

Université du Québec  
INRS - Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DE L'EXCRÉTION CHEZ L'HUMAIN DES MÉTABOLITES  
DES 19-NORSTÉROÏDES PROVENANT DE DIVERSES ORIGINES**

Par  
Claudiane Guay

Mémoire présenté  
Pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	M. Martial Saugy, Ph.D. Laboratoire Suisse d'analyse du dopage
Examineur interne	M. Alain Fournier, Ph.D. INRS- Institut Armand-Frappier
Directrice de recherche	Mme Christiane Ayotte, Ph.D. INRS- Institut Armand-Frappier

## AVANT-PROPOS

Un travail de longue haleine ne peut se réaliser sans l'aide de notre entourage. J'aimerais donc profiter des quelques lignes qui suivent pour exprimer ma gratitude aux personnes qui ont contribué au dénouement de ce travail.

En premier lieu, je remercie ma directrice de recherche, Christiane Ayotte, pour son aide, sa supervision et ses conseils tout au long de ma maîtrise.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de contrôle du dopage sans qui la réalisation de mon projet aurait été beaucoup plus fastidieuse. J'aimerais mentionner les personnes suivantes : Danielle Goudreault pour ses judicieux conseils, Alain Charlebois et Christophe Rominguère pour leur disponibilité et leur précieuse aide avec les appareils analytiques, Carole Glavicich, Isabelle Deguise et Catherine Diez pour leur contribution et les étudiants Patrick Bhérer, Sophie Charbonneau, Marilyn Cléroux, André Lajeunesse et Josianne Roy pour avoir égayé mes nombreuses heures passées en laboratoire.

Je voudrais aussi exprimer un merci tout spécial aux nombreux volontaires qui ont accepté de prendre part à mes études avec autant de rigueur et de bonne volonté.

Enfin, je ne pourrais passer sous silence l'aide précieuse et sans fin de mes parents, Louise et André, qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise. Je désire aussi remercier mes ami(e)s qui ont été là pour m'écouter, m'encourager et me divertir lorsque j'en avais le plus grand besoin...

Finalement, j'aimerais remercier le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ-FCAR-santé) de m'avoir accordé une bourse pour la durée de mes études de deuxième cycle et l'INRS, pour m'avoir octroyé un supplément de bourse.

## RÉSUMÉ

Les 19-norstéroïdes représentent une classe de stéroïdes anabolisants très populaires auprès des athlètes ayant recours au dopage pour augmenter leurs performances sportives. Le métabolisme des 19-norstéroïdes conduit à la formation de deux principaux métabolites, la norandrostérone et la norétiocholanolone, majoritairement conjugués au groupement glucuronide. La présence de ces métabolites dans l'urine à de faibles niveaux n'est pas garante de l'usage illicite des 19-norstéroïdes puisqu'ils peuvent provenir d'une production naturelle par l'humain. De plus, il a récemment été proposé que les abats de porc non-castré représentent une source de consommation involontaire des 19-norstéroïdes conduisant aussi à l'excrétion de ces métabolites en faibles concentrations.

Les objectifs des travaux présentés dans ce mémoire étaient 1- de décrire et de comparer les profils d'excrétion des métabolites suite à une production naturelle ou à une administration de 19-norstéroïdes, 2- de caractériser les niveaux d'excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone selon le type d'abats de porc non-castré consommés et 3- de vérifier s'il existait des distinctions significatives dans la proportion relative des métabolites des 19-norstéroïdes excrétés selon leur origine.


Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons identifié par CG/SM puis quantifié par CG/SMHR les niveaux des métabolites des 19-norstéroïdes excrétés sous forme glucuro- et/ou sulfoconjuguée dans les échantillons d'urine provenant de deux femmes enceintes (origine endogène), de l'administration orale de 19-norandrost-4-ène-3,17-dione et d'échantillons déclarés positifs aux tests de contrôle antidopage de routine (origine exogène) et de la consommation d'abats de porc non-castré.

Suite à l'analyse des résultats obtenus, nous avons observés une seule différence significative entre la production naturelle des métabolites des 19-norstéroïdes et leur

excrétion suite à une administration. En effet, les concentrations urinaires les plus élevées étaient de 15 ng/ml pour les femmes enceintes comparativement à 42 200 ng/ml pour l'administration de 19-norstéroïdes. Le rapport entre la norandrostérone et la norétiocholanolone excrétées sous forme glucuroconjuguée et la proportion relative de norandrostérone glucuroconjuguée par rapport à celle sulfoconjuguée tendaient à être différents selon l'origine endogène ou exogène des 19-norstéroïdes. Cependant, les importantes variations observées entre les échantillons provenant d'une même source ont rendu impossible l'utilisation de tels paramètres pour distinguer entre les métabolites provenant d'une sécrétion physiologique et ceux excrétés suite à une administration de 19-norstéroïdes. Finalement, nos résultats indiquaient que seules les femmes enceintes excrétaient naturellement les métabolites des 19-norstéroïdes à des niveaux détectables.

Nos résultats soutenaient l'hypothèse que les abats de porc non-castré représentent une source de consommation involontaire de 19-norstéroïdes. Nous avons observé que la consommation de 100 g de rein conduisait à l'excrétion de norandrostérone à une concentration maximale pouvant atteindre 20 ng/ml, ce qui était de 10 et 20 fois plus élevé que les niveaux excrétés suite à la consommation de foie et de viande, respectivement. Par la suite, les analyses sur CG/SMRI ont démontré que la teneur en  $^{13}\text{C}$  de la norandrostérone excrétée suite à la consommation d'abats de porc non-castré correspondait à une source endogène et permettait donc de différencier cette consommation involontaire d'une administration volontaire.

L'ensemble de nos résultats confirment que le seuil de positivité établi par le C.I.O. à 2 ng/ml pour les hommes et à 5 ng/ml pour les femmes demeure le critère le plus adéquat pour contrôler l'usage illicite des 19-norstéroïdes. De plus, nos travaux nous ont permis de constater que seule l'analyse sur CG/SMRI permet de discriminer efficacement entre l'origine endogène et celle exogène des métabolites des 19-norstéroïdes.

  
Étudiante

  
Directrice de recherche

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Avant-propos .....</b>	<b>ii</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures et des tableaux .....</b>	<b>x</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b><i>PREMIÈRE SECTION - Revue de la littérature</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1. LES STÉROÏDES ANDROGÈNES ANABOLISANTS .....</b>	<b>5</b>
1.1 Situation dans le système endocrinien .....	5
1.2 Structures chimiques .....	5
1.3 Régulation des SAA par le corps humain .....	6
1.3.1 Biosynthèse .....	6
1.3.2 Sécrétion dans le sang .....	9
1.3.3 Protéines de transport et biodisponibilité .....	9
1.3.4 Métabolisme et excrétion .....	10
1.3.4.1 Réactions de phase I .....	10
1.3.4.2 Réactions de phase II .....	11
1.4 Action biologique .....	12
1.4.1 Action androgène versus anabolisante .....	12
1.4.2 Mécanisme d'action via le récepteur androgène .....	13
1.5 Applications médicales .....	14
1.5.1 Actions thérapeutiques .....	15
1.5.2 Voies d'administration .....	15
1.5.3 Modifications pharmacologiques .....	16
<b>2. LES STÉROÏDES ANDROGÈNES ANABOLISANTS ET LE DOPAGE .....</b>	<b>19</b>
2.1 Notions reliées au dopage .....	19
2.2 Historique de l'utilisation des SAA .....	20
2.3 Régime d'administration .....	21
2.4 Effets physiologiques .....	22
2.4.1 Augmentation de la synthèse des protéines .....	23
2.4.2 Diminution du catabolisme des protéines .....	23
2.4.3 Effets de l'entraînement physique .....	24
2.5 Effets secondaires .....	25
2.5.1 Effets cutanés .....	26

2.5.2	Effets hépatiques .....	26
2.5.3	Effets cardio-vasculaires .....	27
2.5.4	Effets sur le système reproducteur .....	27
2.5.5	Effets psychologiques .....	28
<b>3.</b>	<b>LES 19-NORSTÉROÏDES .....</b>	<b>29</b>
3.1	La 19-nortestostérone et ses précurseurs .....	29
3.2	Action biologique .....	30
3.3	Métabolisme .....	30
3.3.1	Principaux métabolites urinaires .....	30
3.3.2	Cinétique d'élimination des métabolites .....	33
3.3.3	Abondance relative des métabolites .....	33
3.3.4	Métabolites glucuroconjugés et sulfoconjugés .....	34
3.4	Biosynthèse des 19-norstéroïdes .....	35
3.4.1	Aromatisation .....	35
3.4.1.1	Mécanisme moléculaire .....	35
3.4.1.2	Production de 19-norstéroïdes .....	36
3.4.1.3	Tissus exprimant le complexe P450arom .....	38
3.4.2	Excrétion physiologique des 19-norstéroïdes .....	39
3.4.2.1	Études de population .....	39
3.4.2.2	Influence de l'activité physique .....	40
3.5	Distinction entre l'origine endogène et exogène .....	41
3.6	Consommation involontaire .....	41
3.6.1	Suppléments alimentaires .....	42
3.6.2	Viande d'animaux d'élevage .....	43
<b>4.</b>	<b>APPAREILS ANALYTIQUES .....</b>	<b>45</b>
4.1	Combinaison chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse .....	45
4.1.1	Principes de base .....	45
4.1.2	Préparation des échantillons .....	46
4.1.3	Identification des SAA .....	46
4.2	Combinaison chromatographie en phase gazeuse/ à spectrométrie de masse à ratio isotopique .....	47
4.2.1	Fonctionnement de l'appareil .....	48
4.2.2	Fractionnement isotopique du carbone .....	49
4.2.3	Teneur en <sup>13</sup> C des SAA .....	50
4.2.4	Critères de positivité .....	51
	<b><i>DEUXIÈME SECTION - Présentation de l'article .....</i></b>	<b>52</b>
<b>1.</b>	<b>ARTICLE .....</b>	<b>53</b>
1.1	Résumé en français .....	54
1.2	Présentation de la version originale .....	55

<b>Discussion .....</b>	<b>94</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>102</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>122</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

17 $\beta$ -HSD : 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase

3 $\beta$ -HSD : 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase

4-nordiols : 19-norandrost-4-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol

4-nordione : 19-norandrost-4-ène-3,17-dione

5-nordione : 19-norandrost-5-ène-3,17-dione

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

APS : Adénosine-5'-phosphosulfate

ATP : Adénosine-triphosphate

CG/C/SMRI : Combinaison chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse de rapports isotopiques

CG/SMHR : Combinaison chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse à haute résolution

CG/SM : Combinaison chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse

C.I.O. : Comité International Olympique

Complexe P450arom : Complexe aromatase du cytochrome P450

$\delta$  <sup>13</sup>C ‰ : Teneur en <sup>13</sup>C exprimée en delta per mille

$\Delta^4$  : 4-ène

$\Delta^5$  : 5-ène

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHN : 5 $\alpha$ -dihydrortestostérone

DHT : 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone

ERA : Élément de régulation des androgènes

ERG : Éléments de régulation des glucocorticoïdes

HDL : Lipoprotéine à haute densité (High density lipoprotein)

FSH : Hormone folliculostimulante



hCG : Hormone gonadotrophine chorionique humaine

LH : Hormone lutéinisante

HSP : Protéine de choc thermique (Heat shock protein)

LDL : Lipoprotéine à faible densité (Low density lipoprotein)

m/z : masse/charge

NADPH : Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (forme réduite)

PAPS : 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate

PLA : Protéine de liaison des androgènes

RA : Récepteur androgène

SAA : Stéroïde androgène anabolisant

SHBG : Protéine de liaison des hormones sexuelles (Sex hormone-binding globulin)

TMS : Triméthylsilyle

UDP : Uridine diphosphate

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure chimique de base des SAA .....	6
Figure 2	Biosynthèse de stéroïdes androgènes anabolisants .....	8
Figure 3	Réactions de conjugaison .....	12
Figure 4	Mécanisme d'activation du récepteur androgène .....	14
Figure 5	Modifications pharmacologiques de la testostérone .....	17
Figure 6	Métabolisme des 19-norstéroïdes .....	32
Figure 7	Schéma de l'aromatation de l'androstènedione en oestrone et de la formation de la 4-nordione .....	37
Figure 8	Schéma du fonctionnement du CG/SM .....	45
Figure 9	Schéma des fragmentations conduisant aux ions 405 et 315 m/z de la norandrostérone et de la norétiocholanolone dérivées TMS .....	47
Figure 10	Schéma du fonctionnement de la CG/SMRI .....	48
Figure 11	Équation mathématique de la normalisation du rapport isotopique du carbone de l'échantillon par rapport au gaz de référence .....	49
Figure 12	Chromatogrammes des dérivés TMS-éther, TMS-énol de la norandrostérone et de la norétiocholanolone obtenus par analyse sur CG/SM de standards authentiques .....	128
Figure 13	Spectres de masse des dérivés TMS-éther, TMS-énol de la norandrostérone et de la norétiocholanolone obtenus par analyse sur CG/SM de standards authentiques .....	129

### LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Classes de substances prohibées par le C.I.O. ....	19
Tableau 2	Liste des principaux SAA .....	124

## INTRODUCTION

Les 19-norstéroïdes représentent une classe de stéroïdes androgènes anabolisants (SAA) très populaires auprès des athlètes ayant recours au dopage pour augmenter leurs performances sportives, bien que leur utilisation à de telles fins soit prohibée par le Comité International Olympique (C.I.O.) depuis 1974. L'appellation de 19-norstéroïdes regroupe essentiellement la 19-nortestostérone et ses précurseurs, soit la 19-norandrost-4-ène-3,17-dione (4-nordione), 19-norandrost-5-ène-3,17-dione (5-nordione) et la 19-norandrost-4-ène-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (4-nordioli).

Le métabolisme de la 19-nortestostérone est bien documenté dans la littérature, mais ses précurseurs n'ont fait l'objet que de quelques récentes études. D'ordre général, l'administration des 19-norstéroïdes conduit à l'excrétion de deux principaux métabolites, la norandrostérone et la norétiocholanolone, majoritairement conjugués au groupement glucuronide (Kintz, Cirimele et Ludes, 1999 ; Schänzer *et al.*, 2000). Un troisième métabolite, la norépiandrostérone, est formé en quantité moindre et est uniquement excrété sous forme sulfoconjuguée (Massé *et al.*, 1985). Puisque les contrôles antidopage pour les 19-norstéroïdes sont basés sur leurs métabolites majeurs, soit la norandrostérone et la norétiocholanolone glucuroconjuguées, très peu d'études se sont attardées à l'excrétion des métabolites sulfoconjugués.

Les 19-norstéroïdes sont produits naturellement par le corps humain et seraient biosynthétisés lors de l'aromatization des androgènes en œstrogènes (Graham-Laurence *et al.*, 1995). Les niveaux physiologiques d'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes sont très faibles, atteignant des concentrations maximales de 0,8 ng/ml, exception faite des femmes enceintes chez qui la norandrostérone a été quantifiée à des valeurs avoisinant les 20 ng/ml (Mareck-Engelke, Geyer et Schänzer, 2000). En plus de l'administration et de la production naturelle, Le Bizec *et al.* (2000) ont proposé que les

abats de porc non-castré représentent une source de 19-norstéroïdes et que leur consommation conduite à l'excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone à des niveaux non-négligeables.

La production physiologique de 19-norstéroïdes par l'humain et la consommation de viande contaminée ou provenant d'animaux qui en biosynthétisent sont systématiquement évoquées pour contester les résultats positifs obtenus suite à des contrôles antidopage. Un test complémentaire pourrait s'avérer utile dans ce contexte. L'utilisation de paramètres cliniques, comme le rapport de norandrostérone sur norétiocholanolone glucuroconjuguées (Le Bizec *et al.*, 1999) et le pourcentage de norandrostérone excrétée sous forme glucuro- ou sulfoconjuguée (Le Bizec *et al.*, 2002a), a été proposée pour déterminer si les métabolites présents dans un échantillon d'urine proviennent d'une production naturelle ou d'une administration illicite de 19-nortestostérone. Ces paramètres cliniques n'ont cependant pas été validés pour l'administration des précurseurs de la 19-nortestostérone. Finalement, en se basant sur une nouvelle méthode développée pour les métabolites de la testostérone, notre laboratoire a démontré que la mesure de la teneur en  $^{13}\text{C}$  au moyen de la CG/SMRI permettait de distinguer la norandrostérone et la norétiocholanolone provenant d'une production naturelle de leur excrétion suite à une administration illicite de 19-norstéroïdes (Ayotte *et al.*, 2001).

La présente étude vise à comparer l'excrétion des métabolites glucuro- et sulfoconjugués des 19-norstéroïdes provenant de diverses origines. Pour ce faire, nous avons analysé des échantillons d'urine contenant des métabolites des 19-norstéroïdes d'origine naturelle et pharmaceutique, soit 1) de la grossesse, 2) de l'administration orale de 4-nordione, 3) d'échantillons déclarés positifs suite aux tests de contrôle antidopage de routine et 4) de la consommation de porc. Les différents paramètres cliniques proposés pour distinguer entre la sécrétion physiologique et l'administration illicite de 19-norstéroïdes ont fait l'objet d'une attention particulière. Finalement, nous avons déterminé, à l'aide de la CG/SMRI, le ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  pour la norandrostérone excrétée suite à la consommation d'abats de porc non-castré afin de déterminer si cette source représente une origine endogène ou exogène.

Afin de situer le projet de recherche parmi les autres travaux effectués sur les 19-norstéroïdes et le domaine du dopage, une revue de la littérature est présentée à la première section de ce mémoire. Les deux premières parties de cette section présentent les aspects biologiques et pharmacologiques des 19-norstéroïdes et situent leur utilisation dans le contexte du dopage sportif. Puisque ces notions s'appliquent aux différents stéroïdes anabolisants employés par les athlètes dopés, ces parties de la revue de la littérature ont été ajustées à l'ensemble des SAA. La troisième partie est consacrée aux 19-norstéroïdes et aux études concernant leur métabolisme, leur biosynthèse et leurs sources d'administration ou de consommation involontaire. Finalement, la dernière partie de la revue de la littérature présente les deux principaux appareils analytiques permettant d'étudier l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes.

La deuxième section comprend l'ensemble du projet de recherche réalisé dans le cadre de ce mémoire. Les méthodes utilisées et les résultats des études effectuées sont présentés sous la forme de l'article qui sera soumis au journal *Steroids*.

Ces deux sections sont suivies d'une discussion qui englobe les différents résultats obtenus lors de ce projet de recherche et les situe parmi les connaissances acquises sur le sujet. Finalement, des informations complémentaires à celles présentées dans ce mémoire et des résultats non inclus dans l'article sont présentés en annexe.

**PREMIÈRE SECTION**

REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1. LES STÉROÏDES ANDROGÈNES ANABOLISANTS

Le groupe des stéroïdes androgènes anabolisants (SAA) inclut la testostérone et l'ensemble de ses dérivés, autant ceux produits naturellement par le corps humain que ceux synthétisés en laboratoire. Les différentes appellations couramment employées pour désigner les SAA portent parfois à confusion. Le terme stéroïde androgène est utilisé pour identifier les SAA produisant des effets biologiques liés au développement des caractères sexuels primaires et secondaires chez l'homme. De son côté, le terme stéroïde anabolisant désigne les SAA qui exercent leurs actions en favorisant une balance positive en azote et en stimulant la synthèse protéique (Becker *et al.*, 1990). Or, les stéroïdes androgènes produisent aussi des effets anabolisants et vice-versa. L'appellation générale de SAA est donc plus appropriée pour désigner l'ensemble des stéroïdes produisant des effets androgènes et anabolisants.

### 1.1 SITUATION DANS LE SYSTÈME ENDOCRINIEN

Les SAA font partie du système endocrinien dont la fonction est de maintenir l'homéostasie du corps humain. Le système endocrinien comprend en fait de nombreuses hormones qui se regroupent en deux principales classes : les hormones dérivées d'acides aminés et les hormones stéroïdiennes. Les SAA constituent ce dernier groupe avec les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes, les progestines et les œstrogènes. Les hormones stéroïdiennes ont un caractère lipophile, contrairement aux hormones dérivées d'acides aminés qui sont hydrosolubles (Marieb et Laurendeau, 1993 ; Voet et Voet, 1995).

### 1.2 STRUCTURES CHIMIQUES

La structure chimique de base des SAA est celle des androstanes, des molécules isomères formées des 4 cycles du cyclopentaphénanthrène et de groupements méthyles en C-10 et C-13 (Solomons, 1997). Les androstanes diffèrent de par l'orientation de l'atome d'hydrogène en C-5, pour former la  $5\alpha$ -androstane ou la  $5\beta$ -androstane. La structure chimique des androstanes est présentée à la Figure 1. La majorité des structures chimiques des SAA comprennent d'autres groupements fonctionnels tels la double liaison

en C-4,5 et les groupements hydroxyles et carbonyles en C-3 et C-17 respectivement. Les structures chimiques de différents SAA sont présentées à l'Annexe A.

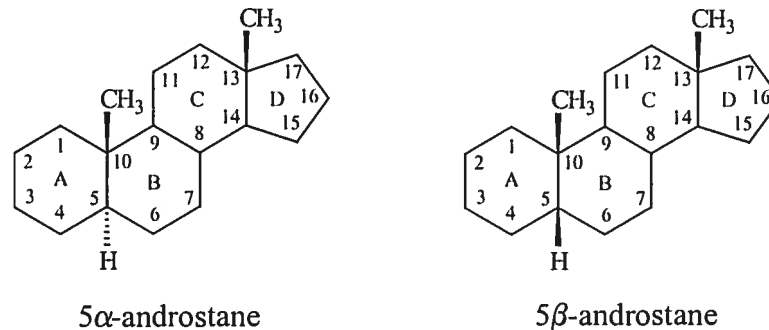


Figure 1 Structure chimique de base des SAA

Légende : Les androstanes sont formés de 4 cycles (A à D) et de 17 atomes de carbone (1 à 17)

### 1.3 RÉGULATION DES SAA PAR LE CORPS HUMAIN

Dans le corps humain, les SAA sont régulés par divers processus agissant aux niveaux de leur biosynthèse, leur sécrétion, leur transport dans le sang, leur métabolisme et leur excrétion.

#### 1.3.1 Biosynthèse

Chez les hommes, les SAA sont principalement produits par les cellules de Leydig des testicules et, dans une moindre mesure, par les glandes surrénales. Chez les femmes, les SAA ne sont synthétisés qu'en faible quantité par les glandes surrénales et les ovaires et ne feront l'objet que de peu d'attention dans ce mémoire. La biosynthèse des SAA requiert diverses réactions catalysées par les enzymes du cytochrome P450. La biosynthèse des principaux SAA produits par le corps humain est présentée à la Figure 2.

La première étape de la stéroïdogénèse représente l'étape limitante du processus. Elle consiste au clivage de la chaîne latérale du cholestérol par la 20,22-desmolase pour former la prégénolone. Par la suite, deux voies métaboliques sont possibles pour convertir la prégénolone en testostérone : la voie 4-ène ( $\Delta^4$ ) et la voie 5-ène ( $\Delta^5$ )



(voir Figure 2). Par la voie 4-ène, le groupement hydroxyle en C-3 est tout d'abord oxydé et la double liaison passe de la position C-5,6 à C-4,5. Ces deux réactions sont catalysées par la même enzyme, soit la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase  $\Delta^{4,5}$  isomérase (3 $\beta$ -HSD  $\Delta^{4,5}$  isomérase). La progestérone ainsi formée est par la suite convertie en 17 $\beta$ -hydroxyprogestérone puis en androst-4-ène-3,17-dione suite aux actions de la 17 $\alpha$ -hydroxylase et de la 17,20-desmolase, respectivement. La testostérone est finalement biosynthétisée par la réduction de la cétone en C-17 de l'androst-4-ène-3,17-dione. Cette dernière réaction est catalysée par la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD) et c'est la seule du processus à être réversible. La voie  $\Delta^4$  est la voie de prédilection pour les SAA synthétisés dans les ovaires.

Les enzymes impliquées dans la voie 5-ène sont identiques à celles de la voie 4-ène. Par la voie  $\Delta^5$ , la prégnénolone est tout d'abord hydroxylée par la 17 $\alpha$ -hydroxylase pour former la 17 $\beta$ -hydroxyprégnénolone, qui est ensuite transformée par la 17,20-desmolase en déhydroépiandrostérone (DHEA). Le groupement carbonyle en C-17 de la DHEA est réduit lors d'une réaction réversible catalysée par la 17 $\beta$ -HSD pour former l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Finalement, l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol est converti en testostérone sous l'action de la 3 $\beta$ -HSD  $\Delta^{4,5}$  isomérase. La voie  $\Delta^5$  est la voie principale de formation des SAA dans les cellules de Leydig (Griffin et Wilson, 1998 ; Kacsoh, 2000).

La testostérone synthétisée dans les testicules est soumise à l'action irréversible de la 5 $\alpha$ -réductase pour mener à la formation de la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT). Malgré son métabolisme à même son lieu de synthèse, la testostérone demeure le produit majeur du processus de biosynthèse et représente le composé de référence du groupe des SAA. La DHEA, l'androsténiol et l'androsténiolone, considérées comme des précurseurs de la testostérone, sont aussi biosynthétisées en quantités appréciables, tout comme la DHT (Griffin et Wilson, 1998). Certains 19-norstéroïdes sont aussi produits naturellement par le corps humain, lors de l'aromatation de la testostérone en oestrogène. Ce groupe de SAA est le sujet principal du présent mémoire et une section entière de la revue de la littérature lui est consacrée (voir Section 3).

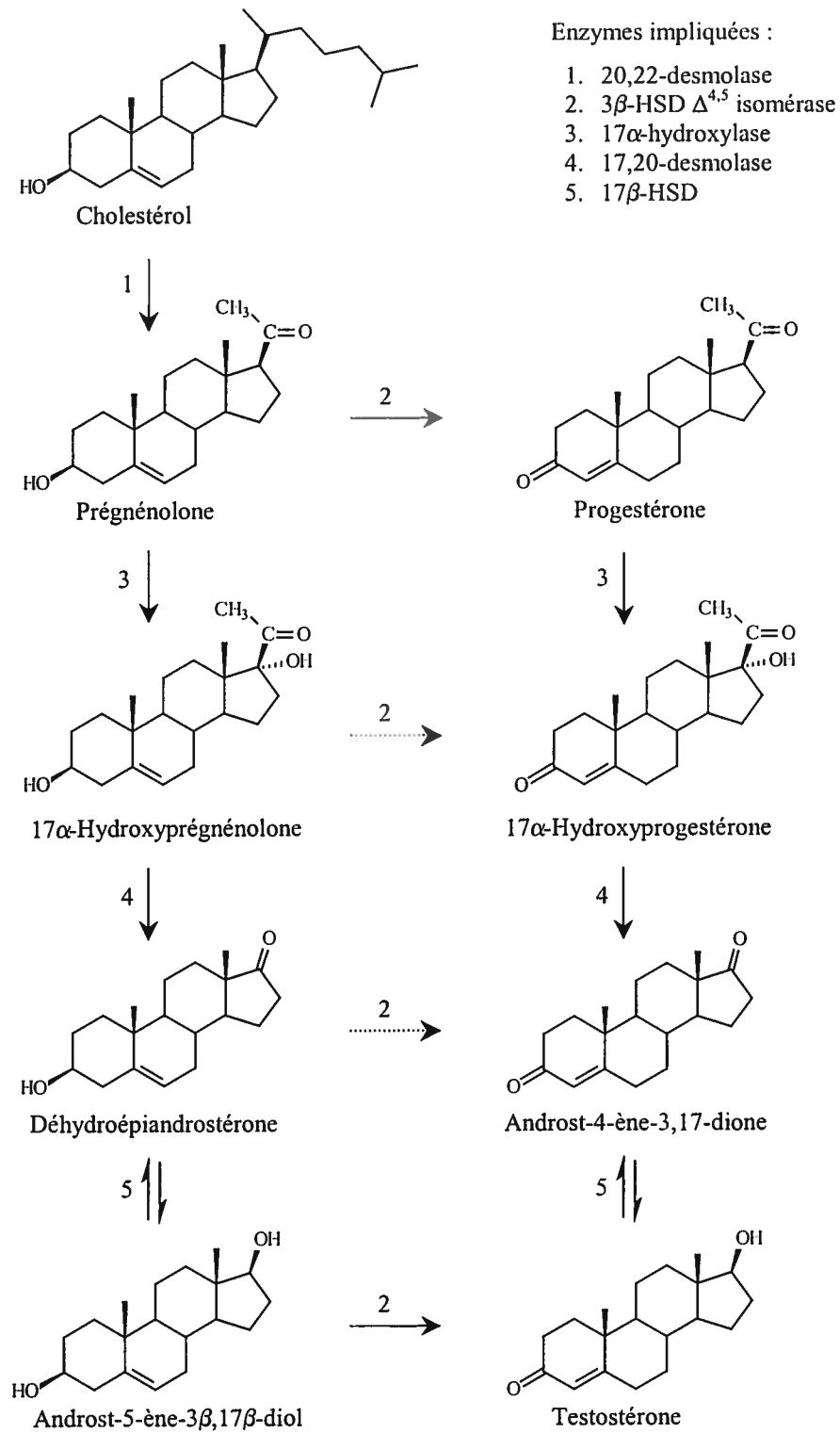


Figure 2 Biosynthèse de stéroïdes androgènes anabolisants

### 1.3.2 *Sécrétion dans le sang*

Suite à sa synthèse dans les cellules de Leydig, la testostérone est sécrétée dans le sang afin de se rendre à ses cellules cibles pour y exercer son action biologique. Ce processus est régi par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadal. L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine qui agit sur l'adénohypophyse afin de promouvoir la libération des hormones gonadotrophines, c'est-à-dire de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculostimulante (FSH). Une fois libérées, la LH et la FSH sont transportées dans le sang jusqu'aux testicules. Dès lors, la LH se lie spécifiquement aux cellules interstitielles des testicules pour stimuler la synthèse et la sécrétion de la testostérone dans la circulation sanguine. De son côté, la FSH favorise la sécrétion de la protéine de liaison des androgènes (PLA) dans les tubules séminifères. Une partie de la testostérone libérée par les cellules interstitielles entre dans les tubules séminifères et se lie à la PLA afin d'activer la spermatogenèse. Des concentrations élevées en testostérone dans le sang et la formation du sperme exercent une rétroaction négative sur l'hypothalamus, ce qui conduit à l'arrêt de la sécrétion de gonadolibérine. Ainsi, la sécrétion de la testostérone résulte de l'équilibre entre les concentrations physiologiques des trois groupes d'hormones suivants : a) la gonadolibérine, b) la LH et la FSH et c) les SAA (Marieb et Laurendeau, 1993).

### 1.3.3 *Protéines de transport et biodisponibilité*

Pour exercer leurs actions biologiques, les SAA doivent quitter leurs lieux de synthèse, ou d'administration, pour atteindre les cellules cibles. À cause de leur caractère lipophile, seulement 2 à 5 % des SAA circulent librement dans les vaisseaux sanguins. Les 95 à 98% restant voyagent liés à des protéines de transport de deux types, soit la protéine de liaison des hormones sexuelles (SHBG) et l'albumine (Griffin et Wilson, 1998; Mottram et George, 2000). Le pourcentage de liaison à la SHBG et à l'albumine varie d'un SAA à l'autre. Chez l'homme, Dunn, Nisula et Rodbard (1981) ont évalué que la testostérone était transportée à 50 % par la SHBG et à 44 % par l'albumine. De leur côté, les précurseurs de SAA dépourvus du groupement  $17\beta$ -hydroxy, comme la DHEA et

l'androstènedione, ne se lient que très faiblement à la SHBG et sont donc majoritairement transportés par l'albumine (Kacsoh 2000).

La liaison des SAA à des protéines de transport dans le sang influence leur biodisponibilité. Pour produire son action biologique, un SAA doit entrer sous forme libre à l'intérieur d'une cellule afin d'aller activer le récepteur androgène (voir Section 2.3.1). Cette capacité à entrer dans une cellule varie selon que les SAA circulent librement dans le sang, associés à l'albumine ou en complexe avec la SHBG (Mendel, 1989). Au début des années 1980, la croyance générale voulait que seule la fraction circulant librement dans le sang était apte à activer le récepteur androgène. Par la suite, il a été proposé et soutenu expérimentalement que les SAA liés à l'albumine puissent eux aussi exercer une action biologique en se dissociant de leur transporteur (Pardridge, 1986 ; Mendel, 1989 ; Mendel *et al.*, 1990). Cependant, ce n'est pas le cas pour les SAA liés aux SHBG puisque le taux de dissociation de ce complexe est trop faible (Mendel, 1990). Ainsi, la proportion des SAA biodisponibles correspond à la combinaison de la fraction libre et de celle liée à l'albumine (Pardridge, 1986 ; Mendel, 1990).

#### 1.3.4 Métabolisme et excrétion

Le métabolisme des SAA se fait majoritairement dans le foie, mais une partie non-négligeable se déroule aussi dans les tissus périphériques (Bélanger *et al.*, 1998 ; Albert *et al.*, 2000 ; Jin et Penning, 2001). Les enzymes métaboliques dégradent les SAA afin de former des métabolites biologiquement inactifs et possédant un caractère hydrosoluble qui facilite leur excrétion dans l'urine via les reins. Le processus de base du métabolisme est similaire pour tous les SAA et se divise en deux catégories, soit les réactions de phase I et les réactions de phase II.

##### 1.3.4.1 Réactions de phase I

Le métabolisme de phase I comprend les réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de désalkylation et d'hydroxylation qui consistent à inactiver les SAA et à diminuer leur caractère lipophile. Les enzymes métaboliques impliquées dans ce

processus différent selon la structure chimique du SAA. Schänzer (1996) a publié un article de revue sur le métabolisme de nombreux SAA. Pour les stéroïdes 4-ène-3-one-17 $\beta$ -OH, comme la testostérone et la 19-nortestostérone, les métabolites détectés dans l'urine proviennent de trois principales réactions enzymatiques. En premier lieu, la double liaison en C-4,5 est réduite de façon irréversible par la 5 $\alpha$ - ou 5 $\beta$ -réductase pour ainsi former un carbone asymétrique en C-5. Le ratio de formation des isomères 5 $\alpha$  et 5 $\beta$  varie selon les SAA impliqués. La réduction de la double liaison représente l'étape limitante du métabolisme des SAA 4-ène. Par la suite, le groupement carbonyle en position C-3 est rapidement réduit par la 3 $\alpha$ - ou 3 $\beta$ -HSD (Träger, 1977). Finalement, le groupement hydroxyle en C-17 $\beta$  est oxydé par la 17 $\beta$ -HSD. Bien que cette réaction soit réversible, la majorité des métabolites de la testostérone et des autres SAA sont excrétés sous forme de 17 $\beta$ -OH (Williams, 1979).

