



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 07-2013 – amendé

Objet: Présence d'origine endogène de substances anabolisantes et/ou interdites chez les animaux producteurs de denrées alimentaires (Dossier SciCom 2012/07)

Avis approuvé par le Comité scientifique le 22 février 2013 et **amendé le 21 novembre 2014.**

Résumé

Les questions suivantes ont été posées au Comité scientifique sur la présence d'origine endogène de substances anabolisantes et/ou interdites chez les animaux producteurs de denrées alimentaires:

- Question 1 : Parmi les substances recherchées par l'AFSCA, quelles sont celles dont la présence dans une matrice d'origine animale est susceptible d'avoir une origine endogène (métabolisme, alimentation animale, ...)?
- Question 2 : Dans quelles matrices¹ et pour quelles espèces² (catégories) animales, la présence d'origine endogène des substances peut-elle être constatée?
 - o Peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier une présence d'origine endogène et un traitement illégal pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?
- Question 3 : La présence de prednisolone et de thiouracil dans d'autres matrices que l'urine peut-elle également avoir une origine endogène?
 - o Si oui, peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier l'origine (endogène versus traitement illégal) pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

Question 1

Pour répondre à la première question, le Comité scientifique a classé les substances listées dans la demande d'avis en trois groupes:

- groupe 1: substances avec une origine endogène connue ou suspectée à un certain niveau via le métabolisme et/ou l'alimentation;
- groupe 2: substances dont la présence dans une matrice d'origine animale peut être liée à une contamination accidentelle ou environnementale;
- groupe 3: substances pour lesquelles il n'y a pas de raison de suspecter une origine endogène.

Les substances dont la présence dans une matrice d'origine animale est connue ou suspectée d'avoir une origine endogène et que l'on peut classer dans le groupe 1 sont: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone, 17 α -boldenone, progesterone, 17 β -testosterone, 17 α -testosterone, 17 β -œstradiol, 17 α -œstradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone et thiouracil.

¹ Pour les matrices suivantes : urine, fèces, graisse, muscle, foie et poils

² Pour les espèces suivantes : bovins, porcs, ovins, caprins, équins, cervidés, volailles, poissons

Question 2

Pour répondre à la deuxième question, les substances du groupe 1 ont été étudiées plus en détail pour des combinaisons substances/espèces animales/matrices. Les substances du groupe 2 et du groupe 3 n'ont pas été étudiées en détail.

Il ressort d'une étude de la littérature étendue que pour les substances suivantes une origine endogène peut être observée:

- dans l'urine de bovins: 17β -nortestosterone, 17α -nortestosterone, 17β -boldenone et 17α -boldenone
- dans le sang chez les bovins, porcs, volailles, ovins, caprins, chevaux, cervidés et poissons: progesterone, testosterone, œstradiol, cortisol et cortisone
- dans l'urine de plusieurs espèces animales: zeranol et taleranol
- dans l'urine de bovins, porcs et chevaux: prednisolone
- dans l'urine de bovins, porcs et ovins: thiouracil.

Plusieurs approches sont en développement pour distinguer une origine endogène d'une administration exogène pour certaines substances anabolisantes et/ou interdites. Des techniques telles que la détection de biomarqueurs et la détermination de rapport isotopique présentent un intérêt croissant.

Les approches rapportées dans la littérature pour différencier une présence endogène d'un traitement illégal sont présentées pour la nortestosterone (nandrolone), la boldenone, les hormones naturelles (testosterone, œstradiol, progesterone, hydrocortisone), le zeranol et taleranol, la prednisolone et le thiouracil. Les recherches sur l'origine endogène de la prednisolone sont peu avancées et les connaissances actuelles ne permettent pas de différencier avec certitude une origine endogène d'un traitement illégal.

~~Les résultats préliminaires d'études expérimentales ont permis de donner des pistes pour différencier, chez le porc, la présence de prednisolone d'origine endogène d'un traitement illégal.~~

Les résultats d'études expérimentales récentes (CER Groupe, 2014) sur les résidus de prednisolone dans l'urine de porcs ont permis de faire la différence entre la prednisolone d'origine endogène (échantillons d'urine conforme) et les échantillons suspects pour une administration illégale de prednisolone.

Question 3

La présence de prednisolone et de thiouracil d'origine endogène dans d'autres matrices que l'urine a été investiguée pour répondre à la question 3. Il ressort d'études expérimentales préliminaires que le foie pourrait être une matrice intéressante pour démontrer un traitement illégal de prednisolone.

Le thiouracil est présent de manière endogène dans la glande thyroïde. Pour l'instant, le Comité scientifique ne dispose pas d'éléments suffisants pour pouvoir différencier une présence d'origine endogène d'un traitement illégal pour le thiouracil dans une matrice autre que l'urine.

En résumé, le Comité scientifique recommande d'accorder la prudence nécessaire lors de l'interprétation des résultats de la présence de substances anabolisantes et/ou interdites avec une origine endogène possible dans les matrices du bétail tant que des valeurs seuils ne sont pas clairement établies.

Le Comité scientifique encourage davantage de recherche comme le développement de méthodes analytiques (ex. GC-C-IRMS), de biomarqueurs, de ratios entre substances pour distinguer une origine endogène d'une administration exogène.

