

Utilisation illégale d'androgènes

F. WRIGHT, E. GODEFROY, M. BONGINI, F. BOZZOLAN, A. DOUKANI

Université Paris VI, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Service de Biochimie Médicale,
91 Boulevard de l'Hôpital 75634 Paris Cedex 13, France.

Le travail de recherche présenté ici a été subventionné par le «Ministère Jeunesse et Sport», «Cellule Vie de l'Athlète» Conventions 91-94.

RESUME

Le dopage par les androgènes est l'utilisation de substances dérivées ou apparentées à la testostérone à des fins d'amélioration de la performance sportive. Toute prise d'androgène est illégale de par la Loi du 28 Juin 89 relative au sport. Il n'existe pas, pour cette classe de substances, de justification thérapeutique possible. Le Comité Médical d'Éthique a confirmé cette décision légale en 1993.

Les moyens utilisés actuellement pour mettre en évidence cette utilisation illégale sont revus ici. En bref, le dépistage de l'utilisation illégale d'androgènes commence par la recherche des différents anabolisants de synthèse dans un échantillon d'urine d'un compétiteur. La seule technique utilisée et reconnue officiellement dans le cadre du dépistage du dopage est la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

Mots-clés : Androgènes, sport, utilisation illégale, dopage.

INTRODUCTION

1. Qu'est-ce que la prise illégale d'androgènes ?

La prise d'androgènes ou de leurs dérivés ainsi que celle d'anabolisants de synthèse est prohibée dans le cadre de l'exercice physique aussi bien au cours de l'entraînement que de la compétition sportive elle-même. *Aucune indication médicale même justifiée n'est admise.* Toute prise de substance androgénique est ainsi considérée comme relevant du dopage [7, 32].

2. Etat de la législation

En France, (Loi n° 89-432 du 28 Juin 1989; Décret n° 92-888 du 27 Août 1992) la législation rend de fait tout dopage illégal. La liste des substances interdites est mise à jour tous les 6 mois au J.O. de la République. **Dans la Communauté Européenne**, la plupart des Pays Membres du Conseil de l'Europe ont signé «*La Charte Européenne contre le Dopage dans le Sport*» et les Résolutions 67 à 88 du Comité des Ministres du Conseil de l'Europe lors des réunions de Juin 67 à Avril 79 contiennent l'essentiel des recommandations à ce sujet. **Au niveau International**, c'est la Commission Médicale du Comité International Olympique qui décide à la fois de la liste des substances interdites et des règles du contrôle antidopage lors des grandes compétitions internationales.

3. Fondement rationnel de cette interdiction

Les effets des androgènes ne sont plus à démontrer et se situent à différents

niveaux : fonction reproductive, masse musculaire, performances physiques, pathologie tendineuse, pathologies cutanées avec acné, alopecie, agrégation plaquettaire, hémato-crite, libido, fonction hépatique. Les effets hormonaux des androgènes ne peuvent pas être dissociés des effets anabolisants sur les protéines, car ces effets sont tous deux médiés au niveau cellulaire par le même récepteur : le récepteur des androgènes (Voir article Dr I. Mowszowicz dans le même numéro).

Cette interdiction a donc une double origine :

- **la première** est d'ordre moral et repose sur le «Fair- Play», l'égalité des chances de chacun, les effets anaboliques de la testostérone et des androgènes en général n'étant plus à démontrer.

- **La seconde** est d'ordre médical et repose sur le problème de Santé Publique que pourraient poser les abus de prise d'androgènes, dont on sait par ailleurs qu'ils ne sont probablement pas étrangers à la survenue de certains cancers (32 et article Dr I. Mowszowicz).

MISE EN ÉVIDENCE D'UN DOPAGE : ETAT DE LA QUESTION

Le responsable officiel, au niveau national, des contrôles de dépistage est le Laboratoire National de Dépistage du Dopage (LNDD).

Le contrôle est effectué sur une miction urinaire recueillie par un médecin préleveur assermenté et transmise anonymement au LNDD. Aucun doute sur le résultat n'est admissible et l'identité de la substance interdite mise en évidence doit être *prouvée chimiquement* pour éviter tout abus. Ceci explique l'utilisation d'une technique sophistiquée telle que la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse qui représente la seule technique admise par le Comité Médical C.I.O. En ce

qui concerne les androgènes, le contrôle consiste en une étude approfondie *qualitative* et *quantitative* du profil des métabolites urinaires des androgènes, qu'ils soient d'origine synthétique, surrénalienne ou testiculaire (profil d'excrétion des différentes substances apparentées).

Cependant, l'établissement de l'origine (endogène ou exogène) d'une molécule naturelle telle que la testostérone est difficile. Le moyen direct qui consiste en la mesure du rapport isotopique de la substance naturelle est techniquement difficile et fastidieux. Les instances sportives internationales se sont donc mises d'accord sur un moyen de *dépistage indirect* avec la mesure d'une constante biologique et, ainsi, depuis les Jeux Olympiques de Los Angeles en 1982, le rapport GT/GEPIT est mesuré en plus des techniques de recherche directe. Depuis 2 ans, les concentrations des glucuronides de testostérone (GT) et d'épitéstostérone (GEPIT) sont elles-aussi mesurées. Une valeur supérieure à 200 ng/ml pour l'épitéstostérone est considérée comme résultant d'un dopage patent. Par contre aucune limite n'est encore fixée pour la testostérone !

L'EPITESTOSTERONE

L'épitéstostérone (Figure 1) est l'épimère 17α hydroxylé de la testostérone isolé en 1964 dans des urines humaines simultanément par Brooks [6] et Korenman [18]. C'est une substance très mal connue car non étudiée en endocrinologie ou biologie clinique.

L'épitéstostérone circule non liée à la TeBG [12], n'a aucun effet androgénique et ne se lie pas au récepteur des androgènes [5, 26]. Wilson et Lipsett ont montré qu'elle n'était pas un métabolite de la testostérone elle-même et qu'elle était d'origine à la fois testiculaire et surrénalienne puisque sa production augmentait d'environ 20% aussi

bien sous ACTH que sous HCG [32]. Dray et al. ont confirmé ces données et montré que, chez l'homme, elle était principalement produite sous forme de sulfates bien que retrouvée dans les urines essentiellement sous forme de glucuronides comme la testostérone elle-même [12]. Certains auteurs [21, 25, 28, 31] ont rapporté sa mesure dans différentes pathologies androgénodépendantes. Ses fluctuations suivent celles de la testostérone (Tableau 1). D'autres ont montré une synthèse d'épitéstostérone chez le cochon d'inde [27] ou *in vitro*, à partir d'ovaires polykystiques humains (2 à 3%) avec pour précurseur la $\Delta 4$ -androstènedione [1, 4, 6, 17]. Cependant, leurs résultats ont été contestés aussi bien par Dray [12] que par Korenman [18] et, par double dilution isotopique, Tamm et al. [28] et Dray et al. [12] ont montré que l'épitéstostérone n'était pas métabolisée, chez l'homme. A ce jour la voie de biosynthèse de l'épitéstostérone n'est toujours pas connue et seule une hypothèse récente de

Weusten et al. [32] tente d'expliquer celle-ci à partir du $\Delta 5$ androstène- $3\beta,17\alpha$ -diol. Cependant, pour ces auteurs, aucune intervention enzymatique particulière ne contrôlerait la synthèse de ce précurseur qui proviendrait d'un «simple» réarrangement spatial aléatoire (statistique donc) du $\Delta 5$ androstène- $3\beta,17\beta$ -diol.