#### 1.3.4.2 Réactions de phase II

Les réactions de phase II consistent en l'ajout d'un groupement polaire à la structure des SAA ou de leurs métabolites. Les deux principaux groupements pouvant être ajoutés sont l'uridine diphosphate (UDP)-acide glucuronique, pour la formation des métabolites glucuroconjugués, et le groupement 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS), pour les métabolites sulfoconjugués.

Les réactions de phase II des métabolites des SAA dépendent de leur structure chimique. Ceux possédant un groupement hydroxyle en conformation 3 $\alpha$  sont majoritairement glucuroconjugués, mais une proportion variable est aussi excrétée sous forme sulfoconjuguée. De leur côté, les métabolites 3 $\beta$ -hydroxy sont uniquement sulfoconjugués puisque l'encombrement stérique empêche l'ajout du groupement UDP-acide glucuronique en position C-3 $\beta$  (Träger, 1977). Les groupements alcools secondaires présents en position C-17 $\beta$  peuvent aussi être glucuroconjugués et/ou sulfoconjugués. Ainsi, la proportion de réaction de glucuroconjugaison versus celle de sulfoconjugaison est propre à chaque métabolite. Bien que la majorité des métabolites soient excrétés sous forme conjuguée, certains y échappent et d'autres possèdent une structure chimique qui nuit aux réactions de conjugaison et se retrouvent sous forme libre dans l'urine.

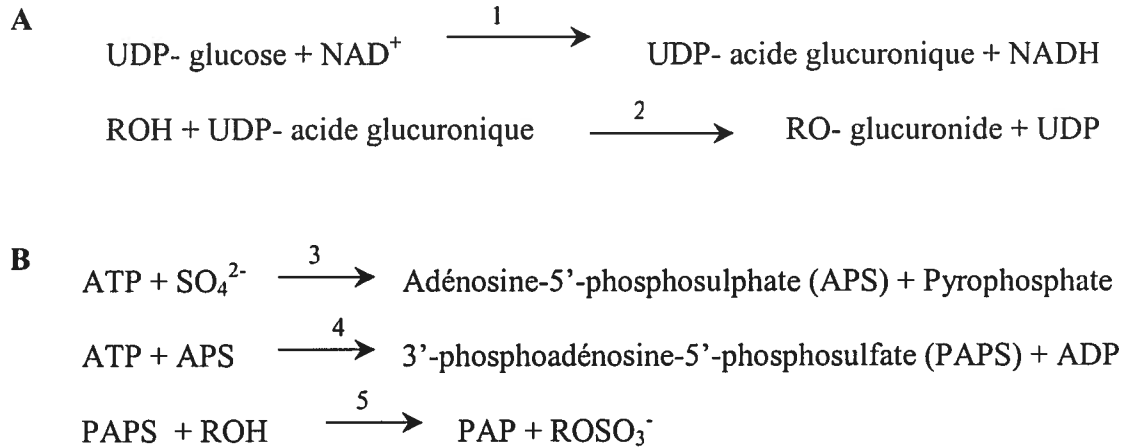


Figure 3 Réactions de conjugaison

Légende : A) Glucuroconjugaison : 1- UDP-glucose déshydrogénase, 2- UDP-glucuronyltransférase.

B) Sulfoconjugaison : 3- ATP-sulfurylase, 4- APS-phosphokinase, 5- Sulfotransférase

Un schéma du mécanisme de la glucuroconjugaison et celui de la sulfoconjugaison est présenté à la Figure 3. La glucuroconjugaison se fait en deux étapes. Le groupement  $\text{-CH}_2\text{-OH}$  du glucose lié à l'uridine diphosphate est tout d'abord oxydé par l'UDP-glucose déshydrogénase pour former l'UDP-acide glucuronique qui est ensuite transféré au SAA lors d'une réaction catalysée par l'UDP-glucuronyltransférase. De son côté, la réaction de sulfoconjugaison requiert trois étapes. Lors de la première, le groupement sulfate est converti en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) puis en PAPS. Ces réactions sont catalysées par l'ATP-sulfurylase et l'APS-phosphokinase, respectivement. Finalement, le SAA réagit avec le groupement sulfate du PAPS sous l'action de la sulfotransférase (Dutton, 1978).

## 1.4 ACTION BIOLOGIQUE

### 1.4.1 Action androgène versus anabolisante

Autant les effets androgènes que ceux anabolisants des SAA résultent de l'activation du récepteur androgène. La distinction entre ces effets biologiques se situe au niveau des organes cibles (Jänne *et al.*, 1993). L'effet androgène est essentiellement observé dans les organes reproducteurs où les SAA sont responsables des caractéristiques sexuelles mâles

primaires, comme le développement de l'appareil génital et la formation des spermatozoïdes. Le développement des caractéristiques secondaires masculines, comme la pilosité, la voix basse et l'agressivité, est aussi relié aux actions androgènes des SAA. Pour sa part, l'action anabolisante est exercée dans les organes périphériques tels les muscles squelettiques, les os et les reins. Les effets anabolisants des SAA sont associés à l'induction de la synthèse de protéines, au développement des muscles, à l'érythropoïèse et à la stimulation puis à l'inhibition de la croissance des os chez les jeunes (Mottram et George, 2000). La capacité d'un SAA à induire une action androgène ou anabolisante dépend donc de son aptitude à atteindre et à activer le récepteur androgène exprimé dans les organes cibles reliés soit aux effets androgènes ou soit à ceux anabolisants.

#### *1.4.2 Mécanisme d'action via le récepteur androgène*

Aux concentrations physiologiques, les SAA exercent leur action androgène ou anabolisante par un mécanisme d'activation directe du récepteur androgène. Ce mécanisme est schématisé à la Figure 4 et comporte les étapes suivantes. Lorsque non-lié à son ligand, le récepteur androgène (RA) se situe dans le cytoplasme associé à différentes molécules dont les protéines de chocs thermiques (HSP) HSP 90 et HSP 70. Lors de la liaison d'un SAA au complexe récepteur, les HSP se dissocient de ce dernier en lui induisant un changement de conformation. Cette modification confère au nouveau complexe RA-SAA les propriétés nécessaires migrer vers le noyau de la cellule. Une fois à l'intérieur du noyau, le complexe RA-SAA se lie à l'ADN en homodimère au site de liaison des éléments de régulation des androgènes (ERA) des gènes cibles des SAA. Cette liaison de l'homodimère à l'ADN permet le recrutement des différentes protéines accessoires qui stabilisent la liaison du complexe et qui favorisent la transcription de gènes cibles. L'ARN messager (ARNm) formé est par la suite traduit en protéine. Ce sont les protéines synthétisées à partir de l'activation des gènes cibles par les complexes RA-SAA qui sont responsables de la réponse androgène et anabolisante (Conn et Melmed, 1997 ; Tyagi, *et al.*, 2000 ; McPhaul et Young, 2001).

La majorité des études réalisées pour établir le mécanisme d'action des SAA ont utilisé la testostérone et/ou la DHT afin d'activer le récepteur androgène. Ce processus a par la

suite été généralisé à l'ensemble des SAA (Basaria, Wahlstrom et Dobs, 2001). Cependant, l'affinité pour le récepteur androgène et la force d'activation du récepteur androgène diffèrent d'un SAA à l'autre (Saartok, Dahlberg et Gustafsson, 1984 ; Carlson et Katzenellenbogen, 1990 ; Grino, Griffin et Wilson 1990).

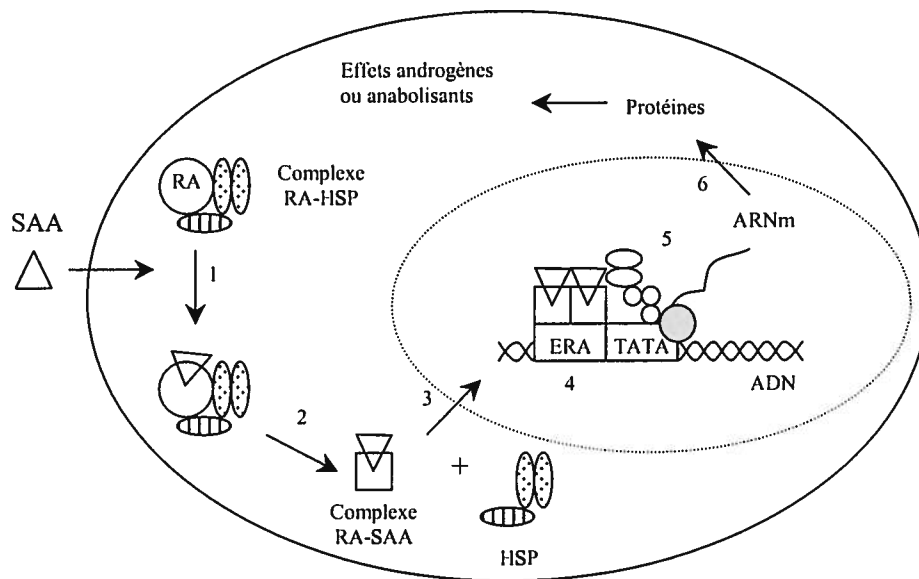


Figure 4 Mécanisme d'activation du récepteur androgène

Légende : (1) Après avoir traversé la membrane plasmique, le SAA se lie au RA qui est situé dans le cytoplasme en complexe avec les HSP. (2) La liaison du SAA au RA induit un changement de conformation du récepteur et les protéines HSP se détachent du complexe. (3) Le complexe RA-SAA formé se rend dans le noyau (4) où il se fixe à l'ADN en homodimère au site de liaison des ERA. (5) La liaison de l'homodimère RA-SAA facilite le recrutement des protéines accessoires pour former un complexe actif de transcription du gène cible. (6) L'ARNm est ensuite traduit en protéine.

Les métabolites des SAA sont considérés comme biologiquement inactifs car ils ne possèdent pas la capacité d'activer le récepteur androgène. À l'opposé, une activité enzymatique est nécessaire pour rendre biologiquement actif les précurseurs des SAA (Kacsoh 2000).

### 1.5 APPLICATIONS MÉDICALES

Autant l'action androgène que celle anabolisante des SAA représentent un intérêt pour la médecine. Isolée pour la première fois en 1935 (David *et al.* 1935), la testostérone a par la



suite été commercialisée par l'industrie pharmaceutique. Durant les années qui suivirent, de nombreux autres SAA ont été mis en marché afin d'améliorer la spécificité de l'action biologique recherchée.

#### *1.5.1 Actions thérapeutiques*

Les SAA ont en premier lieu été prescrits par les médecins afin de contrer les niveaux anormalement bas de testostérone chez des patients masculins. L'administration de SAA s'est avérée efficace pour restaurer les niveaux hormonaux chez des patients ayant subi l'ablation chirurgicale des testicules, due à une malformation ou à une tumeur, et pour stimuler le développement sexuel chez des adolescents ayant une carence en testostérone. De son côté, l'effet anabolisant des SAA a surtout été exploité par le domaine médical afin de combler une perte importante de protéines suite à une maladie comme le cancer, l'ostéoporose, l'anémie et le sida ou suite à un grave traumatisme comme une brûlure sévère (Griffin et Wilson, 1998 ; Basaria, Whalstrom et Dobs, 2001).

#### *1.5.2 Voies d'administration*

Les SAA sont administrés aux patients principalement par voie orale ou par injection intramusculaire. Lorsque pris par voie orale, les SAA sont rapidement absorbés par le tractus gastro-intestinal et acheminés par la veine porte au foie où ils sont soumis à l'action des enzymes métaboliques. Les SAA possédant une structure sensible à l'action des enzymes hépatiques sont rapidement dégradés et deviennent biologiquement inactifs avant même d'avoir atteint la circulation systémique. Ce mécanisme est appelé l'effet de premier passage. Le temps requis pour inactiver la moitié de la dose administrée correspond au temps de demi-vie d'une hormone. Ainsi, seule la fraction de la dose administrée qui atteint la circulation systémique avant son passage dans le foie est disponible pour exercer son action biologique. Les SAA synthétisés par l'industrie pharmaceutique possèdent des structures qui résistent mieux aux enzymes hépatiques (voir Section 2.4.3). L'effet de premier passage est donc grandement ralenti chez ces SAA synthétiques et leur disponibilité biologique en est par conséquent augmentée (Griffin et Wilson, 1998).

Lorsque administrés par injections intramusculaires, les SAA sont absorbés au site d'administration et rejoignent rapidement la circulation systémique. Leur transport dans le sang les conduit au foie où ils sont métabolisés. Comparativement à l'administration orale, l'injection intramusculaire diminue l'effet de premier passage, mais le temps de demi-vie n'en est que légèrement augmenté. La modification de la structure des SAA synthétisés en laboratoire a permis d'obtenir des stéroïdes absorbés plus lentement au site d'injection (voir Section 2.4.3) (Griffin et Wilson, 1998).

Les laboratoires de recherche en pharmacologie ont tenté de mettre au point divers moyens pour ralentir l'absorption des SAA au site d'injection. Différents modes d'administration, comme l'implant dermique, ont été développés mais sans grand succès (Becker *et al.*, 1990). Un nouveau progrès pharmaceutique pourrait promouvoir l'utilisation de SAA sans modification pharmacologique, dont notamment la testostérone. Le développement d'une matrice biologique injectable et biodégradable pourrait servir de véhicule pour l'administration sous-cutanée de testostérone. Cette matrice aurait l'avantage de relâcher lentement les SAA et servirait ainsi de facteur de ralentissement de l'absorption au site d'injection (Burris, Ewing et Sherins, 1988). Une récente étude effectuée auprès de 14 patients souffrant d'hypogonadisme a démontré que l'injection sous-cutanée d'une seule dose de testostérone dans une matrice biodégradable formée de microcapsules de polylactide-co-glycolide permettait de rétablir les niveaux sanguins de testostérone pour 7 à 10 semaines (Amory *et al.*, 2002). De plus, aucun effet secondaire n'a été rapporté par les volontaires lors de cette étude et les niveaux sanguins de diverses hormones pouvant être affectées par l'administration massive de SAA sont restés constants.

### 1.5.3 Modifications pharmacologiques

Afin de conférer des propriétés physiologiques avantageuses à son utilisation clinique, trois types de changements ont été apportés à la structure chimique de base de la testostérone pour former de nouveaux SAA. Ces trois types de modifications sont: l'estérification du groupement  $17\beta$ -OH (type A), l'alkylation en position  $17\alpha$  (type B) et la modification de l'anneau A, B ou C (type C) (voir Figure 5).

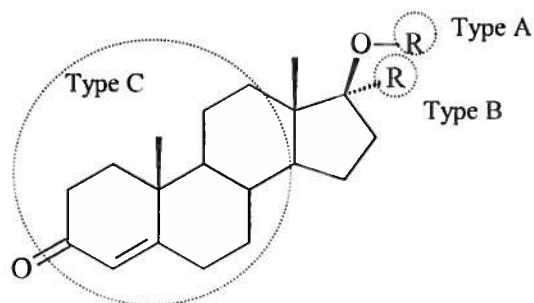


Figure 5 Modifications pharmacologiques apportées à la testostérone

Légende : Type A = estérification en C-17 $\beta$ , Type B = alkylation an C-17 $\alpha$ , Type C = modification de l'anneau A, B ou C.

L'estérification de la fonction alcool en C-17 $\beta$  diminue la polarité des SAA, ce qui augmente leur solubilité dans les huiles utilisées comme véhicule d'injection. Ce gain d'affinité pour leur véhicule d'injection permet aux esters de SAA de quitter plus lentement leur site d'administration et ainsi prolonger leur durée d'action. Plus la chaîne ester ajoutée contient de carbone, plus le SAA formé est liposoluble et plus il exerce une action de longue durée. L'estérification des SAA amène cependant deux contraintes. Le caractère lipophile des esters de SAA restreint leur administration par voie orale et favorise leur administration par injection intramusculaire. Aussi, la présence du groupement ester en C-17 $\beta$  rend les SAA biologiquement inactifs. Le groupement ester doit donc être hydrolysé avant que le stéroïde puisse exercer son action thérapeutique. Malgré ces deux contraintes, l'estérification représente la modification de choix pour prolonger la durée d'action d'un SAA.

L'ajout d'un groupement alkyle en position C-17 $\alpha$  est particulièrement efficace pour les SAA administrés par voie orale. Bien qu'ils soient acheminés vers le foie après leur absorption, les SAA 17 $\alpha$ -alkyl ne sont que faiblement métabolisés par les enzymes hépatiques. Ils atteignent ainsi la circulation systémique en concentration suffisante pour exercer leur action thérapeutique. Contrairement aux esters de SAA, les SAA 17 $\alpha$ -alkyl sont biologiquement actifs sans que leur groupement ajouté ne soit hydrolysé. Cependant, la combinaison de cette propriété à leur faible taux de dégradation hépatique rend ces

composés très nocifs pour le foie. Ainsi, bien que les substitutions  $17\alpha$ -méthyle et  $17\alpha$ -éthyle soient courantes chez les SAA administrés oralement, l'administration prolongée de SAA  $17\alpha$ -alkyl n'est pas recommandée.

Finalement, les modifications effectuées sur la structure des cycles A, B et C des SAA sont diverses, allant d'une simple substitution (principalement en position C-1, C-2, C-9 et C-11) à l'ajout d'un hétérocycle à l'anneau A, tel le noyau pyrazole du stanozolol. Les effets recherchés sont généralement une augmentation de son potentiel et/ou de sa durée d'action ou une diminution de son métabolisme. De plus, certaines modifications apportées à la structure des cycles confèrent aux SAA obtenus une activité anabolisante plus importante que celle androgène.

Ainsi, les trois types de modifications de la structure de base de la testostérone confèrent aux nouveaux SAA synthétisés des propriétés pharmacologiques favorables à son utilisation médicale. Afin d'optimiser les effets biologiques recherchés, les SAA synthétisés en laboratoire possèdent généralement une combinaison de ces trois types de modifications (Griffin et Wilson, 1998 ; Basaria, Wahlstrom et Dobs, 2001).

## 2. LES STÉROÏDES ANDROGÈNES ANABOLISANTS ET LE DOPAGE

### 2.1 NOTIONS RELIÉES AU DOPAGE

La notion de dopage est définie par le Comité International Olympique (C.I.O.) comme suit :

« Est qualifié de dopage : 1. l'usage d'un artifice (substance ou méthode) potentiellement dangereux pour la santé des athlètes et/ou susceptible d'améliorer leur performance, ou 2. la présence dans l'organisme d'un athlète d'une substance interdite, la constatation de l'usage d'une telle substance ou la constatation de l'application d'une méthode interdite » (C.I.O., 1999, p.12)

Les substances interdites se regroupent en cinq catégories : les stimulants, les narcotiques, les agents anabolisants (comprenant les SAA et les agonistes- $\beta_2$ ), les diurétiques et les hormones peptidiques (incluant les substances mimétiques et les analogues). Les effets physiologiques recherchés par les athlètes ainsi que des exemples de substances dopantes pour chacune des classes sont présentés au Tableau 1 (C.I.O., 1999).

Tableau 1 Classes des substances prohibées par le C.I.O.

Classes	Effets biologiques	Exemples de composés
Stimulants	Stimuler l'activité cérébrale Diminuer la sensation de fatigue	Cocaïne, Éphédrine, Amphétamines
Narcotiques	Inhiber les effets de la douleur	Méthadone, Morphine
Agents anabolisants	Augmenter la masse, la force et la puissance musculaire	19-Nortestostérone, Clenbutérol
Diurétiques	Favoriser la perte de poids rapide Masquer l'utilisation de produits dopants	Furosémide, Triamtèrene
Hormones peptidiques	Induire la sécrétion de testostérone Favoriser la croissance Accroître l'endurance	Hormone lutéinisante, Hormone de croissance, Érythropoïétine

## 2.2 HISTORIQUE DE L'UTILISATION DES SAA

Dès la fin du XIX<sup>e</sup>, le physiologiste français Charles Édouard Brown-Sequard a observé que l'administration intra-musculaire d'extraits de testicules de porc et de cochon d'Inde augmentait la force physique (Basaria, Wahlstrom et Dobs, 2001). Il faudra cependant attendre en 1935 avant que la testostérone soit isolée (David *et al.*, 1935) puis synthétisée en laboratoire (Butenandt et Hanisch, 1935 ; Ruzicka et Wettstein, 1935) en même temps que les premiers SAA synthétiques (Ruzicka, Goldberg et Rosenberg, 1935).

Les premières utilisations de SAA répertoriées chez les sportifs remontent vers la fin des années 1940. Bien que cet usage n'ait jamais été formellement établi, il semblerait que ce soit des culturistes américains qui aient abusé pour la première fois de la testostérone. Le premier cas avoué de son utilisation serait survenu lors des championnats mondiaux d'haltérophilie en 1954. Un médecin de l'équipe russe aurait révélé à son homologue américain les bienfaits de la testostérone sur les performances exceptionnelles de ses athlètes. Toutefois vers 1956, les effets indésirables reliés à la prise de testostérone auraient poussé les athlètes à se tourner vers les SAA synthétiques nouvellement arrivés sur le marché pharmaceutique et possédant une action anabolique plus importante que les effets androgènes indésirables. Par la suite, l'utilisation des SAA envahit l'ensemble des disciplines et leur consommation devint excessive (De Mondenard, 2000 ; Laure, 2000).

Les SAA ont rejoint la liste des substances interdites par le C.I.O. en 1974, mais les tests permettant la détection de leur usage n'ont été instaurés qu'en 1976, lors des Jeux Olympiques de Montréal. Malgré leur interdiction, les SAA sont demeurés au fil des années une substance de choix pour les athlètes désirant améliorer leurs performances. Au cours des années 1980 et 1990, l'amélioration des méthodes de détection et l'élaboration de nouveaux tests de dépistage ont permis de mieux déceler l'abus des SAA par les athlètes (De Mondenard, 2000).

Malgré l'amélioration des tests de dépistage et le resserrement du contrôle des athlètes, les SAA sont toujours très populaires dans le domaine sportif. Les statistiques recueillies depuis 1993 par les laboratoires accrédités par le C.I.O. pour le contrôle du dopage

révèlent que, de tous les cas de dopage dépistés à chaque année, plus de 50% sont dus à l'usage de SAA (Mottram et George, 2000).

### 2.3 RÉGIME D'ADMINISTRATION

Peu d'informations sont disponibles sur les doses et les régimes d'administration des SAA aux athlètes afin d'augmenter leurs performances sportives. La majorité des cas relatés dans la littérature se rapportent aux pratiques des culturistes qui s'administrent des SAA à des doses largement supérieures à celles thérapeutiques. Par exemple, la dose médicale recommandée pour le décanoate de 19-nortestostérone, aussi connue sous le nom de Deca-Durabolin<sup>®</sup>, est de 50 à 100 mg à toutes les trois à quatre semaines (Association des pharmaciens du Canada, 2002) alors que les doses quotidiennes prises par les culturistes sont 100 fois supérieures (Mottram et George, 2000).

L'administration continue d'un SAA sur une longue période de temps induit une résistance à ce stéroïde et provoque une diminution des effets physiologiques recherchés. Pour contourner ce problème, les culturistes consomment simultanément divers SAA possédant des métabolismes différents. La voie d'administration, c'est-à-dire orale ou intramusculaire, est aussi considérée dans le choix du mélange de SAA. La dose globale de SAA que s'administre à chaque jour un culturiste dopé peut atteindre 250 à 3 500 mg par semaine (Blue et Lombardo, 1999). Cependant, les résultats d'études effectuées auprès d'haltérophiles, d'athlètes d'endurance et des sprinters indiquaient qu'ils utilisaient plusieurs SAA, mais à des doses avoisinant celles thérapeutiques (Perry, Andersen et Yates, 1990 ; Rogol et Yesalis, 1992). L'effet de l'utilisation d'un mélange de SAA au lieu d'un seul a été observé lors d'une étude réalisée par Hartgens *et al.* (2002). Bien que cette étude comporte certaines lacunes, les résultats indiquaient que l'administration de 200 mg de décanoate de 19-nortestostérone à chaque semaine, durant huit semaines, à des athlètes masculins n'affectait pas leur masse musculaire alors que la prise d'un mélange de SAA, dont la composition et les doses étaient laissées à la discrétion des athlètes, conduisait après huit semaines à une augmentation de la taille de muscles. Kutscher, Lund et Perry (2002) ont rapporté que, pour des raisons éthiques, les études cliniques étaient restreintes à l'administration d'un seul SAA.

L'usage de SAA à des doses excessives entraîne de nombreux effets secondaires indésirables (voir Section 2.5). Afin de réduire ces effets, les SAA sont administrés aux culturistes selon deux types de régime, soit le régime cyclique et le régime pyramidal. Le régime cyclique consiste à l'administration de SAA sur une période de six à douze semaines, puis à l'arrêt durant quelques semaines avant d'entreprendre un nouveau cycle. Le nombre de cycle effectué durant une année est de trois ou quatre, selon leur durée. Le principe de ce régime d'administration est que la limitation de la période d'exposition du corps humain au SAA diminuerait les effets secondaires et que la période de repos permettrait au corps de se rétablir des effets nocifs encourus. De son côté, le régime pyramidal consiste en l'augmentation puis en la diminution graduelle de la dose de SAA administrés. Ce régime permettrait l'accoutumance progressive du corps à l'augmentation des concentrations sanguines de SAA puis à la diminution et réduirait ainsi le développement des effets secondaires. Les culturistes combinent généralement ces deux types de régime d'administration. Ils consomment donc un mélange de SAA en dose graduelle sur des cycles de quelques mois en croyant obtenir le maximum d'effets anabolisants et le minimum d'effets secondaires (Blue et Lombardo, 1999 ; Mottram et George, 2000 ; Kutscher, Lund et Perry, 2002).

#### 2.4 EFFETS PHYSIOLOGIQUES

De nombreuses études ont démontré des résultats contradictoires sur l'effet des SAA sur le développement des muscles. Dans un article revu sur le sujet, Celotti et Negri Cesi (1992) ont signalé cinq faiblesses qui compromettaient l'interprétation des résultats de la plupart des études effectuées jusqu'alors. En résumé, ces faiblesses sont : a) les effets secondaires observés chez les sujets traités aux SAA rendent difficile la tenue d'une étude avec un placebo, b) les SAA sont administrés aux volontaires à des doses inférieures à celles prises par les athlètes dopés, c) les études se déroulent sur une période de temps trop courte (trois à quatre semaines seulement), d) les programmes d'entraînement et l'alimentation des volontaires ne sont pas uniformisés ni contrôlés et e) l'effet placebo et l'augmentation de l'agressivité chez les volontaires traités aux SAA ont pu affecter la mesure de l'augmentation de la force musculaire. Malgré l'amélioration de la rigueur des études effectuées par la suite, les résultats demeurent mitigés. Cependant, l'ensemble des



études tendent à proposer que le développement musculaire observé suite à l'administration de SAA résulte d'une combinaison de trois mécanismes, soit l'augmentation de la synthèse des protéines, la diminution de leur catabolisme et l'accroissement de la résistance à l'effort (Wu, 1997 ; Basaria, Wahlstrom et Dobs, 2001 ; Kutscher, Lund et Perry, 2002).

#### 2.4.1 *Augmentation de la synthèse des protéines*

À des niveaux physiologiques, les SAA exercent leurs actions biologiques en activant le récepteur androgène (voir Section 1.4.2), exprimé dans les cellules composant les muscles squelettiques (Kimura *et al.*, 1993 ; Kadi, 2000). Cependant, les SAA sont produits naturellement chez l'homme en concentration sanguine saturante pour les niveaux de récepteurs androgènes exprimés dans les cellules musculaires (Wu, 1997). L'administration de SAA ne devrait donc que stimuler faiblement l'activité des récepteurs androgènes. Or, Sheffield-Moore *et al.* (1999) ont démontré que l'administration orale d'oxandrolone à faible dose, 15 mg par jour durant cinq jours, à six jeunes hommes résultait en une augmentation de la synthèse des protéines musculaires et en une élévation des niveaux d'ARNm du récepteur androgène dans les muscles squelettiques. Lors d'une étude similaire effectuée par Ferrando *et al.* (1998) l'administration par injection intramusculaire d'une seule dose de 200 mg d'énanthate de testostérone à sept volontaires masculins en santé conduisait à une augmentation de la synthèse des protéines et à une réutilisation des acides aminés dans les cellules musculaires. Ces études suggèrent donc que les SAA augmentent la masse et la force musculaire en favorisant la réutilisation des acides aminés et en élevant les niveaux d'expression du récepteur androgène dans les muscles squelettiques.

#### 2.4.2 *Diminution du catabolisme des protéines*

Tout comme le récepteur androgène, le récepteur glucocorticoïde est exprimé dans les muscles squelettiques (Snochowski *et al.*, 1981). Pour exercer leur action catabolique, les glucocorticoïdes se lient à leur récepteur au site liaison des éléments de régulation des glucocorticoïdes (ERG) et l'activent afin de conduire à l'induction de la transcription de

gènes cibles. Les résultats de certaines études permettent de soutenir l'hypothèse que le développement des muscles observé suite à l'administration de SAA serait dû en partie à la diminution de l'action des glucocorticoïdes sur le catabolisme des protéines. Il a été démontré lors d'études *in vitro* que plusieurs SAA inhibaient la liaison d'un glucocorticoïde, la dexaméthasone, à son récepteur (Mayer et Rosen 1975 ; DuBois et Almon, 1984), ce qui conduisait à une diminution de l'activation de gènes cibles (Danhaive et Rousseau, 1986). L'action anti-catabolique de SAA a aussi été démontrée dans les muscles des rats *in vivo* (Seene et Viru, 1982 ; Danhaive et Rousseau, 1988). L'ensemble de ces résultats propose que les SAA exercent une action anti-catabolique en empêchant les glucocorticoïdes de se lier à leur récepteur et de l'activer. Hickson *et al.* (1990) ont pour leur part émis l'hypothèse que les SAA, à l'aide du récepteur androgène, interfèreraient avec l'action des glucocorticoïdes en se liant au site ERG à la place du récepteur glucocorticoïde, sans que la transcription des gènes cibles ne soit toutefois déclenchée.

Bien que le processus par lequel les SAA interfèrent avec les glucocorticoïdes afin d'atténuer leur action catabolique ne soit toujours pas déterminé à ce jour, des études cliniques supportent cependant cette hypothèse. Par exemple, l'administration d'énanthate de testostérone à des patients gravement brûlés, état de santé relié à hypercortisolisme et à l'hypogonadisme, a permis de diminuer significativement le catabolisme des protéines (Ferrando *et al.*, 2001).

#### 2.4.3 Effets de l'entraînement physique

Lors de la croissance des muscles chez l'embryon, les jeunes cellules musculaires, appelées myoblastes, prolifèrent et fusionnent pour former les filaments d'actine et de myosine qui composent les fibres musculaires. Chez l'adulte, les noyaux des fibres musculaires ne se divisent plus (Stockdale et Holtzer, 1961 ; Shafiq, Gorycki et Mauro, 1968 ; Bischoff et Holtzer, 1969) et ce sont les cellules satellites qui veillent à la croissance et à la réparation des muscles (Moss et Leblond, 1971). Or, plusieurs sportifs et membres de leur entourage croient que l'usage de SAA favorise la prolifération des myoblastes et active les cellules satellites (Kutscher, Lund et Perry, 2002). Kadi (2000) a

démontré que ce ne sont pas les SAA mais bien l'entraînement qui induit l'augmentation des cellules satellites dans les muscles squelettiques. Cette augmentation de cellules satellites favorise la réparation des fibres musculaires endommagées suite à un entraînement et conduit aussi au développement des muscles sollicités.

L'entraînement sur une longue période de temps induit l'augmentation du nombre de récepteurs androgènes contenus dans les fibres musculaires et cet effet est accru avec l'administration de fortes doses de SAA (Kadi *et al.*, 1999). Cependant, l'action des SAA sur les niveaux des récepteurs androgènes est hautement sélective et varie selon les différents muscles squelettiques du corps humain. Dans certains muscles, les niveaux des récepteurs androgènes sont augmentés par l'action des SAA tandis que dans d'autres, ils sont diminués (Kadi, 2000). Pour les muscles impliqués, une élévation du nombre de récepteurs androgènes les rend plus susceptibles à l'action des SAA et favorise, par le fait même, leur développement.

Une étude effectuée par Bhasin *et al.* (1996) a démontré que bien que l'administration de testostérone ou l'exercice seul conduisait à l'augmentation de la taille et de la force des muscles, ces effets étaient beaucoup plus importants lorsque l'administration de testostérone était combinée à un exercice physique approprié. Ainsi, l'administration de SAA semble stimuler, par différents processus, le développement des muscles et de façon plus prononcée lorsque cette administration est combinée à un exercice physique.

## 2.5 EFFETS SECONDAIRES

La synthèse de SAA produisant une action androgène moindre a permis de diminuer certains effets secondaires reliés à leur administration. Cependant, les doses excessives de SAA absorbés par les athlètes entraînent des effets néfastes pour leur santé et peuvent, en certaines occasions, être mortelles. Parmi les nombreux effets secondaires observés suite à l'administration de SAA, les plus fréquents se situent au niveau de la peau, du foie, du système cardio-vasculaire, du système reproducteur et du cerveau (Blue et Lombardo, 1999 ; Kutscher, Lund et Perry, 2002).

### 2.5.1 Effets cutanés

Divers troubles cutanés ont été rapportés suite à l'administration de SAA : une peau et un cuir chevelu plus gras, de l'acné sévère, de l'hirsutisme, de l'alopecie et des dermatites (Wu, 1997 ; Blue et Lombardo, 1999 ; Kutscher, Lund et Perry, 2002). L'analyse de biopsies de la peau provenant de divers consommateurs de SAA a démontré que l'administration de SAA favorisait le développement de facteurs causant l'acné, comme l'hypertrophie des glandes sébacées, l'augmentation des lipides à la surface de la peau et l'élévation de la population cutanée de *Propionibacteria acnes* (Kiraly, Collan et Alen, 1987 ; Kiraly *et al.*, 1988 ; Scott et Scott, 1992). Les effets cutanés sont souvent les premiers signes de l'utilisation de SAA pouvant être décelés (Piérard, 1998).