Summary

Advice 07-2013 of the Scientific Committee of the FASFC on the presence of endogenous anabolics and or prohibited substances in food producing animals

The following questions were asked to the Scientific Committee on the presence of endogenous anabolic and/or prohibited substances in food-producing animals:

- Question 1: Among the substances being examined by the FASFC, which are those whose presence in a matrix of animal origin is suspected to have an endogenous origin (metabolism, feed, ...)?
- Question 2: In which matrices and in which animal species (categories), the presence of substances of endogenous origin can be observed?
 - o Can a residue concentration be determined differentiating an endogenous origin from an illegal treatment for combinations substance/matrix/species?
- Question 3: Can the presence of prednisolone and thiouracil in matrices other than urine also have an endogenous origin?
 - o If this is the case, can a residue concentration be determined which can differentiate the origin (endogenous versus illegal treatment) for combinations of substance/matrix/species?

Question 1

To answer question 1, the Scientific Committee has subdivided the substances listed in the request into three groups:

- group 1: substances with known or suspected endogenous origin at a certain level via metabolism and/or food;
- group 2: substances whose presence in a matrix of animal origin may be related to environmental or accidental contamination;
- group 3: substances for which there is no reason to suspect an endogenous origin.

Substances whose presence in an animal matrix is known or suspected to have an endogenous origin and which can be classified in group 1 are: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone, 17 α -boldenone, progesterone, 17 β -testosterone, 17 α -testosterone, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone and thiouracil.

Question 2

To answer question 2, substances in group 1 were studied more in detail for combinations substances/species/matrices. Substances of group 2 and group 3 were not studied in detail.

An extended literature study has shown that for the following substances an endogenous origin can be observed:

- in bovine urine: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone and 17 α -boldenone
- in blood of bovine, pigs, poultry, sheep, goats, horses, deer and fish: progesterone, testosterone, estradiol, cortisol and cortisone
- in bovine, porcine and equine urine: prednisolone
- in bovine, porcine and sheep urine: thiouracil.

Several approaches are under development to distinguish endogenous origin and exogenous administration for certain anabolic and/or prohibited substances. The importance of a number of techniques such as the detection of biomarkers and the determination of the isotopic ratio is growing.

Approaches reported in the literature to differentiate endogenous presence from illegal treatment are presented for nortestosterone (nandrolone), boldenone, natural hormones (testosterone, estradiol, progesterone, hydrocortisone), zeranol and taleranol, prednisolone and thiouracil. Few progress is made in the study of the endogenous origin of prednisone and

the actual knowledge does not allow to differentiate with certitude an endogenous origin versus an illegal treatment origin.

~~Preliminary results of experimental studies enable to provide clues for the differentiation between prednisolone from endogenous origin or as consequence of an illegal treatment in pigs.~~

Results of recent experimental studies on prednisolone residues in pig urine (CER Groupe, 2014) enable to differentiate between prednisolone from endogenous origin (conform urine samples) and samples suspected of illegal treatment with prednisolone.

Question 3

The presence of prednisolone and thiouracil of endogenous origin in matrices other than urine was investigated to answer question 3. Preliminary experimental studies have shown that the liver could be an interesting matrix to show illegal treatment of prednisolone.

Thiouracil is endogenously present in the thyroid gland. Presently, the Scientific Committee does not have sufficient evidence to be able to differentiate thiouracil from endogenous origin from illegal treatment in a matrix other than urine.

In summary the Scientific Committee recommends to be careful with the interpretation of results of the presence of anabolic and/or prohibited substances with a possible endogenous origin in livestock matrices as long as threshold values are not clearly established.

The Scientific Committee encourages further research i.e. towards the development of analytical methods (eg GC-C-IRMS), biomarkers, and ratio's of substances to distinguish between endogenous origin and exogenous administration.

Mots clés

Substances anabolisantes, substances interdites, origine endogène, espèces animales, matrices.

1. Termes de référence

1.1. Question posée

Il est demandé au Comité scientifique de répondre à certaines questions concernant la présence d'origine endogène de substances anabolisantes et/ou interdites chez les animaux producteurs de denrées alimentaires.

Question 1 : Parmi les substances recherchées, quelles sont celles dont la présence dans une matrice d'origine animale est susceptible d'avoir une origine endogène (métabolisme, alimentation animale, ...)?

Question 2 : Dans quelles matrices³ et pour quelles espèces⁴ (catégories) animales, la présence d'origine endogène des substances peut-elle être constatée?

- Peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier une présence d'origine endogène et un traitement illégal pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

Question 3 : La présence de prednisolone et de thiouracil dans d'autres matrices que l'urine peut-elle également avoir une origine endogène?

- Si oui, peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier l'origine (endogène versus traitement illégal) pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

1.2. Contexte légal

Directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE.

Directive 96/22/CE du Conseil, du 29 avril 1996, concernant l'interdiction d'utilisation de certaines substances à effet hormonal ou thyrostatique et des substances β -agonistes dans les spéculations animales et abrogeant les directives 81/602/CEE, 88/146/CEE et 88/299/CEE.

Règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale.