La normalité de l'excrétion du glucuronide d'épitéstostérone a été définie sur une population masculine par Donike et al. [10, 11] et confirmée par Catlin et al. [7] soit :

$$GT/GEPIT = 1,5 \pm 0,9$$

Les normes utilisées par les différents laboratoires officiels de dépistage du dopage ont été définies à partir de cette moyenne à laquelle ont été ajoutés 6 écart-types. L'échantillon urinaire analysé est considéré comme négatif vis à vis de tout apport exogène de testostérone si le rapport GT/GEPIT est inférieur à 6, tous les autres paramètres cités précédemment étant «normaux», par ailleurs.

Cependant, suite à diverses controverses apparues dans le monde sportif, l'interprétation des résultats concernant le rapport GT/GEPIT a été mise en cause par certains athlètes et médecins connectés avec le mouvement sportif qui arguent du manque de consensus scientifique et publications sur l'épitéstostérone urinaire. Ainsi, récemment

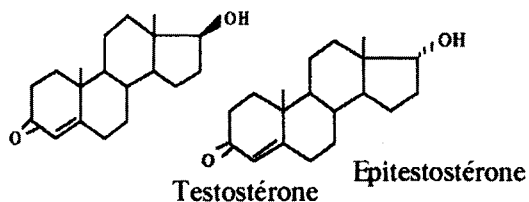


Figure 1 : Formule de l'épitéstostérone.

Tableau 1 : Mesures de l'excrétion des glucuronides de testostérone et d'épitéstostérone par technique fluorimétrique d'après les résultats de Pal [25].

		Testostérone µg/24h		Epitestostérone µg/24h	
12	Garçonnetts 6 à 13 ans	:0,9	(0,3 à 2,6)	1,30	(0,4 à 3,2)
30	Hommes 20 à 30 ans	:62,6	(24,5 à 111)	45,9	(16,2 à 93,2)
30	Hommes 31 à 41 ans	:59,3	(22 à 176)	38,8	(20 à 100)
100	Femmes 18 à 61 ans	:4,7	(0,8 à 13,8)	2,90	(0,6 à 12,4)
14	Tumeurs surrénales	:	(68 à 436)		(46 à 446)
5	Tumeurs surrénales	:	(227 à 504)		(130 à 224)
2	Maladies d'Addisson	:	(20 à 35)		(8,8 à 12,5)
2	Tumeurs virilisantes (ovaires)	:	(273 à 380)		(178 à 258)
3	Tumeurs virilisantes (surrénales)	:	(188 à 412)		(150 à 326)

(1994-95), les limites de la normalité ont elles été reculées arbitrairement à la valeur de 10, sous certaines conditions, par le C.I.O.

Notre équipe a donc participé à un vaste réseau de recherche français et européen sur la rationalité du rapport GT/GEPIT avec étude de ses modifications éventuelles au cours de la puberté, de l'exercice sportif [22], en longitudinal au cours du temps ainsi qu'au cours de la prise contrôlée d'undécanoate de testostérone par voie buccale. Les résultats sont résumés ci-dessous et devraient contribuer à une meilleure rationalité dans l'établissement des limites de la normalité chez l'homme.

PROTOCOLE DE RECHERCHE EPI TESTOSTERONE : RESULTATS

1. Modifications en fonction de l'âge

Cette étude a été faite par Mathian, Ferret et al. [22] sur 78 sportifs (54 footballeurs et 34 cyclistes) âgés de 13 à 20 ans (stades de Tanner II à V).

Les dosages sanguins (Testo, DHT, Δ_4 , FSH et LH) ont été effectués par radio-immunologie, après chromatographie sur célite pour les stéroïdes. Les dosages urinaires ont été effectués après hydrolyse des urines par la β glucuronidase d'*Escherichia coli* (Pasteur), extraction organique et chromatographie gazeuse (GC/MS) selon la technique validée par le C.I.O. [7]. Les résultats (Figure 2) montrent qu'il n'y a pas de modification particulière du rapport GT/GEPIT dans les urines en fonction de l'âge ni d'instabilité des valeurs au cours de la puberté.

2. Modifications suite à l'exercice physique, effets de la fatigue [22]

Les sujets ont été étudiés sur 4 périodes différentes sur une année scolaire. La première étude a été effectuée au retour des vacances après un repos estival, avant et après un entraînement intensif de 1h30. La même chose a été faite en fin d'année scolaire. Les résultats montrent que le rapport GT/GEPIT est remarquablement stable chez tous ces sujets et que, dans les condi-

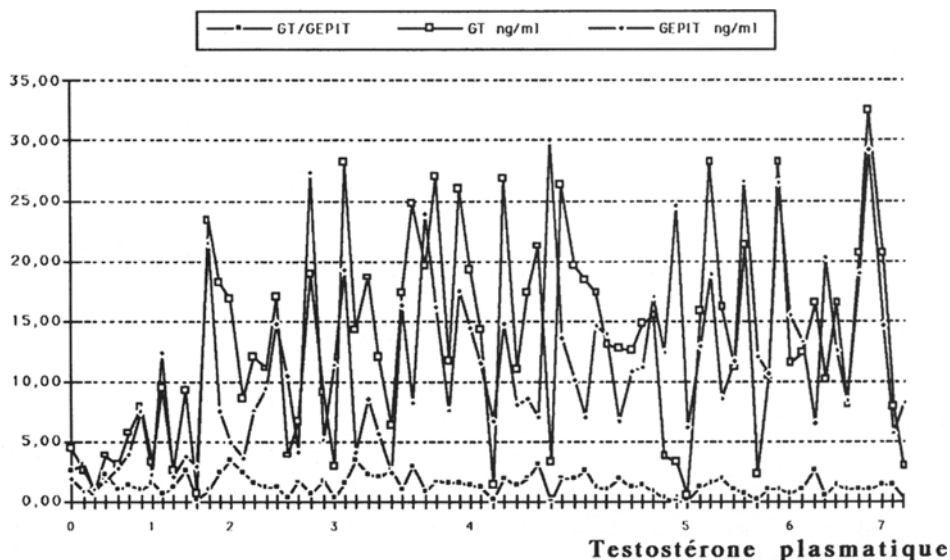


Figure 2 : Modification des glucuronides de testostérone et d'épitestostérone urinaires ainsi que du rapport GT/GEPIT chez 78 jeunes garçons en fonction des résultats de la testostérone plasmatique portée en abscisse.

tions de l'étude, ni l'entraînement ni la fatigue scolaire ne modifient GT/GEPIT (Tableau 2).