### 2.5.2 Effets hépatiques

Les troubles hépatiques occasionnés par l'administration à des doses excessives de SAA sont divers et leur degré de sévérité dépend à la fois des doses administrées, de la durée du cycle de consommation et de la combinaison des SAA employés. Par exemple, les SAA possédant une chaîne alkyle en position C-17 $\alpha$  sont reconnus pour leurs effets hépato-toxiques. L'abus de SAA peut conduire à l'élévation des fonctions métaboliques, telle que l'augmentation de l'activité des transaminases et la diminution des enzymes du cytochrome P450. Les désordres hépatiques favorisent le développement de la jaunisse, de l'hépatite cytolytique et cholestatique et, plus rarement, du carcinome hépatique (Soe, Soe et Gluud, 1992). Des périodes de repos suffisantes, entre des cycles d'administration de courte durée, permettent généralement aux fonctions métaboliques du foie de retourner à des niveaux normaux et ainsi prévenir le développement de maladies hépatiques (Ishak et Zimmerman, 1987 ; Blue et Lombardo, 1999 ; Kutscher, Lund et Perry, 2002).

Les désordres hépatiques causés par les SAA peuvent s'aggraver si leur administration est combinée à d'autres types de drogues ou de médicaments. Des études effectuées *in vivo* chez des rats ont démontré que l'administration à de fortes doses à long terme de divers SAA altérait la capacité du foie à métaboliser les xénobiotiques, en diminuant les niveaux de cytochrome P450 (Saborido, Molano et Megias, 1993 ; Boada *et al.*, 1999).

### 2.5.3 Effets cardio-vasculaires

De nombreux désordres du système cardio-vasculaire causés par l'administration de SAA ont été reportés dans la littérature. Parmi ceux-ci, les plus fréquemment cités sont l'altération du profil lipidique et l'hypertrophie du cœur. L'administration de SAA conduit à l'altération du profil lipidique en augmentant les niveaux sanguins des lipoprotéines à faible densité (LDL) et en diminuant ceux des lipoprotéines à haute densité (HDL) (Lenders *et al.*, 1988 ; Glazer, 1991; Pärssinen et Seppälä, 2002). Ces changements semblent reliés aux types de SAA administrés (Friedl *et al.*, 1990 ; Kuipers *et al.*, 1991 ; Bhasin *et al.* 1996 ; Kouri, Pope et Oliva, 1996) mais ne seraient pas dose-dépendants (Kouri, Pope et Oliva, 1996). L'altération du profil lipidique est réversible suite à l'arrêt de l'administration de SAA pendant quelques semaines (Kuipers *et al.*, 1991 ; Kouri, Pope et Oliva, 1996). Bien que l'effet à long terme sur la morbidité et la mortalité dues au déséquilibre du profil lipidique induit par les SAA ne soit pas déterminé, les changements dans les niveaux de HDL et LDL sont cependant connus pour augmenter les risques de maladies cardiaques (Miller, 1987 ; Musliner et Krauss, 1988).

Des effets cardio-vasculaires beaucoup plus graves ont été observés chez certains athlètes après avoir consommé des doses excessives de SAA. Des rapports d'autopsie rapportent la présence de cœurs hypertrophiés (Sullivan *et al.*, 1998 ; Blue et Lombardo 1999). Les conséquences de l'hypertrophie cardiaque sont sérieuses et peuvent conduire à un arrêt cardiaque (Luke *et al.*, 1990 ; Hausmann, Hammer et Betz, 1998).

### 2.5.4 Effets sur le système reproducteur

L'administration de SAA produit des effets secondaires sur le système reproducteur qui diffèrent selon les sexes. Chez l'homme, les SAA exercent une rétroaction négative sur les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion des hormones LH et FSH suivie d'une réduction de la spermatogenèse (MacIndoe *et al.* 1997). Les changements observés sont la réduction de la densité, du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes en plus d'un changement dans leur morphologie. Ces effets diffèrent selon la dose et le SAA administrés (Knuth, Maniera et

Nieschlag, 1989 ; MacIndoe *et al.* 1997). L'arrêt de l'utilisation des SAA conduit généralement à un rétablissement de la spermatogenèse, bien que le retour complet à la normale puisse prendre de quelques mois à quelques années, selon la durée et la dose employée. Lorsque les SAA sont utilisés massivement sur de longues périodes de temps, les effets néfastes sur l'appareil génital mâle peuvent être graves et conduire à l'infertilité et à l'impuissance (Kutscher, Lund et Perry, 2002).

Chez les femmes, l'utilisation de SAA cause l'apparition de caractéristiques masculines à divers degrés. L'appareil génital est affecté par l'hypertrophie du clitoris, la diminution du volume des glandes mammaires ainsi que le ralentissement des menstruations pouvant aller jusqu'à l'aménorrhée. De nombreux autres effets secondaires ont été rapportés par certaines femmes utilisant les SAA tels que l'abaissement de la voix et l'augmentation considérable de l'appétit (Strauss, Liggett et Lanese, 1985). Ces séquelles disparaissent généralement après l'arrêt de l'administration de SAA, malgré que certaines demeurent irréversibles (Simon, 2001; Burger et Davis, 2002 ; Kutscher, Lund et Perry, 2002).

### 2.5.5 Effets psychologiques

Il est difficile d'étudier les effets directs des SAA sur le comportement des volontaires. Les résultats des études portant sur le changement du comportement suite à l'administration de SAA sont contradictoires. Par exemple, dans des conditions expérimentales similaires, Tricker *et al.* (1996) ont observé que l'administration d'un SAA rendait les volontaires plus agressifs que ceux recevant le placebo alors que Pope, Kouri et Hudson (2000) ont rapporté l'opposé. Malgré ces résultats mitigés, certaines études ont démontré une association entre l'administration de SAA et le développement de sentiments comme l'agressivité, l'irritabilité, l'anxiété et d'autres humeurs apparentées (Wang *et al.*, 1996 ; Blue et Lombardo, 1997 ; Basaria, Wahlstrom et Dobs, 2001). Pope et Katz (1994) ont étudié le comportement des personnes s'administrant régulièrement des SAA à des doses excessives. Les résultats de cette étude indiquaient qu'un changement majeur d'humeur, par exemple la dépression ou la manico-dépression, avait été vécu par 23 % des culturistes s'administrant des SAA. Des comportements agressifs et/ou violents ont aussi été rapportés par la majorité de ces utilisateurs de SAA.

### 3. LES 19-NORSTÉROÏDES

Les 19-norstéroïdes sont des dérivés de la testostérone. Leur structure chimique se caractérise par l'absence du groupement méthyle en position C-19. Après la testostérone et ses précurseurs, les 19-norstéroïdes sont les SAA les plus fréquemment détectés dans les échantillons d'urine recueillis auprès d'athlètes. Environ 15% de tous les cas de dopage rapportés à chaque année sont dus à la prise illicite de 19-norstéroïdes (Mottram et George, 2000). À noter que pour les fins de ce travail, nous incluons dans l'appellation de 19-norstéroïdes la 19-nortestostérone, la 19-norandrost-4-ène-3,17-dione (4-nordione), la 19-norandrost-5-ène-3,17-dione (5-nordione), la 19-norandrost-4-ène-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (4-nordiol).

#### 3.1 LA 19-NORTESTOSTÉRONNE ET SES PRÉCURSEURS

Suite à sa synthèse au début des années 1950 (Birch, 1950 ; Wilds et Nelson, 1953), la 19-nortestostérone a été commercialisée sous le nom de nandrolone. Les préparations pharmaceutiques de 19-nortestostérone sont généralement des dérivés estérifiés en C-17 qui sont administrés par injection intramusculaire, comme le phénylpropionate de 19-nortestostérone (Durabolin<sup>®</sup>) et le décanoate de 19-nortestostérone (Déca-Durabolin<sup>®</sup>) (Association des pharmaciens, 2002). L'estérification permet d'augmenter le temps de demi-vie de la 19-nortestostérone et ainsi de prolonger la durée de son action pharmacologique (van der Vies, 1985). La 19-nortestostérone non-modifiée est pour sa part administrée par voie orale.

La commercialisation des 4- et 5-nordione et de la 4-nordiol s'est fait plus récemment avec la mise en marché des suppléments alimentaires (voir Section 3.6.1). Ces produits sont consommés sous forme de comprimés par voie orale. Il n'existe présentement aucune préparation pharmaceutique de 4- ou 5-nordione ni de 4-nordiol (Association des pharmaciens, 2002). Étant considéré comme des précurseurs métaboliques de la 19-nortestostérone, ces pro-hormones ont été ajoutées à la liste des substances prohibées par le C.I.O. en 1997.

### 3.2 ACTION BIOLOGIQUE

Les 19-norstéroïdes exercent leurs actions biologiques de la même façon que les autres SAA, c'est-à-dire en favorisant la synthèse protéique, en diminuant le catabolisme des protéines et augmentant la résistance à l'effort (voir Section 2.4). Une partie de ces effets dépend donc de l'activation du récepteur androgène à l'intérieur des cellules cibles (voir Section 1.4.2).

Comparativement à la testostérone, la 19-nortestostérone induit une activité anabolique plus importante et occasionne moins d'effets androgènes. Cette différence est due au métabolisme des SAA qui n'est pas le même dans les muscles et dans les organes reproducteurs (Jin et Penning, 2001). Suite à leur entrée dans les cellules des organes reproducteurs, les SAA sont soumis à l'action de la 5 $\alpha$ -réductase. La réduction de la 19-nortestostérone et de la testostérone par cette enzyme conduit à la formation de la 5 $\alpha$ -dihydroneortestostérone (DHN) et de la DHT, respectivement. Or, la DHN ne possède qu'une faible affinité pour le récepteur androgène alors que la DHT représente le SAA activant le plus fortement ce récepteur (Tòth et Zakar, 1982a et 1982b ; Bergink, Geelen et Turpijn, 1985). La 19-nortestostérone n'exerce donc que peu d'influence sur l'activité du récepteur androgène dans les organes cibles exprimant la 5 $\alpha$ -réductase, comme les organes reproducteurs (Sundaram *et al.*, 1995). À l'opposé, les muscles squelettiques sont pratiquement dépourvus de la 5 $\alpha$ -réductase. Étant donné que la 19-nortestostérone active plus fortement le récepteur androgène que la testostérone, les effets anaboliques observés dans les muscles squelettiques sont donc plus importants (Tòth et Zakar, 1982a et 1982b ; Bergink, Geelen et Turpijn, 1985).

### 3.3 MÉTABOLISME

#### 3.3.1 Principaux métabolites urinaires

Vers la fin des années 1950, Engel, Alexander et Wheeler (1958) ont observé que l'administration de 19-nortestostérone conduisait à l'excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone. Dans les années qui suivirent, les structures chimiques de ces deux



métabolites ont été validées suite à leur synthèse par Kupfer, Forchielli et Dorfmann (1960). Plus récemment, Massé *et al.* (1985) ont utilisé la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour identifier les principaux métabolites excrétés suite à l'administration intramusculaire de décanoate de 19-nortestostérone, soit la norandrostérone, la norétiocholanolone et la norépiandrostérone.

Schänzer (1996) a publié un article regroupant les résultats des travaux effectués sur le métabolisme de plusieurs SAA, dont la 19-nortestostérone. Les principaux métabolites de la 19-nortestostérone proviennent de l'action combinée de trois groupes d'enzymes hépatiques : la 5 $\alpha$ - et 5 $\beta$ -réductase, la 3 $\alpha$ - et 3 $\beta$ -HSD et la 17 $\beta$ -HSD. Théoriquement, quatre métabolites pourraient être formés : la norandrostérone (5 $\alpha$ -estran-3 $\alpha$ -ol-17-one), la norépiandrostérone (5 $\alpha$ -estran-3 $\beta$ -ol-17-one), la norétiocholanolone (5 $\beta$ -estran-3 $\alpha$ -ol-17-one) et la norépiétiocholanolone (5 $\beta$ -estran-3 $\beta$ -ol-17-one). Cependant, ce dernier métabolite n'a jamais été détecté dans l'urine et sa formation demeure à être confirmée (Massé *et al.*, 1985 ; Schänzer, 1996).

Le métabolisme des 19-norstéroïdes autres que la 19-nortestostérone a fait l'objet de quelques récentes études, mais uniquement dans le contexte du dopage (Kintz, Cirimele et Ludes, 1999 ; Uralets et Gillette, 1999 et 2000 ; Schänzer, 2000 ; Machnik, Schrader et Schänzer, 2001 ; Lévesque *et al.*, 2002). Étant considérées comme des précurseurs, il est généralement admis que la 4-nordione et la 4-nordiol sont en partie transformées en 19-nortestostérone avant de suivre le même sentier métabolique (Uralets et Gillette, 1999 ; Schänzer *et al.*, 2000 ; Machnik, Schrader et Schänzer, 2001). Un schéma des voies enzymatiques conduisant à la formation des principaux métabolites de la 19-nortestostérone, de la 4-nordione et de la 4-nordiol est proposé à la Figure 6. L'administration de 5-nordione conduit aussi à l'excrétion de la norandrostérone et de la norétiocholanolone (Uralets et Gillette, 2000).

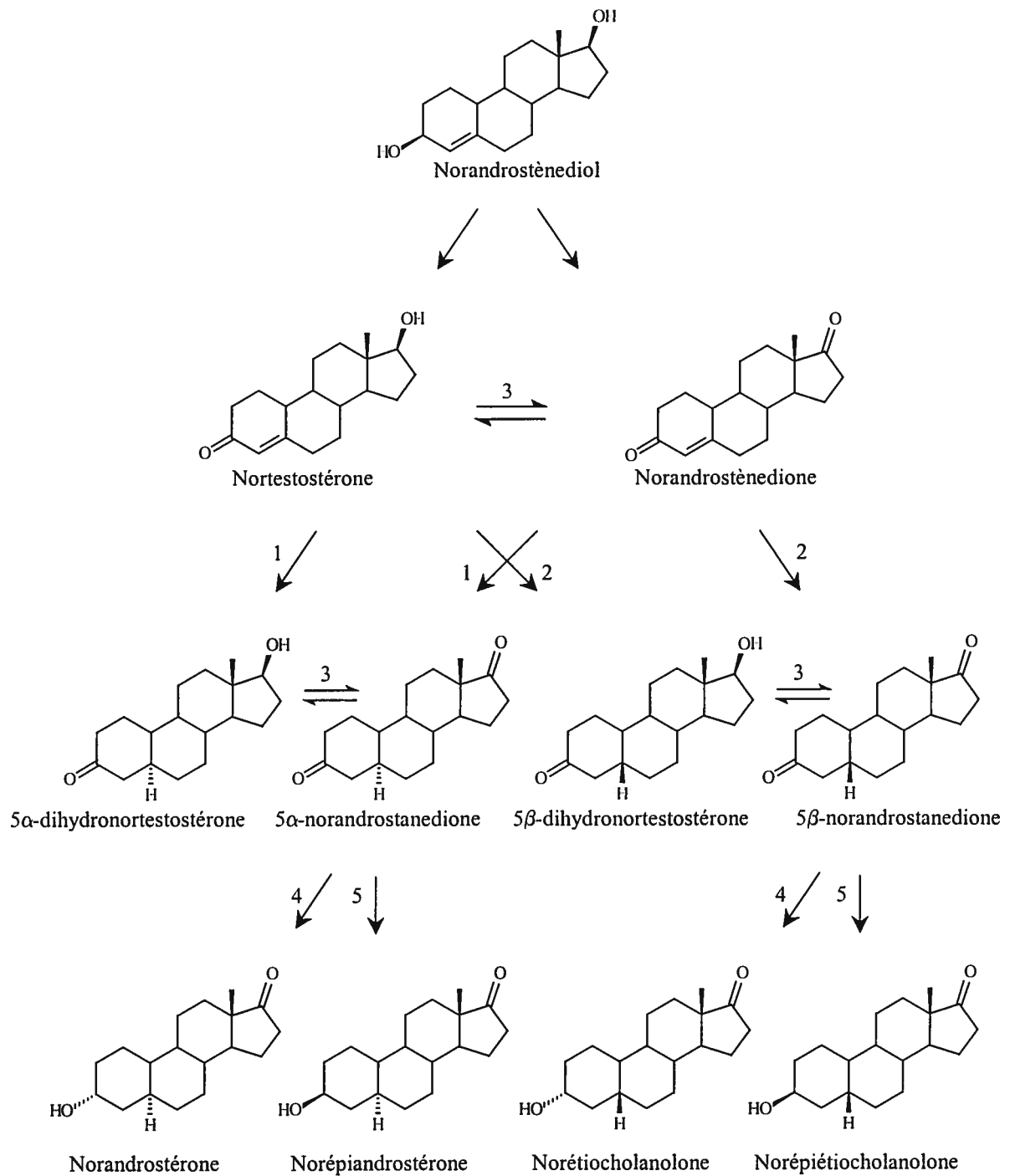


Figure 6 Métabolisme des 19-norstéroïdes

Enzymes impliquées : 1- 5 $\alpha$ -réductase, 2- 5 $\beta$ -réductase, 3- 17 $\beta$ -HSD, 4- 3 $\alpha$ -HSD, 5- 3 $\beta$ -HSD

### 3.3.2 *Cinétique d'élimination des métabolites*

Le mode d'administration influence le profil et la durée d'excrétion des métabolites. Lorsque administrés par injection intramusculaire, les esters de 19-nortestostérone sont relâchés progressivement dans l'organisme. Le profil d'excrétion de ses métabolites reflète cette cinétique. Suite à l'injection intramusculaire de 50 mg de décanoate de 19-nortestostérone, Kintz, Cirimele et Ludes (1999) ont observé que la norandrostérone et la norétiocholanolone étaient excrétées graduellement durant les premières heures pour atteindre des niveaux maximaux entre douze et vingt heures suivant l'administration. De plus, l'élimination de ces métabolites par le corps humain est lente puisque, huit mois après l'injection, les niveaux de norandrostérone et de norétiocholanolone avoisinaient encore les 2 ng/ml (Kintz, Cirimele et Ludes, 1999). À l'opposé, l'élimination des métabolites des 19-norstéroïdes pris par voie orale est rapide, de l'ordre de quelques jours (Kintz, Cirimele et Ludes, 1999 ; Uralets et Gillette, 1999 et 2000 ; Schänzer 2000). Dans ces études d'excrétion, les niveaux les plus élevés de norandrostérone et de norétiocholanolone ont été détectés dans les premiers échantillons recueillis suite à l'administration orale, démontrant ainsi un important effet de premier passage.

### 3.3.3 *Abondance relative des métabolites*

Il est établi que la norandrostérone et la norétiocholanolone sont les principaux métabolites excrétés suite à l'administration de 19-norstéroïdes (Engel, Alexander et Wheeler, 1958 ; Massé *et al.*, 1985 ; Schänzer, 1996 ; Özer et Temizer, 1997 ; Kintz, Cirimele et Ludes, 1999 ; Uralets et Gillette, 1999 et 2000 ; Schänzer, 2000). Les résultats obtenus par différentes études indiquent cependant que la proportion de ces deux métabolites varie en fonction du 19-norstéroïde, du mode d'administration et du temps d'excrétion.

Suite à l'administration de décanoate de 19-nortestostérone par injection intramusculaire, la norandrostérone est excrétée à des niveaux supérieurs à ceux de la norétiocholanolone (Kintz, Cirimele et Ludes, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'administration par voie orale de 19-nortestostérone (Schänzer *et al.*, 2000). Kintz,

Cirimele et Ludes (1999) ont aussi observé que les concentrations de norandrostérone étaient supérieures à celles de la norétiocholanolone dans les échantillons recueillis jusqu'à 16 heures suivant l'administration par voie orale de sulfate de 19-nortestostérone, pour par la suite s'inverser jusqu'à la fin de la période d'excrétion. De son côté, Schänzer (1996) a évalué le ratio de formation de la norandrostérone et de la norétiocholanolone à 72 : 28, respectivement. Cette étude ne spécifiait cependant pas si la 19-nortestostérone avait été administrée par voie intramusculaire ou orale.

L'administration de 4-nordione ou de 4-nordiol conduit aussi à l'excrétion de la norandrostérone à des niveaux plus élevés que ceux de la norétiocholanolone, bien que l'inverse ait été observé à quelques moments durant la période d'excrétion de ces métabolites (Kintz, Cirimele et Ludes, 1999 ; Uralets et Gillette, 1999, Schänzer *et al.*, 2000). L'administration de l'isomère  $\Delta^5$  de la nordione conduit à l'excrétion de la norétiocholanolone à des concentrations supérieures à ceux de la norandrostérone (Uralets et Gillette, 2000). Ainsi, la norandrostérone est généralement le métabolite urinaire le plus abondant excrété suite à l'administration de 19-norstéroïdes, bien que certaines études aient démontré quelques exceptions à cette tendance.

Le troisième métabolite, la norépiandrostérone, est aussi retrouvé dans l'urine suite à l'administration de 19-norstéroïdes, mais à de plus faibles niveaux (Schänzer *et al.*, 2000). Divers autres métabolites secondaires ont été détectés suite à l'administration de 19-norstéroïdes (Uralets et Gillette, 1999 ; Schänzer *et al.*, 2000). Schänzer *et al.* (2000) ont identifié que la  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- $5\alpha$ -estran-17-one, la  $3\alpha$ -hydroxyestr-4-èn-17-one et la  $3\beta$ -hydroxyestr-4-èn-17-one étaient des métabolites secondaires communs à la 19-nortestostérone, la 4-nordione et la 4-nordiol.

### 3.3.4 Métabolites glucuroconjugués et sulfoconjugués

Les réactions de conjugaison de phase II diffèrent selon la structure des métabolites (voir Section 2.2.4.2). Étant des dérivés  $3\alpha$ -hydroxy, la norandrostérone et la norétiocholanolone sont excrétées principalement sous forme glucuroconjuguée et de façon moindre sous forme sulfoconjuguée (Träger, 1977). De son côté, la

norépiandrostérone, un métabolite  $3\beta$ -hydroxy, est excrétée uniquement sous forme sulfoconjuguée (Massé *et al.*, 1985 ; Schänzer, 1996 ; Schänzer *et al.*, 2000).

La proportion des réactions métaboliques de phase II suite à l'administration de 19-norstéroïdes a fait l'objet de peu d'attention. La majorité des études d'excrétion quantifient uniquement la concentration de la norandrostérone et de la norétiocholanolone dans la fraction glucuroconjuguée et ignorent celle sulfoconjuguée.

### 3.4 BIOSYNTHÈSE DE 19-NORSTÉROÏDES

La présence endogène de 19-norstéroïdes chez l'humain a été observée pour la première fois dans le plasma de femmes enceintes (Reznik *et al.*, 1987) et dans les fluides des follicules ovariens (Dehennin, Jondet et Scholler, 1987) et a été dès lors associée au processus d'aromatisation des androgènes en œstrogènes.

#### 3.4.1 Aromatisation

##### 3.4.1.1 Mécanisme moléculaire

L'aromatisation représente le processus de biosynthèse des 3-hydroxyœstrogènes à partir de 3-kétoandrogènes. Cette réaction, catalysée par le complexe aromatase du cytochrome P450 (complexe P450arom) (Thompson et Siiteri, 1973 et 1974b), consiste à la formation d'un cycle aromatique sur l'anneau A et à la perte du groupement méthyle en C-19 des 3-kétoandrogènes. Un schéma simplifié de l'aromatisation de l'androstènedione en œstrone est présenté à la Figure 7.

Le processus d'aromatisation se divise en quatre étapes. En premier lieu, le groupement méthyle en C-19 de l'androstènedione subit deux réactions d'hydroxylation pour conduire à la formation successive de la 19-hydroxyméthylène-androstènedione puis du 19-formylandrostènedione. La formation du 19-hydroxyméthylèneandrostènedione représente l'étape limitante du processus d'aromatisation (Wilcox et Engel, 1965). Par la suite, l'hydrogène en C- $2\beta$  du 19-formylandrostènedione subit une attaque oxydative.

Cette réaction conduit en fait à l'énolisation de la cétone en C-3 pour produire la 19-formylandrosténolone. Finalement, l'anneau aromatique est formé lors d'une attaque peroxydative en C-19 (Cole et Robinson, 1988 ; Graham-Lorence *et al.*, 1991 et 1995 ; Kao *et al.*, 2001). Lors du processus d'aromatisation, 3 moles de NADPH et 3 moles de O<sub>2</sub> sont requises pour chaque mole de substrat métabolisé (Thompson et Siiteri, 1974a) et l'enzyme NADPH-P450 réductase est responsable du transfert des électrons du NADPH au complexe P450arom (Grogan *et al.*, 1993).

#### 3.4.1.2 Production de 19-norstéroïdes

La biosynthèse de 19-norstéroïdes découlerait d'une réaction secondaire se produisant lors du processus d'aromatisation. Des études *in vitro*, effectuées avec le complexe P450arom équin, porcin ou humain, ont observé la biosynthèse de la 19-nortestostérone et de la 4-nordione lors de l'aromatisation de la testostérone en 17 $\beta$ -estradiol ou de l'androstènedione en oestrone (Khalil *et al.*, 1989; Garrett *et al.*, 1991 ; Moslemi, Silberzahn et Gaillard, 1995 ; Kao *et al.*, 2000).

Chez l'humain, Kao *et al.* (2000) ont évalué que l'aromatisation de la testostérone conduisait à la formation de l'œstradiol et de la 19-nortestostérone dans une proportion de 92 : 8, respectivement. Graham-Lorance *et al.* (1995) ont créé un modèle informatique en trois dimensions du complexe P450arom humain, basé sur les résultats de précédentes études. Cette modélisation leur a permis de proposer un mécanisme pour la production des 19-norstéroïdes. Un schéma de la synthèse de la 4-nordione à partir de l'androstènedione est proposé à la Figure 7. Brièvement, suite aux deux premières réactions d'hydroxylation du processus normal de l'aromatisation, le C-19 serait l'hôte d'une troisième hydroxylation qui conduirait à la formation du 19-carboxyandrostènedione. Ce dernier serait par la suite spontanément décarboxylé pour produire la 4-nordione (Graham-Lorence *et al.*, 1995).

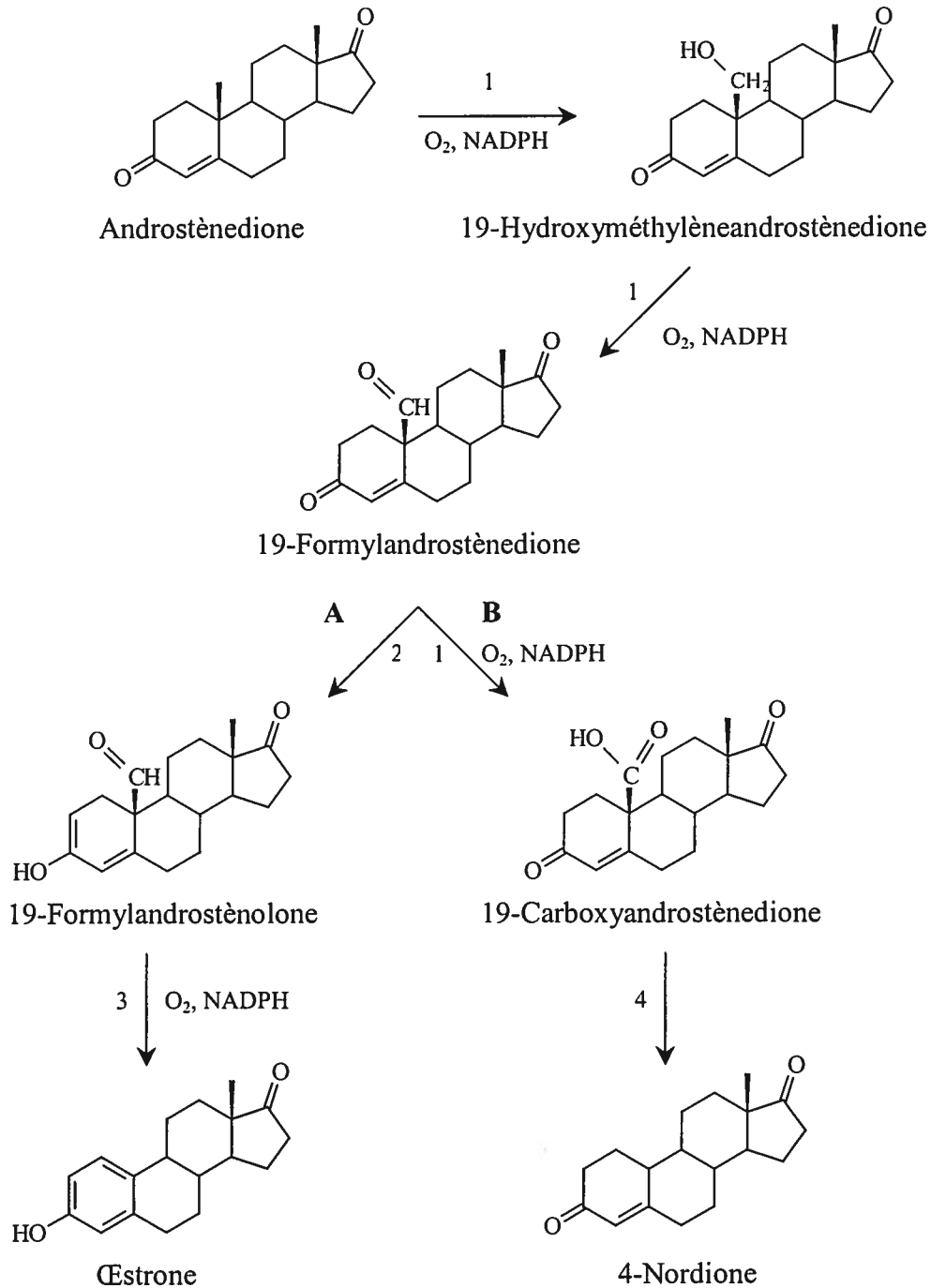


Figure 7 Schéma de l'aromatization de l'androstènedione en œstrone et de la formation de la 4-nordione

Réactions catalysées par le complexe P450arom, 1- hydroxylation, 2- énilisation, 3- déformylation, 4- décarboxylation spontanée, dans le processus d'aromatization (A) et dans la voie secondaire conduisant à la synthèse des 19-norstéroïdes (B).

En étudiant le modèle porcin *in vitro*, Corbin, Trant et Conley (2001) ont aussi proposé que les 19-norstéroïdes seraient synthétisés à partir d'un des intermédiaires du processus d'aromatisation, mais par un complexe enzymatique indépendant de celui du complexe P450arom. Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée et le complexe enzymatique impliqué demeure à être identifié.

#### 3.4.1.3 Tissus exprimant le complexe P450arom

Les réactions d'aromatisation ont été observées chez l'humain dans le placenta (Ryan, 1959), les follicules ovariens (Ryan, Petro et Kaiser, 1968), les testicules (Payne *et al.*, 1976), le tissu adipeux (Schindler, Ebert et Friedrich, 1972 ; Bolt et Göbel, 1972), les muscles squelettiques (Matsumine *et al.*, 1986), la peau (Bergkovitz *et al.*, 1984) et le cerveau (Steckelbroeck *et al.*, 1999). Le complexe P450arom a été identifié dans divers tissus du fœtus, dont principalement le foie (Price, Aitken et Simpson, 1992), mais ses niveaux d'expression sont cependant très faibles comparativement à ceux du placenta (Doody et Carr, 1989).

Le complexe P450arom provient de l'expression du gène CYP19 (Nelson *et al.*, 1993) qui est régulée par un promoteur qui diffère selon les tissus et qui est sous le contrôle de diverses hormones (Simpson *et al.*, 1994 ; Nelson et Bulun, 2001). L'activité du complexe P450arom est donc spécifique à chaque tissu. Dans un article revu, Nelson et Bulun (2001) ont rapporté que les principaux sites d'aromatisation sont le placenta chez la femme enceinte, les follicules ovariens chez la femme pré-ménopausée et le tissu adipeux et la peau chez l'homme et la femme ménopausée. Chez l'homme, la stéroïdogénèse dans les testicules contribuerait pour 15% des œstrogènes circulant dans le sang (Nelson et Bulun, 2001). Lors d'une étude *in vitro*, Inkster, Yue et Brodie (1995) ont observé que l'activité aromatique était en moyenne 18 fois plus élevée dans le placenta que dans les testicules. Simpson *et al.* (1994) ont indiqué que la biosynthèse des œstrogènes était très importante dans le placenta et faible dans le tissu adipeux. L'ensemble de ces études suggère donc que le placenta soit le tissu le plus riche en aromatasase.



### 3.4.2 Excrétion physiologique des 19-norstéroïdes

#### 3.4.2.1 Études de population

Les études réalisées auprès de la population générale rapportaient que, dans la majorité des échantillons recueillis, aucune trace des métabolites des 19-norstéroïdes n'avait été détectée. Lorsque présents, les concentrations de norandrostérone et de norétiocholanolone ne dépassaient pas 0,8 et 0,2 ng/ml, respectivement (Ciardi *et al.*, 1998 ; Dehennin, Bonnaire et Plou, 1999 ; Jeanneau *et al.*, 1999 ; Kintz, Cirimele et Ludes, 1999 ; Le Bizec *et al.*, 1999 ; Humbert *et al.*, 2000 ; Van Eenoo *et al.*, 2001).

Des niveaux d'excrétion plus élevés de norandrostérone ont été observés chez la femme enceinte (Jeanneau *et al.*, 1999 ; Mareck-Engelke *et al.*, 2000 ; Van Eenoo *et al.*, 2001). Mareck-Engelke *et al.* (2000) ont remarqué que la concentration de norandrostérone avait tendance à augmenter au cours de la grossesse chez cinq patientes, passant de 0-2,7 ng/ml durant le premier trimestre à 2,7-7,0 ng/ml durant le dernier. L'analyse de plus de 250 échantillons provenant de différentes femmes enceintes, ayant dépassé le stade de 20 semaines, a démontré que la norandrostérone était généralement excrétée en concentration inférieure à 5 ng/ml, mais pouvait atteindre jusqu'à 16,5 ng/ml (Mareck-Engelke *et al.*, 2000). Ces augmentations corrélaient avec les changements hormonaux associés à la grossesse. Kitawaki *et al.* (1992) ont observé que l'activité du complexe P450arom augmentait de plus de 16 fois entre la 10<sup>e</sup> et la 40<sup>e</sup> semaine de grossesse. De leur côté, Reznik *et al.* (2001) ont observé que l'administration à des volontaires masculins d'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG), sécrétée naturellement que par le placenta, semblait stimuler l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes. Suite à l'administration de hCG, les niveaux de norandrostérone et de norétiocholanolone sont passés de non-détectables à 0,43 et 0,20 ng/ml, respectivement. De plus, cette augmentation était étroitement liée à la concentration plasmatique en œstradiol.