Considérant les discussions menées lors des réunions du groupe de travail du 16 mars 2012, du 27 août 2012, du 25 octobre 2012 et du 07 décembre 2012 et de la séance plénière du 22 février 2013;

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Un résultat est considéré comme non conforme lorsqu'une concentration supérieure à la limite de décision de la méthode d'analyse (CC alpha), ou supérieure ou égale à la limite de performance minimale requise (MRPL) (pour les substances avec MRPL) est mise en évidence. Les laboratoires européens de référence fixent dans certains cas des valeurs «seuils» pour différencier une origine endogène d'une administration externe (exemple: thiouracil, 17 β -testostérone).

³ Pour les matrices suivantes : urine, fèces, graisse, muscle, foie et poils

⁴ Pour les espèces suivantes : bovins, porcs, ovins, caprins, équins, cervidés, volailles, poissons

Récemment, de nouvelles données scientifiques concernant la prednisolone et le thiouracil ont montré que l'approche recommandée par la Commission européenne devrait être réévaluée.

3. Réponses

Les réponses aux questions posées sont données en fonction de la liste des substances qui a été transmise par le demandeur d'avis.

3.1. Réponse à la question 1 : Parmi les substances recherchées, quelles sont celles dont la présence dans une matrice d'origine animale est susceptible d'avoir une origine endogène (métabolisme, alimentation animale)?

Pour répondre à la question 1, le Comité scientifique a défini trois groupes:

- Groupe 1: substances avec une origine endogène connue ou suspectée à un certain niveau via le métabolisme et/ou l'alimentation;
- Groupe 2: substances dont la présence dans une matrice d'origine animale peut être liée à une contamination accidentelle ou environnementale;
- Groupe 3: substances pour lesquelles il n'y a pas de raison de suspecter une origine endogène.

Le Comité scientifique a classé les substances dans l'un de ces trois groupes sur base de la structure moléculaire des substances, des données de la littérature et de l'avis des experts du groupe de travail.

3.1.1. Substances avec une origine endogène connue ou suspectée à un certain niveau via le métabolisme et/ou l'alimentation (groupe 1)

Les substances dont la présence dans une matrice d'origine animale est connue ou suspectée d'avoir une origine endogène et que l'on peut classer dans le groupe 1 sont: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone, 17 α -boldenone, progesterone, 17 β -testosterone, 17 α -testosterone, 17 β -œstradiol, 17 α -œstradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone et thiouracil.

Cette liste n'est pas limitative. A cette liste, on peut également ajouter d'autres hormones naturelles telle que l'estrone, la dihydroxytestotérone (DHT), voir des précurseurs comme DHEA (dehydroepiandrosterone), etc.

Le Comité scientifique fait remarquer que les plantes supérieures (ex. plantes à fleurs) peuvent contenir des stéroïdes (ex. androgènes, œstrogènes, progestérone). Des feuilles de noyer (*Juglans regia*) contenant de la progestérone ont été utilisées comme aliment complémentaire pour chevaux. La consommation de feuilles de noyer (*Juglans regia*) pourrait être à l'origine de la présence de progestérone chez les animaux producteurs de denrées alimentaires. D'autres plantes supérieures peuvent produire de la progestérone et pourraient être utilisées dans les médicaments à base de plantes. L'annexe 1 décrit brièvement les hormones animales présentes dans les plantes.

3.1.2. Substances dont la présence dans une matrice d'origine animale peut être liée à une contamination accidentelle ou environnementale (groupe 2)

Les substances classées dans le groupe 2 sont: norgestrel, 17 β -ethinylestradiol et chloramphenicol.

Le norgestrel et le 17 β -ethinylestradiol sont des molécules présentes dans les contraceptifs humains pour lesquels des résidus sont retrouvés dans l'environnement, en particulier dans l'eau.

Le chloramphenicol est une substance antimicrobienne à large spectre produite par certaines lignées de bactéries du sol *Streptomyces venezuelae* (De Brabander *et al.*, 2009). La présence de chloramphenicol (CAP) a été détectée par Stolker *et al.* (2012) dans la paille en concentration de 0,1 à 11 μ g/kg. Le CAP a également été détecté dans plusieurs échantillons

d'herbes de différentes origines géographiques avec des concentrations jusque 450 µg/kg (Berendsen *et al.*, 2010). Il est supposé que le CAP produit dans le sol par *Streptomyces venezuelae* et d'autres Actinomycetes est absorbé par les plantes via le système racinaire.

Le CAP appartient au tableau 2 du Règlement (UE) n° 37/2010⁵ (substances interdites). Le Comité scientifique fait remarquer que les autres substances de ce tableau 2, c'est-à-dire *Aristolochia spp.* et l'ensemble de ses préparations, chloroforme, chlorpromazine, colchicine, dapsonne, diméridazole, metronidazole, nitrofuranes (furazolidone incluse) et ronidazole pourraient également être reprises dans le groupe 2. Il s'agit de médicaments pour lesquels on pourrait retrouver des contaminations liées à un usage médicamenteux historique. Ces substances ne seront pas étudiées dans le cadre de cet avis.

Le vert de malachite et le leucomalachite peuvent également être repris dans le groupe 2. Le Comité scientifique a émis un avis sur la présence de vert malachite et de leucomalachite dans le poisson d'élevage (Avis 22-2007 http://www.favv-afsc.be/comitescientifique/avis/_documents/AVIS22-2007_FR_DOSSIER2007-31_000.pdf).