Tableau 2 : Effets de l'entraînement et de la fatigue sur GT/GEPIT.

Début d'année scolaire (retour de vacances) :
GT/GEPIT = 1,40 ± 0,86 avant entraînement GT/GEPIT = 1,53 ± 0,99 après entraînement (1h15)
Fin d'année scolaire (avant les vacances) :
GT/GEPIT = 1,23 ± 0,72 avant entraînement GT/GEPIT = 1,27 ± 0,73 après entraînement (1h15)

3. Effets de l'undécanoate de testostérone

L'undécanoate de testostérone (UT) administré par voie orale est absorbé au niveau intestinal et transite par voie lymphatique [14, 29].

Une étude longitudinale sur un an a été effectuée sur 15 sujets masculins sportifs ou sédentaires âgés de 18 à 45 ans sur trois périodes. Tous les sujets avaient été informés des modalités et du contenu du protocole et avaient signé un accord préalable. Le protocole avait reçu l'accord du comité d'éthique local (Avant Loi Huriet). **La première période** (8 à 10 jours) a permis d'étudier les sujets à l'état de base, de déterminer le rythme nyctéméral et la reproductibilité des différents paramètres endocriniens plasmatiques et urinaires. **La seconde période** (21 jours) est celle au cours de laquelle les sujets ont absorbé 40 ou 80 mg d'undécanoate de testostérone (Pantestone®) en une ou deux prises journalières. Elle a permis de suivre les effets périphériques d'une prise contrôlée d'UT. **La troisième période** (9 mois à 1 an) est celle suivant l'arrêt du traitement. Elle a permis de suivre les modifications consécutives à la déprivation d'androgène substitu-

tif et le retour à la normale des paramètres hormonaux.

Les paramètres sanguins (T, Δ_4 , DHT, DHA, SDHA, E2, TeBG, FSH, LH) ainsi que les paramètres urinaires (GT, DHT, GEPIT, ADIOL, BDIOL) ont tous été dosés par techniques RIA spécifiques [18, 24, 33]. Par contre, GT et GEPIT ont aussi été dosés en GC/MS, par le LNDD, afin de faire une étude comparative des résultats obtenus par les 2 techniques. L'étude comparative a montré une cohérence à 100% entre les résultats de GT/GEPIT par les 2 techniques. La créatininurie a été mesurée sur chaque miction ainsi que pour chaque recueil de 24h, par spectrophotométrie (Beckman), montrant une bonne reproductibilité de ce paramètre, aussi bien par 24h que par miction, pour un sujet donné, confirmant les études déjà publiées [13, 16].

Les valeurs de base des différents stéroïdes mesurés étaient toutes en accord avec celles de la littérature internationale et tous nos sujets présentaient un rythme nyctéméral normal pour les paramètres stéroïdiens [20]. Les valeurs basales sont résumées dans les tableaux 3 et 4. Quelle que soit la technique de dosage utilisée, RIA ou GC/MS, le rapport GT/GEPIT est très stable dans le temps pour un sujet donné. La moyenne des rapports GT/GEPIT est tout à fait comparable à celle publiée dans la littérature internationale [7, 10, 11] avec, pour nos 15 sujets, GT/GEPIT = 1,14 ± 0,17.

Les modifications observées au cours de la prise de UT témoignent toutes de son faible passage sanguin ainsi que de son métabolisme très rapide et confirment les études publiées dans la littérature [14, 29]. Aucune rétro-inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire n'est observée aux doses utilisées. Le rythme nyctéméral de la testostérone, par contre, est très perturbé. La DHT plasmatique est significativement augmentée, chez la plupart des sujets, mais cette

Tableau 3 : Paramètres plasmatiques à l'état de base (15 hommes normaux).

Testostérone	592 ± 142	ng/100 ml	20,50 ± 4,90	nmol/l
Δ4 androstènedione	109 ± 35	ng/100 ml	3,80 ± 1,20	nmol/l
DHT	30 ± 16	ng/100 ml	1,10 ± 0,60	nmol/l
DHA	340 ± 43	ng/100 ml	11,80 ± 1,5	nmol/l
S-DHA	165 ± 58	µg/100ml	4226 ± 717	nmol/l
Oestradiol	24,0 ± 10,8	pg/ml	0,09 ± 0,04	nmol/l
17OH progestérone	1,5 ± 0,5	ng/ml	0,31 ± 0,15	nmol/l
FSH			2,8 ± 1,3	mUI/ml
LH			2,5 ± 0,9	mUI/ml
TeBG			29,9 ± 15,2	nmol/l

Tableau 4 : Résultats hormonaux urinaires à l'état de base (15 hommes normaux).

	µg/24h	nmol/24h
Testostérone	57 ± 22	198 ± 76
5α androstane 3α,17β diol	123 ± 56	422 ± 192
5α androstane 3β,17β diol	11 ± 6	38 ± 19
Dihydrotestostérone	14 ± 9	48 ± 30
Épitéstostérone	48 ± 16	165 ± 57
Créatininurie (Fonction de âge, taille, poids)	1,5 à 2,5 g / 24h	

augmentation n'est pas constante dans la journée. Son utilisation en tant qu'index de prise d'androgène est donc difficile (Figures 3 et 4). Les excrétions urinaires des autres métabolites des androgènes sont, par contre, importantes pendant les 3 à 6 premières heures témoignant d'un métabolisme actif de la testostérone administrée. Quel que soit le mode d'expression des résultats (excrétion urinaire sur les 24h, concentration / ml ou, mieux encore, concentration rapportée à la créatininurie dans le même recueil) l'ADIOL, le BDIOL, la DHT et la testostérone urinaires sont augmentés de façon significative sous UT pour reprendre rapidement leurs valeurs initiales. Pour notre population la testostéronurie basale est à 51,7 ± 23,6 ng/ml (29,1 ± 10,5 ng/mg créatinine). Elle passe à 2061 ± 1641 ng/ml (1485 ± 957 ng/mg de créatinine) sous 40 mg d'UT par jour avec une valeur minimale à 388 ng/mg de créatinine. Sous 80 mg d'UT par jour la valeur est