Dans une moindre mesure, l'augmentation des niveaux d'excrétion de norandrostérone a été notée chez la femme lors de l'ovulation et semble corrélée avec l'élévation de la

concentration sanguine de la LH (Hemmersbach, Hågensen et Misund, 2000) et de l'œstradiol (Van Eenoo *et al.*, 2001). Les niveaux de ces deux hormones varient lors du cycle menstruel pour atteindre un maximum durant la fin de la phase proliférative qui se termine par l'ovulation (Abraham et Klaiber, 1970 ; McNatty *et al.*, 1976). Doody *et al.* (1990) ont démontré que le complexe P450arom était exprimé dans les ovaires à ce stade du cycle et Suzuki *et al.* (1994) ont proposé que l'élévation de la concentration sanguine en œstradiol durant l'ovulation soit liée à l'augmentation du nombre de cellules granuleuses qui expriment le complexe P450arom. Les concentrations maximales de norandrostérone mesurées pendant le cycle menstruel de 12 femmes étaient en moyenne de 0,6 ng/ml et n'excédaient pas 0,8 ng/ml (Hemmersbach, Hågensen et Misund, 2000).

#### 3.4.2.2 Influence de l'activité physique

En analysant les échantillons recueillis auprès de trois volontaires avant et après un entraînement, Le Bizec *et al.* (1999) ont émis l'hypothèse que la concentration urinaire de norandrostérone pouvait être de 2 à 4 fois plus élevée après un exercice physique. De façon similaire, les niveaux moyens de norandrostérone dans des échantillons d'urine obtenus d'athlètes amateurs et professionnels après une compétition étaient plus élevés que dans ceux recueillis auprès d'un groupe contrôle et avoisinaient dans certains cas les 2 ng/ml (Saugy *et al.*, 2000 ; Robinson *et al.*, 2001 et Le Bizec *et al.*, 2002b). Il n'avait alors pu être exclu que l'exercice physique intense, ou le stress qui l'accompagne, favorise l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes. Il a aussi été observé que la fréquence de détection de la norandrostérone à l'état de traces étaient plus élevée dans les échantillons d'urine provenant d'athlètes que dans la population générale (Gàlan Martin *et al.*, 2001 ; Gambelunghe, Somnavilla et Rossi, 2002). À l'opposé, Schmitt *et al.* (2002) ont démontré que l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes n'était pas affectée par l'activité physique. Aucun changement n'a été observé dans les niveaux de métabolites excrétés avant, pendant et après un entraînement chez 29 athlètes de calibre national et international.

### 3.5 DISTINCTION ENTRE L'ORIGINE ENDOGÈNE ET EXOGÈNE

La détection de norandrostérone ou de norétiocolanolone en quantité supérieure à 2 et à 5 ng/ml dans les urines d'athlètes masculins et féminins, respectivement, est considérée comme une preuve de l'administration illicite de 19-norstéroïdes (C.I.O., 1999). Cependant, avant qu'une athlète ne soit déclarée positive, la grossesse et les contraceptifs oraux contenant de la noréthistérone doivent être investigués comme source possible de norandrostérone. Chez les femmes enceintes, le placenta produit des niveaux élevés de norandrostérone et de norétiocolanolone (voir Section 3.4.1.3). La mesure de la hCG permet de déterminer si des concentrations élevées des métabolites des 19-norstéroïdes dans une urine sont dues à la grossesse (Mareck-Engelke, Geyer et Schänzer, 1999). De son côté, la noréthistérone est une hormone progestative utilisée comme contraceptif oral. Le métabolisme de la noréthistérone conduit à la formation à un faible taux de la norandrostérone (Massé, Ayotte et Dugal, 1989). La prise de noréthistérone se distingue de l'administration illicite de 19-norstéroïdes par la présence dans l'échantillon d'urine de son métabolite majeur, la tétrahydronoréthistérone, à des niveaux plus élevés que ceux de la norandrostérone (Mareck-Engelke, Geyer et Schänzer, 1999).

Certains tests complémentaires aux critères de positivité établis ont été proposés dans le but de pouvoir déterminer en cas de doute si la norandrostérone et la norétiocolanolone présentes dans un échantillon d'urine proviennent d'une excrétion physiologique ou d'une administration illicite. Les tests proposés sont basés sur le rapport des concentrations de norandrostérone et de norétiocolanolone excrétées (Le Bizec *et al.*, 1999) et la proportion relative entre la norandrostérone glucuro- et sulfoconjuguée (Le Bizec *et al.*, 2002a). L'utilisation de tels paramètres pour distinguer entre les métabolites provenant de la production naturelle des 19-norstéroïdes et ceux découlant d'une administration illicite demeure cependant à être validée.

### 3.6 CONSOMMATION INVOLONTAIRE

Quelques cas ont été rapportés où la présence de norandrostérone dans l'urine humaine semble avoir résultée d'une consommation involontaire de 19-norstéroïdes provoquée par

la prise de suppléments alimentaires contaminés. De façon hypothétique, l'ingestion de viande d'animaux qui produisent naturellement ou qui ont reçu une administration de 19-norstéroïdes pourrait aussi représenter une source d'administration à l'insu du consommateur.

### 3.6.1 *Suppléments alimentaires*

Au milieu des années 1990, les suppléments alimentaires ont envahi le marché nutritionnel. Bien que la plupart ne renferme que des vitamines et des extraits de plantes, certains sont des pro-hormones et précurseurs de SAA, comme la DHEA, l'androstènedione, l'androstènediol, les 4- et 5-nordione, la 4-nordiol et plusieurs autres (Ayotte, 1999). Bien qu'interdite au Canada, la vente de ces suppléments est légale dans plusieurs pays dont les États-Unis. Depuis l'adoption en 1994 du « Dietary supplement health and educational act » par le congrès américain, les suppléments alimentaires sont en vente libre sans qu'ils ne fassent l'objet de vérification de la part de la Food and Drug Administration, organisme responsable de contrôler les produits pharmaceutiques aux États-Unis. De plus, le réseau Internet contribue à promouvoir leurs propriétés anabolisantes et à faciliter la distribution internationale de ces pro-hormones vendues sous la forme de suppléments alimentaires (Dumestre-Toulet, 2000). Aucune étude pharmacologique n'a cependant démontré l'efficacité de ces produits.

Certains suppléments alimentaires sont vendus comme précurseurs de la 19-nortestostérone et sont identifiés comme tels. Cependant, de nombreux autres renferment aussi des 19-norstéroïdes sans que leur présence ne soit spécifiée sur l'étiquette du produit (Ayotte, 1999 ; Catlin *et al.*, 2000 ; De Cock *et al.*, 2001 ; Geyer *et al.*, 2001 ; Pipe *et al.*, 2002 ; Schänzer, 2002). Lors d'une étude menée par De Cock *et al.* (2001), l'administration orale d'un supplément alimentaire, dont l'étiquette ne mentionnait que des extraits de plantes, à des volontaires a conduit à l'excrétion de norandrostérone et de norétiocholanolone à des niveaux atteignant 80 000 ng/ml et 65 000 ng/ml, respectivement, dans les heures suivant l'administration. Geyer *et al.* (2001) ont analysé le contenu de 165 suppléments dont les étiquettes ne mentionnaient pas la présence de pro-hormones. Les résultats indiquaient que 10% d'entre eux contenaient des

précurseurs des 19-norstéroïdes en quantité variant de 0,01 à 6 000  $\mu\text{g}$  et que l'administration de ces suppléments contaminés pouvaient conduire à l'excrétion de norandrostérone à des niveaux dépassant largement le seuil limite de positivité (Geyer *et al.*, 2001). De façon similaire, les résultats de l'analyse de 634 suppléments alimentaires, ne contenant pas de stéroïdes selon l'étiquetage, indiquaient que près de 15% d'entre eux renfermaient des pro-hormones, dont ceux de la 19-nortestostérone, et que ces suppléments dits contaminés provenaient en majorité des États-Unis (Schänzer, 2002).

### 3.6.2 Viande d'animaux d'élevage

Certaines fermes d'élevage utiliseraient, légalement ou illégalement, différentes hormones afin de favoriser la croissance des animaux (Meyer, 2001). Debruyckere, de Sagher et Van Petegham (1992) ont émis l'hypothèse que la viande provenant de ces animaux représentait une source de consommation involontaire de SAA pouvant conduire à l'obtention d'un résultat positif lors d'un test de contrôle du dopage. Leurs travaux relataient le cas d'un volontaire, sur dix, qui a excrété les métabolites de la chlorotestotérone après avoir mangé 150 g de viande provenant d'étals de boucher de Ghent, en Belgique. Les auteurs de cet article ont extrapolé cette observation à l'ensemble des hormones utilisées dans l'élevage (Debruyckere, de Sagher et Van Petegham, 1992).

Bien qu'illégale, la 19-nortestostérone est utilisée pour promouvoir la croissance des animaux d'élevage. Debruyckere, de Sagher et Van Petegham (1992) ont observé que la 19-nortestostérone était détectée dans 36 % des 369 cas d'animaux dopés rapportés dans leur laboratoire en 1990 et 1991. Ce groupe de recherche a par la suite mené une étude auprès de 50 volontaires à qui ils ont servi un repas composé de 150 g de viande maigre de bœuf achetée chez un boucher de Ghent (Debruyckere, Van Petegham et de Sagher, 1993). Un de ces volontaires a excrété la norandrostérone à une concentration légèrement supérieure à 2 ng/ml. Hemmersbach *et al.* (1995) ont mené une étude similaire afin de valider l'hypothèse du groupe de recherche de Debruyckere. Pour ce faire, ils ont administré par injection intramusculaire une dose par semaine de 315 mg de décanoate de 19-nortestostérone à deux bœufs sur une période de trois semaines. Après une période d'attente de un et deux mois, les animaux ont été sacrifiés et la viande provenant des sites

d'injection a été prélevée. Un total de douze volontaires ont consommé 150 g de viande provenant du site d'injection et aucune trace de métabolites des 19-norstéroïdes n'a été détectée dans les échantillons d'urine recueillis suite au repas (Hemmersbach *et al.*, 1995). Les auteurs de cette étude ont conclu que, bien qu'ils ne pouvaient exclure la possibilité de retrouver des 19-norstéroïdes dans la viande provenant du site d'injection, la probabilité de consommer cette viande et d'excréter la norandrostérone à des niveaux supérieurs à 2 ng/ml était très faible. De plus, les risques d'ingérer involontairement des 19-norstéroïdes par la viande de bœuf sont liés à leur administration puisque ces animaux n'en produisent pas naturellement (McEvoy *et al.*, 1999a et 1999b).

Les 19-norstéroïdes sont produits naturellement par certains animaux. La 19-nortestostérone est biosynthétisée par l'étalon (Houghton *et al.*, 1984 ; Benoit *et al.*, 1985 ; Ditinger *et al.*, 1989) et le porc non-castré (Ruokonen et Vihko, 1974 ; Debruyckere *et al.*, 1990, Debruyckere et Van Peteghem, 1991 ; Vandebroek *et al.*, 1991 ; Schwarzenberger *et al.*, 1993 ; De Wash *et al.*, 2001) et la 17 $\alpha$ -NT par le veau nouveau-né (Meyer *et al.*, 1992) et par des femelles en gestation, comme la vache (Meyer *et al.*, 1992 ; De Brabander *et al.*, 1994), la brebis (Clouet *et al.*, 1997), la jument et la chèvre (Sterk *et al.*, 1998). Le Bizec *et al.* (2000) ont émis et soutenu l'hypothèse que le porc non-castré représenterait une source de consommation involontaire de 19-norstéroïdes. L'ingestion de 300 g d'abats de porc non-castré par 3 volontaires a conduit à l'excrétion de norandrostérone à des niveaux atteignant 8 ng/ml.

## 4. APPAREILS ANALYTIQUES

Les méthodes de détection élaborées pour démasquer l'usage des SAA, dont les 19-norstéroïdes, sont basées sur l'identification et la quantification par spectrométrie de masse de leurs métabolites dans les échantillons d'urine.

### 4.1 COMBINAISON CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE/ SPECTROMÉTRIE DE MASSE

#### 4.1.1 Principes de base

Comme son nom l'indique, la combinaison du chromatographe en phase gazeuse au spectromètre de masse (CG/SM) comprend deux parties distinctes : le chromatographe en phase gazeuse sépare les composants d'un échantillon et le spectromètre de masse détecte et analyse les substances séparées. Le fonctionnement du CG/SM est schématisé à la Figure 8.

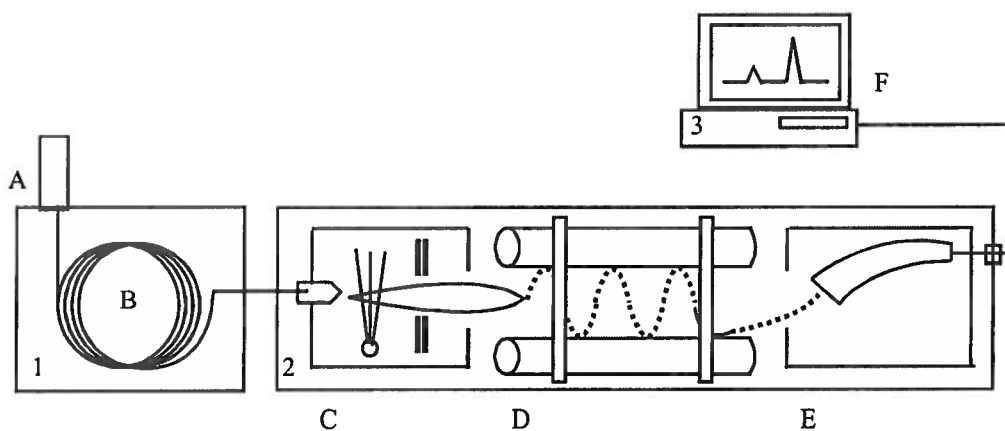


Figure 8 Schéma du fonctionnement du CG/SM

Composantes de l'appareil : 1- Partie CG : Injecteur (A), Colonne de chromatographie (B) 2-Partie SM : source (C), champ magnétique (D), détecteur (E) et 3- Analyseur des données (F)

Brièvement, le contenu de l'échantillon est tout d'abord injecté dans une colonne de chromatographie sous un flux d'hélium. Lors de leur trajet, les métabolites des SAA sont soumis à un programme d'élévation de pression et de température afin de favoriser leur séparation. À leur sortie de la colonne les molécules pénètrent dans la source où un faisceau d'électrons les bombarde afin de les ioniser. Les molécules ionisées se

fragmentent par la suite. Les ions ainsi formés sont par la suite concentrés et accélérés pour produire un faisceau à la sortie de la source. Finalement, les ions sont acheminés à un détecteur qui les analyse et qui distingue leur masse (McLafferty et Tureček, 1993).

L'analyse des résultats à l'aide d'un programme informatique permet l'obtention de deux types de résultats : le chromatogramme qui indique l'abondance des ions détectés en fonction de leur temps de rétention et le spectre de masse qui représente l'abondance de tous les ions détectés à un temps de rétention précis.

#### *4.1.2 Préparation des échantillons*

Le protocole typique de dépistage est basé sur a) l'isolation des métabolites des SAA de la matrice urinaire, b) l'hydrolyse spécifique de leur groupement conjugué (majoritairement glucuronide) et c) la dérivation des groupements hydroxyles et/ou carbonyles, principalement en C-3 et C-17, des SAA (Massé, Ayotte et Dugal, 1989). Cette dernière étape a pour but de former des dérivés triméthylsilyles (TMS) afin d'accroître la stabilité de leur structure chimique et ainsi de faciliter leur évaporation et leur analyse sur CG/SM (Donike et Zimmermann, 1980 ; Opfermann et Schänzer, 1997).

Parallèlement à l'amélioration de la procédure d'extraction, diverses études ont été menées pour déterminer les métabolites de chacun des SAA, pour synthétiser leurs standards authentiques qui n'étaient pas disponibles commercialement et pour développer l'analyse de tous les SAA et de leurs métabolites sur CG/SM. Les articles de Schänzer (1996), Schänzer et Donike (1993) et Ayotte, Goudreault et Charlebois (1996) englobent bien l'ensemble des résultats obtenus par les nombreuses études effectuées sur ces sujets.

#### *4.1.3 Identification des SAA*

L'identification des métabolites des SAA à l'aide du CG/SM se fait par l'analyse du chromatogramme et des spectres de masse. Le principe est le suivant. Chaque molécule se fractionne selon un patron déterminé par sa structure chimique et forme des ions de masse précise ( $m/z$ ), nommés ions spécifiques, en abondance relative les uns par rapport aux



autres. L'ensemble des ions spécifiques d'une molécule forme un spectre de masse qui lui est caractéristique. Le temps de rétention d'un métabolite lui est aussi spécifique. Ainsi, une molécule est identifiée dans un échantillon lorsque son spectre de masse est obtenu à son temps de rétention (McLafferty et Tureček, 1993).

Par exemple, pour la norandrostérone et la norétiocholanolone dérivées TMS, leurs ions spécifiques sont 420, 405, 315 m/z. Le fragment 420 m/z correspond à l'ion moléculaire ( $M^{+}$ ) de ces deux métabolites. L'ion 405 m/z et 315 m/z sont formés suite à la perte d'un groupement méthyle  $[M-CH_3]^{+}$  puis du TMSOH  $[M-CH_3-TMSOH]^{+}$ , respectivement. L'abondance des ions détectés par le CG/SM est proportionnelle à leur stabilité. Un schéma de la fragmentation conduisant aux ions 405 et 315 m/z est présenté à la Figure 9. Un exemple du chromatogramme et de spectres de masse obtenus suite à l'analyse de la norandrostérone et de la norétiocholanolone sur CG/SM est présenté à l'Annexe B.

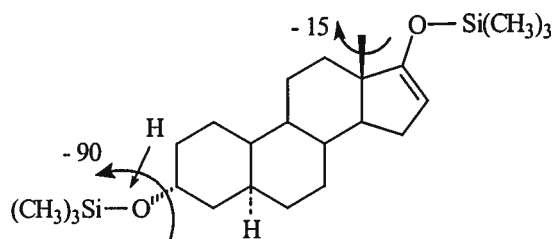


Figure 9 Schéma des fragmentations conduisant aux ions 405 et 315 m/z de la norandrostérone et de la norétiocholanolone dérivées TMS

#### 4.2 COMBINAISON CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE/ SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE RAPPORTS ISOTOPIQUES

La combinaison du chromatographe en phase gazeuse au spectromètre de masse de rapports isotopiques (CG/SMRI) est utilisée comme analyse complémentaire à celle du CG/SM. Un SAA produit naturellement par le corps humain et son homologue synthétisé en laboratoire possèdent une structure chimique identique. Les analyses sur CG/SM ne permettent donc pas de déterminer si la présence d'un métabolite de SAA dans un échantillon fait suite à sa production naturelle (endogène) ou à son administration illicite (exogène). Vers la fin des années 1990, trois groupes de recherche ont proposé

l'utilisation d'une nouvelle méthode analytique pour différencier entre l'administration illicite de testostérone et sa production naturelle (Becchi *et al.*, 1994 ; Aguilera *et al.*, 1996 ; Horning *et al.*, 1997 ; Shackleton *et al.*, 1997). Cette méthode est basée sur la détermination de la composition isotopique des atomes de carbone par le CG/SMRI.

#### 4.2.1 Fonctionnement de l'appareil

Les composantes de la CG/SMRI telles que nous les connaissons aujourd'hui proviennent de Matthews et Hayes (1978). Son fonctionnement est schématisé à la Figure 10. Brièvement, les constituants d'un échantillon sont séparés lors de leur passage dans la colonne de chromatographie et entrent par la suite dans une interface de combustion où ils sont carbonisés, en présence d'un agent oxydant, pour former du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et de l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Les molécules de  $\text{H}_2\text{O}$  formées sont absorbées par une membrane de nafion. Seules les molécules de  $\text{CO}_2$  sont dirigées vers le spectromètre de masse qui détermine leur teneur en  $^{13}\text{C}$  (Habfast, 1992 ; Meier-Augenstein, 1997).

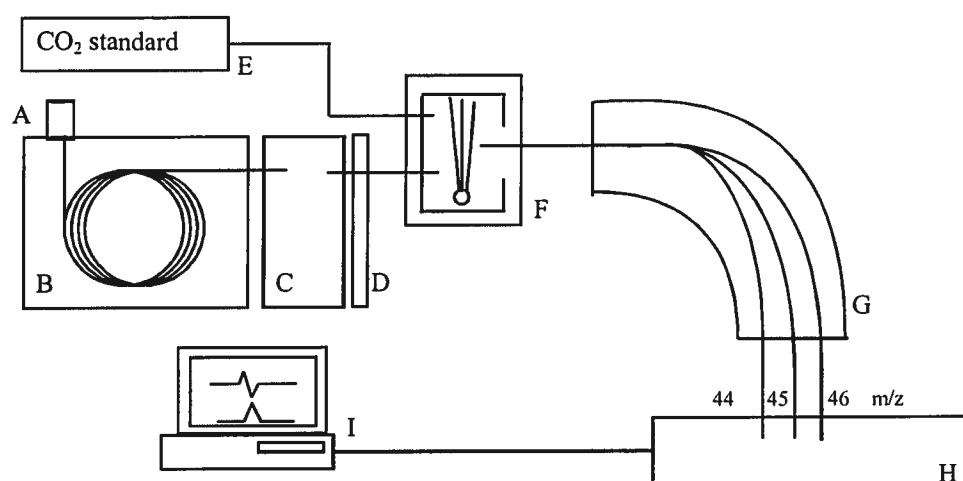


Figure 10 Schéma du fonctionnement de la CG/SMRI

Composantes de l'appareil : injecteur du CG (A), CG (B), chambre de combustion (C), trappe à  $\text{H}_2\text{O}$  (D), injecteur du gaz de référence (E), source du SMRI (F), champ magnétique (G), détecteur (H) et analyseur des données (I)

Dans l'atmosphère, l'abondance de l'isotope du  $^{13}\text{C}$  est de 1,12% et celle de l'isotope de  $^{18}\text{O}$  est de 0,20 %. Ainsi, la masse du  $\text{CO}_2$  détecté par le SMRI peut être à m/z 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ), 45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ) ou 46 ( $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ). Dans le contexte du dopage, l'intérêt de la CG/SMRI est sa capacité à déterminer la teneur en  $^{13}\text{C}$  des SAA. Le rapport obtenu est comparé et normalisé par rapport au gaz  $\text{CO}_2$  de référence dont la composition isotopique est prédéterminée, ce qui permet la comparaison des résultats entre différents échantillons. La normalisation du rapport se fait à l'aide de l'équation mathématique présentée à la Figure 11. Le résultat exprime l'abondance de l'isotope du  $^{13}\text{C}$  en delta per mille ( $\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$ ) (Habfast, 1992 ; Meier-Augenstein, 1997).

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = \left[ \frac{\text{R échantillon}}{\text{R référence}} - 1 \right] \times 1000 \quad \text{où } R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$$

Figure 11 Équation mathématique de la normalisation du rapport isotopique du carbone de l'échantillon par rapport au gaz de référence

#### 4.2.2 Fractionnement isotopique du carbone

Les atomes de carbone formant les molécules organiques proviennent tous, à des degrés divers, de la fixation du  $\text{CO}_2$  par les chloroplastes des plantes lors de la photosynthèse. Dès le début des années 1950, Baertschi (1953) a observé que la photosynthèse conduisait au fractionnement isotopique des atomes de carbone. Park et Epstein (1960) ont proposé et supporté expérimentalement l'hypothèse que le fractionnement isotopique du carbone se faisait en deux étapes lors du processus de photosynthèse, soit lors de l'entrée du  $\text{CO}_2$  atmosphérique dans les chloroplastes et lors de sa fixation à la ribulose-1,5-biphosphate pour débiter le cycle de Calvin.

En plus d'expliquer le phénomène de la discrimination des isotopes du carbone lors de la photosynthèse, il semble que l'hypothèse de Park et Epstein (1960) permette d'expliquer les variations entre les ratios  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  des différentes plantes. Le cycle de Calvin est le processus par lequel la fixation du  $\text{CO}_2$  conduit à la formation du premier intermédiaire

organique, le 3-phosphoglycérate, chez les plantes de type C3. De leur côté, les plantes de type C4 fixent le CO<sub>2</sub> au phosphoénolpyruvate pour biosynthétiser le premier intermédiaire organique, l'oxaloacétate. La synthèse des molécules organiques par les plantes C3 et C4 diffère donc au niveau des réactions enzymatiques régissant l'incorporation du CO<sub>2</sub>, ce qui pourrait être à l'origine de la différence entre l'abondance de l'isotope <sup>13</sup>C dans les molécules organiques provenant des plantes de type C3 et C4. Smith et Epstein (1971) ont analysé le ratio des isotopes du carbone de plus de 100 espèces de plantes appartenant à 60 familles différentes. Les résultats de cette étude indiquaient que les valeurs de δ <sup>13</sup>C ‰ variaient selon les espèces. Pour les plantes de type C4, les valeurs de δ <sup>13</sup>C ‰ se situaient entre -5,6 et -18,8 comparativement de -23,2 à -34,3 pour les plantes de type C3 (Smith et Epstein, 1971).

#### 4.2.3 Teneur en <sup>13</sup>C des SAA

Les SAA produits naturellement par le corps humain sont biosynthétisés à partir du cholestérol (voir Figure 3). Les valeurs de δ <sup>13</sup>C ‰ des métabolites des SAA endogènes se situent entre -19,9 et -27,6 (Becchi *et al.*, 1994 ; Aguilera *et al.*, 1996 ; Horning *et al.*, 1997 ; Shackleton *et al.*, 1997 ; Horning *et al.*, 1998 ; Aguilera *et al.*, 1999 et 2001 ; Ayotte *et al.*, 2001, Ueki *et al.*, 2001). Les variations inter-individuelles ne semblent pas liées à la nationalité, mais plutôt à la diète (Shackleton *et al.*, 1997 ; Aguilera *et al.*, 1999 ; Ueki et Okano, 1999 ; Aguilera *et al.*, 2001). Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse de rapports isotopiques de nombreux aliments soutiennent cette idée puisque les valeurs de δ <sup>13</sup>C ‰ ont été mesurées entre -12,8 et -36,4 (Schoeller *et al.*, 1986).

De leur côté, les SAA contenus dans les préparations pharmacologiques ainsi que dans les suppléments alimentaires sont synthétisés en laboratoire à partir de molécules de plantes C3, comme la diogénine du soya (Solomons, 1997) et devraient donc en posséder la teneur en <sup>13</sup>C. L'analyse de différents SAA provenant de produits pharmaceutiques le confirme puisque les valeurs de δ <sup>13</sup>C ‰ ont été mesurées entre -26,2 et -32,7 (Horning *et al.*, 1997 ; Schackleton *et al.*, 1997 ; Horning *et al.*, 1998 ; Ayotte *et al.*, 2001 ; de la Torre *et al.*, 2001 ; Mathurin *et al.*, 2001). De plus, de nombreuses études d'excrétion ont démontré que l'administration de testostérone (Becchi *et al.*, 1994 ; Aguilera *et al.*, 1996 ;

Horning *et al.*, 1997 ; Shackleton *et al.*, 1997 ; Horning *et al.*, 1998 ; Aguilera *et al.*, 1999), d'androstènedione et de DHEA (Ayotte *et al.*, 2001), de 19-nortestostérone (Mathurin *et al.*, 2001 ; Desroches *et al.*, 2002) et de 19-norandrostènedione (Ayotte *et al.*, 2001), provenant de produits pharmaceutiques, conduisaient à l'excrétion de ces SAA et/ou de leurs métabolites ayant des ratios  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  plus faibles que ceux produits naturellement par le corps humain. Par exemple, le  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ mesuré pour la norandrostérone était de  $-23,3$  lorsque excrétée naturellement par des femmes enceintes comparativement à  $-31,1$  et à  $-31,6$  suite à l'administration de 19-nortestostérone et de 4-nordione respectivement (Ayotte *et al.*, 2001). La diminution de la teneur en  $^{13}\text{C}$  a aussi été rapportée suite à l'administration de corticostéroïdes (Bourgogne *et al.*, 2000).

#### 4.2.4 Critères de positivité

Bien que les résultats de l'analyse sur SMRI soient normalisés par rapport à un gaz de référence, les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ obtenues sont des données absolues qui ne tiennent pas compte de la variation entre les individus. Pour contourner ce problème, Shackleton *et al.* (1997) ont proposé de comparer la valeur  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ obtenue pour le métabolite d'origine exogène à celle d'un stéroïde présent naturellement dans l'urine et qui n'est pas affecté par l'administration de la testostérone ou de l'un de ses précurseurs. Ce composé de référence est un métabolite final d'un stéroïde précurseur des SAA lors de leur biosynthèse (voir Figure 1). Le prégnanediol, le prégnanetriol et le cholestérol se sont avérés de bons choix pour l'obtention de la valeur de  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ de référence des stéroïdes endogènes chez un individu (Aguilera *et al.*, 1999 ; Ayotte *et al.*, 2001). Les résultats obtenus par Shackleton *et al.* (1997) suggéraient qu'un rapport des  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ du SAA suspecté et du stéroïde endogène supérieur à 1,1 indique la présence d'un SAA exogène. Ce ratio limite de 1,1 a par la suite été confirmé par d'autres études (Aguilera *et al.*, 1999; Ayotte *et al.*, 2001).

## **DEUXIÈME SECTION**

### **PRÉSENTATION DE L'ARTICLE**

## ***Excretion of norsteroids' phase II metabolites of different origin in human***

### **Auteurs**

Claudiane Guay, Danielle Goudreault, Wilhem Schänzer, Ulrich Flenker et Christiane Ayotte

### **Journal**

*Steroids* (soumission prévue en mai 2003)

### **Contribution personnelle**

Cet article englobe la majorité de mes travaux de maîtrise. J'ai aidé à la planification de la première étude de la consommation de porc et au recrutement des volontaires. Je me suis chargée de tenir une séance d'information pour assurer l'obtention du consentement libre et éclairé de chaque volontaire. Pour la reprise de l'expérience, je me suis occupée de tout son déroulement. J'ai effectué les manipulations et les analyses de tous les résultats présentés dans l'article, en plus de mettre au point certains protocoles. De plus, j'ai rédigé le manuscrit et procédé aux corrections suggérées par ma directrice de recherche.

### **Contribution des coauteurs**

Danielle Goudreault a mis sur pied l'étude de la consommation de porc en établissant les trois différentes recettes, en recrutant les volontaires et en obtenant les services du centre de recherche en nutrition appliquée de l'Institut du Tourisme et d'Hôtellerie du Québec (ITHQ). Elle a de plus conseillé sur la réalisation des études d'excrétion des métabolites endogènes et exogènes des 19-norstéroïdes.

Wilhem Schänzer et Ulrich Flenker ont réanalysé les échantillons sélectionnés sur CG/SMRI afin de valider les résultats obtenus.

Christiane Ayotte a planifié les différentes études et a procédé à la correction et à la traduction de l'article.

## 1.1 Résumé en français

La norandrostérone et la norétiocholanolone sont les deux principaux métabolites excrétés, majoritairement sous forme glucuroconjuguée, suite à l'administration de 19-norstéroïdes. Un troisième métabolite, la norépiandrosterone, est aussi retrouvé dans la fraction sulfoconjuguée. Lorsque détectés à de faibles niveaux, ces métabolites peuvent provenir d'une production naturelle ou d'une consommation involontaire d'abats de porc non-castré. La présente étude avait pour but d'étudier et de comparer le métabolisme des 19-norstéroïdes provenant de diverses origines. Pour ce faire, des échantillons d'urine provenant de femmes enceintes (origine endogène), de l'administration de 19-norstéroïdes (origine exogène) et de la consommation de porc non-castré ont été analysés sur CG/SM et CG/SMHR. Les résultats obtenus indiquaient que l'administration de 19-norstéroïdes conduisaient à l'excrétion de la norandrostérone, de la norétiocholanolone et de la norépiandrosterone à des niveaux largement supérieurs à ceux obtenus suite à une production naturelle ou à la consommation de porc non-castré. De plus, l'utilisation de paramètres cliniques basés sur la proportion relative de la norandrostérone et de la norétiocholanolone dans les fractions glucuro- et sulfoconjuguées s'est avérée inefficace pour distinguer entre l'origine endogène des 19-norstéroïdes et celle exogène. Finalement, des échantillons d'urine recueillis suite à la consommation d'abats de porc non-castré ont été analysés sur CG/SMRI et les valeurs obtenues pour le  $\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$  correspondaient une origine endogène et permettaient donc de distinguer cette consommation involontaire de l'administration illicite de 19-norstéroïdes.



*Excretion of norsteroids' phase II metabolites of different origin in human*

Claudiane Guay, Danielle Goudreault, Wilhem Schänzer<sup>†</sup>, Ulrich Flenker<sup>†</sup> and Christiane Ayotte

Laboratoire de contrôle du dopage, INRS-Institut Armand-Frappier, Montréal, Québec

<sup>†</sup>Institute of Biochemistry, German Sport University, Köln, Germany

Address for correspondence:

Christiane Ayotte, Ph.D.  
INRS-Institut Armand-Frappier  
245, boul. Hymus  
Pointe-Claire, Québec H9R 1G6  
Tel.: 514.630.8806  
Fax: 514.630.8999  
E-mail: [christiane.ayotte@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:christiane.ayotte@inrs-iaf.quebec.ca)

Keywords: 19-norandrosterone, 19-norsteroids, excretion, GC/MS, GC/C/IRMS, glucuronide, sulfate

Abbreviations:

NA: 19-norandrosterone (5 $\alpha$ -estran-3 $\alpha$ -ol-17-one)

NE: 19-noretiocholanolone (5 $\beta$ -estran-3 $\alpha$ -ol-17-one)

NP: 19-norepiandrosterone (5 $\alpha$ -estran-3 $\beta$ -ol-17-one)

NT: 19-nortestosterone (Estr-4-en-17 $\beta$ -ol-3-one)

Nordione: 19-norandrost-4-en-3,17-dione (Estr-4-en-3,17-dione)

IRMS: isotope ratio mass spectrometry

HRMS: high resolution mass spectrometry

## INTRODUCTION

In the past years, the administration of pharmaceutical preparations of 19-nortestosterone, a well known anabolic steroid, and of other norsteroids that became available for oral self-administration, was shown to lead mainly to the excretion of 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone and 19-norepiandrosterone, the later being found exclusively as its sulfoconjugate while the first two are predominantly excreted as their glucuronide derivative. While the i.m. administration of long-lasting preparations may be detected for months, the metabolites formed from oral ingestion are excreted massively in the following hours and remain detectable for only a few days. 19-norandrosterone is generally excreted predominantly over the  $5\beta$ -isomer but inversed proportions were reported at the end of the excretion period or when  $\Delta^5$ -isomers of norsteroids were taken [1-7]. 19-norandrosterone is also a minor metabolite of the progestogen, norethisterone although weak in abundance when compared to the main isomeric tetrahydro metabolites. Concentrations lower than 1 to 2 ng/mL are generally measured following the administration of most oral contraceptives. Nortestosterone and the precursors, norandrostenedione and norandrostenediol are listed as prohibited substances by the International Olympic Committee and the presence of 19-norandrosterone in an amount greater than 2 ng/mL and 5 ng/mL in male and female athletes' samples respectively constitutes a doping offence [8].