3.1.3. Substances pour lesquelles il n'y a pas de raison de suspecter une origine endogène (groupe 3)

Il n'y a pas de raison de supposer une origine endogène pour les substances suivantes: stanozolol et son métabolite 16β-hydroxy stanozolol, methylboldenone, 17β-trenbolone, 17α-trenbolone, ethylestrandiol, methandriol, methylandrostandiol, 17β-methyltestosterone, norethandrolone, methylestrandiol, dexaméthasone, fluméthasone, fluocinolone acétonide, isoflupredone, methylprednisolone, triamcinolone acétonide, beclométhasone, betaméthasone, clobetasol, cortexone, acetoxyprogesterone, caproxyprogesterone, melangestrol acetate (MGA), altrenogest, delmadinone acetate, algestone acetophenide, mestranol, diméthylthiouracil, éthylthiouracil, mercaptobenzimidazole, méthylthiouracil, propylthiouracil, tapazol, phénylthiouracil, diénestrol, hexestrol et diéthylstilbestrol.

La liste des substances du groupe 3 n'est pas exhaustive. Elle contient seulement les substances mentionnées dans la demande d'avis.

3.2. Réponse à la question 2a: Dans quelles matrices⁶ et pour quelles espèces⁷ (catégories) animales, la présence d'origine endogène des substances peut-elle être constatée?

Le Comité scientifique a classé les substances suivantes avec une origine endogène ou suspecte dans le groupe 1 (cfr. question 1): 17β-nortestosterone, 17α-nortestosterone, 17β-boldenone, 17α-boldenone, progesterone, 17β-testosterone, 17α-testosterone, 17β-œstradiol, 17α-œstradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone et thiouracil.

Pour les substances du groupe 1, une revue de la littérature a été effectuée pour savoir dans quelle matrice et pour quelle espèce animale la présence de ces substances peut être constatée. Les résultats de cette revue de la littérature sont présentés à l'annexe 2.

Le tableau à l'annexe 3, présente les concentrations retrouvées pour les combinaisons substances/espèces animales/matrices. Il ressort de ce tableau que la plupart des substances sont recherchées dans l'urine.

⁵ Règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale

⁶ Pour les matrices suivantes : urine, fèces, graisse, muscle, foie

⁷ Pour les espèces suivantes : bovins, porcs, ovins, caprins, équins, cervidés, volailles, poissons

3.3. Réponse à la question 2b: Peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier une présence d'origine endogène d'un traitement illégal pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

3.3.1. Introduction

Plusieurs approches ont été développées ou sont en développement pour faciliter la distinction entre une origine endogène et un traitement illégal. Les approches incluent l'emploi de métabolites marqueurs qualitatifs, l'établissement de concentrations seuils, la détermination d'esters de stéroïdes, l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse couplée à l'analyse élémentaire du carbone et la détection par spectrométrie de masse à rapport isotopique (GC-C-IRMS), l'expérimentation longitudinale⁸ et le développement de biomarqueurs de profilage «omics» (Scarth *et al.*, 2012).

Le concept des méthodes utilisant **des métabolites marqueurs** est de dépister un composé qui est détecté uniquement après administration de stéroïdes, et qui n'est pas trouvé chez les animaux non traités. Pour de tels composés, une analyse de confirmation qualitative simple est suffisante pour démontrer un usage illégal (Scarth *et al.*, 2012).

L'idée de l'utilisation **d'un seuil** implique la mesure de la concentration d'une substance au dessus de laquelle il existe une différence statistiquement significative entre les résultats obtenus chez des animaux non traités et les résultats obtenus à partir des animaux traités. Le but étant de ne pas produire un taux de «*faux non conformes*» élevé.

De nombreux facteurs peuvent être pris en compte pour établir une concentration en résidus qui permet de différencier une origine endogène d'un traitement illégal, tels que:

- l'espèce animale,
- la race,
- l'état physiologique de l'animal, l'âge, le sexe, l'état de gestation,
- l'alimentation,
- ...

Esters de stéroïdes

La plupart des stéroïdes sont injectés sous forme d'ester, forme qui n'est pas présente naturellement. La détection de ces esters chez les animaux est le signe d'un traitement illégal (Scarth *et al.*, 2012).

GC-C-IRMS (Gas Chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry)

L'approche la plus prometteuse pour le contrôle des stéroïdes naturels est la mesure de la différence relative entre le rapport C^{13}/C^{12} des stéroïdes endogènes en comparaison du rapport C^{13}/C^{12} du composé synthétique correspondant par GC-C-IRMS (Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry) (Balizs *et al.*, 2005; Le Bizec *et al.*, 2009; Janssens *et al.*, 2013). La composition isotopique en carbone des stéroïdes dépend étroitement de l'origine. Les estrogènes et androgènes produits naturellement par l'organisme dérivent du cholestérol si bien que leurs rapports C^{13}/C^{12} dépend directement du régime alimentaire de l'animal (Noppe *et al.*, 2008). Le rapport résultant sera plus faible après administration de stéroïdes par rapport aux composés endogènes. La GC-C-IRMS peut, par conséquent être utilisée pour détecter de telles différences dans le rapport C^{13}/C^{12} (Scarth *et al.*, 2012; Janssens *et al.*, 2013).