encore plus élevée soit 2908 ± 1629 ng/ml (1655 ± 851 ng/mg de créatinine) avec une valeur minimale à 450 ng/mg de créatinine. Très rapidement, à l'arrêt de UT, les paramètres reprennent leurs valeurs initiales (Figure 5). L'épitéstostérone urinaire, par contre, ne varie pas de façon significative. La valeur de base de notre population est à 24,5 ± 10,4 ng/ml (18 ± 5,8 ng/mg de créatinine). Sous 80 mg/jour d'UT, l'épitéstostérone urinaire passe à 26,1 ± 20,2 ng/ml (18,2 ± 11,9 ng/mg de créatinine) et, à l'arrêt d'UT l'épitéstostérone est toujours à 24,6 ± 10,1 ng/ml (18,1 ± 5,7 ng/mg de créatinine) c'est à dire non significativement modifiée (p < 0,05) (Figure 6). Les résultats sont semblables que le sujet soit un sportif de haut niveau ou un sujet sédentaire.

Le rapport GT/GEPIT est très stable pour un individu donné. Les modifications différentielles d'excrétion des glucuronides de testostérone et d'épitéstostérone ont pour conséquence une grande variation du rap-

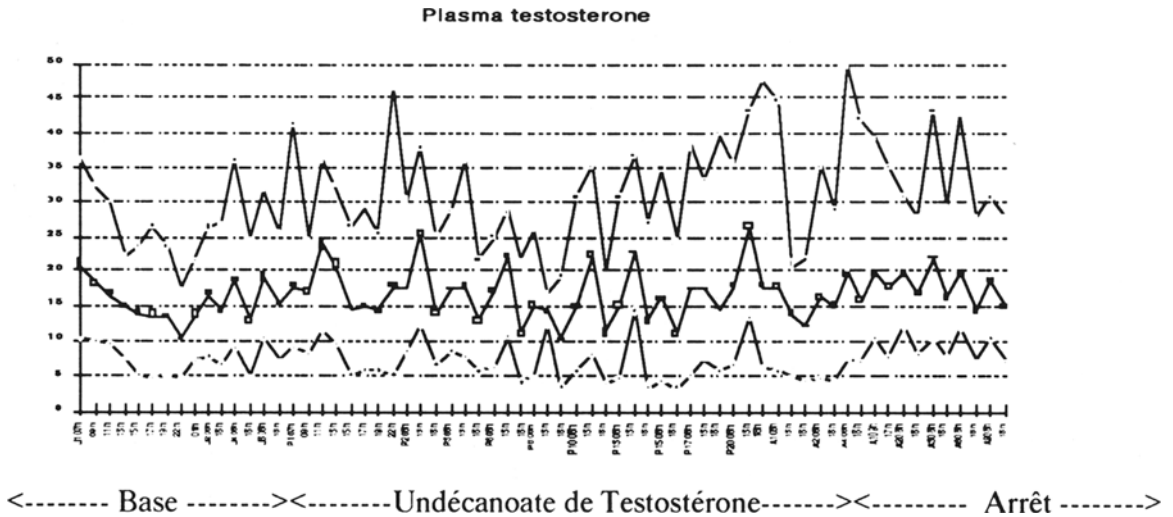


Figure 3 : Evolution de la Testostérone plasmatique sous UT (40 mg/j).

Normale homme	(Moyenne ± SD)	: 20,5 ± 4,9 nM	(592 ± 142 ng/100 ml)
Protocole Base	(Moyenne ± SD)	: 15,3 ± 6,3 nM	(444 ± 182 ng/100 ml)
Protocole Traitement	(Moyenne ± SD)	: 16,5 ± 8,7 nM	(475 ± 251 ng/100 ml)
Protocole Arrêt	(Moyenne ± SD)	: 16,9 ± 8,1 nM	(486 ± 231 ng/100 ml)

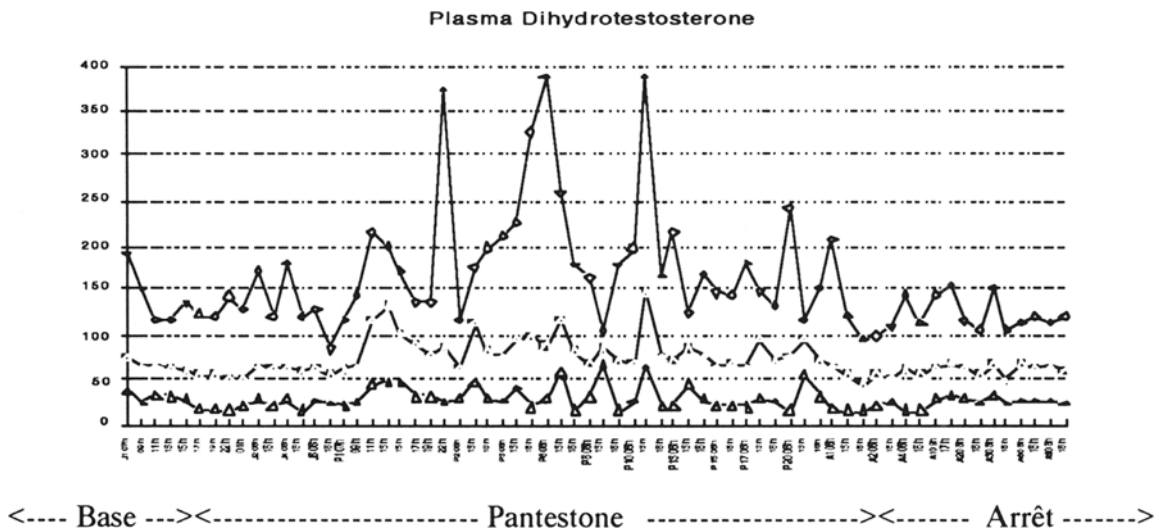


Figure 4 : Evolution de la Dihydrotestostérone plasmatique sous UT (40 mg/j). Normale homme (Moyenne ± Sd) : 1,1 ± 0,42 nM (35 ± 12 ng/100 ml).