Excreted in very low amounts in human urine samples, endogenous 19-norandrosterone is not detected by the methods routinely employed in drug testing laboratories. Higher levels reaching up to 15 - 20 ng/mL are measured in specimens collected during

pregnancy [9]. A more sensitive instrumentation, larger volumes of urine and extensive sample clean-ups were needed to detect, identify and quantify endogenous 19-norandrosterone, which in the specimens of some males was found at levels varying around 0.01 to 0.32 and 0.05 to 0.6 ng/mL, thus well below the limit for reporting positive results [10-12]. The physiological levels of 19-norandrosterone measured in samples collected from females are lower than 1 ng/mL [13-15], maximum value of 0.8 ng/mL having been recorded during the ovulation and correlating apparently with high levels of estrogens [16]. In tissues expressing the cytochrome P450 aromatase-complex, 19-nortestosterone and 19-norandrost-4-en-3,17-dione seem to be formed *in vitro* during the aromatization of androgens to oestrogens [17-21]. In humans, norsteroids were detected in ovarian follicular fluids and in the placenta [22-23], one group proposing a model according to which norsteroids would be formed in a relation of 8:72 to estradiol during the aromatization process [22].

Lately Reznik et al. strengthen their hypothesis by showing that the excretion of 19-norandrosterone could derive from gonadal stimulation, having observed that basal levels were being increased to around 0.4 ng/mL further to the administration of hCG. They also reported that insulinic stress (by induced hypoglycaemia) had no effect in the excretion of norandrosterone [24].

Recently, the results of the only truly controlled study involving athletes demonstrated that exercise does not influence the excretion of 19-norandrosterone. Again, very low levels ranging from undetectable to a maximum of 0.25 ng/mL were measured (mean value of  $0.048 \pm 0.050$  ng/mL) [12].

Much attention has been given in the past years to what was described in the media as a “rash” of norsteroids’ positive findings reported by the laboratories. Those results were heavily challenged by arguing that the urinary metabolites were endogenously formed or had resulted from the benign intake of food or food supplements. This impression is however not supported by the statistical review of the cases reported by the IOC accredited laboratories, since the proportion of samples reported positive to norsteroids has been relatively constant from 1993 to 2001 ranging from 0.22 to 0.28% [25].

19-norsteroids, 17 $\alpha$ - or  $\beta$ -isomers, are produced naturally in some animal species such as the stallion, the non-castrated pig, females in gestation and were found in the newly born calf [26-36]. The intake of an appreciable amount of non-castrated pig offal has been shown to cause the excretion of 19-norandrosterone in amounts reaching nearly 10 ng/mL in the following hours [37].

This work aims at studying the phase II metabolites originating physiologically during the pregnancy or from the intake of norsteroids in the three typical following conditions: 1) the intake of a “dietary supplement” of 19-norandros-4-en-3,17-dione; 2) the ingestion of edible parts of non-castrated and castrated pig; 3) in several athlete’s samples which were found to be positive during routine doping controls. We have paid special attention to the biochemical parameters proposed by other groups to distinguish between the physiological secretion and the use of a prohibited source of norsteroids [37]. We have estimated by GC/HRMS the excreted levels of 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone and 19-norepiandrosterone when possible after selective hydrolysis of

the glucuro and sulfoconjugated metabolites. The  $^{13}\text{C}$  content of the metabolites present in sufficient amount after the ingestion of edible parts of non-castrated pig was measured by isotope ratio mass spectrometry.

## EXPERIMENTAL

### *Reagents, solvents, chemicals and standards*

All chemicals, salts and buffers were of analytical grade and obtained from either J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada), BDH (Montreal, QC, Canada) or Malinckrodt (Paris, KY, USA).  $\beta$ -glucuronidase from *E. coli* type IX-A lyophilized powder containing between  $1.5$  and  $2 \times 10^6$  U/g was purchased from Sigma Chemical (St-Louis, MO, USA). The chemical derivatization agents, trimethylsilylating reagent (TMIS) and N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA), triethylamine from Sigma Chemical and ethanethiol from Fisher (NJ, USA). The solvents were glass-distilled or HPLC grades and were purchased from Caledon (Montreal, QC, Canada). Deionized water was obtained by reverse osmosis and filtered over a Milli-Q water purification system (Millipore, Montreal, QC, Canada). Nitrogen, grade zero, was obtained from Air Liquide Canada (Montreal, QC, Canada). Commercial capsules of 19-norandrost-4-en-3,17-one (*Nordione*) were purchased with Health Canada's authorization (number: 8572.090.98) from a distributor of "sport nutritional supplements" chosen randomly on the Internet, Price's Power International (International Nutrition and Export, Newport News, VA, USA). Standards of  $5\alpha$ -estran- $3\alpha$ -ol-17-one and  $5\beta$ -estran- $3\alpha$ -ol-17-one

were obtained from Radian International (Austin, TX, USA), certified  $5\alpha$ -estran- $3\alpha$ -ol-17-one and  $5\beta$ -estran- $3\alpha$ -ol-17-one from Cerilliant (Austin, TX, USA),  $5\alpha$ -estran- $3\beta$ -ol-17-one and  $5\alpha$ -estran- $3\alpha,17\beta$ -diol from Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA).

### *Excretion studies*

Excretion studies were conducted with the approval of the Ethical Committee of INRS. All urine samples were collected in sterile plastic containers and were kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed. A) Pregnancy: Urine samples were collected once a week during the entire pregnancy of two women aged 30 (W30) and 34 (W34) respectively. B) Administration of 19-norandrost-4-en-3,17-dione : one capsule of *Nordione* containing 100 mg of 19-norandrost-4-en-3,17-dione was administered to a healthy male volunteer (M26; 26 year-old). The content of the pill was verified by GC/MS. All the specimens were collected 24 hours before the intake and five days after. C) Athletes' urine samples containing norsteroids: ten athletes' urine samples analysed in our laboratory and reported positive for the presence of norsteroids' metabolites during routine doping controls were selected for re-analysis. These samples were collected between 1993 and 2000, were kept frozen since then. They were selected considering the year of the collection, the amount of 19-norandrosterone present and the volume of urine left. D) Consumption of pig edible parts: selected edible parts of 3 three-year-old uncastrated pigs and of 3 four-month-old castrated pigs were provided by a local slaughterhouse (*Oviande Inc.*, Montreal, QC, Canada) and were kept frozen. The *Institut du tourisme et d'hôtellerie du Québec* (ITHQ, Montreal, Canada) prepared on two different occasions, different meals each containing a total amount of 300 g (18 volunteers) or 100 g (3 volunteers) of cooked meat. In the first round, three different meals containing 300 g of

either uncastrated or castrated pig edible parts were prepared: the first combined roasted kidney, liver and heart (100 g of each), the second one, liver and heart (150 g of each) while the third one contained only oven-baked meat (leg). The eighteen volunteers who agreed to participate in the first “300 g” experiment (double-blind study) were healthy men and women aged between 22 and 53 and weighing 56 to 95 kg. Six different groups of three were made including at least one man and one woman in each group. One individual in each group had to exercise for a period of 1 h. On a second round of experiments, three other meals were prepared for 3 volunteers who had participated before, this time with 100 g of kidney, liver or meat of uncastrated pig only. All the urines samples were collected during 24 hours before and 48 hours after the meal. They were kept frozen until analysed.

#### *Analysis of samples*

The urinary norsteroids were detected, identified and their concentration measured by GC/MS analysis in the selected ion monitoring mode (SIM) as their TMS-derivatives. A first screening of the samples was done on the combined free and glucuroconjugated steroids in order to identify and estimate the amount of the norsteroids present and to exclude an administration of other anabolic agents. For the final confirmation and quantification by GC/HRMS (high resolution mass spectrometry), selective hydrolysis was used to fractionate the glucuro- and sulfoconjugated steroids. The four samples containing the highest amount of norsteroids derived from the consumption of uncastrated pig offal were also analysed by GC/C/IRMS to obtain the  $^{13}\text{C}$  content of the glucuroconjugated norsteroids.

*Preparation of the urine samples*

The first screening by GC/MS was done with a slight modification of the method described previously [38]. Typically, urine aliquots of volumes adjusted in function of the specific gravity of the sample (ranging from 1.5 to 10.0 mL) were diluted with an equal volume of acetate buffer (pH 5.2, 2M). After the addition of 125 ng of the internal standard, 5 $\alpha$ -estran-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, the steroids were isolated by solid phase extraction (Sep Pak plus tC<sub>18</sub> cartridges (Waters, Canada). The glucuroconjugated steroids contained in the methanolic eluate were hydrolysed after evaporation to dryness, with 1 mg of the enzymatic preparation in 1 mL phosphate buffer (pH 6.9) at 50°C during one hour. The steroids were extracted twice with diethylether at pH 9 after the addition of 400  $\mu$ L of carbonate buffer. The TMS-ether, TMS-enol derivatives prepared by the addition of 50  $\mu$ L of a mixture containing MSTFA:TMIS:ethanethiol as described previously were analysed as such by GC/MSD. For the confirmation and quantification experiments, new aliquots were prepared (triplicates) adjusting the volume of urine in order to have the amount of norsteroids to fit inside the range of linearity of the method as described elsewhere [39]. Blank urine and quality control specimens were processed simultaneously. The glucuroconjugated steroids were isolated and hydrolysed as described before but were then extracted twice with hexane at pH 11. The solvolysis of the steroids was carried out on the residue of the enzymatic hydrolysis at 50°C for 1 h with 2  $\mu$ L of sulphuric acid (4M) in 1 mL of tetrahydrofuran as described previously [40] and the steroids then extracted twice with diethylether at pH 9. The TMS-ether, TMS-enol derivative mixtures were analysed as such by GC/HRMS.



For the determination of the  $^{13}\text{C}$  content by isotope ratio mass spectrometry, in accordance with the method described elsewhere [39], the combined isolated free and hydrolysed glucuroconjugated steroids present in 20 mL aliquots were dissolved in 25  $\mu\text{L}$  of methanol. The norsteroids were purified by HPLC (HP 1090 series II instrument; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) being present in the fraction collected between 9 and 10 minutes after the injection on a Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (3.5  $\mu\text{m}$ , 150 X 4.6 mm; Agilent Technologies) with a gradient of methanol:water increasing from 60:40 to 90:10 in 15 min and kept constant for 5 min (flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup>). After the evaporation of the solvent, the steroids were dissolved in 25  $\mu\text{L}$  of *tert*-butyl methyl ether and analysed as such by GC/MSD to verify the identity of the peaks and GC/C/IRMS.

#### *Preparation of urinary standards*

For the calibration curves, six child-derived urinary standards of 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone and 19-norepiandrosterone were prepared in concentration ranging from 0.5 to 15.0 ng/mL. Quality control samples containing 2.0, 4.0, 5.0 and 8.0 ng/mL were analysed during the quantification experiments. The limits of detection and quantification were established for the present experiments using urine samples spiked in amounts of 0.01 to 1.0 ng/mL.

#### *GC/MS and GC/HRMS analysis*

Verification of the identity of the steroids, first screening and estimation of the concentration of norsteroids were achieved by GC/MS using a HP 5973 MSD instrument linked to a HP 6890 gas chromatograph and an autosampler HP 7683 (Agilent Technologies) with a HP-5MS capillary column (5% phenyl polymethyl siloxane, 25 m X

0.20 mm inside diameter, 0.33  $\mu\text{m}$  film thickness: Agilent Technologies). Typically, 1  $\mu\text{L}$  of the TMS-derivatization mixture was injected in the splitless mode with the following instrument conditions: injector 270°C, transfer line 310°C with programming of the oven temperature starting at 100°C (hold 1 min) increased at 20°C/min to 220°C, then to 278°C at 4.4°C/min to 320°C at 10°C/min (hold 5.6 min). 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone were detected in the SIM mode scanning the ions at  $m/z$  420.3 (molecular ion), 405.3 and 315.2 and at  $m/z$  422.3, 407.3 for the internal standard. The samples were grouped in batches of 20 including one blank urine and a control sample containing 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in a concentration of 3.0 ng/mL (0.06 ng/ $\mu\text{L}$  injected). The absolute retention times and ion ratios had to correspond to those of the authentic standards within 5% and 10% respectively. The limit of detection was 0.3 ng/mL (S/N = 3).

Quantification was performed on a JEOL JMS-700 high-resolution mass spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) linked directly to a HP 6890 gas chromatograph and HP 7683 autosampler (Agilent Technologies) with the same capillary column and conditions of separation. Operating conditions were as follows: ionization current 300  $\mu\text{A}$ , accelerating voltage 10 kV, electron multiplier 1 kV, and resolution 10,000 or 11,000. The ions were fixed at  $m/z$  420.2879, 405.2645, 315.2144 for 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone and 19-norepiandrosterone and at  $m/z$  422.3036 and 407.2802 for the internal standard. The limit of detection of these experiments was 0.04 and 0.05 ng/mL respectively for 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone (S/N = 3) and the limit of quantification, 0.07 and 0.08 ng/mL respectively (S/N = 5) as estimated with a urine sample of a specific gravity of 1.012. The method was linear over the range of

concentrations under study i.e. from 0.5 to 15.0 ng/mL, coefficients of correlation for the calibration curves (linear, including origin) better than 0.995 and the QC values found within 15% of variation from the theoretical values. When specified, to allow comparison between samples, the concentration was adjusted taking into account the specific gravity of the specimens as proposed by Donike *et al.* [41]:  $[C]_{\text{corrected } 1.020} = [C]_{\text{measured}} \cdot \{(1.020 - 0.998) / (\text{specific gravity} - 0.998)\}$ .

### *GC/C/IRMS*

a) The  $^{13}\text{C}$  content of the norsteroids was first estimated in the Montreal laboratory as described elsewhere [39] with a PDZ Europa stable isotope analyzer connected to a Orchid II combustion interface module coupled to a HP 6890 gas chromatograph (PDZ Europa, Cheshire, England). The same capillary column was used and the oven temperature was programmed as follows: 150°C (hold for 1 min) to 290°C at 5°C/min increased at 25°C/min to 320°C (hold 4 min). The identity of the steroids was verified by GC/MSD analysis of the underivatized extract, under the same operating conditions.

b) The precise measurements were carried out by the Koln Laboratory, under different protocols for sample preparation and analysis. *Sample Preparation:* The steroids were isolated from 10 mL of urine with 500 mg SPE cartridge (Chromabond C18, Macherey & Nagel, Düren, Germany). The methanol eluate was evaporated to dryness, the residue dissolved in 1 mL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7) and then washed with 5 mL *tert*-butyl methyl ether (TBME). After careful removal of the residual TBME, the glucuroconjugated steroids were hydrolysed as described previously with  $\beta$ -glucuronidase

from *E. coli* (50°C/2h). After the addition of 250  $\mu\text{L}$  of a 20% aqueous solution of a 1:1 mixture of  $\text{K}_2\text{CO}_3:\text{KHCO}_3$ , the steroids were extracted with 5 mL of TBME. The residue was dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of methanol to which was added 1  $\mu\text{L}$  of a methanolic solution of testosterone acetate (1 mg/mL) as the reference standard for the separation by HPLC.

*Isolation of steroids by HPLC:* the steroids of interest were purified using an Agilent 1100 (Agilent, Böblingen, Germany) liquid chromatograph equipped with a variable wavelength detector and a LiChrospher RP-18 column (250 x 4 mm, particle size of 5  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was composed of a gradient of water and acetonitrile, starting at 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  increasing linearly to 45% in 17 min and then to 100% within another 5 min. The column flow was kept at 1.8 mL/min and compounds were detected at 192 nm. Three fractions were collected (LC-1 – LC-3). Noretiocholanolone was recovered in the first (LC-1, 13.5 – 14.9 min), norandrosterone in the second (LC-2, 14.9 – 16.1 min) and etiocholanolone often associated with androsterone in the third fraction (LC-3, 16.1 – 18.3 min). The fractions were evaporated and the residue was dissolved in 10  $\mu\text{L}$  of cyclohexane. The solution containing free steroids was analysed as such.

*Acetylated steroids:* After removal of the solvent, the steroids were acetylated by the addition of 5  $\mu\text{L}$  of pyridine, 150  $\mu\text{L}$  of acetonitrile and 150  $\mu\text{L}$  of acetic anhydride and heating at 80°C for 2 h. The mixture was purified by HPLC under the same conditions under a gradient solvent of acetonitrile and water starting at 40% acetonitrile increasing to 100% in 15 min. Acetylated norandrosterone was recovered in the fraction collected between 10.4 to 11.3 min. The fraction was treated as described previously and analysed as such. *GC/IRMS:* Free underivatized steroids were analyzed on a HP 5890 gas chromatograph coupled to a Finnigan MAT delta-C (Finnigan MAT, Bremen, Germany) isotope ratio mass spectrometer. Acetylated compounds were analyzed on a HP 6890 gas

chromatograph coupled to a Finnigan MAT delta-plus XP isotope ratio mass spectrometer. Both systems were modified as follows: 1) The backflush valve was mounted outside the GC; 2) The connections from the analytical column to the backflush valve and to the combustion furnace were managed by a pressfit connector instead by a metal union; 3) The oxidation furnace was placed 1.5 cm higher in the heating zone than by default; 4) The reduction furnace was unmounted; 5) The Nafion water trap was replaced by a cryogenic trap (Dewar, acetone/dry ice,  $-78^{\circ}\text{C}$ ).

*Analysis of underivatized steroids:* The free steroids were injected on an Optima- $\delta$  3 column (Macherey & Nagel, Düren, Germany; 17 m x 0.25 mm, film thickness: 0.25  $\mu\text{m}$ ). The injection port was kept at  $300^{\circ}\text{C}$  and the injection was made in the splitless mode. Deactivated fused silica (SGE, 2 m length, 0.32 mm inner diameter) connected in front of the GC column by a pressfit connector served as retention gap. The temperature of the oven was programmed as follows:  $60^{\circ}\text{C}$  (1.5 min), increased to  $265^{\circ}\text{C}$  at  $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $295^{\circ}\text{C}$  at  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (kept for 4 min). Four reference gas pulses were set when in “straight mode” to calculate  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  values.

*Analysis of acetylated steroids:* The steroids were injected on an Optima- $\delta$  6 column (30 m x 0.25 mm; film thickness: 0.25  $\mu\text{m}$ ) under the same conditions described above. The oven temperature was programmed as follows:  $60^{\circ}\text{C}$  (1.5 min) to  $280^{\circ}\text{C}$  at  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and to  $300^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (final temperature kept for 5 min.)

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Administration of a "dietary supplement" of 19-norandrost-4-en-3,17-dione*

As shown in figure 1, 19-norandrostenedione is rapidly metabolized to 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone excreted in both the glucuro- and sulfoconjugated forms while the third isomer, 19-norepiandrosterone is sulfoconjugated. Highest levels of these metabolites are found in the first ten hours, 19-norandrosterone glucuronide being measured at 240 ng/mL after two days and still present after 105 hours at 14 ng/mL.

During the five days following the administration, the relative amounts of phase I and II metabolites varied constantly, the ratio of 19-norandrosterone to 19-noretiocholanolone changing from 2 to around 70. The glucuroconjugated metabolites being excreted more rapidly, 19-norandrosterone glucuronide accounted for 95% of the total excreted in the first hours. However, after six hours the sulfate became predominant (80% of total). As described by other groups [5-7, 42], the glucuronide of 19-nortestosterone and of 5 $\beta$ -norandrost-4-en-3,17-dione as well as other metabolites are present but only in the first hours.

19-norsteroids are sold in many countries and on the Internet as "dietary supplements" which as such are not subjected to stringent quality controls. Several reports concluded that steroids pro-hormones or precursors of testosterone, 19-nortestosterone and  $\Delta^1$ -testosterone, could be present in other products without any mention on the label, in amounts sufficient to cause positive findings in the following hours [43-47].

*Athlete's samples containing 19-norandrosterone*

19-norandrosterone found in randomly selected positive urine samples was mainly present in the glucuroconjugated form that accounted for 65% to 93% of the total, the 5 $\beta$ -isomer being also glucuroconjugated to an average of 94%. However, in one specimen collected in 2000, 19-norandrosterone sulfate was present in a higher amount than the glucuronide i.e. 160 ng/mL and 59 ng/mL respectively. Again, the three isomers were present, 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in both conjugated forms, 19-norepiandrosterone as the sulfate, in the mean relative proportion of 7:2:1 as summarised in table 1. A similar ratio of 72:28 was reported previously for the 5 $\alpha$ :5 $\beta$  isomers [3] although important variations were observed, one specimen containing both metabolites almost equally, and this may reflect the oral intake of a 19-norandrostenedione supplement. The sulfates of 19-noretiocholanolone and 19-norepiandrosterone are not detected when 19-norandrosterone is found in an amount lower than 10 and 5 ng/mL.

*Physiological excretion of norsteroids (pregnancy)*

Fourteen and twenty-six urine samples in the second case, collected regularly from the 10<sup>th</sup> or 12<sup>th</sup> week to the 40<sup>th</sup> week of the pregnancy of two volunteers were found to contain norandrosterone in variable amounts reaching a maximum of 15 ng/mL. These results are in agreement with those reported previously [9, 14-15]. Noretiocholanolone was only present in low amounts not exceeding 4 ng/mL. Again, norandrosterone was predominantly excreted in its glucuroconjugated form that accounted for 80% to 94% of the total, the excretion profile in both cases being represented at figure 2.

Even though the exact mechanism by which the enzymes of cytochrome P450 convert androgens to estrogens remains to be confirmed, norsteroids were shown to be formed during that process and the placenta is one of the main site of aromatization [8-21, 48].

*Ingestion of edible parts of castrated and non-castrated pig*

No norsteroids were detected in any of the 150 specimens collected from the 19 volunteers, male or female, before the meals or following the intake of castrated pig offal. As summarized in table 2, 19-norandrosterone glucuronide was the main norsteroid excreted however in highly variable amounts in the hours following the ingestion of 300 g of mixed non-castrated pig offal and meat. The highest levels of 20 to 130 ng/mL of 19-norandrosterone were reached 5 to 12 hours after and were due to the ingestion of kidney, liver and heart while only one volunteer excreted 19-norandrosterone glucuronide in an amount greater than 2 ng/mL after eating 300 g of meat. As expected, the kidneys contain the highest amount of norsteroids. In the specimens voided by the three volunteers who ate meals containing kidneys, 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone and 19-norepiandrosterone were measured in both conjugated forms for the former while the later was entirely sulfoconjugated. In all the cases, the 19-norandrosterone was not detectable anymore after 20 to 30 hours. Although the levels of excreted 19-norsteroids varied importantly, the excretion profiles were similar. In a typical case presented at figure 3, the amount of noretiocholanolone glucuronide was lower in the first hours but became equivalent at the end of the excretion.



When the experiment was repeated with meals containing a normal portion of 100g, 19-norandrosterone glucuronide was excreted in an amount greater than 2 ng/mL only with kidneys (table 2).

The highest levels of 19-nortestosterone and estrogens were measured in the blood of newly born pig during the development of the testis [33] and following the castration, these steroids are not detectable anymore in blood and urine specimens [30,49]. While norsteroids are produced naturally by the testis, 19-nortestosterone and 19-norandrostenedione were identified in the  $\mu\text{g}/\text{kg}$  range in kidneys, liver, heart and muscles [51]. In our experiments, the ingestion of kidneys leads to excreted levels 10 to 20 times those produced by the consumption of liver and meat respectively. The levels reached were also significantly greater than those reported by another group [37]; this is not unexpected since the levels of norsteroids are known to differ from one animal to another and in function of the age of the animal [33, 50]. One should however realistically estimate as almost null the risks of ingesting non-castrated pig offal, since only the meat is included in dry meat characteristic of Italian delicatessen while all other products are made from castrated pig.

Finally, the excretion of the norsteroids was not affected by a one-hour work-out period.

#### *GC/C/IRMS Analysis*

As described elsewhere, the mean  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ value of endogenous urinary steroids measured in Montreal laboratory is around -23.5 (ranging from -19.8 to -26.8) while the  $^{13}\text{C}$  content of several norsteroids commercially available since 1960s is found in the

range of depleted values of -30.3 to -36.0 [39, 45]. Not surprisingly, the mean  $\delta^{13}\text{C}^{\text{‰}}$  value of norandrosterone measured in the specimens collected from volunteers or positive athletes samples was around -31 while the values excreted during pregnancy, when measurable, were found within the normal range of values e.g. at around -23 [39]. These results are in agreement with those reported by other groups [51]. The first analysis done in Montreal of the three more concentrated specimens (M46) collected further to the ingestion of non-castrated pig offal indicated that the  $^{13}\text{C}$  content was not distinguishable from the normal values found in humans being measured at around -22 (Table 3). Six specimens from three different volunteers were sent to Koln for the determination of their  $^{13}\text{C}$  content. The amount of norandrosterone contained in these samples was ranging from 20 to 140 ng/mL. The results of the analyses done in duplicate revealed a mean  $\delta^{13}\text{C}^{\text{‰}}$  value of -20.93 for 19-norandrosterone, individual measurements ranging from -19.77 to -22.43. The  $^{13}\text{C}$  content of the reference endogenous steroids androsterone and etiocholanolone were very similar to those obtained for cholesterol in Montreal affording values of -20.58, -20.16 and -20.11 respectively for the three volunteers.

To the best of our knowledge, this is the first time that the  $^{13}\text{C}$  content of urinary norsteroids excreted from the ingestion of meat containing 19-norsteroids is described. These values do not differ from those of several steroids excreted naturally by cows [52-55].

*Discrimination between endogenous and exogenous origin*

Comparing the results obtained from the analysis of the urine samples excreted during the pregnancy or following the administration (presumed in the case of athletes' samples) of 19-norsteroids originating from non-castrated pig offal and commercial products, we observe that the only significant difference lies in the  $^{13}\text{C}$  content which is found at depleted values in the norsteroids of synthetic origin. The relative abundance of either the  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -isomers ( $5\alpha$ ,  $5\beta$ -reductases) or of the glucuronides to the sulfates varying widely cannot indicate their origin in single specific specimen collected at a given moment. The mean value of the ratio 19-norandrosterone to 19-noretiocholanolone glucuronides was  $3 \pm 1$  in specimens collected during pregnancy,  $7 \pm 7$  in those collected from athletes or further to the administration of 19-norandrostenedione and  $4 \pm 3$  further to the ingestion of non-castrated pig offal. Not more significant were the proportions of the individual conjugates, 19-norandrosterone being glucuroconjugated to the mean extent of  $93\% \pm 6\%$  (pregnancy),  $43\% \pm 25\%$  (administration of norsteroids) and  $71\% \pm 26\%$  (non-castrated pig offal) (table 4).

One study reported that 19-norandrosterone was excreted solely as the glucuroconjugate following the administration of 19-nortestosterone while up to 30% of 19-norandrosterone described as *endogenously* produced, was sulfoconjugated. These results were obtained from the analysis of the most concentrated of 385 urine samples (from 40 players) [56-57]. In our view, these surprising results exemplify the need for an appropriate mean of hydrolyzing conjugated steroids, since the arylsulfatases contained in *Helix pomatia* mixtures are known to lack activity for these substrates particularly those

conjugated in the 17-O position and of the 5 $\alpha$ -H, 3 $\alpha$ -ol configuration [59-60]. The chemical solvolysis must be used in place of the enzymatic preparations as it is known that these often lack the activity and specificity needed, may bring conversion to other steroids and in complex matrices, their activity may be inhibited by salts for examples.

### *Conclusion*

Our results indicate that when the norsteroids conjugates are properly measured, 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone glucuronides and sulfates are present in relative amounts which do not enable a distinction between their synthetic or endogenous origin. The use of the isotope ratio mass spectrometry is the only way when the norsteroids are present in a sufficient amount, to prove the origin of the metabolites. With regards to the ingestion of non-castrated pig offal, since norsteroids are normally present in the level of micrograms in the kidneys, liver, heart, not surprisingly, the urine samples collected in the few following hours can contain principally 19-norandrosterone glucuronide in an amount that could be in vast excess of the threshold for positivity. Athletes should prudently refrain from eating pig or other animals' offal although the risks of getting an important intake of non-castrated pig kidney are minimal.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Part of this work has been supported by the WADA (Montreal and Koln Laboratories: Excretion of 19-norsteroids from consumption of pig meat and offal: combined GC/MS and GC/C/IRMS analysis). The financial support of the Canadian Centre for Ethics in Sports (CCES), of the International Association of Athletic Federations (IAAF), the

International Drug Testing and Management (IDTM) through their testing programmes and FCAR-FRSQ (Studentship to CG) is gratefully acknowledged. The skilled contribution of Alain Charlebois is invaluable.

## REFERENCES

1. Engel LL, Alexander J, Wheeler M. Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone. *J Biol Chem* 1958;231:159-64.
2. Massé R, Laliberté C, Tremblay L, Dugal R. Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone urinary metabolites in man. *Biomed Mass Spectrom* 1985;12(3):115-21.
3. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem* 1996;42(7):1001-20.
4. Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Norandrostérone et norétiocholanolone: les métabolites révélateurs. *Acta Clin Belg Suppl* 1999;Suppl 1:68-73.
5. Schänzer W, Breidbach A, Geyer H, van Kuk C, Nolteernsting E, Thevis M. Metabolism of nortestosterone, norandrostenedione and norandrostenediol. Identification of  $3\alpha$ -hydroxyestr-4-en-17-one glucuronide and  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy- $5\alpha$ -estr-17-one glucuronide and sulphate. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (7). 17th Cologne Workshop on Dope Analysis 14th to 19th March 1999. Köln: Sport and Buch Strauss, 2000. pp. 155-74.
6. Uralets VP, Gillette PA. Over-the-Counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten- $3\alpha,17\alpha$ -diol, and 19-nor-4-androstene-3,17-dione: Excretion studies in men. *J Anal Toxicol* 1999;23(5):357-66.
7. Uralets VP, Gillette PA. Over-the-Counter delta5 anabolic steroids 5-androsten-3,17-dione; 5-androsten- $3\alpha,17\beta$ -diol; Dehydroepiandrosterone and 19-Nor-5-androstene-3,17-dione: Excretion studies in men. *J Anal Toxicol* 2000;24 (3):188-93.

8. International Olympic Committee, IOC Medical Code and Explanatory Documents, 2001.
9. Mareck-Engelke U, Schultze G, Geyer H, Schänzer W. 19-Norandrosterone in pregnant woman. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (7). 17th Cologne Workshop on Dope Analysis 14th to 19th March 1999. Köln: Sport and Buch Strauss, 2000. pp. 145-54.
10. Dehennin L, Bonnaire Y, Plou P. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1999;721(2):301-7.
11. Le Bizec B, Monteau F, Gaudin I, André F. Evidence for the present of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *J Chromatogr B* 1999;723(1-2):157-72.
12. Schmitt N, Flament MM, Goubault C, Legros P, France Grenier-Loustalot M, Denjean A. Nandrolone excretion is not increased by exhaustive exercise in trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34(9):1436-9.
13. Ciardi M, Ciccoli R, Barbarulo MV, Nicoletti R. Presence of norandrosterone in "normal" urine samples. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (6). 16th Cologne Workshop on Dope Analysis 15th to 20th March 1998. Köln: Sport and Buch Strauss, 1999. pp. 97-104.
14. Jeanneau T, Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Détermination des concentrations physiologiques de la norandrostérone et de la norétiocholanolone, métabolites urinaires de la nandrolone par CPG/SM. *Toxicorama* 1999;XI:25-9.
15. Van Eenoo P, Delbeke FT, De Jong FH, De Backer P. Endogenous origin of norandrosterone in female urine: indirect evidence for the production of 19-

- norsteroids as by-products in the conversion from androgen to estrogen. *J Steroids Biochem Mol Biol* 2001;78(4):351-7.
16. Hemmersbach P, Hågensen AH, Misund J. Determination of urinary norandrosterone excretion in females during one menstrual cycle by gas chromatography/mass spectrometry. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (7). 17th Cologne Workshop on Dope Analysis 14th to 19th March 1999. Köln: Sport and Buch Strauss, 2000. pp. 141-4.
  17. Khalil M, Morley P, Glasier M, Armstrong D, Lang T. Formation of 4-oestren-3,17-dione (19-norandrostenedione) in porcine granulosa cells in vitro is inhibited by the aromatase inhibitor 4-hydroxyandrostenedione and the cytochrome P-450 inhibitors aminoglutethimide phosphate and ketoconazole. *J Endocrinol* 1989;120(2):251-260.
  18. Garrett WM, Hoover DJ, Shackleton CHL, Anderson LD. Androgen metabolism by porcine granulosa cells during the process of luteinization in vitro: Identification of 19-oic-androstenedione as a major metabolite and possible precursor for the formation of C18 Neutral Steroids. *Endocrinology* 1991;129(6):2941-50.
  19. Graham-Laurence S, Amarnah B, White RE, Peterson JA, Simpson ER. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Sci* 1995;4(6):1065-80.
  20. Moslemi S, Silberzahn P, Gaillard J-L. In vitro 19-norandrogen synthesis by equine placenta requires the participation of aromatase. *J Endocrinol* 1995;144(3):517-25.
  21. Kao Y-C, Higashiyama T, Sun X, Okubo T, Yarborough C, Choi I, Osawa Y, Simmen FA, Chen S. Catalytic differences between porcine blastocyst and placental aromatase isozymes. *Eur J Biochem* 2000;267(20):6134-9.



22. Dehennin L, Jondet M, Scholler R. Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: an isotope dilution-mass spectrometric study. *J Steroid Biochem* 1987;26(3):399-405.
23. Reznik Y, Herrou M, Dehennin L, Lemaire M, Leymarie P. Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy: determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Endocr Metabol* 1987;64(5):1086-8.
24. Reznik Y, Dehennin L, Coffin C, Mahoudeau J, Leymarie P. Urinary nandrolone metabolites of endogenous origin in man: A confirmation by output regulation under human chorionic gonadotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:146-50.
25. IOC Medical Commission. Statistics of IOC Accredited Laboratories. Communication to the IOC accredited laboratories for doping control analyses. International Olympic Committee, Lausanne, Switzerland.
26. Houghton E, Copsey J, Dumasia MC, Haywood PE, Moss MS, Teale P. The identification of C-18 neutral steroids in normal stallion urine. *Biomed Mass Spectrom* 1984;11(2):96-9.
27. Benoit E, Garnier F, Courtot D, Delatour P. Radioimmunoassay of 19-nortestosterone evidence of its secretion by the testis of the stallion. *Ann Rech Vet* 1985;16(4):379-83.
28. Dintinger T, Gaillard J-L, Zwain I, Bouhamidi R, Silberzahn P. Synthesis and aromatization of 19-norandrogens in the stallion testis. *J Steroid Biochem* 1989;32(4):537-44.