L'approche de biomarqueurs ciblés et non ciblés.

Le concept de l'approche «omics» n'est pas de détecter la présence d'une substance directement, mais d'être capable de détecter les effets biologiques cumulatifs (biomarqueurs) au sein d'un animal via une approche ciblée (profilage pré-défini) ou non ciblée (profilage

⁸ L'expérimentation longitudinale est une étude de recherche corrélative qui implique des observations répétées des mêmes variables sur une longue période de temps. L'expérimentation longitudinale, aussi connu sous le nom de profilage basé sur des sujets, a été introduit dans le sport sur base de l'observation que la variation intra-individu est plus faible que la variation inter-individu. L'expérimentation longitudinale compte sur l'application d'une approche statistique bayésienne ou chaque individu a son propre seuil pour une variable particulière qui dépend des résultats déterminés précédemment.

global de l'empreinte) (Scarath *et al.*, 2012). La substance n'est donc pas directement détectée.

Le profilage des matrices biologiques pour révéler les effets biologiques d'une substance peut être réalisé par ciblage de classes de composés particuliers ou d'une manière non ciblée en utilisant des stratégies globales transcriptomiques (ARNm), protéomiques (protéines) ou métabolomiques (métabolites). L'objectif principal de cette approche est d'identifier les biomarqueurs liés à l'utilisation des anabolisants, en comparant les empreintes entre les animaux traités et les animaux contrôles non traités, ce qui requiert des outils biostatistiques pour traiter l'information (Pinel *et al.*, 2010).

Suivant Nebbia *et al.* (2011), davantage de recherches sont requises avant que des marqueurs biologiques potentiels puissent être utilisés à grande échelle via des tests de screening de promoteurs de croissances illégaux.

3.3.2. Différentiation entre une origine endogène et un traitement illégal pour les combinaisons substances/matrices/espèce animale

Les approches rapportées dans la littérature pour différencier une origine endogène d'un traitement illégal sont présentées plus en détail ci-dessous pour la nortestosterone (nandrolone), la boldenone, les hormones naturelles (testosterone, progestérone, œstradiol, hydrocortisone), le zeranol et taleranol, la prednisolone et le thiouracil.

Pour la prednisone, les recherches sur l'origine endogène sont peu avancées et ne permettent pas encore (de fixer une concentration permettant) de différencier une origine endogène d'un traitement illégal.

Nortestosterone (nandrolone)

Bovins

Pinel *et al.* (2010) ont suggéré que les isomères *abb* (5 α -estrane-3 β ,17 β -diol) et *bab* (5 β -estrane-3 α ,17 β -diol) pourraient être considérés comme des biomarqueurs pour indiquer un usage illégal de nandrolone chez les bovins.

Scarath *et al.* (2011) ont proposé des concentrations seuils dans l'urine pour le screening et la confirmation d'un usage illégal de nandrolone chez les taureaux âgés de 7 à 30 mois et les génisses de plus d'un an. La stratégie consiste en la détection de marqueurs (17 α -nandrolone, *aba*-estradiol ou 19-noretiocholanolone) à des concentrations spécifiques. Kennedy *et al.* (2009) ont montré que des concentrations élevées en nandrolone et 17 α -nandrolone peuvent être retrouvés chez des bovins lors d'abattage de nécessité après fracture ou pendant la gestation.

Porcs

Roig *et al.* (2007) ont montré que les principaux métabolites de la nandrolone après une administration exogène à des verrats sont excrétés dans la fraction conjuguée (sulfo- et glucuro-conjugués, tandis que Debruyckere et Van Peteghem (1991) ont montré que les métabolites réduits au niveau du cycle A sont seulement détectables après administration de nandrolone. Il peut donc être possible d'établir une valeur seuil de sulfate de nandrolone, ou un métabolite réduit du cycle A, comme un indicateur d'une administration exogène de nandrolone chez des porcs (source: Scarath *et al.*, 2009).

Scarath *et al.* (2010) ont suggéré d'utiliser le biomarqueur 19-noretiocholanolone à des valeurs seuils dans l'urine de 7,5 ng/ml pour les verrats et de 19,2 ng/ml pour les truies.

Le seuil n'est pas applicable pour les porcins inter-sexes. Le caractère endogène de 19-norétiocholanolone à de faibles concentrations indique qu'une méthode seuil plutôt qu'une simple démonstration qualitative de la présence de ce composé est requise pour utiliser ce composé comme un biomarqueur de l'administration exogène de nandrolone.

Equidés

Houghton *et al.* (2007) ont suggéré qu'un seuil pour le sulfate de nandrolone chez le cheval peut être un moyen efficace de différencier un traitement illégal de nandrolone d'une sécrétion endogène.

La présence d'estradiol chez les bovins et les chevaux pourrait être utilisée comme stratégie de screening d'une administration de nandrolone (Pinel *et al.*, 2010).

Un seuil de 45 ng/ml a été établi pour le 5 α -estrane-3 α , 17 α -diol libre et conjugué, métabolite de la nandrolone, dans l'urine des chevaux mâles, à l'exception des hongres (Dehennin *et al.*, 2007; IFHA, 2012).