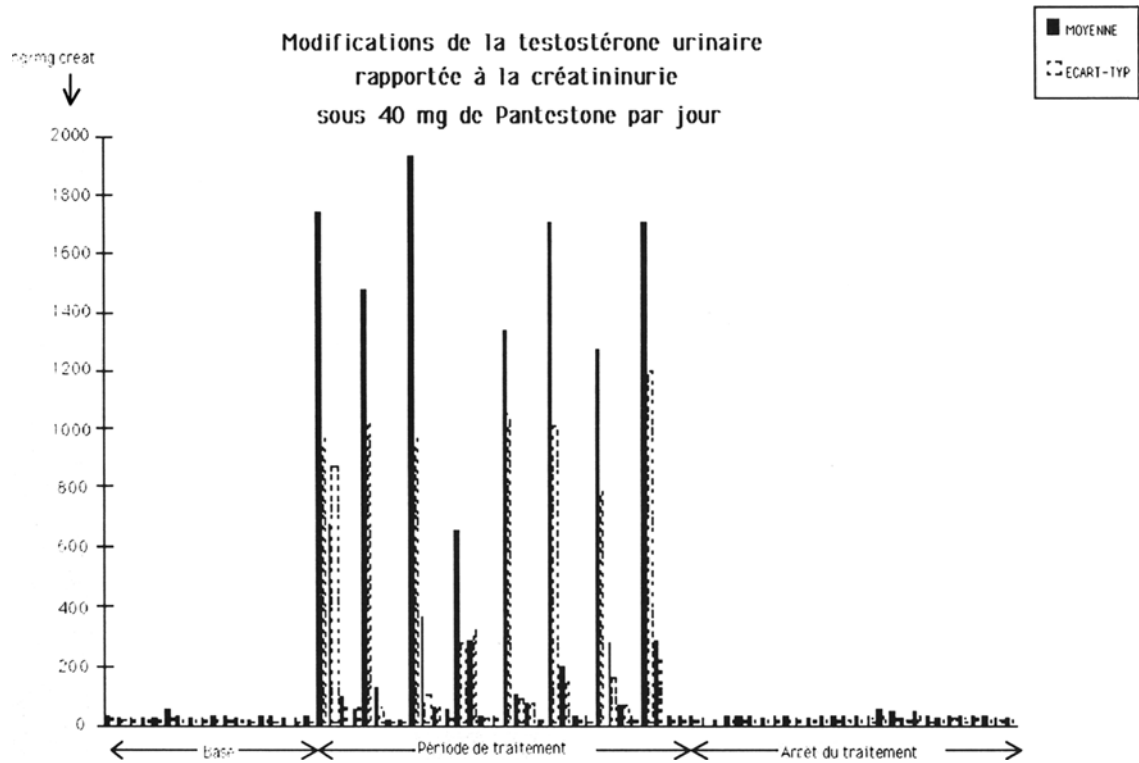


Figure 5 : Evolution du glucuronide de testostérone urinaire sous U.T.

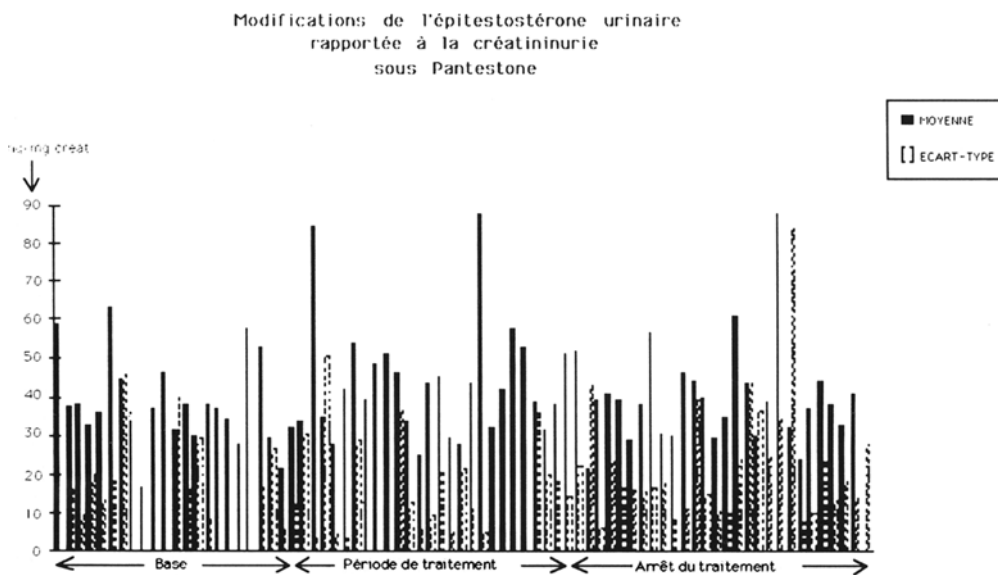


Figure 6 : Evolution du glucuronide d'épitéstostérone urinaire sous U.T.

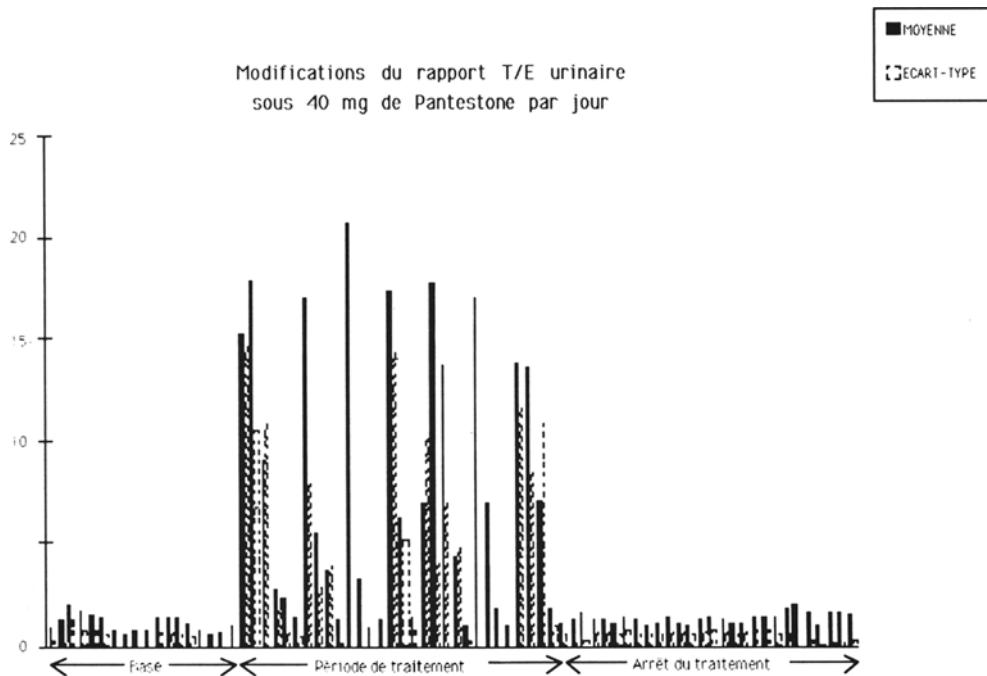


Figure 7 : Evolution du rapport GT/GEPIT dans les urines.