29. Debruyckere G, Van Peteghem C, De Brabander H, Debackere M. Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of 19-nortestosterone in the urine of untreated boars-effect of the administration of Laurabolin. *Vet Q* 1990;12(4):246-50.
30. Debruyckere G, Van Peteghem C. Detection of 19-nortestosterone and its urinary metabolites in miniature pigs by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1991;564(2):393-403.
31. Vandebroeck M, Van Vyncht G, Gaspar P, Dasnois C, Delahaut P, Pelzer G, De Grave J, Maghuin-Rogister G. Identification and characterization of 19-nortestosterone in urine of meat-producing animals. *J Chromatogr B* 1991;564(2):405-12.
32. Meyer HHD, Falckenberg D, Janowski T. Evidence for the presence of endogenous 19-nortestosterone in the cow peripartum and in the neonatal calf. *Acta Endocrinol* 1992;126(4):369-73.
33. Schwarzenberger F, Toole GS, Christie HL, Raeside JI. Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinol* 1993;128(2):173-7.
34. De Brabander H, van Hende J, Hendricks L. Endogenic nortestosterone in cattle? *Analyst* 1994;119(12):2581-5.
35. Clouet A-M, Le Bizec B, Montrade M-P, Monteau F, André F. Identification of endogenous 19-Nortestosterone in pregnant ewes by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 1997;122(5):471-4.

36. Sterk S, Herbold H, Blokland M, van Rossum H, van Gikel L, Stephany R.  
Nortestosterone: endogenous in urine of goats, sheep and mares? *Analyst*  
1998;123(12): 2633-6.
37. Le Bizec B, Gaudin I, Monteau F, André F, Impens S, De Wash K, De Brabander H.  
Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profile of nandrolone  
metabolites. I. Mass spectrometric detection and quantification of 19-norandrosterone  
and 19-noretiocholanolone in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*  
2000;14(12): 1058-65.
38. Ayotte C, Goudreault D, Charlebois A. Testing for natural and synthetic anabolic  
agents in human urine. *J Chromatogr B* 1996; 687(1):3-25.
39. Ayotte C, Goudreault D, Lajeunesse A, Cléroux M, Richard Y, Charlebois A, Couture  
J-P, Fakirian A. GC/C/IRMS and GC/MS in "natural" steroids testing. In: Schänzer  
W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. *Recent advances in doping  
analysis (9)*. 19th Cologne Workshop on Dope Analysis 18th to 23rd March 2001.  
Köln: Sport and Buch Strauss, 2001. pp. 133-43.
40. Lévesque J.-F. and Ayotte C. The Oral Administration of DHEA: The Efficiency of  
Steroid Profiling. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U,  
editors. *Recent advances in doping analysis (7)*. 17th Cologne Workshop on Dope  
Analysis 14th to 19th March 1999. Köln: Sport and Buch Strauss, 2000. pp. 213-21.
41. Donike M, Rauth S, Sample B. Excretion of ephedrine and endogenous steroids under  
conditions of controlled water intake and of urine diuresis. In: Donike M, Geyer H,  
Gotzmann A, Mareck-Engelke U and Rauth S, editors. *Recent advances in doping  
analysis*. 10th Cologne Workshop on Dope Analysis 7th to 12th June 1992. Köln:  
Sport and Buch Strauss, 1992. pp. 163-84.

42. Uralets VP, Gillette PA, Latven RK. Occurrence of 19-nordehydro-androsterone/etiocholanolone in nandrolone positive specimens. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (4). 15th Cologne Workshop on Dope Analysis 17th to 22nd March 1996. Köln: Sport and Buch Strauss, 1997. pp. 35-41.
43. Ayotte, C. Nutritional supplements and doping controls. IAAF New Studies in Athletics 1999;14:37-42.
44. Catlin DH, Leder BZ, Ahrens B, Starcevic B, Hatton CK, Green GA, Finkelstein JS. Trace contamination of over-the-counter androstenedione and positive urine test results for a nandrolone metabolite. JAMA 2000;284(20):2618-21.
45. Ayotte C, Levesque JF, Cléroux M, Lajeunesse A, Goudreault D, Fakirian A. Sport nutritional supplements: quality and doping controls. Can J Appl Physiol 2001;26 Suppl:S120-9.
46. Schanzer W. Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic steroids, an international study. 2002 Communication from IOC's web site:  
[http://multimedia.olympic.org/pdf/en\\_report\\_324.pdf](http://multimedia.olympic.org/pdf/en_report_324.pdf)
47. Geyer H, Mareck-Engelke U, Wagner A, Schänzer W. The analysis of "non-hormonal" nutritional supplements for prohormones. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (9). 19th Cologne Workshop on Dope Analysis 18th to 23rd March 2001. Köln: Sport and Buch Strauss, 2001. pp. 63-71.
48. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Gramham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR,

- Bulun SE. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen synthesis. *Endocr Rev* 1994;15(3):342-55.
49. Raeside JJ, Friendship RM, Vrablic OE. Effects of castration on early postnatal development of male accessory sex glands in the domestic pig. *Eur J Endocrinol* 1997;137(3):287-92.
50. De Wasch K, Le Bizec B, De Brabander H, André F, Impens S. Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profile of nandrolone metabolites. II. Identification and quantification of 19-norsteroids responsible for 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone excretion in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15(16):1442-7.
51. Mathurin J-C, Herrou V, Bourgogne E, Pascaud L, de Ceaurriz J. Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis of 19-norsteroids: application to the detection of a nandrolone metabolite in urine. *J Chromatogr B* 2001;759(2):267-75.
52. Mason PM, Hall SE, Gilmour I, Houghton E, Pillinger C, Seymour MA. The use of stable carbon isotope analysis to detect the abuse of testosterone in cattle. *Analyst* 1998;123(12):2405-8.
53. Ferchaud V, Le Bizec B, Monteau F, André F. Determination of the exogenous character of testosterone in bovine urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Analyst* 1998;123(12):2617-20.
54. Ferchaud V, Le Bizec B, Monteau F, André F. Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14(8):652-6.

55. Prévost S, Nicol T, Monteau F, André F, Le Bizec B. Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to control the misuse of androgens in breeding animals: new derivatisation method applied to testosterone metabolites and precursors in urine samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15(24):2509-14.
56. Le Bizec B, Bryand F, Gaudin I, Monteau F, Poulain F, André F. Endogenous nandrolone metabolites in human urine. Two-year monitoring of male professional soccer players. *J Anal Toxicol* 2002; 26(1):43-7.
57. Le Bizec B, Bryand F, Gaudin I, Monteau F, Poulain F, André F. Endogenous nandrolone metabolites in human urine: preliminary results to discriminate between endogenous and exogenous origin. *Steroids* 2002;67(2):105-10.
58. Shackleton CHL. Profiling Steroid Hormones and Urinary Steroids. *J. Chromatogr.* 1986;379:91-156.
59. Vestergaard P. The hydrolysis of conjugated neutral steroids in urine. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh.)*1978;217:96.

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1 : 19-norsteroids metabolites excreted in glucuroconjugated (A) and sulfoconjugated (B) forms after oral administration of a single dose of 4-nordione to a volunteer (M26).

Concentration in ng/mL corrected for specific gravity of 1.020.

Figure 2 : Variation of measurable glucuroconjugated and sulfoconjugated 19-norsteroids metabolites excreted during the pregnancy of volunteers W30 (A) and W34 (B).

Concentration in ng/mL corrected for specific gravity of 1.020.

Figure 3 : 19-norsteroids metabolites excreted after the intake of 300 g of kidney, heart and liver mix from non-castrated pig by a volunteer (W37).

Concentration in ng/mL corrected for specific gravity of 1.020.

Figure 4 : Mean values of ratio NA/NE and % NA G for metabolites from endogenous (pregnancy) and exogenous (19-norsteroids administration and consumption of non-castrated pig) origins.

**TABLE LEGENDS**

Table 1 : Relative abundance of NA, NE and NP in positive urine samples collected from athletes.

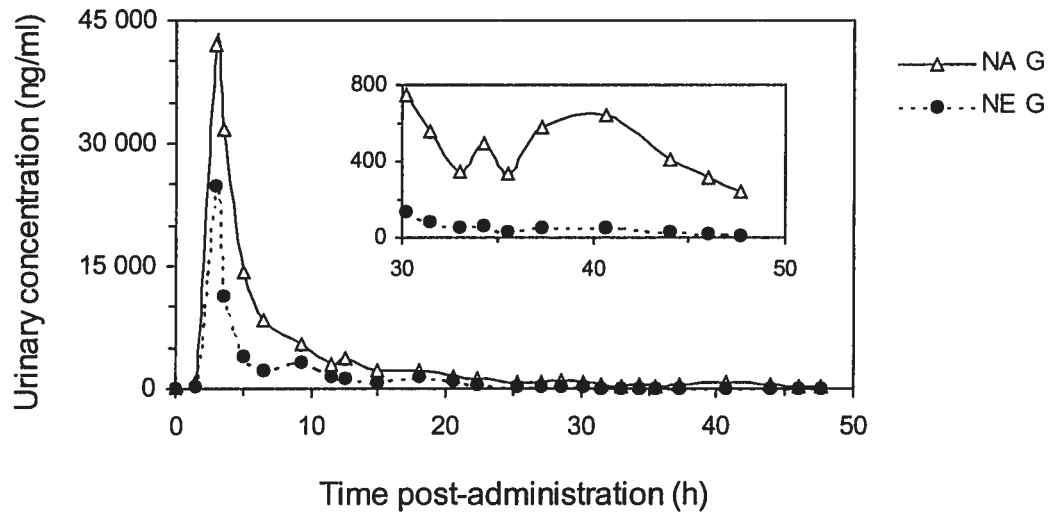
Table 2 : Glucuroconjugated norandrosterone excreted after the intake of non-castrated pig by 12 volunteers.

Table 3 :  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ values of norandrosterone in urinary samples from 2 volunteers after the intake of 300 g of kidney, liver and heart mix from non-castrated pig.



Figure 1

A)



B)

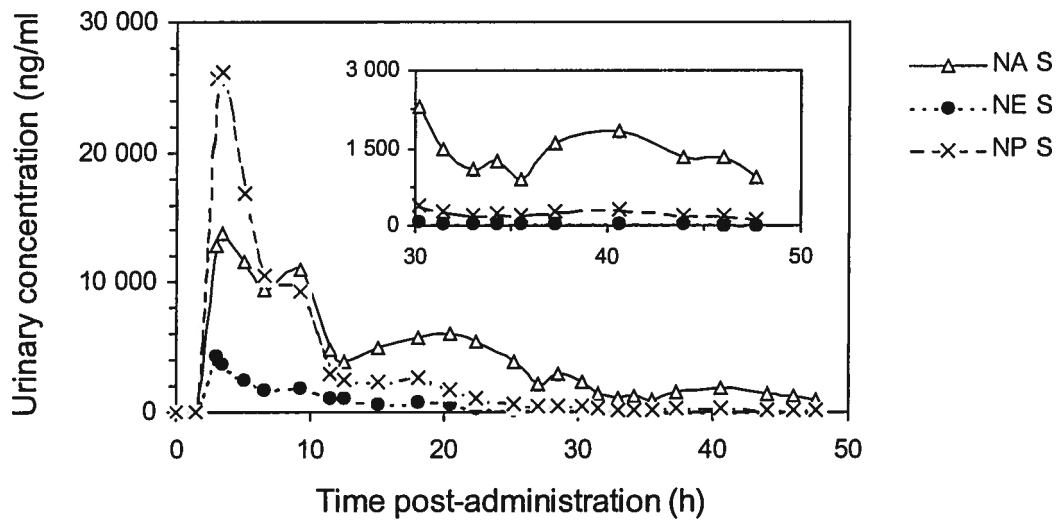
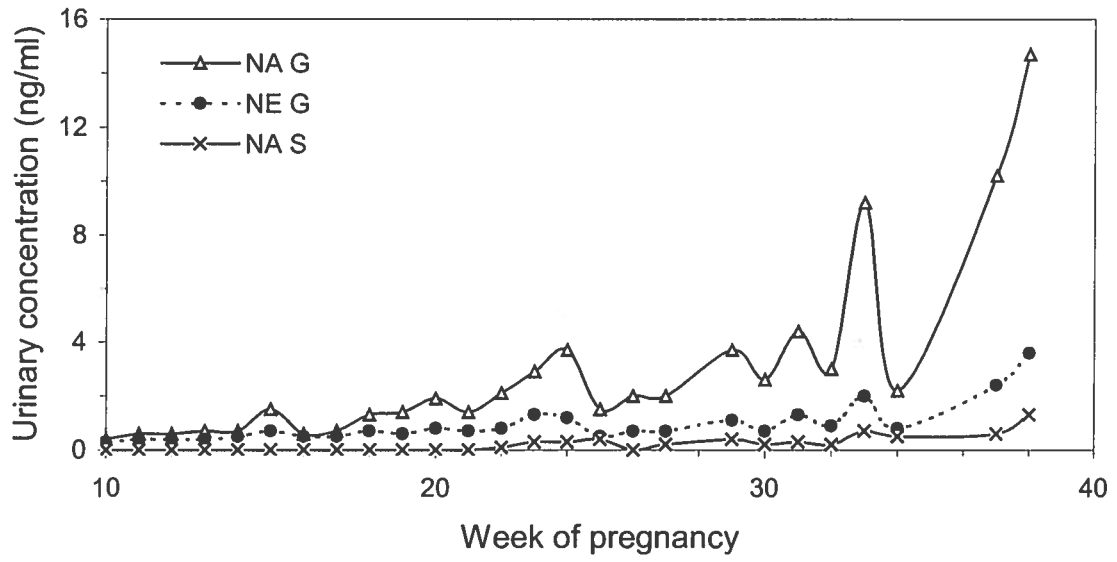


Figure 2

A)



B)

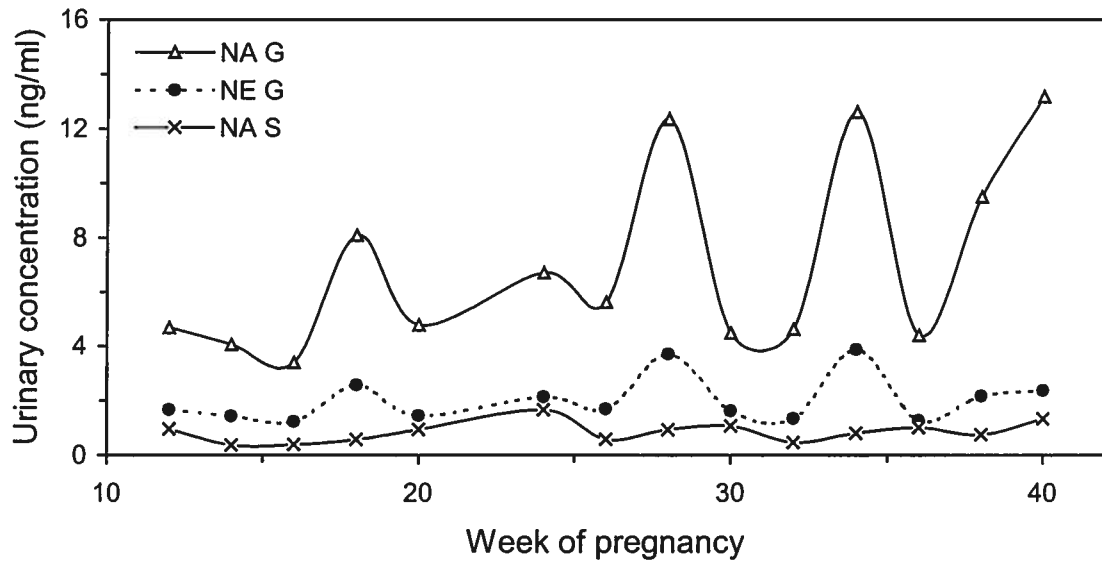
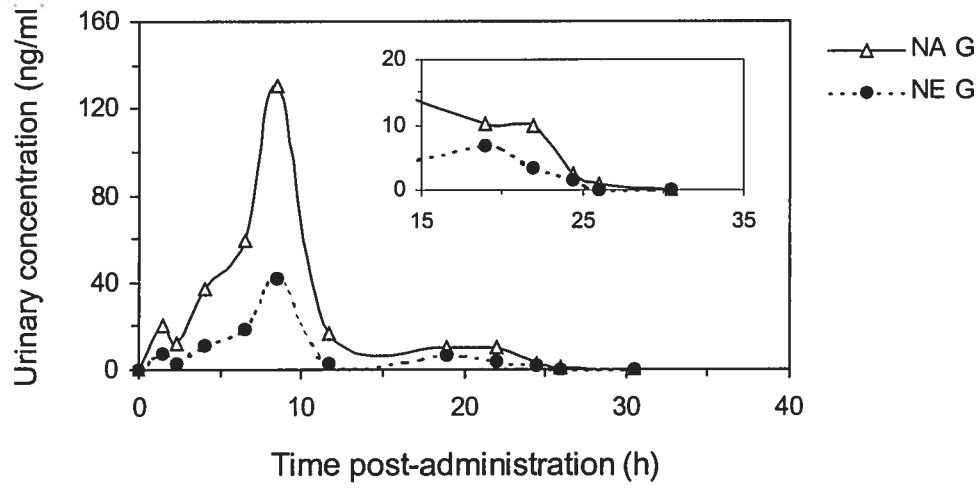
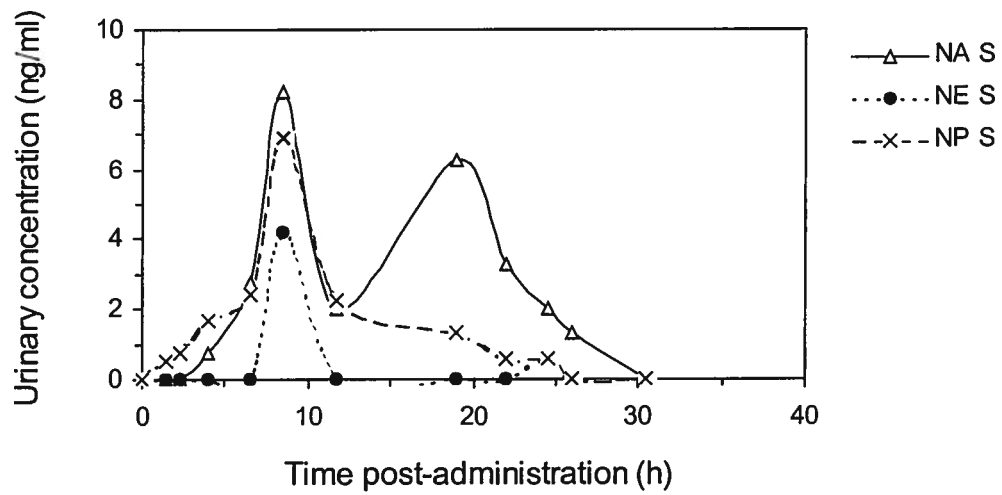


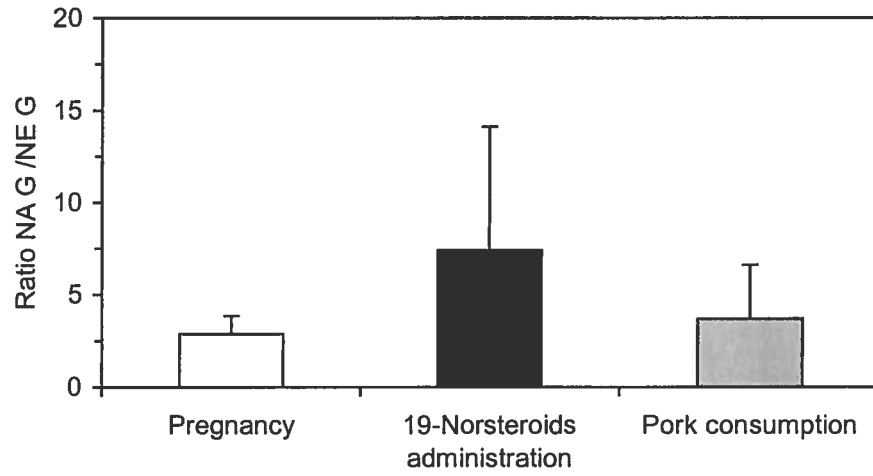
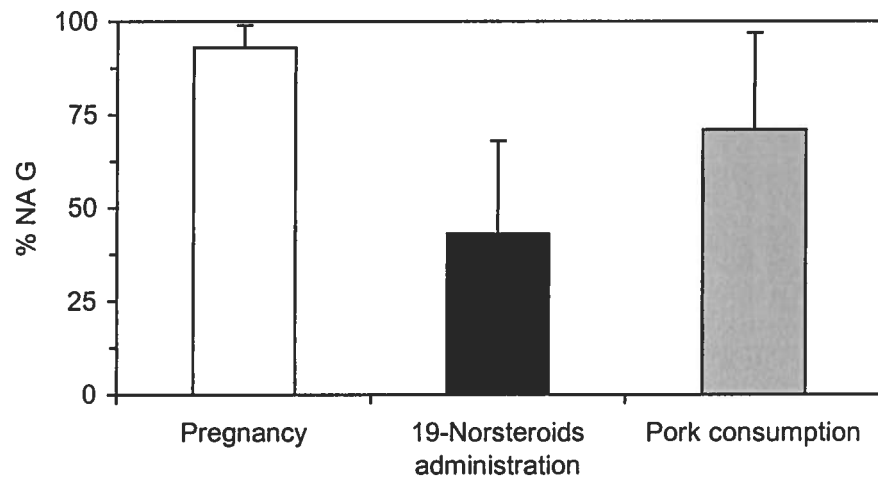
Figure 3

A)



B)



**Figure 4****A)****B)**

**Table 1**

No sample <sup>1</sup>	Conc. NA G <sup>2</sup> (ng/ml)	% NA G (G/G+S)	% NE G (G/G+S)	% NA NA / Total <sup>3</sup>	% NE NE / Total	% NP NP / Total
M1993A	6.7	90%	100%	79%	10%	12%
M1993B	23.8	77%	89%	71%	21%	8%
M1994	44	79%	98%	75%	19%	7%
M1995	3 540	77%	92%	72%	18%	10%
M1997	58	94%	98%	85%	11%	4%
M1998	195	69%	85%	80%	3%	17%
M1999A	5.5	65%	100%	80%	3%	17%
M1999B	36 500	73%	89%	60%	24%	15%
M2000A	433	29%	93%	48%	42%	10%
M2000B	3.7	100%	100%	76%	24%	0%

1- No sample : M = male and No = year of sample collection

2- Concentration adjusted to a specific gravity of 1.020

3- Total = total amount of glucuro- and sulfoconjugated NA, NE and NP

**Table 2**

Volunteer <sup>1</sup>	NA G		Time post-ingestion (h)	Time to return to basal level (h)
	Total excreted (ng/24h)	Max urinary concentration <sup>2</sup> (ng/ml)		
Kidney, liver, heart mix (300 g)				
M46	31 740	62.6	7h00	24h50
M22	11 140	21.4	5h30	27h30
W37	19 000	130	8h30	30h30
Sarapatel (300 g)				
M23	3 500	4.0	5h30	28h00
M25	2 040	9.0	4h40	20h15
W36	1 330	5.4	2h30	19h45
Meat (300 g)				
M31	880	2.4	3h50	22h10
M37	560	1.7	7h20	23h00
W35	860	0.6	6h10	24h45
Kidney (100 g)				
M24	2860	14.4	5h30	13h16
Liver (100 g)				
M34	530	1.9	5h40	19h30
Meat (100 g)				
M32	193	0.7	3h15	10h45

1- No sample : M = male, W = woman and No = age of the volunteer

2- Urinary concentration adjusted to a specific gravity of 1.020

**Table 3**

No samples <sup>1</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ ‰ values		Ratio NA/Chol.
	NA	Cholesterol	
M22	-22,6	-21,5	1,05
M46A	-21,4	-20,7	1,04
M46B	-21,3	-20,6	1,03

1- No sample : M = male and No = age of the volunteer

## DISCUSSION

### *Production naturelle des 19-norstéroïdes*

Dans la population générale, les niveaux d'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes sont très faibles et généralement inférieurs aux limites de quantification des appareils analytiques utilisés, c'est-à-dire de l'ordre de 0,1 ng/ml, (Ciardi *et al.*, 1999 ; Dehennin, Bonnaire et Plou, 1999 ; Jeanneau *et al.*, 1999 ; Kintz, Cirimele et Ludes, 1999; Le Bizec *et al.*, 1999 ; Humbert *et al.*, 2000 ; Van Eenoo *et al.*, 2001). Dans la présente étude, aucune trace des métabolites des 19-norstéroïdes n'a été détectée lors de l'analyse de plus de 150 échantillons d'urine, provenant de 19 volontaires féminins et masculins et recueillis durant les 24 heures précédant leur participation à nos études. En fait, l'excrétion physiologique des 19-norstéroïdes n'a été détectée que dans les échantillons provenant de femmes enceintes. Une augmentation de l'excrétion des métabolites a été observée chez nos deux volontaires pour atteindre des valeurs maximales dans la fraction glucuroconjuguée avoisinant les 15 ng/ml pour la norandrostérone et les 4 ng/ml pour la norétiocholanolone, et ce, durant le dernier trimestre de leur grossesse (voir Figure 2 de l'article).

L'excrétion de norandrostérone par des femmes enceintes à des niveaux plus élevés par rapport à la population générale avait préalablement été rapportée (Mareck-Engelke, Geyer et Schänzer, 1999 ; Jeanneau *et al.*, 1999 ; Van Eenoo *et al.*, 2001) et Mareck-Engelke *et al.* (2000) avait aussi noté une relation entre les niveaux de norandrostérone quantifiée et le nombre de semaines de grossesse. La variation dans l'excrétion physiologique de norandrostérone avait aussi été observée durant le cycle menstruel, mais pour atteindre des concentrations urinaires ne dépassant pas 0,8 ng/ml lors de l'ovulation (Hemmersbach, Hågensen et Misund, 2000).



Les niveaux physiologiques de norandrostérone et de norétiocholanolone observés lors de la présente étude et rapportés dans la littérature corrélient avec l'hypothèse que les 19-norstéroïdes seraient biosynthétisés lors de l'aromatation des androgènes en œstrogènes par le complexe aromatasase du cytochrome P450 (Khalil *et al.*, 1989, Garrett *et al.*, 1991, Graham-Lorence *et al.*, 1995, Moslemi, Silberzahn et Gaillard, 1995). Kao *et al.* (2000) ont évalué que l'aromatation de la testostérone conduisait à un ratio de formation de l'œstradiol sur la 19-nortestostérone à 92 : 8, respectivement. Lors d'études *in vivo*, la 19-nortestostérone et la 4-nordione ont été identifiées dans les fluides folliculaires (Dehennin, Jondet et Scholler, 1987) et dans le sang d'une femme enceinte (Reznick *et al.*, 1987), ce qui laissait dès lors présager que les 19-norstéroïdes étaient principalement synthétisés dans les ovaires et le placenta. De plus, les changements hormonaux observés lors de la grossesse et durant le cycle menstruel soutiennent cette idée. L'activité du complexe aromatasase augmente au cours de la grossesse (Kitawaki *et al.*, 1992) et la hCG stimule l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes (Reznick *et al.*, 2001). Dans une moindre mesure, l'augmentation des niveaux urinaires de norandrostérone observée lors de l'ovulation semble liée à l'augmentation des concentrations sanguines d'œstradiol (Van Eenoo *et al.*, 2001) et corrèle avec l'élévation de l'excrétion de LH (Hemmersbach, Hågensen et Misund, 2000). Finalement, le placenta est un des principaux sites d'aromatation chez l'humain (Simpson *et al.*, 1994), ce qui explique que les niveaux d'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes soient plus élevés chez les femmes enceintes que dans le reste de la population.

Différentes études ont rapporté la présence de norandrostérone, à des niveaux supérieurs à ceux retrouvés dans la population générale, dans des échantillons d'urine recueillis auprès d'athlètes amateurs ou professionnels suite à un entraînement ou à une compétition. Bien que la plupart de ces athlètes n'avaient pas été testés avant leur compétition, les résultats de ces études ne permettaient pas d'exclure la possibilité qu'un exercice physique intense ou le stress qui l'accompagne favorise l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes (Saugy *et al.*, 2000 ; Robinson *et al.*, 2001 ; Le Bizec *et al.*, 2002b). Nos résultats sont en opposition avec cette hypothèse. En effet, l'exercice physique effectué par 6 volontaires dans les heures suivant la consommation de 300 g de porc, n'affectait pas l'excrétion des

métabolites des 19-norstéroïdes, ne pouvait expliquer les importantes variations observées entre les profils d'excrétion des volontaires et ne conduisait pas à la présence des métabolites des 19-norstéroïdes dans les urines des volontaires ayant consommé le porc castré. Ainsi, aucun effet relié à l'exercice physique n'a été observé sur les niveaux urinaires des métabolites des 19-norstéroïdes. Nos résultats sont en accord avec une étude récente effectuée par Schmitt *et al.* (2002) sur le sujet, mais sont en opposition avec l'étude de Le Bizec *et al.* (1999) qui proposait qu'un exercice physique intense pouvait conduire à l'excrétion de norandrostérone en concentration urinaire de 2 à 4 fois plus élevée. Cependant, les conclusions de cette étude nous apparaissent peu supportées par les résultats démontrés, ceux-ci étant en effet basés sur la simple comparaison visuelle de l'abondance de la norandrostérone sur les chromatogrammes obtenus suite à l'analyse sur CG/SM des échantillons d'urine recueilli avant et après l'exercice, sans en avoir déterminé la concentration. Les auteurs n'ayant pas non plus considéré la concentration de l'échantillon urinaire, i.e. sa gravité spécifique, et il est ainsi probable que cette apparente augmentation du pic de norandrostérone sur le chromatogramme lui soit due. À notre connaissance, aucun mécanisme physiologique ou métabolique n'a été rapporté dans la littérature pour expliquer l'influence de l'exercice physique intense, ou le stress qui l'accompagne, sur la biosynthèse des 19-norstéroïdes et/ou sur l'excrétion de leurs métabolites. Fait intéressant, Reznik *et al.* (2001) ont démontré qu'un stress métabolique, induit par une injection d'insuline, n'affectait pas la sécrétion de norandrostérone et de norétiocolanolone.

#### *Administration de 19-norstéroïdes*

Exception faite des femmes enceintes, la présence de norandrostérone et de norétiocolanolone dans un échantillon d'urine en concentration supérieure aux seuils limites établis par le C.I.O., 2 ng/ml pour les hommes et 5 ng/ml pour les femmes, provient de l'administration volontaire de 19-norstéroïdes. Comme le démontre nos travaux (voir Figure 1 et Tableau 1 de l'article) et de nombreuses autres études effectuées sur le sujet, l'administration de 19-norstéroïdes conduit à l'excrétion de deux principaux métabolites, soit la norandrostérone et la norétiocolanolone (Engel, Alexander et Wheeler, 1958 ; Massé *et al.*, 1985 ; Schänzer, 1996 ; Özer et Temëzer, 1997 ; Kintz,

Cirimele et Ludes, 1999 ; Uralets et Gillette, 1999 et 2000 ; Schänzer *et al.*, 2000). Suite à l'administration de 4-nordione par voie orale, nous avons identifié la norépiandrostérone, uniquement sulfoconjuguée, comme étant le troisième métabolite majeur des 19-norstéroïdes, ce qui concorde avec des études précédentes (Massé *et al.*, 1985 ; Schänzer *et al.*, 2000).

### *Consommation de porc non-castré*

Trois différentes sources pouvant conduire à la consommation involontaire de 19-norstéroïdes ont été rapportées dans la littérature : les suppléments alimentaires (Catlin *et al.*, 2000 ; De Cock *et al.*, 2001 ; Geyer *et al.*, 2001 ; Pipe et Ayotte, 2002), les étals d'animaux d'élevage traités aux hormones (Debruyckere, de Sagher et Van Petegham, 1992 ; Debruyckere et Van Petegham, 1993 ; Hemmersbach *et al.*, 1995) et les abats de porc non-castré (Le Bizec *et al.*, 2000). Dans la présente étude, nous avons analysé cette dernière possibilité. Nos résultats précisent que seuls les volontaires ayant consommé du porc non-castré ont excrété les métabolites des 19-norstéroïdes et qu'aucune trace de ceux-ci n'a été détectée dans les urines provenant des volontaires ayant mangé le porc castré. L'ensemble des résultats obtenus pour l'étude du porc non-castré est présenté à l'Annexe C.

Nos résultats pour l'étude du porc non-castré sont en accord avec la littérature. La production naturelle de 19-nortestostérone par le porc a été observée pour la première fois *in vivo* dans les testicules et a été dès lors associée à l'aromatisation des androgènes en œstrogènes (Ruokonen et Vihko, 1974). Diverses études *in vitro* ont par la suite rapporté la formation de 19-nortestostérone ou de 4-nordione suite au métabolisme de l'androstènedione ou de la testostérone en présence du complexe P450arom porcin (Khalil *et al.*, 1989 ; Garrett *et al.*, 1991 ; Kao *et al.*, 2000). Chez le porc nouveau-né, ce complexe enzymatique est exprimé principalement dans les testicules et, dans une moindre mesure, dans les glandes surrénales, alors qu'il est identifié uniquement dans les testicules du porc adulte (Conley *et al.*, 1996). Des études *in vivo* appuient aussi l'idée que les 19-norstéroïdes seraient synthétisés par les testicules du porc. Les plus hauts niveaux sanguins de divers stéroïdes androgènes et œstrogènes observés chez des porcs

nouveau-nés ont été associés au développement des testicules (Schwarzenberger *et al.*, 1993) et la castration de jeunes porcs a conduit à l'obtention de niveaux sanguins indétectables pour ces stéroïdes (Raeside, Friendship et Vrablic, 1997). De plus, contrairement au porc non-castré, aucun métabolite des 19-norstéroïdes n'a été détecté dans les urines de porc castré (Debruyckere et Van Petegham, 1991 ; Vandebroek *et al.*, 1991). Ainsi, seul le porc non-castré représente une source de consommation involontaire de 19-norstéroïdes.