Boldenone

Bovins

La constatation de la différence entre les formes conjuguées et libres de 17 β -boldénone (17 β -Bol) dans l'urine de bovins est une première indication pour distinguer une origine endogène d'un traitement illégal (De Brabander *et al.*, 2004). La présence de formes conjuguées du 17 β -Bol dans l'urine des veaux est une preuve d'un traitement illégal. Le 17 β -Bol-sulfate peut être utilisé comme marqueur d'une administration illégale de boldénone, d'esters de boldénone ou boldione dans l'urine des veaux (Destrez *et al.*, 2009). Cependant, ce critère ne peut pas être étendu à d'autres espèces animales étant donné que la forme sulfo-conjuguée a été détectée dans des échantillons d'urine «blancs» de chevaux mâles par Ho *et al.* (2004) et Grace *et al.* (2008).

Le tableau 1 ci-dessous résume les données concernant l'origine endogène de boldénone et présente la stratégie adoptée par le laboratoire d'étude des résidus et des contaminants dans les aliments (LABERCA, France) pour le contrôle de l'emploi de boldénone chez les bovins.

Tableau 1: Origine endogène de boldénone et stratégie pour le contrôle de l'emploi de boldénone chez les bovins (source: De Brabander *et al.*, 2004)

	Situation normale	Stratégie pour le contrôle de boldenone
Urine	Traces* de 17 α -Bol	17 α -Bol conjugué > 2 ng/ml Suspicion d'emploi illégal
	Pas de 17 β -Bol	Présence de 17 β -Bol conjugué a n'importe quelle concentration Confirmation d'un usage illégal
Fèces	17 α -Bol non conjugué libre 17 β -Bol non conjugué libre (dans fèces sèches)	?

*Par GC-MS (Gas Chromatography- Mass Spectrometry)

Le principal métabolite urinaire de boldénone après une administration exogène est le 17 α -boldenone.

Equidés

Chez les étalons, l'origine endogène de boldénone a été démontrée. Un seuil de 17 β -Bol libre et conjugués de 15 ng/ml dans l'urine a été adopté chez les étalons (Ho *et al.*, 2004; IFHA, 2012).

Hormones naturelles

Certains auteurs (Arts *et al.* (1991), Biddle *et al.* (2007), Scarth *et al.* (2011) et Schmidt *et al.* (2012)) ont proposé des valeurs seuils pour les stéroïdes endogènes. Heitzmann (1992) a établi des valeurs indicatrices pour le contrôle d'hormones naturelles (progesterone, œstradiol, testostérone) chez les bovins.

Pour les stéroïdes endogènes, il est difficile de faire la différence entre leur présence d'origine endogène et leur présence due à un traitement illégal en tant que promoteurs de croissance, car à ce jour aucun critère quantitatif (par exemple des valeurs de seuil) n'existe pour permettre une telle différenciation de manière fiable (Schmidt *et al.*, 2012). Plusieurs approches ont été développées pour faciliter la preuve d'un traitement illégal dans le cas des stéroïdes endogènes en utilisant des critères qualitatifs. Ces approches consistent entre autres dans l'utilisation de la méthode GC-C-IRMS (Buisson *et al.*, 2005) et la détection des esters de stéroïdes intacts dans les poils (Stolker *et al.*, 2009).

Testostérone

Schmidt *et al.* (2012) ont proposé des valeurs seuils provisoires pour 17 α -testostérone (17 α -T) et 17 β -testostérone (17 β -T) dans l'urine et le plasma de veaux mâles et de taureaux à l'engrais et pour 17 α -T dans le plasma de veaux femelles.

Scarth *et al.* (2011) ont proposé des concentrations seuils dans l'urine pour le screening et la confirmation d'un usage illégal de testostérone chez les taureaux âgés de 7 à 30 mois et les génisses de plus d'un an. La stratégie consiste en la détection du marqueur *bab*-androstane diol (5 β -Androstane-3 α , 17 β -diol) à des concentrations spécifiques.

Il est important de noter que les taux de testostérone dans le sang varient en fonction de l'âge (puberté), la race et au cours de la journée (variation nyctémérale).

Aux USA, les niveaux de testostérone endogène permis chez les génisses sont de 0,64 μ g/kg dans le muscle, 2,6 μ g/kg dans la graisse, 1,9 μ g/kg dans les reins et de 1,3 μ g/kg dans le foie (EFSA, 2007).

Les limites pour la testostérone dans le plasma de bovin proposées par Heitzmann (1992) sont de 0,5 ng/ml pour les femelles non gestantes, de 10 ng/ml pour les mâles de moins de 6 mois et de 30 ng/ml pour les mâles de plus de 6 mois.

Chez les chevaux hongres et les juments, les populations étudiées ont permis d'établir des valeurs seuils dans l'urine pour la testostérone libre et conjuguée de 20 et 55 ng/ml, respectivement pour le contrôle de l'administration exogène de ce stéroïde (IFHA, 2012). Il n'existe pas de seuil pour les chevaux mâles intacts en raison des concentrations élevées et variables produites par les animaux (Scarth *et al.*, 2009).

Progestérone

Scarth *et al.* (2011) ont proposé des concentrations seuils dans l'urine pour le screening et la confirmation d'un usage illégal de progestérone chez les taureaux âgés de 7 à 30 mois et les génisses de plus d'un an. La stratégie consiste en la détection du marqueur *aba*-pregnanediol à des concentrations spécifiques.