port GT/GEPIT au cours de la prise contrôlée d'UT. La valeur de base du rapport GT/GEPIT est de $1,14 \pm 0,17$ (moyenne \pm SD). Sous UT, que ce soit à la dose journalière de 40 ou 80 mg, on observe, au cours des quatre premières heures suivant la prise, une augmentation très importante de GT/GEPIT qui passe à $23,7 \pm 6,2$. Entre la quatrième et la dixième heure GT/GEPIT diminue à la valeur de $9,8 \pm 6,9$. Entre la dixième et la quatorzième heure GT/GEPIT diminue encore pour atteindre une valeur considérée comme en dessous de la limite fixée pour un «dopage» soit $2,3 \pm 1,6$. Après la quatorzième heure et, dans tous les cas, GT/GEPIT reprend sa valeur initiale soit, $1,2 \pm 0,2$.

DISCUSSION

La présentation des résultats par rapport à l'excrétion correspondante de créatinine est celle employée en biologie clinique [3]. La

créatininurie des 24h est un paramètre de référence qui est fonction de la taille, de l'âge et du poids de l'individu. Elle est relativement stable au cours du temps [13, 16]. Elle peut même être calculée mathématiquement chez un sujet donné à 10-20% d'erreur près [16], ce qui est peu, par rapport aux énormes variations des volumes urinaires qui peuvent être observées chez un sujet. Cette présentation des résultats lors des contrôles de dépistage du dopage devrait permettre de mieux apprécier les résultats hormonaux quantitativement et donnerait une sécurité supplémentaire au regard des dilutions malintentionnées des urines.

La stabilité du rapport GT/GEPIT, permet de le considérer comme une constante biologique individuelle [22]. Au cours de notre étude, pendant la prise d'UT à la dose de 40 ou 80 mg/jour, les augmentations du rapport GT/GEPIT sont une constance. Les variations maximales enregistrées pour un

même sujet ont été $GT/GEPIT = 0,41$, avant prise d'UT, et, $GT/GEPIT = 49,5$, après UT. Cependant, si l'on s'en tient aux seules recommandations du Comité Médical du C.I.O., c'est à dire à une valeur de $GT/GEPIT$ inférieure à 6 et un $GEPIT < 200$ ng/ml (contrôle antidopage négatif), on note 50% de «faux négatifs» à l'analyse des résultats expérimentaux. Ce fort taux de «faux négatifs» est indépendant de la technique utilisée (GC/MS ou RIA).

Peut-on améliorer l'analyse des résultats tout en évitant les décisions arbitraires ?

Les travaux de de Lignières et al. ont en effet montré l'importance de l'exercice physique sur les régulations de la fonction testiculaire [9]. Ceux de Lagoguey et al., sur le rythme nyctéméral de GT et GEPIT, [20], ont montré des variations d'élimination de ces stéroïdes pouvant atteindre 50% au cours de l'année. Les valeurs de GT sont bien documentées dans la littérature internationale [7, 10, 11, 19, 23, 25, 33] et bien connues des endocrinologues contrairement à celles de GEPIT. La moyenne (± 2 écarts-types) pour GT se situe, chez l'homme, à $109,4 \pm 43,1 \mu\text{g}/24\text{h}$ soit 380 ± 149 nmol/24h. Ces valeurs, rapportées à la créatinurie correspondante deviennent 30 ± 16 ng/mg créatinine. La prise en compte

des valeurs de $GT/GEPIT$ mais aussi de GT dans l'analyse de nos résultats permet de rapprocher celle-ci de la «vérité expérimentale» (Tableau 5).

La méconnaissance des voies de biosynthèse de l'épitéstostérone pose aussi problème car l'éventualité d'une «maladie génétique» liée à celle-ci ne peut être écartée. L'hypothèse de Weusten et al. [30] qui suggère une production de l'épitéstostérone par voie non enzymatique mais par simple réarrangement moléculaire statistique doit être étayée ou supplantée. Une certitude cependant : il est hors de question de mettre en cause, un déficit en 17α -hydroxylase chez les sujets porteurs de taux très bas d'épitéstostérone (ce qui est bien souvent le cas chez les sujets à fort rapport $GT/GEPIT$) en l'absence de toute perturbation du métabolisme des glucocorticoïdes...!

Des modifications de la conjugaison de l'épitéstostérone ont parfois été évoquées pour expliquer une augmentation du rapport $GT/GEPIT$ [8]. Nous nous permettons simplement de rappeler que la conjugaison des hormones stéroïdes est un phénomène de solubilisation et détoxification qui dépend essentiellement de leur structure sur le carbone 3 et non pas de la structure des substituants en C17. On voit donc mal com-

Tableau 5 : Analyse critique des résultats urinaires expérimentaux de GT et GEPIT rapportés à la créatininurie.

GT/Créat limité à 200 ng/mg de créatinine et, $GT/GEPIT$ inférieur ou égal à 3 :	on observe et	46% de «faux négatifs» 0% de «faux positifs»
GT/Créat limité à 150 ng/mg de créatinine et, $GT/GEPIT$ inférieur ou égal à 3 :	on observe et	38% de «faux négatifs» 0% de «faux positifs»
GT/Créat limité à 100 ng/mg de créatinine et, $GT/GEPIT$ inférieur ou égal à 3 :	on observe et	33% de «faux négatifs» 0% de «faux positifs»
GT/Créat limité à 75 ng/mg de créatinine et, $GT/GEPIT$ inférieur ou égal à 3 :	on observe et	20% de «faux négatifs» 0% de «faux positifs»
GT/Créat limité à 50 ng/mg de créatinine et, $GT/GEPIT$ inférieur ou égal à 3 :	on observe et	10% de «faux négatifs» 3,5% de «faux positifs»

ment la testostérone serait correctement glucuroconjuguée alors que l'épitéstostérone ne le serait pas [2, 12, 15].

CONCLUSION

La détection de la prise illégale d'une substance par ailleurs naturelle rend très difficile la détection d'un tel dopage. En ce qui concerne les androgènes, la recherche des métabolites urinaires des androgènes dans la fraction glucuronide est faite dans les règles de l'art (chimie analytique) par le LNDD, mais l'utilisation de la testostérone par voie orale peut fausser totalement les critères à partir desquels sont établies les normes des contrôles à visées de détection de l'utilisation illégale des androgènes.

