-NA, et que le ratio 19-NA/19-NE est inférieur à 3,0.

### 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. 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.
4. 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.
5. 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.
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.

# Document technique de l'AMA – TD2016NA-FR

Document n° :	TD2016NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Groupe d'experts Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2016	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2016

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