Aux USA, les limites maximales de résidus (LMR) pour la progestérone endogène chez les taureaux et les veaux sont de 3 μ g/kg dans les muscles, de 12 μ g/kg dans la graisse, de 9 μ g/kg dans les reins et de 6 μ g/kg dans le foie. Chez les agneaux, les LMR sont de 3 μ g/kg dans les muscles et de 15 μ g/kg dans la graisse, les reins et le foie (EFSA, 2007).

Œstradiol

Biddle *et al.* (2007), sur base d'une évaluation statistique non paramétrique, ont proposé des limites d'action (avec une probabilité de faux positifs de 1 sur 1000) de 1,6 et 2,7 ng/ml pour le 17 α -œstradiol dans l'urine de bovins mâles et femelles et de 0,040 et 0,044 ng/ml pour le 17 β -œstradiol dans l'urine de bovins mâles et femelles. Une limite d'action de 0,020 ng/ml a été proposée pour le 17 α - et le 17 β -œstradiol dans le sérum de bovins mâles. Dans le sérum

de bovins femelles, une limite d'action de 0,04 et 0,02 ng/ml a été proposée respectivement pour le 17 α - et le 17 β -œstradiol.

Scarth *et al.* (2011) ont proposé des concentrations seuils dans l'urine pour le screening et la confirmation d'un usage illégal d'œstradiol chez les taureaux âgés de 7 à 30 mois et les génisses de plus d'un an. La stratégie consiste en la détection du marqueur 17 α -œstradiol à des concentrations spécifiques.

Il est important de noter que la concentration plasmatique d'œstradiol fluctue en fonction du sexe, de l'âge, de l'état physiologique de l'animal (œstrus, anoestrus, gestation).

Hydrocortisone

L'IFHA (International Federation of Horseracing Authorities, 2012) a établi une valeur seuil de 1 μ g/ml pour la présence d'hydrocortisone dans l'urine des chevaux.

Zeranol/taleranol

Le zeranol peut être formé *in vivo* à partir de zéaralenone et α -zéaralenol. Ce sont des mycotoxines oestrogéniques produites par *Fusarium ssp.* *Fusarium graminearum* provoque la fusariose du maïs, du blé et de l'orge, ainsi que des graminées fourragères. La présence de résidus de zeranol peut provenir de l'ingestion d'aliments pour animaux ou d'herbe contaminée par des moisissures de *Fusarium* (Dickson *et al.*, 2009).

Kennedy *et al.* (1998) ont suggéré que la détermination simultanée de zeranol, taleranol et de toxines de *Fusarium ssp.* pourrait être un critère d'une contamination environnementale par des toxines de *Fusarium ssp.* Suivant Launay *et al.* (2004), la quantité de zeranol/taleranol peut être liée à la quantité totale de toxines de *Fusarium ssp.* via une régression linéaire avec un intervalle de prédiction de 99%. Ceci suggère que la présence de zéranol dans les échantillons pourrait provenir de la métabolisation *in vivo* de toxines de *Fusarium ssp.*

Les LMR établies pour le zeranol chez les bovins par le JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) sont de 2 μ g/kg dans les muscles et de 10 μ g/kg dans le foie. Les mêmes valeurs de LMR sont établies au Canada et au Japon. Aux USA, la LMR est de 20 μ g/kg dans les tissus comestibles des moutons et aucune tolérance n'est requise pour les tissus des bovins. En Australie, la LMR pour la viande est de 5 μ g/kg et de 20 μ g/kg pour les abats comestibles (EFSA, 2007).

Prednisolone

Bovins

Selon Dusi *et al.* (2012), actuellement il est difficile d'établir une concentration seuil incontestable pour la prednisolone d'origine endogène dans l'urine des bovins. Cela est dû à la variation très élevée des taux de glucocorticoïdes, liés aux conditions de bien-être de l'animal et au rythme circadien de la sécrétion d'ACTH. Les auteurs proposent un paramètre additionnel, à savoir la présence de certains métabolites ou le rapport cortisol (ou cortisone)/prednisolone, doit être étudié pour permettre aux organismes de contrôle officiels de prendre les bonnes décisions concernant l'origine de la présence de prednisolone dans les urines (soit endogène ou à la suite d'un traitement).

D'après Vincenti *et al.* (2012), davantage de recherches sont nécessaires pour confirmer la relation entre les conditions de stress, la sécrétion de cortisol et la présence de prednisolone dans l'urine de bovins. Un développement prometteur de la recherche serait l'emploi du rapport prednisolone/cortisol urinaire comme moyen potentiel pour distinguer une administration exogène d'une production endogène.

Sterk *et al.* (2012) proposent à des fins de contrôle réglementaire d'utiliser une valeur seuil de 5 μ g/L pour la détection de la présence illégale de prednisolone dans l'urine de bovins (veaux et bovins adultes). Il est remarqué que Andersen *et al.* (2008) ont observé la présence de prednisolone dans l'urine à une concentration de 13 μ g/L.

Selon Leporati *et al.* (2012), la détection et la quantification de 20 β -dihydroprednisolone peut présenter un moyen potentiel de résoudre la question de l'origine endogène versus exogène de la prednisolone chez les bovins. Le métabolite est susceptible de devenir un nouveau marqueur, capable de détecter tout traitement illégal.