La mesure du rapport GT/GEPIT permet d'ajouter effectivement un critère indirect fiable dans la détection de la prise d'androgènes naturels. Cependant, les limites de la normalité doivent être définies de façon incontestable. Nous recommandons donc de nouveaux critères pour la détection de prise de testostérone de synthèse à savoir, par exemple, GT/GEPIT urinaire inférieur ou égal à 3 *ainsi que* GT/Créat < 75 ng/mg de créatinine et GEPIT/Créat < 75 ng/mg de créatinine. La décision finale, par contre, doit toujours tenir compte d'un avis médical. Les sujets peuvent, en effet, être porteurs de tumeurs androgéno-sécrétantes récentes et/ou de certaines autres affections endocriniennes, qui pourraient elles aussi conduire à des modifications de ces métabolites. A l'heure actuelle, c'est effectivement un Comité d'Expert qui prend la décision, au cas par cas, pour tous les rapports GT/GEPIT entre 6 et 10.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACEVEDO H.F., CORRAL GALLARDO J. : Epitestosterone : an *in-vitro* metabolite of Δ 4-androstenedione in a sclerotic ovary. J. Clin. Endoc., 1965, 25 :1675-1676.
2. BEAULIEU E.E., CORPECHOT C., DRAY F., EMILIOZZO R., LEBEAU M.C., MAUVAIS-JARVIS P. and ROBEL P. : An adrenal-secreted «androgen»: Dehydroepiandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man. Recent Prog. Hormone Res., 1984, 40 : 411-501.
3. BINGHAM S.A. and CUMMINGS J.H. : The Use of Creatinine output as a check on the completeness of 24 hour urine collections. Human. Nutr. Clin. Nutr., 1985, 39 : 343-353.
4. BLAQUIER J., DORFMAN R.I. and FORCHIELLI E. : Formation of epitestosterone by human blood and adrenal tissue. Acta Endocrinol., 1967, 54 : 208-214.
5. BONNE C., RAYNAUD J.P. : Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. Steroids, 1975, 26 : 227-232.
6. BROOKS R.V. and GIULIANI G. : Epitestosterone : Isolation from Human urine and experiments on possible precursors. Steroids, 1964, 1 : 101-116.
7. CATLIN H. and HATTON C.K. : Use and Abuse of anabolic and other drugs for athletic enhancement. Adv. Int. Med., 1991, 36 : 399-424.
8. DEHENNIN L. : Secretion by the human testis of epitestosterone with its sulfoconjugate and precursor androgen Δ 5 androstene -3 β ,17 α -diol. J. Steroid Bioch. Molec. Biol., 1993, 44 : 171-177.
9. De LIGNIERES B., PLAS J.-N., COMMANDRE F., MORVILLE R., VIANI J.-L., PLAS F. : Sécrétion testiculaire d'androgènes après effort physique prolongé chez l'homme. Nelle Presse Méd., 1976, 5 : 2060-2063.
10. DONIKE M., GEYER H., KRAFT M. and RAUTH S. : Long term influence of anabolic steroids on the steroid profile. Int. J. Sports Med., 1988, 9 : 401.
11. DONIKE M., GEYER H., GOTZMANN A., MAREK-ENGELKE U., RAUTH S. : Dope analysis. 10th Cologne Workshop on Dope Analysis 7th to 12th June 1992. Proceedings Sport und Buch Strauß Edition Sport- Köln 1993.
12. DRAY F. et LEDRU M. J. : Métabolisme de l'épitéstostérone. Absence d'interconversion périphérique de l'épitéstostérone et de la testostérone et existence d'une production de sulfate d'épitéstostérone chez l'homme adulte normal. C.R. Acad. Sc. Paris, 1966, 262 :679-681.
13. HEYMSFIELD S.B., ARTEAGA C., Mc MANUS C., SMITH J. and MOFFITT S. : Measurement of muscle mass in humans : Validity of the 24 hour urinary creatinine method. Am. J. Clin. Nutr., 1983, 37 : 478-494.

14. HORST H.J., HOLTJE M., DENNIS M., COERT A., GEELEN J. and VOIGT K. : Lymphatic absorption and metabolism of orally administered testosterone undecanoate in man. *Klin. Wochenschr.*, 1976, 54 : 875-879.
15. JAFFE R.B., PAYNE A.H. : Gonadal steroid sulfates and sulfatases. IV. Comparative studies on steroid sulfokinase in the human fetal testis and adrenal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, 33 : 592-596.
16. KAWASAKI T., UEZONO K., ITOH K. and UENO M. : Prediction of 24 hour urinary creatinine excretion from age, body weight and height of an individual and its application. *Nippon. Koshu. Eisei. Zasshi*, 1991, 38 : 567-574.
17. KOCHAKIAN C.D. and STEDWORTHY G. : Metabolism of Δ^4 -Androstene-3,17-dione by tissue homogenates. *J. Biol. Chem.*, 1954, 210 : 933-935.
18. KORENMAN S.G., WILSON H. and LIPSETT M.B. : Isolation of 17α Hydroxyandrost- Δ^4 -en, 3-one (Epitestosterone) from Human Urine. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239 : 1004-1006.
19. KUTTENN F. : L'hirsutisme. Monographie, Flammarion, 1990
20. LAGOGUEY M., DRAY F., CHAUFFOURNIER J.M. et REINBERG A. : Etude des rythmes circadiens et circannuels des glucuronides de testostérone et d'épitéstostérone chez l'homme adulte sain. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1972, 274 : 3435-3437.
21. MAHOUDEAU J.A., DROSDOWSKY M.A. et JAYLE M.F. : Dosage de la testostérone et de l'épitéstostérone urinaires dans l'hypogonadisme mâle et dans l'hirsutisme. *Ann. Endocrinol.*, 1970, 31 : 585-597.
22. MATHIAN B., FERRET J.M., PATRICOT M.C., D'ALEO PH. and REVOL A : Influence de l'entraînement de l'adolescent footballeur sur la valeur du rapport Testostérone / Epitéstostérone dans l'urine au moment du contrôle antidopage. *Sport Med.*, 1992, 43 : 18-21.
23. MAUVAIS-JARVIS P., CHARRANSOL G. and BOBAS-MASSON F. : Simultaneous determination of urinary androstanediol and testosterone as an evaluation of human androgenicity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, 36 : 452-459.
24. MAUVAIS-JARVIS P. : *Medecine de la reproduction masculine*. Edité par SCHAISON G., BOUCHARD P., MAHOUDEAU J., LABRIE F. Flammarion, Medecine-Sciences, Presses de l'Université de Montréal. 1984.
25. PAL S.B. : Urinary excretion of testosterone and epitestosterone in men, women and children, in health and disease. *Clin. Chim. Acta*, 1971, 33 : 215-227.
26. RAYNAUD J.P., AZADIAN-BOULANGER G., BONNE C., PERRONNET J. and SAKIZ E. : Present trends in antiandrogen research. *Androgens and Antiandrogens*, pp 281-293, edited by Martini M. and Motta M.; Raven Press, New York, 1977.
27. SZAMATOWICZ M., DROSDOWSKY, M.A. and JAYLE M.F. : The role of testosterone and androstenedione as precursors of epitestosterone in guinea pigs (*in vivo* and *in vitro* studies). *Acta Endocrinol.* 1971, 67 : 187-196.
28. TAMM J., VOLKWEIN U. and STARCEVIC Z. : The urinary excretion of epitestosterone, testosterone and androstenedione following intravenous infusions of high doses of these steroids in human subjects. *Steroids*, 1966, 8 : 659-669.
29. VERMEULEN A. : From methyltestosterone to testosterone undecanoate. *Science Serv. Int.*, 1989, 55-58.
30. WEUSTEN, J.J.A.M., LEGEMAAT G., VAN DER WOUW M.P.M.E., SMALS A.G.H., KLOPENBORG P.W.C. and BENRAAD T.J. : The mechanism of the synthesis of 16-androstenes in human testicular homogenates. *J Steroid Biochem.*, 1989, 32 : 689-694.
31. WILSON H. and LIPSETT M.B. : Metabolism of Epitestosterone in Man. *J. Clin. Endocr.*, 1966, 26 : 902-914.
32. WILSON J.D. : Androgen Abuse by Athletes. *Endocrin. Reviews*, 1988, 9 : 181-199.
- 33L WRIGHT F., MOWSZOWICZ F. and MAUVAIS-JARVIS P. : Urinary 5 α androstane -3 α ,17 β - diol radioimmunoassay : A new clinical evaluation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1978, 47 : 850-854.