La 19-nortestostérone et la 4-nordione ont été identifiées et quantifiées, à des niveaux de l'ordre du  $\mu\text{g}$  par kg de tissu, dans les testicules, les reins, le foie, le cœur et les muscles du porc non-castré (De Wash *et al.*, 2001). La reprise de l'étude avec des portions de 100g nous a permis de constater que la consommation de rein conduisait à l'excrétion de norandrostérone à des niveaux de 10 et 20 fois plus élevés que la consommation de foie et de viande, respectivement (voir Annexe C). En extrapolant nos résultats, nous avons estimé que pour excréter la norandrostérone glucuronide à des niveaux supérieurs à 2 ng/ml, un individu devait consommer un minimum de 14 g de rein, de 110 g de foie ou 290 g de viande provenant de porc non-castré. Plusieurs faits doivent cependant être pris en considération avant d'émettre des conclusions sur ces estimations. Tout d'abord, nos résultats démontrent clairement que les niveaux de métabolites des 19-norstéroïdes excrétés diffèrent grandement d'un individu à l'autre. De plus, les niveaux de norandrostérone glucuronide mesurés suite à la consommation du mélange de reins, de foie et de cœur de porc non-castré étaient, en moyenne, de 15 fois supérieurs à ceux obtenus lors d'une étude comparable (Le Bizec *et al.*, 2000). Cette différence pourrait provenir de la variation dans les niveaux de 19-norstéroïdes biosynthétisés qui diffèrent d'un animal à l'autre (De Wash *et al.*, 2001) et selon l'âge du porc non-castré (Schwarzenberger *et al.*, 1993). Cependant, même en tenant compte de ces variations, la probabilité qu'un athlète test positif aux 19-norstéroïdes suite à la consommation involontaire de porc non-castré est très faible puisque les produits alimentaires distribués dans les magasins d'alimentation proviennent du porc d'élevage qui est toujours castré. Dans les pays industrialisés, la viande de porc non-castré ne peut se retrouver que dans certaines viandes séchées, typiques de la charcuterie italienne.

*Distinction entre les différentes origines des 19-norstéroïdes*

L'étude de l'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes suite à leur production naturelle, à leur administration par voie orale ou à leur consommation involontaire par le porc non-castré a permis de constater que la seule différence notable entre ces trois sources étaient les niveaux les plus élevés atteints. Contrairement à ce qu'avait avancé Le Bizec *et al.* (1999 et 2002a), l'utilisation de paramètres cliniques, comme le rapport des concentrations urinaires de norandrostérone et de norétiocholanolone glucuroconjuguées et la proportion relative entre la norandrostérone glucuro- et sulfoconjuguée, s'est avérée inefficace pour distinguer l'origine des 19-norstéroïdes. Le rapport norandrostérone sur norétiocholanolone provient de la différence entre l'action de la 5 $\alpha$ -réductase et celle de la 5 $\beta$ -réductase, respectivement, lors du métabolisme des 19-norstéroïdes. La moyenne de ce rapport était de  $3 \pm 1$  pour l'origine endogène, comparativement à  $7 \pm 7$  pour l'origine exogène et de  $4 \pm 3$  pour la consommation involontaire (voir figure 4 de l'article). Bien qu'il semble y avoir à première vue une différence entre l'origine endogène et celle exogène, les importantes variations observées entre les échantillons empêchent l'utilisation de ce paramètre pour déterminer la provenance des 19-norstéroïdes. Kintz, Cirimele et Ludes (1999) avaient préalablement conclu qu'il était impossible de déterminer quel 19-norstéroïde avait été administré en analysant simplement le rapport de norandrostérone sur norétiocholanolone dans la fraction glucuroconjuguée.

De son côté, le pourcentage de norandrostérone excrétée sous forme glucuroconjuguée était de  $93 \pm 6$  % pour l'origine endogène, comparativement à  $43 \pm 25$  % pour l'origine exogène et à  $71 \pm 26$  % pour la consommation involontaire via le porc non-castré (voir figure 4 de l'article). Encore une fois, les importantes variations obtenues entre les échantillons pour la proportion relative de norandrostérone glucuro- et sulfoconjuguée empêchent l'utilisation de ce paramètre pour distinguer l'origine des métabolites des 19-norstéroïdes. Suite à l'administration de 19-norstéroïdes, Schänzer *et al.* (2000) avait aussi rapporté que la norandrostérone était excrétée sous forme glucuro- et sulfoconjuguée, en proportion variable mais avoisinant généralement un rapport 50 :50.

À l'opposé, Le Bizec *et al.* (2002a) ont observé que suite à l'administration de 19-nortestostérone, la norandrostérone et la norétiocholanolone étaient presque entièrement excrétées sous forme glucuroconjuguée. Cependant, lors de cette dernière étude, les groupements sulfoconjugués ont été hydrolysés par le jus enzymatique d'*Helix pomatia*. Or, différentes études ont démontré que l'activité enzymatique d'*Helix pomatia* conduisait à des réactions secondaires et ne permettait pas d'hydrolyser les groupements 3 $\alpha$ -sulfate des 5 $\alpha$ -stéroïdes comme l'androstérone (Vestergaard, 1978 ; Leunissen, 1979 ; Vanlichene, Eecheute et Vandekerckhove, 1982). Pour ces raisons, il avait alors été conclu que la solvolysse chimique devait être employée pour hydrolyser les métabolites sulfoconjugués à la place des préparations enzymatiques. Ainsi, nos résultats démontrent qu'aucun paramètre clinique basé sur les proportions relatives d'excrétion des métabolites n'est efficace pour différencier la production naturelle de l'administration illicite des 19-norstéroïdes.

Une étude effectuée par Ayotte *et al.* (2001) a démontré que l'utilisation de la CG/SMRI permettait de distinguer efficacement l'origine des métabolites des 19-norstéroïdes. En effet, les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ pour la norandrostérone provenant de la production naturelle par des femmes enceintes (origine endogène) varient entre -23 et -26 alors que celles suivant l'administration de 4-nordione (origine exogène) se situaient entre -30,4 et -31. Lors de la présente étude, les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ obtenues pour la norandrostérone excrétée suite à la consommation de porc non-castré se situaient entre -21,3 et -22,6 (voir Figure 3 de l'article), ce qui signifie que la teneur en  $^{13}\text{C}$  des stéroïdes produits naturellement par le porc est similaire à celle de l'humain. À notre connaissance, c'est la première fois que les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ sont mesurées pour des stéroïdes provenant du porc. Cependant, nos résultats sont comparables à ceux obtenus pour différents stéroïdes excrétés naturellement par la vache, dont les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ se situaient entre -22 et -28 (Mason *et al.*, 1998 ; Ferchaud *et al.*, 1998 et 2000 ; Prévost *et al.*, 2001).

Shackleton *et al.* (1997) ont proposé l'utilisation d'un rapport entre la valeur  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ du métabolite d'intérêt et celle d'un stéroïde de référence présent naturellement dans l'échantillon d'urine et qui n'est pas affecté par l'administration du stéroïde suspecté ou

de l'un de ses précurseurs. Le rapport limite de 1,1 :1,0 proposé par Shackleton *et al.* (1997) pour les métabolites de la testostérone a été validé pour ceux des 19-norstéroïdes par Ayotte *et al.* (2001). Suite à la consommation de porc non-castré, nous avons obtenu un rapport des valeurs  $\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$  de la norandrostérone et du cholestérol se situant entre 1,03 et 1,05, ce qui correspondait à une origine endogène chez l'humain. L'analyse sur CG/SMRI permet donc de distinguer entre l'administration illicite de 19-norstéroïdes et leur production naturelle ou leur absorption involontaire par la consommation de porc non-castré.

### *Conclusion*

Les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire ont permis de décrire et de comparer les profils d'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes suite à une production naturelle, à l'administration de 4-nordione et à la consommation involontaire par le porc non-castré. Nos résultats confirment que le seuil de positivité établi par le C.I.O. à 2 ng/ml pour les hommes et à 5 ng/ml pour les femmes demeurent le critère le plus adéquat pour contrôler l'usage illicite des 19-norstéroïdes. De plus, nos travaux démontrent que les paramètres cliniques, basés sur la proportion relative d'excrétion des métabolites des 19-norstéroïdes, sont inappropriés dans cette optique et que seule la détermination de la teneur en  $^{13}\text{C}$  par le CG/SMRI, lorsque possible, permet de discriminer efficacement entre l'origine endogène et celle exogène des métabolites des 19-norstéroïdes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABRAHAM, G. E. et E. L. Klaiber. 1970. "Plasma immunoreactive estrogens and LH during the menstrual cycle". American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 108, p. 528-531.

AGUILERA, R., M. Becchi, H. Casabianca, C. K. Hatton, D. H. Catlin, B. Starcevic et H. G. Pope. 1996. "Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids". Journal of Mass Spectrometry, vol. 31, p. 169-176.

AGUILERA, R., D. H. Catlin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, R. S. Swerdloff, H. G. Pope et C. K. Hatton. 1999. "Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstane diols". Journal of Chromatography B, Biomedical Applications, vol. 727, p. 95-105.

AGUILERA, R., T. E. Chapman, B. Starcevic, C. K. Hatton et D. H. Catlin. 2001. "Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios". Clinical Chemistry, vol. 47, p. 292-300.

ALBERT, C., O. Barbier, M. Vallée, G. Beaudry, A. Bélanger et D. W. Hum. 2000. "Distribution of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) expression and activity in cynomolgus monkey tissues: Evidence for differential expression of steroid-conjugating UGT enzymes in steroid target tissues". Endocrinology, vol. 141, p. 2472-2780.

AMORY, J. K., B. D. Anawalt, P. D. Blaskovich, J. Gilchrist, E. S. Nuwayser et A. M. Matsumoto. 2002. "Testosterone release from a subcutaneous, biodegradable microcapsule formulation (Vitatrel) in hypogonadal men". Journal of Andrology, vol. 23, p. 84-91.

Association des pharmaciens du Canada. 2002. Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques. 37<sup>e</sup> édition. 2074 p.

AYOTTE, C. 1999. "Nutritional supplements and doping controls". IAAF New Studies in Athletics, vol. 14, p. 37-42.

AYOTTE, C., D. Goudreault et A. Charlebois. 1996. "Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine". Journal of Chromatography B, vol. 687, p. 3-25.



- AYOTTE, C., D. Goudreault, A. Lajeunesse, M. Cléroux, Y. Richard, A. Charlebois, J.-P. Couture et A. Fakirian. 2001. "GC/C/IRMS and GC/MS in "natural" steroids testing". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann and U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (9). (19<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 18<sup>th</sup> to 23<sup>rd</sup> March 2001). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 133-143.
- BAERTSCHI, P. 1953. "Die Fraktionierung der natürlichen Kohlenstoffisotopen im Kohlendioxydstoffwechsel grüner Pflanzen". Helvetica Chimica Acta, vol. 36, p. 773-781.
- BASARIA, S., J. T. Wahlstrom et A. Dobs. 2001. "Clinical review 138. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 86, p. 5108-5117.
- BECCHI, M., R. Aguilera, Y. Farizon, M.-M. Flament, H. Casabianca et P. James. 1994. "Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 8, p. 304-308.
- BECKER, K. L., J. P. Bilezikian, W. J. Bremner, W. Hung, C. R. Kahn, D. L. Loriaux, R. W. Rebar, G. L. Robertson et L. Wartofsky. 1990. Principles and practice of endocrinology and metabolism. Philadelphia : J.B. Lippincott Company, 1912 p.
- BÉLANGER, A., D. W. Hum, M. Beaulieu, É. Lévesque, C. Guillemette, A. Tchernof, G. Bélanger, D. Turgeon et S. Dubois. 1998. "Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissue". Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, vol. 65, p. 301-310.
- BENOIT, E., F. Garnier, D. Courtot et P. Delatour. 1985. "Radioimmunoassay of 19 nor testosterone. Evidence of its secretion by the testis of the stallion". Annals of Veterinary Research, vol. 16, p. 379-383.
- BERGINK, E. W., J. Geelen et E. W. Turpijn. 1985. "Metabolism and receptor binding of nandrolone and testosterone under in vitro and in vivo conditions". Acta Endocrinologica, vol. S271, p. 31-37.
- BERKOVITZ, G. D., M. Fujimoto, T. R. Brown, A. M. Brodie et C. J. Migeon. 1984. "Aromatase activity in cultured human genital skin fibroblasts". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 59, p. 665-671.
- BHASIN, S., T. W. Storer, N. Berman, C. Callegari, B. Clevenger, J. Phillips, T. J. Bunnell, R. Tricker, A. Shirazi et R. Casaburi. 1996. "The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men". The New England Journal of Medicine, vol. 335, p. 1-7.
- BIRCH, A. J. 1950. "Hydroaromatic steroid hormones. I. 10-Nortestosterone". Journal of Chemical Society, p. 367-368.

- BISCHOFF, R. et H. Holtzer. 1969. "Mitosis and the process of differentiation of myogenic cells in vitro". The Journal of Cell Biology, vol. 41, p. 188-200.
- BLUE, J. G. et J. A. Lombardo. 1999. "Steroids and steroid-like compounds". Clinics in Sports Medicine, vol. 18, p. 667-689.
- BOADA, L. D., M. Zumbado, S. Torres, A. Lopez, B. N. Diaz-Chico, J. J. Cabrera et O. P. Luzardo. 1999. "Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats". Archives of Toxicology, vol. 73, p. 465-472.
- BOLT, H. M. et P. Göbel. 1972. "Formation of estrogens from androgens by human subcutaneous adipose tissue in vitro". Hormone and Metabolic Research, vol. 4, p. 312-313.
- BOURGOGNE, E., V. Herrou, J.-C. Mathurin, M. Becchi et J. de Ceaurriz. 2000. "Detection of exogenous intake of natural corticosteroids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: application to misuse in sport". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 14, p. 2343-2347.
- BURGER, H. G. et S. R. Davis. 2002. "The role of androgen therapy". Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 16, p. 383-393.
- BURRIS, A. S., L. L. Ewing et R. J. Sherine. 1988. "Initial trial of slow-release testosterone microspheres in hypogonadal men". Fertility and Sterility, vol. 50, p. 493-497.
- BUTENANDT, A. et G. Hanisch. 1935. "Über Testosteron. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosteron, ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin". Hoppe Seylers Z Physiological Chemistry, vol. 237, p. 89-97.
- CARLSON, K. E. et J. A. Katzenellenbogen. 1990. "A comparative study of the selectivity and efficiency of target tissue uptake of five tritium-labeled androgens in the rat". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 36, p. 549-561.
- CATLIN, D. H., B. Z. Leder, B. Ahrens, B. Starcevic, C. K. Hatton, G. A. Green et J. S. Finkelstein. 2000. "Trace contamination of over-the-counter androstenedione and positive urine test results for a nandrolone metabolite". Journal of the American Medical Association, vol. 284, p. 2618-2621.
- CELOTTI, F. et P. Negri Cesi. 1992. "Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics". Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, vol. 43, p. 469-477.
- CIARDI, M., R. Ciccoli, M. V. Barbarulo et R. Nicoletti. 1999. "Presence of norandrosterone in "normal" urine samples". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann et U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (6). (16<sup>th</sup> Cologne

Workshop on Dope Analysis 15<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> March 1998). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 97-104.

C.I.O. 1999. Code antidopage du mouvement olympique, 95 p.

CLOUET, A.-M., B. Le Bizec, M.-P. Montrade, F. Monteau et F. André. 1997. "Identification of endogenous 19-nortestosterone in pregnant ewes by gas chromatography-mass spectrometry". The Analyst, vol. 122, p. 471-474.

COLE, P. A. et C. H. Robinson. 1988. "A peroxide model reaction for placental aromatase". Journal of American Chemical Society, vol. 110, p. 1284-1285.

CONLEY, A. J., C. J. Corbin, M. M. Hinshelwood, Z. Liu, E. R. Simpson, J. J. Ford et N. Harada. 1996. "Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis". Biology of Reproduction, vol. 54, p. 497-505.

CONN, P.M. et S. Melmed. 1997. Endocrinology. New Jersey : Humana Press, 448 p.

CORBIN, C., J. Trant et A. Conley. 2001. "Porcine gonadal and placental isozymes of aromatase cytochrome P450: sub-cellular distribution and support by NADPH-cytochrome P450 reductase". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 172, p. 115-124.

DANHAIVE, P. A. et G. G. Rousseau. 1986. "Binding of glucocorticoid antagonists to androgen and glucocorticoid hormone receptors in rat skeletal muscle". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 24, p. 481-487.

DANHAIVE, P. A. et G. G. Rousseau. 1988. "Evidence for sex-dependent anabolic response to androgenic steroids mediated by muscle glucocorticoid receptors in the rat". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 29, p. 575-581.

DAVID, K., E. Dingemans, J. Freud et E. Lacquer. 1935. "Über kristallines männliches Hormon aus holden (Testosteron), wirksamer als aus Ham oder Cholesterin bereitestes Androsteron". Hoppe Seylers Z Physiological Chemistry, vol. 233, p.281- 282.

DE BRABANDER, H., J. van Hende, L. Hendricks, J. Rauss, F. Smets, G. Pottie, L. van Gikel et R. W. Stephany. 1994. "Endogenic nortestosterone in cattle?". The Analyst, vol. 119, p. 2581-2585.

DE COCK, K. J. S., F. T. Delbeke, P. Van Eenoo, N. Desmet, K. Roels et P. De Backer. 2001. "Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 25, p. 843-852.

DE LA TORRE, X., J. C. Gonzalez, S. Pichini, J. A. Pascual et J. Segura. 2001. " <sup>13</sup>C/ <sup>12</sup>C isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 24, p. 645-650.

DE MONDENARD, J.-P. 2000. "Historique et évolution du dopage". Annales de Toxicologie Analytique, vol. XII, p. 5-18.

DE WASH, K., B. Le Bizec, H. De Brabander, F. André et S. Impens. 2001. "Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profile of nandrolone metabolites. II. Identification and quantification of 19-norsteroids responsible for 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone excretion in human urine". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 15, p. 1442-1447.

DEBRUYCKERE, G., R. de Sagher et C. Van Peteghem. 1992. "Clostebol-positive urine after consumption of contaminated meat". Clinical Chemistry, vol. 38, p. 1869-1873.

DEBRUYCKERE, G. et C. Van Peteghem. 1991. "Detection of 19-nortestosterone and its urinary metabolites in miniature pigs by gas chromatography-mass spectrometry". Journal of Chromatography B, Biomedical Applications, vol. 564, p. 393-403.

DEBRUYCKERE, G. et C. Van Peteghem. 1993. "Influence of the consumption of meat contaminated with anabolic steroids on doping tests". Analytica Chimica Acta, vol. 275, p. 49-56.

DEBRUYCKERE, G., C. Van Peteghem, H. De Brabander et M. Debackere. 1990. "Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of 19-nortestosterone in the urine of untreated boars-effect of the administration of Laurabolin®". The Veterinary Quarterly, vol. 12, p. 246-250.

DEHENNIN, L., Y. Bonnaire et Ph. Plou. 1999. "Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by chromatography-mass spectrometry". Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, vol. 721, p. 301-307.

DEHENNIN, L., M. Jondet et R. Scholler. 1987. "Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: an isotope dilution-mass spectrometric study". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 26, p. 399-405.

DESROCHES, M. C., J. C. Mathurin, Y. Richard, P. Delahaut et J. de Ceaurriz. 2002. "Urinary 19-norandrosterone purification by immunaffinity chromatography: application to gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 16, p. 370-374.

DINTINGER, T., J.-L. Gaillard, I. Zwain, R. Bouhamidi et P. Silberzahn. 1989. "Synthesis and aromatization of 19-norandrogens in the stallion testis". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 32, p. 537-544.

DONIKE, M. et J. Zimmermann. 1980. "Zur Darstellung von trimethylsilyl-, triethylsilyl- und tert-butyldimethylsilyl-enolathern von ketosteroiden für gas-chromatographische und massen-spektrometrische Untersuchungen". Journal of Chromatography, vol. 202, p. 483-486.

DOODY, K. et B. Carr. 1989. "Aromatase in human fetal tissues". American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 161, p. 1694-1697.

DOODY, K. J., M. C. Lorence, J. I. Mason et E. R. Simpson. 1990. "Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 70, p. 1041-1045.

DUBOIS, D. et R. Almon. 1984. "Glucocorticoid sites in skeletal muscle: adrenalectomy, maturation, fiber type and sex". American Journal of Physiology, vol. 247, p. E118-E125.

DUMESTRE-TOULET, V. 2000. "Se doper via Internet ? Un jeu... de souris". Annales de Toxicologie Analytique, vol. XII, p. 19-25.

DUNN, J. F., B. C. Nisula et D. Rodbard. 1981. "Transport of steroid hormones : binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 53, p. 58-67.

DUTTON, G. J. 1978. "Developmental aspects of drug conjugation, with special reference to glucuronidation". Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 18, p. 17-35.

ENGEL, L. L., J. Alexander et M. Wheeler. 1958. "Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone". Journal of Biological Chemistry, vol. 231, p. 159-164.

FERCHAUD, V., B. Le Bizec, F. Monteau et F. André. 2000. "Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 14, p. 652-656.

FERCHAUD, V., B. Le Bizec, F. Monteau et F. André. 1998. "Determination of the exogenous character of testosterone in bovine urine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry". The Analyst, vol. 123, p. 2617-2620.

FERRANDO, A. A., M. Sheffield-Moore, S. E. Wolf, D. N. Herndon et R. R. Wolfe. 2001. "Testosterone administration in severe burns ameliorates muscle catabolism". Critical Care Medicine, vol. 29, p. 1936-1942.

FERRANDO, A. A., K. D. Tipton, D. Doyle, S. M. Phillips, J. Cortiella et R. R. Wolfe. 1998. "Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport". American Journal of Physiology, vol. 275, p. E864-E871.

FRIEDL, K., C. J. Hannan, R. Jones et S. Plymate. 1990. "High-density lipoprotein cholesterol is not decreased if an aromatizable androgen is administered". Metabolism, Clinical and Experimental, vol. 39, p. 69-74.

GALAN MARTIN, A. M., J. I. Maynar Marino, M. P. Garcia de Tiedra, J. J. Rivero Marabe, M. J. Caballero Loscos et M. Maynar Marino. 2001. "Determination of nandrolone and metabolites in urine samples from sedentary persons and sportsmen". Journal of Chromatography B, vol. 761, p. 229-236.

GAMBELUNGHE, C., M. Sommovilla et R. Rossi. 2002. "Testing for nandrolone metabolites in urine samples of professional athletes and sedentary subjects by GC/MS/MS analysis". Biomedical Chromatography, vol. 16, p. 508-512.

GARRETT, W. M., D. J. Hoover, C. H. L. Shackleton et L. D. Anderson. 1991. "Androgen metabolism by porcine granulosa cells during the process of luteinization in vitro: Identification of 19-oic-androstenedione as a major metabolite and possible precursor for the formation of C<sub>18</sub> Neutral Steroids". Endocrinology, vol. 129, p. 2941-2950.

GEYER, H., U. Mareck-Engelke, A. Wagner et W. Schänzer. 2001. "The analysis of "non-hormonal" nutritional supplements for prohormones". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann and U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (9). (19<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 18<sup>th</sup> to 23<sup>rd</sup> March 2001). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 63-71.

GLAZER, G. 1991. "Atherogenic effects on anabolic steroids on serum lipid levels". Archives Internal Medicine, vol. 151, p. 1925-1933.

GRAHAM-LAURENCE, S., B. Amarnah, R. E. White, J. A. Peterson et E. R. Simpson. 1995. "A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450". Protein Science, vol. 4, p. 1065-1080.

GRAHAM-LAURENCE, S., W. M. Khalil, M. C. Lorence, Mendelson Carole R. et E. R. Simpson. 1991. "Structure-function relationships of human aromatase cytochrome P-450 using molecular modeling and site-directed mutagenesis". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 11939-11946.

GRIFFIN, J.E. et J.D. Wilson. 1998. "Disorders of the testes and the male reproductive tract". In J.D. Wilson, D.W. Foster, H.M. Kronenberg et P.R. Larsen (éd.) Williams textbook of endocrinology. 9<sup>e</sup> édition. États-Unis : W.B. Saunders Company, 1998, p. 819-875.

GRINO, P. B., J. E. Griffin et J. D. Wilson. 1990. "Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone ". Endocrinology, vol. 126, p. 1165-1172.

GROGAN, J., M. Shou, D. Zhou, S. Chen et K. R. Korzekwa. 1993. "Use of aromatase (CYP19) metabolite ratios to characterize electron transfer from NADPH-cytochrome P450 reductase". Biochemistry, vol. 32, p. 12007-12012.

HABFAST, K. 1992. The methodology and instrumentation of GC-IRMS. Bremen : Finnigan MAT, 23 p.

HARTGENS, F., H. van Straaten, S. Fideldij, G. Rietjens, H. A. Keizer et H. Kuipers. 2002. "Misuse of androgenic-anabolic steroids and human deltoid muscle fibers: differences between polydrug regimens and single drug administration". European Journal of Applied Physiology, vol. 86, p. 233-239.

HAUSMANN, R., S. Hammer et P. Betz. 1998. "Performance enhancing drugs (doping agents) and sudden death- a case report and review of the literature". International Journal of Legal Medicine, vol. 111, p. 261-264.

HEMMERSBACH, P., A. H. Hagensen et J. Misund. 2000. "Determination of urinary norandrosterone excretion in females during one menstrual cycle by gas chromatography/mass spectrometry". In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, (éd.). Recent advances in doping analysis (7). (17<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 14<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> March 1999). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 141-144.

HEMMERSBACH, P., S. Tomten, S. Nilsson, H. Oftebro, O. Havrevoll, B. Oen et K. Birkeland. 1995. "Illegal use of anabolic agents in animal fattening - Consequences for doping analysis". In: M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann et U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (2). 12<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 10<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> March 1994. Köln: Sport and Buch Strauss, 1995, p. 185-191.

HICKSON, R. C., S. M. Czerwinski, M. T. Falduto et A. P. Young. 1990. "Glucocorticoid antagonism by exercise and androgenic-anabolic steroids". Medicine and Science in Sports and Exercise, vol. 22, p. 331-340.

HORNING, S., H. Geyer, U. Flenker et W. Schänzer. 1998. "Detection of exogenous steroids by <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C analysis". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann et U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (5). (15<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 23<sup>rd</sup> to 28<sup>th</sup> February 1997). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 135-148.

HORNING, S., H. Geyer, M. Machnik, W. Schänzer, A. Hilkert et J. OeBelmann. 1997. "Detection of exogenous testosterone by <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C analysis". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann et U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (4). (14<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 17<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup> March 1996). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 275-283.

HOUGHTON, E., J. Copey, M. C. Dumasia, P. E. Haywood, M. S. Moss et P. Teale. 1984. "The identification of C-18 neutral steroids in normal stallion urine". Biomedical Mass Spectrometry, vol. 11, p. 379-383.

HUMBERT, L., M. L'Hermitte, F. Vaysette, G. Pépin, F. Descamps, M.-H. Ghysel, É. Lacassie, J.-M. Gaulier, L. Schang, Y. Ricordel, V. Cirimele et P. Kintz. 2000. "Détermination des concentrations physiologiques de la norandrostérone et de la norétiocolanolone, métabolites urinaires de la nandrolone par CPG/SM. Résultats d'une étude multicentrique.". Annales de Toxicologie Analytique, vol. XII, p. 36-42.

- INKSTER, S., W. Yue et A. Brodie. 1995. "Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 80, p. 1941-1947.
- ISHAK, K. G. et H. J. Zimmerman. 1987. "Hepatotoxic effects of anabolic/androgenic steroids". Seminars in Liver Disease, vol. 7, p. 230-236.
- JÄNNE, O. A., J. J. Palvimo, P. Kallio et M. Mehto. 1993. "Androgen receptor and mechanism of androgen action". Annals of Medicine, vol. 25, p. 83-89.
- JEANNEAU, T., P. Kintz, V. Cirimele et B. Ludes. 1999. "Détermination des concentrations physiologiques de la norandrostérone et de la norétiocholanolone, métabolites urinaires de la nandrolone par CPG/SM". Toxicorama, vol. XI, p. 25-29.
- JIN, Y. et T. M. Penning. 2001. "Steroid 5 $\alpha$ -reductases and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism". Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 15, p. 79-94.
- KACSOH, B. 2000. Endocrine physiology. États-Unis : McGraw-Hill, 741 p.
- KADI, F. 2000. "Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids". Acta Physiologica Scandinavica, vol. 168, p. 1-52.
- KADI, F., A. Eriksson, S. Holmner et L.-E. Thornell. 1999. "Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes". Medicine and Science in Sport and Exercise, vol. 31, p. 1528-1534.
- KAO, Y.-C., T. Higashiyama, X. Sun, T. Okubo, C. Yarborough, I. Choi, Y. Osawa, F. A. Simmen et S. Chen. 2000. "Catalytic differences between porcine blastocyst and placental aromatase isozymes". European journal of biochemistry, vol. 267, p. 6134-6139.
- KAO, Y.-C., K. R. Korzekwa, C. A. Laughton et S. Chen. 2001. "Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450. A site-directed mutagenesis study". European Journal of Biochemistry, vol. 268, p. 243-251.
- KARCH, S. B. 1993. "Anabolic steroid". Chap. In : The pathology of drug abuse. United States : CRC Press Inc. p. 355-373.
- KHALIL, M., P. Morley, M. Glasier, D. Armstrong et T. Lang. 1989. "Formation of 4-oestren-3,17-dione (19-norandrostenedione) in porcine granulosa cells in vitro is inhibited by the aromatase inhibitor 4-hydroxyandrostenedione and the cytochrome P-450 inhibitors aminoglutethimide phosphate and ketoconazole". Journal of Endocrinology, vol. 120, p. 251-260.
- KIMURA, N., A. Mizokami, T. Oonuma, H. Sasano et H. Nagura. 1993. "Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in



paraffin-embedded human tissues". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 41, p. 671-678.

KINTZ, P., V. Cirimele et B. Ludes. 1999. "Norandrostérone et norétiocholanolone: les métabolites révélateurs". Acta Clinica Belgica Supplementum, vol. 1, p. 68-73.

KIRALY, C. L., M. Alen, J. Korvola et M. Horsmanheimo. 1988. "The effect of testosterone and anabolic steroids on the skin surface lipids and the population of Propionibacteria acnes in young postpubertal men". Acta Dermato-Venereologica, vol. 68, p. 21-26.

KIRALY, C. L., Y. Collan et M. Alen. 1987. "Effect of testosterone and anabolic steroids on the size of sebaceous glands in power athletes". American Journal of Dermatopathology, vol. 9, p. 515-519.

KITAWAKI, J., S. Inoue, T. Tamura, T. Yamamoto, T. Noguchi, Y. Osawa et H. Okada. 1992. "Increasing aromatase cytochrome P-450 level in human placenta during pregnancy: studied by immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay". Endocrinology, vol. 130, p. 2751-2757.

KNUTH, U. A., H. Maniera et E. Nieschlag. 1989. "Anabolic steroids and semen parameters in bodybuilders". Fertility and Sterility, vol. 52, p. 1041-1047.

KOURI, E. M., H. G. Pope et P. S. Oliva. 1996. "Changes in lipoprotein-lipid levels in normal men following administration of increasing doses of testosterone cypionate". Clinical Journal of Sport Medicine, vol. 6, p. 152-157.

KUIPERS, H., A. G. Wijnen, F. Hartgens et S. M. M. Willems. 1991. "Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders". International Journal of Sports Medicine, vol. 12, p. 413-418.

KUPFER, D., E. Forchielli et R. I. Dorfmann. 1960. " $3\alpha$ -Hydroxy-19-nor-5 $\alpha$ -androstan-17on and 19-nor-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol". Journal of Organic Chemistry, vol. 25, p. 1674-1675.

KUTSCHER, E. C., B. C. Lund et P. J. Perry. 2002. "Anabolic steroids". Sports Medicine, vol. 32, p. 285-296.

LAURE, P. 2000. Dopage et société. Paris : Ellipses, 447 p.

LE BIZEC, B., F. Bryand, I. Gaudin, F. Monteau, F. Poulain et F. André. 2002a. "Endogenous nandrolone metabolites in human urine: preliminary results to discriminate between endogenous and exogenous origin". Steroids, vol. 67, p. 105-110.

LE BIZEC, B., F. Bryand, I. Gaudin, F. Monteau, F. Poulain et F. André. 2002b. "Endogenous nandrolone metabolites in human urine. Two-year monitoring of male professional soccer players". Journal of Analytical Toxicology, vol. 26, p. 43-47.

LE BIZEC, B., I. Gaudin, F. Monteau, F. André, S. Impens, K. De Wash et H. De Brabander. 2000. "Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profile of nandrolone metabolites. I. Mass spectrometric detection and quantification of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 14, p. 1058-1065.

LE BIZEC, B., F. Monteau, I. Gaudin et F. André. 1999. "Evidence for the present of endogenous 19-norandrosterone in human urine". Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, vol. 723, p. 157-172.

LENDERS, J. W., P. N. Demacker, J. A. Vos, P. L. Jansen, A. J. Hoitsma, A. van't Laa et T. Thien. 1988. "Deleterious effects of anabolic steroids on serum lipoproteins, blood pressure, and liver function in amateur body builders". International Journal of Sports Medicine, vol. 9, p. 19-23.

LEUNISSEN, W.J.J. 1979. "Quantitative aspects of the determination of steroid profiles from urine by capillary gas chromatography" Thèse de doctorat, Eindhoven, Pays-Bas.

LÉVESQUE, J.-F., M. Gaudreault, R. Houle et Chauret, N. 2002. "Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective". Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, vol. 780, p. 145-153.

LUKE, J. L., A. Farb, R. Virmani et B. Sample. 1990. "Sudden cardiac death during exercise in a weight lifter using anabolic androgenic steroids: pathological and toxicological findings". Journal of Forensic Sciences, vol. 35, p. 1441-1447.

MACHNIK, M., Y. Schrader et Schänzer W. 2001. "Plasma levels of 19-norsteroids after oral and buccal administration of norandrostenedione". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann and U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (9). (19<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 18<sup>th</sup> to 23<sup>rd</sup> March 2001). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 125-131.

MACINDOE, J. H., P. J. Perry, W. R. Yates, T. L. Holman, V. L. Ellingrood et S. D. Scott. 1997. "Testosterone suppression of the HPT axis". Journal of Investigation Medicine, vol. 45, p. 441-447.

MARECK-ENGELKE, U., H. Geyer et W. Schänzer. 1999. "19-Norandrosterone - Criteria for the decision making process". In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, (éd.) Recent advances in doping analysis (6). (16<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 15<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> March 1998). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 119-129.

MARECK-ENGELKE, U., G. Schultze, H. Geyer et W. Schänzer. 2000. "19-Norandrosterone in pregnant women". In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, (éd.) Recent advances in doping analysis (7). (17<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 14<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> March 1999). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 145-154.