ABSTRACT

Drug abuse for synthetic anabolic androgenic steroids

**F. WRIGHT, E. GODEFROY, M. BONGINI,
F. BOZZOLAN, A. DOUKANI**

Drug abuse for synthetic anabolic androgenic steroids in order to ameliorate sports results is illegal since the law of june 89 in France. No exception whatsoever, therapeutical purpose(s) included, is accepted. Means for controlling such abuse are reviewed briefly here together with data from our research on epitestosterone modifications following physical exercise and testosterone undecanoate controled administration in 15 nor-

In France the national body responsible for doping analysis in sports is the «Laboratoire National de Dépistage du Dopage» (LNDD).

In fact, the control of drug abuse in sports requires laboratory means enabling the detection of banned substances with unlimited certainty. Briefly, untimed urine samples are analyzed for such purpose by gas (liquid or high pressure) chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) which is the only technique accepted by the medical commission of I.O. C. and relevant bodies worldwide.

However, since testosterone itself can now be used as a mean of steroid abuse in man, detection has to solve new problems arising from such manipulation. After considering various approaches in order to prove the offense, such as the isotopic ratio for testosterone and different urinary metabolites, an indirect technique, based on the ratio of testosterone to epitestosterone glucuronides, has proved valuable but is now questioned.

Epitestosterone is the 17α epimere of testosterone. It is not readily known to clinicians as it has no androgenic potency [5] and does not bind to the specific plasma protein TeBG (26) or androgen receptor [5, 26]. Epitestosterone was first isolated from human urines, simultaneously, by Brooks [6] and Korenman [18]. Wilson and Lipsett [30] among others demonstrated, in man, that this steroid originated both from adrenals and testis, results confirmed recently by Dehennin [8]. Dray et al. and studied its production and circadian rhythm in man pointing out that epitestosterone is found in the sulphate fraction of plasma steroids and in the glucuronide fraction of urinary androgen metabolites [12, 20].

Epitestosterone is recovered as such in urines. It is not metabolized [12, 28]. However the pathway for epitestosterone biosynthesis is still uncertain today. The best (for it's the only one !) hypothesis at present being that of Weustein et al. [30] who reported that epitestosterone could be synthesized in man from $\Delta 5$ androstène- $3\beta,17\alpha$ - diol through a possible non enzymic modification of $\Delta 5$ androstène- $3\beta,17\beta$ - diol.

Donike et al. [10] showed, in man, that the mean GT/GEPIT ratio in urines was $1,5 \pm 0,9$ (\pm SD) using epitestosterone as a marker for endogenous androgens. This added index has being implemented, as an official test for androgen abuse's detection in sports, since the Los Angeles Olympic Games in 1982. All other parameters being normal the definition of a positive androgen doped case is based on GT/GEPIT values over 6. This value of 6 was obtained by adding 6 SD to the mean obtained in man. However, is the use of this parameter justified and 100% safe ?

Some have questioned its use arguing that epitestosterone, not a well known substance, can not be reliable and could lead to false positive results. We summarize here the results of the French Research Network to which we participated.

Mathian et al. [22] showed that epitestosterone production follows testosterone production whatever the age of the subject. The ratio GT/GEPIT doesn't vary according to age, even over puberty, it remains at $1,40 \pm 0,86$ from Tanner Stage II to Tanner Stage V. It doesn't vary significantly after exercise or with fatigue.

We also report our study of 15 young men (18-45 year old) over a year.

Extensive blood (T, Δ_4 , DHT, DHA, SDHA, E2, TeBG, FSH, LH) and urinary parameters (GT, DHT, GEPIT, ADIOL, BDIOL) were measured before, during and after a 21 days course of testosterone undecanoate (TU). Whatever the technique used (GC/MS or RIA) results are identical. We confirmed that GT/GEPIT was very stable for each individual and could be considered as a personal marker. After TU, at the dosage of 40 to 80 mg/day, GT/GEPIT increased significantly in all instances (athletes and sedentary subjects alike), but not permanently. This change resulted from an increase in testosterone excretion whereas epitestosterone remained non statistically changed. However at the dosage used no permanent modification was found and most of the time GT/GEPIT returned to basal values rapidly.

The analysis of the results of our study, according to the limit set by the I.O.C. at 6 for GT/GEPIT, pointed out a lot of false negative (over 50%). Values for GT excretion rate corrected with the creatinine content in the same urinary sample (GT/mg creatinine) have therefore been considered together with GT/GEPIT values. In our opinion, a more suitable and reliable index is thus obtained. The setting of a new limit at 3 for GT/GEPIT (Mean \pm 3 SD) together with values under 75 ng/mg creatinine for GT is analyzed. It is also stressed that only a medical commission (aware of the significance of epitestosterone) can interpret the results obtained by analytical chemistry. This is the case in France.

Key words : drug abuse, testosterone/epitestosterone ratio, testosterone/mg creatinine.