MARIEB, E. N. et G. Laurendeau. 1993. Anatomie et physiologie humaine. Québec : ERPI, 1014 p.

MASSÉ, R., C. Ayotte et R. Dugal. 1989. "Studies on anabolic steroids I. Integrated methodological approach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine". Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, vol. 489, p. 23-50.

MASSÉ, R., C. Laliberté, L. Tremblay et R. Dugal. 1985. "Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone urinary metabolites in man". Biomedical Mass Spectrometry, vol. 12, p. 115-121.

MASON, P. M., S. E. Hall, I. Gilmour, E. Houghton, C. Pillinger et M. A. Seymour. 1998. "The use of stable carbon isotope analysis to detect the abuse of testosterone in cattle". The Analyst, vol. 123, p. 2405-2408.

MATHURIN, J.-C., V. Herrou, E. Bourgoigne, L. Pascaud et J. de Ceaurriz. 2001. "Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis of 19-norsteroids: application to the detection of a nandrolone metabolite in urine". Journal of Chromatography B : Biomedical Applications, vol. 759, p. 267-275.

MATSUMINE, H., K. Hirato, T. Yanaihara, T. Tamada et M. Yoshida. 1986. "Aromatization in skeletal muscle". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 63, p. 717-720.

MATTHEWS, D. E. et J. M. Hayes. 1978. "Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry". Analytical Chemistry, vol. 50, p. 1465-1473.

MAYER, M. et F. Rosen. 1975. "Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol". American Journal of Physiology, vol. 229, p. 1381-1386.

McEVOY, J. D. G., J. W. McCaughey, J. Cooper, D. G. Kennedy et B. M. McCartan. 1999a. "Nortestosterone is not a naturally occurring compound in male cattle". The Veterinary Quarterly, vol. 21, p. 8-15.

McEVOY, J. D. G., C. E. McVeigh, S. A. Hewitt et J. W. McCaughey. 1999b. "Absence for testicular production of nortestosterone in the bull". Veterinary Record, vol. 144, p. 729-730.

McLAFFERTY, F.W. et F. Tureček. 1993 Interpretation of mass spectra. 4<sup>e</sup> édition. Californie : University Science Books, 371 p.

McNATTY, K., D. Baird, A. Bolton, P. Chambers, C. Corker et H. McLean. 1976. "Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle". Journal of Endocrinology, vol. 71, p. 77-85.

- McPHAUL, M. J. et M. Young. 2001. "Complexities of androgen action". Journal of American Academy of Dermatology, vol. 45, p. S87-S94.
- MEIER-AUGUSTIN, W. 1997. "The chromatographic side of isotope ratio mass spectrometry- pitfalls and answers". LC-GC, vol. 15, p. 244-253.
- MENDEL, C. M. 1989. "The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model". Endocrine Reviews, vol. 10, p. 232-274.
- MENDEL, C. M. 1990. "Rates of dissociation of sex steroid hormones from human sex hormone-binding globulin: a reassessment". Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, vol. 37, p. 251-255.
- MENDEL, C. M., M. B. Miller, P. K. Siiteri et J. T. Murai. 1990. "Rates of dissociation of steroid and thyroid hormones from human serum albumin". Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, vol. 37, p. 245-250.
- MEYER, H. H. D. 2001. "Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production". APMIS, vol. 109, p. 1-8.
- MEYER, H. H. D., D. Falckenberg, T. Janowski, M. Rapp, E. F. Rösel, L. van Look et H. Karg. 1992. "Evidence for the presence of endogenous 19-nortestosterone in the cow peripartum and in the neonatal calf". Acta Endocrinologica, vol. 126, p. 369-373.
- MILLER, N. 1987. "High-density lipoprotein: a major risk factor for coronary atherosclerosis". Ballière's Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 1, p. 603-622.
- MOSLEMI, S., P. Silberzahn et J.-L. Gaillard. 1995. "In vitro 19-norandrogen synthesis by equine placenta requires the participation of aromatase". Journal of Endocrinology, vol. 144, p. 517-525.
- MOSS, F. P. et C. P. Leblond. 1971. "Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats". Anatomical Record, vol. 170, p. 421-435.
- MOTTRAM, D. R. et A. J. George. 2000. "Anabolic steroids". Ballière's Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 14, p. 55-69.
- MUSLINER, T. A. et R. M. Krauss. 1988. "Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease". Clinical Chemistry, vol. 34, p. B78-B83.
- NELSON, D., T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda et D. W. Nebert. 1993. "The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature". DNA and Cell Biology, vol. 12, p. 1-51.
- NELSON, L. R. et S. E. Bulun. 2001. "Estrogen production and action". Journal of American Academy of Dermatology, vol. 45, p. S116-S124.

OPFERMANN, G. et W. Schänzer. 1997. "Trimethylsilation- Aspects for derivatisation". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann et U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (4). (14<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 17<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup> March 1996). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 247-252.

ÖZER, D. et A. Temëzer. 1997. "The determination of nandrolone and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry". European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, vol. 22, p. 421-425.

PARDRIDGE, W. M. 1986. "Serum bioavailability of sex steroid hormones". Clinics in Endocrinology and Metabolism, vol. 15, p. 259-278.

PARK, R. et S. Epstein. 1960. "Carbon isotope fractionation during photosynthesis". Geochimica and Cosmochimica Acta, vol. 21, p. 110-126.

PÄRSSINEN, M. et T. Seppälä. 2002. "Steroid use and long-term health risks in former athletes". Sports Medicine, vol. 32, p. 83-94.

PAYNE, A., R. P. Kelch, S. S. Musich et M. E. Halpern. 1976. "Intratesticular site of aromatization in the human". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 42, p. 1081-1087.

PERRY, P.J., K.H. Anderson et W.R. Yates. 1990. "Illicit anabolic steroid use in athletes. A case series analysis". The American Journal of Sports Medicine, vol. 18, p. 422-428.

PIÉRARD, G. E. 1998. "Acne gymnasium: une acné fulminante dopée". Revue Médicale de Liège, vol. 53, p. 441-443.

PIPE, A. et C. Ayotte. 2002. "Nutritional supplements and doping". Clinical Journal of Sports Medicine, vol. 12, p. 245-249.

POPE, H. G., E. M. Kouri et J. I. Hudson. 2000. "Effects of supraphysiologic doses of testosterone on mood and aggression in normal men". Archives of General Psychiatry, vol. 57, p. 133-140.

POPE, H. J. et D. L. Katz. 1994. "Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use". Archives of General Psychiatry, vol. 51, p. 375-382.

PRÉVOST, S., T. Nicol, F. Monteau, F. André et B. Le Bizec. 2001. "Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to control the misuse of androgens in breeding animals: new derivatization method applied to testosterone metabolites and precursors in urine samples". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 15, p. 2509-2514.

PRICE, T., J. Aitken et E. R. Simpson. 1974. "Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 4, p. 879-883.

RAESIDE, J. I., R. M. Friendship et O. E. Vrablic. 1997. "Effects of castration on early postnatal development of male accessory sex glands in the domestic pig". European Journal of Endocrinology, vol. 137, p. 287-292.

REZNIK, Y., L. Dehennin, C. Coffin, J. Mahoudeau et P. Leymarie. 2001. "Urinary nandrolone metabolites of endogenous origin in man: A confirmation by output regulation under human chorionic gonadotropin stimulation". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 86, p. 146-150.

REZNIK, Y., M. Herrou, L. Dehennin, M. Lemaire et P. Leymarie. 1987. "Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy: determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography-mass spectrometry". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 64, p. 1086-1088.

ROBINSON, N., F. Taroni, M. Saugy, C. Ayotte, P. Mangin et J. Dvorak. 2001. "Detection of nandrolone metabolites in urine after a football game in professional and amateur players: a Bayesian comparison". Forensic Science International, vol. 122, p. 130-135.

ROGOL, A.D. et Yesalis, C.E. 1992. "Anabolic-androgenic steroids and athletes: what are the issues?". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 74, p. 465-469.

RUOKONEN, A. et R. Vihko. 1974. "Steroid metabolism in testis tissue: concentrations of unconjugated and sulfated neutral steroids in boar testis". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 5, p. 33-38.

RUZICKA, L. et A. Wettstein. 1935. "Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol)". Helvetica Chimica Acta, vol. 18, p. 1264-1275.

RUZICKA, L. M.W. Goldberg et H.R. Rosenberg. 1935. "Herstellung des 17-Methyltestosteron und anderer Androsten- und Androstanderivate. Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und männlicher Hormonwirkung". Helvetica Chimica Acta, vol. 18, p. 1487-1498.

RYAN, K. J. 1959. "Biological aromatization of steroids". Journal of Biological Chemistry, vol. 234, p. 268-272.

RYAN, K., Z. Petro et J. Kaiser. 1968. "Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and theca cells". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 28, p. 355-358.

SAARTOK, T., E. Dahlberg et J. A. Gustafsson. 1984. "Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin". Endocrinology, vol. 114, p. 2100-2106.

SABORIDO, A., F. Molano et A. Megias. 1993. "Effect of training and anabolic-androgenic steroids on drug metabolism in rat liver". Medicine and Science in Sports and Exercise, vol. 25, p. 815-822.

SAUGY, M., N. Robinson, C. Cardis, C. Schweizer, L. Rivier, P. Mangin, C. Ayotte et J. Dvorak. 1999. "Nandrolone metabolites in football players: Utility for in and out of competition tests". In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, (éd.). Recent advances in doping analysis (7). (17<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 14<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> March 1999). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 95-108.

SCHANZER, W. 1996. "Metabolism of anabolic androgenic steroids". Clinical Chemistry, vol. 42, p. 1001-1020.

SCHANZER, W. 2002. "Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic steroids, an international study". Communiqué provenant du site Internet du Comité International Olympique : [http://multimedia.olympic.org/pdf/en\\_report\\_324.pdf](http://multimedia.olympic.org/pdf/en_report_324.pdf) (Page consultée le 1er décembre 2002).

SCHANZER, W., A. Breidbach, H. Geyer, C. van Kuk, E. Nolteernsting et M. Thevis. 2000. "Metabolism of nortestosterone, norandrostenedione and norandrostenediol. Identification of 3 $\alpha$ -hydroxyestr-4-en-17-one glucuronide and 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -estr-17-one glucuronide and sulphate". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann et U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (8). (18<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 20<sup>th</sup> to 25<sup>th</sup> February 2000). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 155-174.

SCHANZER, W. et M. Donike. 1993. "Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites". Analytica Chimica Acta, vol. 275, p. 23-48.

SCHINDLER, A. E., A. Ebert et E. Friedrich. 1972. "Conversion of androstenedione to estrone by human fat tissue". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 35, p. 627-630.

SCHMITT, N., M.-M. Flament, C. Goubault, P. Legros, M.-F. Grenier-Loustalot et A. Denjean. 2002. "Nandrolone excretion is not increased by exhaustive exercise in trained athletes". Medicine and Science in Sports and Exercise, vol. 34, p. 1436-1439.

SCHOELLER, D. A., M. Minagawa, R. Slater et I. R. Kaplan. 1986. "Stable isotopes of carbon, nitrogen and hydrogen in the contemporary north american human food web". Ecology of Food and Nutrition, vol. 18, p. 159-170.

SCHWARZENBERGER, F., G. S. Toole, H. L. Christie et J. I. Raeside. 1993. "Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs". Acta Endocrinologica, vol. 128, p. 173-177.

SCOTT, M. J. 3<sup>rd</sup> et A. M. Scott. 1992. "Effects of anabolic-androgenic steroids on the pilosebaceous unit". Cutis, vol. 50, p. 113-116.

SEENE, T. et A. Viru. 1982. "The catabolic effect of glucocorticoids on different types of skeletal muscle fibers and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 16, p. 349-352.

SHACKLETON, C. H. L., A. Phillips, T. Chang et Y. Li. 1997. "Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstanediols". Steroids, vol. 62, p. 379-387.

SHAFIQ, S., M. Gorycki et A. Mauro. 1968. "Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat". Journal of Anatomy, vol. 103, p. 135-141.

SHEFFIELD-MOORE, M., R. J. Urban, S. E. Wolf, J. Jiang, D. H. Catlin, D. N. Herndon, R. R. Wolfe et A. A. Ferrando. 1999. "Short-term oxandrolone administration stimulates net muscle protein synthesis in young men". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 84, p. 2705-2711.

SIMON, J. A. 2001. "Safety of estrogen/androgen regimens". The Journal of Reproductive Medicine, vol. 46, p. 281-290.

SIMPSON, E. R., M. S. Mahendroo, G. D. Means, M. W. Kilgore, M. M. Hinshelwood, S. Graham-Laurence, B. Amarnah, Y. Ito, C. R. Fisher, M. D. Michael, C. Mendelson et S. E. Bulun. 1994. "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis". Endocrine Reviews, vol. 15, p. 342-355.

SMITH, B. N. et S. Epstein. 1971. "Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants". Plant Physiology, vol. 47, p. 380-384.

SNOCHOWSKI, M., T. Saartok, E. Dahlberg, E. Eriksson et J.-A. Gustafsson. 1981. "Androgen and glucocorticoid receptors in human skeletal muscle cytosol". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 14, p. 765-771.

SOE, K., M. Soe et C. Gluud. 1992. "Liver pathology associated with the use of anabolic-androgenic steroids". Liver, vol. 12, p. 73-79.

SOLOMONS, G. T.W. 1997. Fundamentals of organic chemistry. 5<sup>e</sup> edition. États-Unis : John Wiley & Sons Inc., 1068 p.

STERK, S., H. Herbold, M. Blokland, H. van Rossum, L. van Gikel et R. Stephany. 1998. "Nortestosterone: endogenous in urine of goats, sheep and mares?". The Analyst, vol. 123, p. 2633-2636.

STOCKDALE, F. et H. Holtzer. 1961. "DNA synthesis and myogenesis". Experimental Cell Research, vol. 24, p. 508-520.

STRAUSS, R. H., M. T. Ligett et R. R. Lanese. 1985. "Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained women athletes". Journal of the American Medical Association, vol. 253, p. 2871-2873.



STRECKELBROECK, S., D. D. Heidrich, B. Stoffel-Wagner, V. H. J. Hans, J. Schramm, F. Bidlingmaier et D. Klingmüller. 1999. "Characterization of aromatase cytochrome P450 activity in the human temporal lobe". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 84, p. 2795-2801.

SULLIVAN, M. L., C. M. Martinez, P. Gennis et J. E. Gallagher. 1998. "The cardiac toxicity of anabolic steroids". Progress in Cardiovascular Diseases, vol. 41, p. 1-15.

SUNDARAM, K., N. Kumar, C. Monder et W. C. Bardin. 1995. "Different patterns of metabolism determine the relative anabolic activity of 19-norandrogens". Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, vol. 53, p. 253-257.

SUZUKI, T., H. Sasano, H. Sasaki, T. Fukaya et H. Nagura. 1994. "Quantitation of P450 aromatase immunoreactivity in human ovary during the menstrual cycle: relationship between the enzyme activity and immunointensity". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 42, p. 1565-1573.

THOMPSON, A. E. et P. K. Siiteri. 1973. "Studies on the aromatization of C-19 androgens". Annals New-York Academy of Sciences, vol. 212, p. 378-391.

THOMPSON, A. E. et P. K. Siiteri. 1974a. "Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione". Journal of Biological Chemistry, vol. 249, p. 5364-5372.

THOMPSON, E. A. et P. K. Siiteri. 1974b. "The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization". Journal of Biological Chemistry, vol. 249, p. 5373-5378.

TOTH, M. et T. Zakar. 1982a. "Different binding of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 $\alpha$  -reduced derivatives to the androgen receptor of the rat seminal vesicle: a step toward the understanding of the anabolic action of nortestosterone". Endokrinologie, vol. 80, p. S163-S172.

TOTH, M. et T. Zakar. 1982b. "Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins: a suggested role of 5 $\alpha$ -reductive steroid metabolism in the dissociation of "myotropic" and "androgenic" activities of 19-nortestosterone". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 17, p. 653-660.

TRÄGER, L. 1977. "Steroidhormone". Chap. In : Biosynthese Stoffwechsel Wirkung. Berlin : Springer-Verlag. p. 166-174.

TRICKER, R., R. Casaburi, T. W. Storer, B. Clevenger, N. Berman, A. Shirazi et S. Bhasin. 1996. "The effects of supraphysiological doses of testosterone on angry behavior in healthy eugonadal men". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 81, p. 3754-3758.

- TYAGI, R. K., Y. Lavrovsky, S. C. Ahn, C. S. Song, B. Chatterjee et A. K. Roy. 2000. "Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells". Molecular Endocrinology, vol. 14, p. 1162-1174.
- UEKI, M. et M. Okano. 1999. "Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry". Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 13, p. 2237-2243.
- UEKI, M., Y. Takao, M. Okano, A. Ikekita et M. Sato. 2001. "Differentiation of endogenous and exogenous steroids in urine by means of isotope ratio mass spectrometry". In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann and U. Mareck-Engelke (éd.) Recent advances in doping analysis (9). (19<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 18<sup>th</sup> to 23<sup>rd</sup> March 2001). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 145-154.
- URALETS, V. P. et P. A. Gillette. 1999. "Over-the-Counter anabolic steroids 4-androstene-3,17-dione; 4-androstene-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol, and 19-nor-4-androstene-3,17-dione: Excretion studies in men.". Journal of Analytical Toxicology, vol. 23, p. 357-366.
- URALETS, V. P. et P. A. Gillette. 2000. "Over-the-Counter delta5 anabolic steroids 5-androsten-3,17-dione; 5-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol; Dehydroepiandrosterone and 19-Nor-5-androstene-3,17-dione: Excretion studies in men.". Journal of Analytical Toxicology, vol. 24, p. 188-193.
- URALETS, V. P., P. A. Gillette et R. K. Latven. 1997. "Occurrence of 19-nordehydroandrosterone/etiocolanolone in nandrolone positive specimens". In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U, editors. Recent advances in doping analysis (4). (15<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis 17<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup> March 1996). Köln: Sport and Buch Strauss, p. 35-41.
- VAN DER VIES, J. 1985. "Implication of basic pharmacology in the therapy with ester of nandrolone". Acta Endocrinologica Supplement, vol. 271, p. 38-44.
- VAN EENOO, P., F. T. Delbeke, F. H. De Jong et P. De Backer. 2001. "Endogenous origin of norandrosterone in female urine: indirect evidence for the production of 19-norsteroids as by-products in the conversion from androgen to estrogen". Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, vol. 78, p. 351-357.
- VANDENBROECK, M., G. Van Vyncht, P. Gaspar, C. Dasnois, P. Delahaut, G. Pelzer, J. De Grave et G. Maghuin-Rogister. 1991. "Identification and characterization of 19-nortestosterone in urine of meat-producing animals". Journal of Chromatography B, Biomedical Applications, vol. 564, p. 405-412.
- VANLUCHENE, E., W. Eechaute, D.J. Vandekerckhove. 1982. "Conversion of free 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene steroids by incubation with *Helix pomatia*". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 16, p. 701-703.

VESTERGAAD, P. 1978. "The hydrolysis of conjugated neutral steroids in urine" Acta Endocrinologica Supplement, vol. 217, p. 96.

VOET, D. et J. G. Voet. 1995. Biochemistry. Etats-Unis : John Wiley & Sons Inc., 1361 p.

WANG, C., G. Alexander, N. Berman, B. Slahian, T. Davidson, V. McDonald, B. Steiner, L. Hull, C. Callegari et R.S. Swerdloff. 1996. "Testosterone replacement therapy improves mood in hypogonadal men – A clinical research center study". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 81, p. 3578-3583.

WILCOX, B. R. et L. L. Engel. 1965. "Kinetic studies on the role of 19-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione in estrogen biosynthesis". Steroids, vol. Suppl. I, p. 49-57.

WILDS, A. L. et N. A. Nelson. 1953. "The facile synthesis of 19-nortestosterone from estrone". Journal of American Chemical Society, vol. 75, p. 5366-5369.

WILLIAMS, D.G. 1979. "The biochemistry of the 17-hydroxysteroid dehydrogenases". In R. Hobkirk (éd.) Steroid Biochemistry. Vol. I. Boca Raton, FL : CRC Press, 1979, p. 83-110.

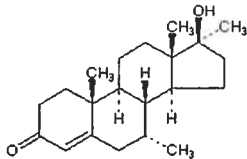
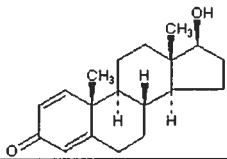
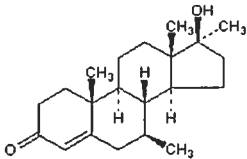
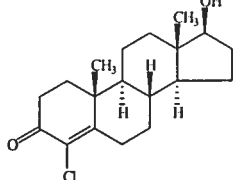
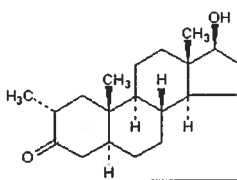
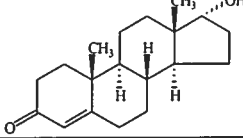
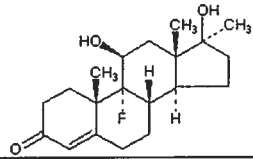
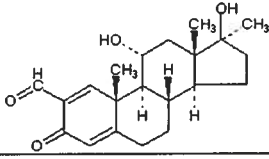
WU, F. C. W. 1997. "Endocrine aspects of anabolic steroids". Clinical Chemistry, vol. 43, p. 1289-1292.

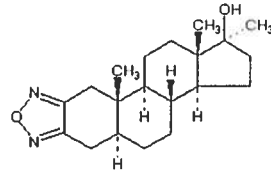
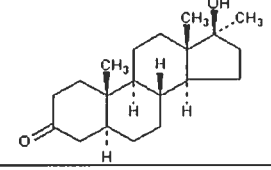
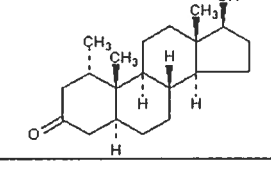
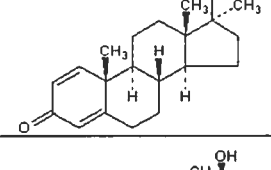
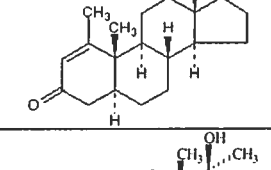
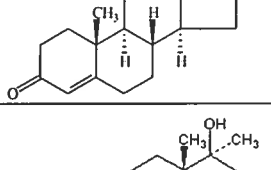
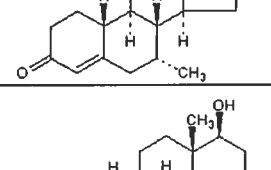
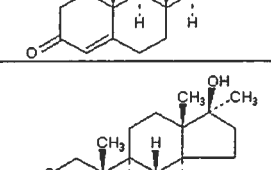
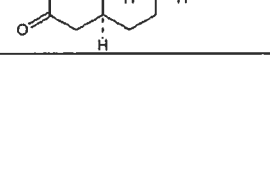
## **ANNEXES**

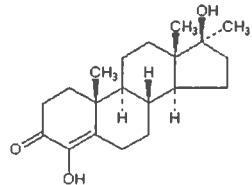
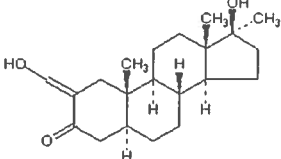
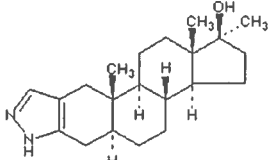
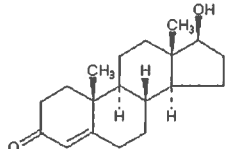
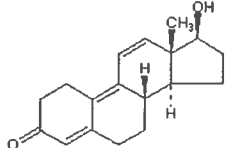
## **ANNEXE A**

### **Liste des stéroïdes androgènes anabolisants**

Tableau 3 Listes des principaux SAA

Nom trivial	Nom systématique	Structure chimique
Bolastérone	7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diméthylandrosta-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Boldénone	androsta-1,4-dièn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Calustérone	7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diméthylandrosta-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Chlorotestostérone	4-chloro-androst-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Drostanolone	2 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	
Épitestostérone	androsta-4-èn-17 $\alpha$ -ol-3-one	
Fluoxymestérone	9 $\alpha$ -fluoro-17 $\alpha$ -méthylandrosta-4-ène-11 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol-3-one	
Formébolone	2-hydroxyméthyl-17 $\alpha$ -méthylandrosta-1,4-diène-11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-3-one	

Furazabol	17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androsta-2,3-furazan-17 $\beta$ -ol	
Mestanolone	17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	
Mestérolone	1 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	
Métandiénone	17 $\alpha$ -méthyl-androsta-1,4-dièn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Métérolone	1-méthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Méthyltestostérone	17 $\alpha$ -méthyl-androst-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Mibolérone	7 $\alpha$ -17 $\alpha$ -diméthyl-estr-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Nortestostérone	estr-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Oxandrolone	17 $\alpha$ -méthyl-2-oxa-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	

Oxymestérone	17 $\alpha$ -méthyl-androst-4-ène-4,17 $\beta$ -diol-3-one	
Oxymétholone	2-hydroxyméthylène-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one	
Stanozolol	17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androst-2-éno(3,2-c)pyrazol-17 $\beta$ -ol	
Testostérone	androst-4-èn-17 $\beta$ -ol-3-one	
Trenbolone	estr-4,9,11-trièn-17 $\beta$ -ol-3-one	



## **ANNEXE B**

### **Analyse de la norandrostérone et de la norétiocholanolone sur CG/SM**

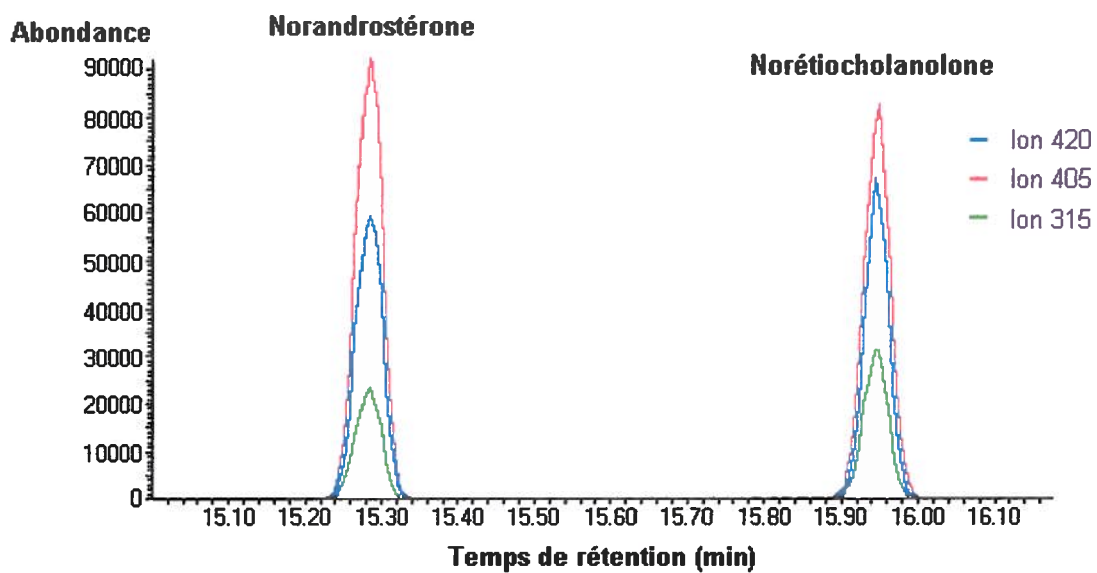


Figure 12 Chromatogramme des dérivés TMS-éther, TMS-énol de la norandrostérone et de la norétiocolanolone obtenu par analyse sur CG/SM de standards authentiques.

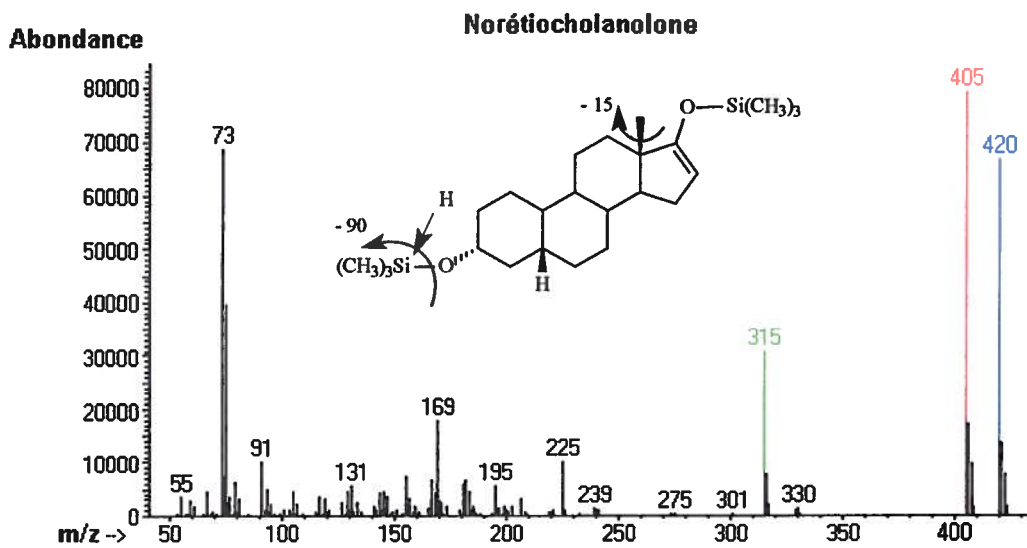
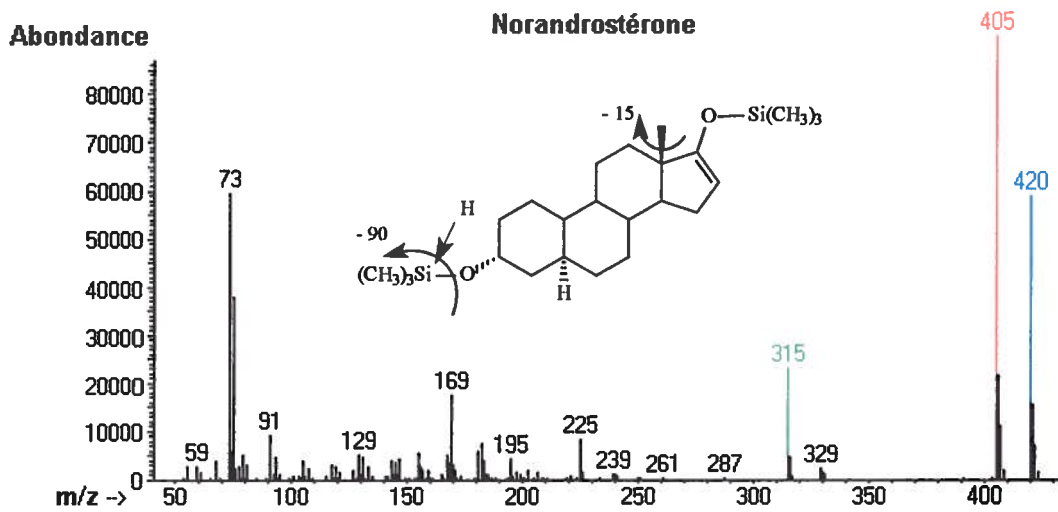
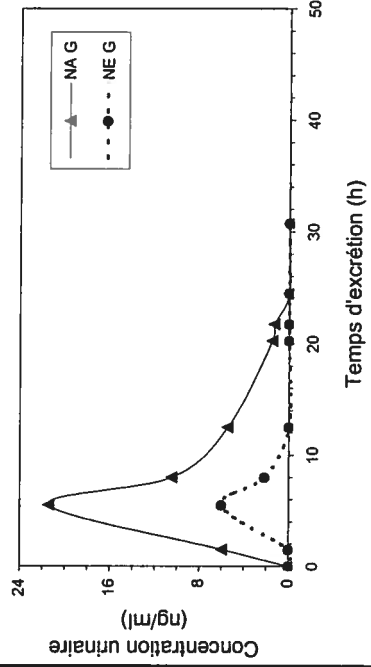


Figure 13 Spectres de masse des dérivés TMS-éther, TMS-énol de la norandrostérone et de la norétiocholanolone obtenus par analyse sur CG/SM de standards authentiques.

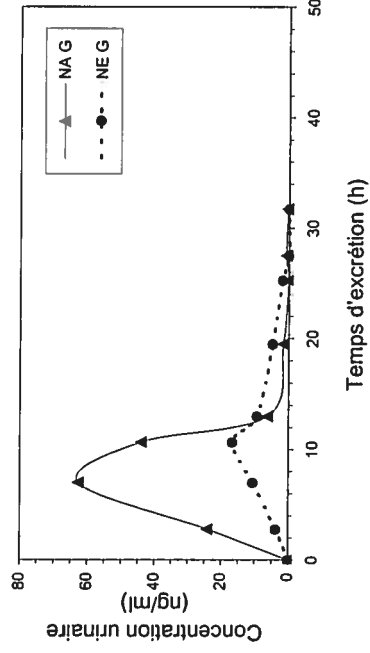
## **ANNEXE C**

### **Résultats des études de consommation de porc**

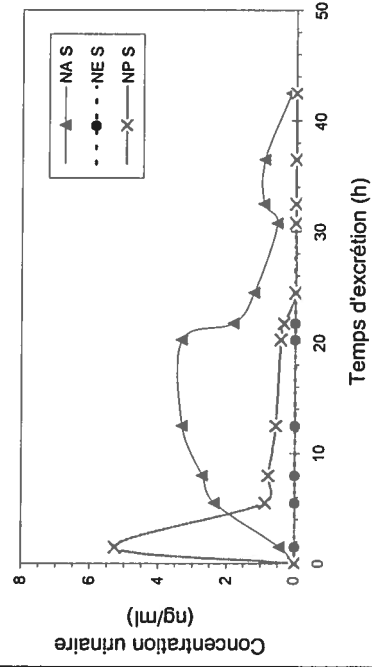
Profil d'excrétion urinaire de NA et NE glucuroconjuguées après absorption de 300 g de rein, de foie et de cœur de porc non-castré par le volontaire M22



Profil d'excrétion urinaire de NA et NE glucuroconjuguées après absorption de 300 g de rein, de foie et de cœur de porc non-castré par le volontaire M46



Profil d'excrétion urinaire de NA, NE et NP sulfoconjuguées après absorption de 300 g de rein, de foie et de cœur de porc non-castré par le volontaire M22



Profil d'excrétion urinaire de NA, NE et NP sulfoconjuguées après absorption de rein, de foie et de cœur de porc non-castré par le volontaire M46