Il est important de continuer à investiguer pour identifier des marqueurs ou autres moyens (ex. ratios) afin de pouvoir détecter l'usage illégal répété à de faibles doses.

Porcs

L'AFSCA a réalisé en 2012 une action de contrôle (PREDPIG) de la prednisolone dans l'urine de porc à l'abattoir. 393 échantillons d'urine ont été analysés. La présence de prednisolone a été détectée dans 73% des échantillons d'urine collectés à l'abattoir. 9,9% des échantillons dépassaient la valeur de 2 ng/ml. Les concentrations en prednisolone variaient de <0,5 ng/ml à 7,8 ng/ml. Aucun effet statistiquement significatif n'a pu être démontré après évaluation des différents paramètres (abattoir, méthode d'anesthésie, durée du trajet, sexe, poids à l'abattage, poids moyen du lot et remplissage de l'estomac). Tous les échantillons de foie (provenant de porcs pour lesquels de la prednisolone avait été retrouvée dans l'urine) étaient négatifs.

Il ressort d'une étude collaborative (ring test) limitée, réalisée à l'initiative de l'AFSCA en 2012 avec 5 laboratoires, pour la détermination quantitative de prednisolone dans l'urine de porc que la détermination de prednisolone est liée à une incertitude de mesure élevée (moyenne 50%) et qu'il existe un biais important (de -17% à +18%) pour certaines méthodes. Le Comité scientifique recommande de standardiser les méthodes d'analyses et de produire du matériel de référence.

Une étude expérimentale limitée, menée sur 10 porcs adultes (d'un poids moyen d'environ 100 kg), a été réalisée récemment au ~~Centre d'Economie Rurale~~ CER Groupe (GER, Marloie). Des échantillons d'urines ont été prélevés plusieurs fois par jour chez les animaux non traités pendant la période d'acclimatation de 2 semaines. Les porcs ont ensuite été répartis en 2 groupes. Cinq animaux ont été traités par voie intramusculaire avec de la prednisolone (2,5% de VMD) à raison de 100 mg par animal tandis que les 5 autres animaux ont été traités avec un analogue de l'ACTH (Synacthen®) par voie intramusculaire, à raison de 5 mg par animal. L'objectif, pour ce dernier groupe, était de stimuler la corticosurrénale de manière à simuler une situation de stress. Les porcs ont été abattus séquentiellement après le traitement, comme décrit ci-après. Dans chaque groupe, un animal a été abattu 2 h, 26 h, 50 h, 74 h et 98 h après le traitement. Des échantillons d'urine et de foie ont été prélevés et analysés par UPLC-MS/MS, après extraction et purification des résidus par immunoaffinité.

Dans tous les échantillons d'urine de porc non traités (n= 125), la prednisolone a été trouvée en concentration de 0,01 à 2,8 ng/ml et le cortisol en concentration de 1,8 à 352 ng/ml. Une bonne corrélation (coefficient de corrélation de 0,81) a été constatée entre les concentrations de prednisolone et de cortisol chez les animaux non traités. Il a également été constaté que le taux de cortisol était lié au niveau de stress (Möstl et Palme, 2002). La prednisolone n'a pas été détectée dans les échantillons de foie d'animaux non traités. Par contre, de faibles teneurs de cortisol de l'ordre de 0,27 à 3,6 ng/g ont été mesurées dans le foie.

Chez les animaux traités à la prednisolone, un taux très élevé de prednisolone a été mesuré dans les urines (de l'ordre du μ g/ml) et ce rapidement (2 h) après le traitement. Ces teneurs élevées en prednisolone sont accompagnées d'un faible taux de cortisol. Dans les jours qui suivent, le taux de prednisolone diminue tandis qu'à partir du 2^{ème} jour, le taux de cortisol augmente. La prednisolone est encore retrouvée, 4 à 5 jours après le traitement, à des concentrations de l'ordre du ng/ml.

Les échantillons de foie des animaux traités à l'ACTH présentent des teneurs faibles en prednisolone (maximum observé: 0,18 ng/g) et un taux de cortisol de l'ordre de 2 à 5 ng/g. Les animaux traités à la prednisolone présentent des concentrations en prednisolone allant jusqu'à 8 ng/g et un taux de cortisol inférieur à 2 ng/g.

Le CER Groupe a réalisé en 2014 une étude dont l'objectif était d'avoir une meilleure connaissance de l'excrétion de la prednisolone d'origine endogène chez les porcs dont il était certain qu'ils n'étaient pas traités.

Il ressort des analyses quantitatives de prednisolone et de cortisol et qualitatives de 3 métabolites (prednisone, 20 α -hydroxyprednisolone et 20 β -hydroxyprednisolone) sur 100 échantillons d'urine et 50 échantillons de foie de porcs non traités (n=100) prélevés après abattage que:

- la prednisolone et le cortisol sont présents dans l'urine des porcs non traités en concentrations de 0,12 à 3,98 ng/ml et de 42,4 à 842 ng/ml, respectivement,
- les métabolites prednisone, 20 α -hydroxyprednisolone, 20 β -hydroxyprednisolone peuvent être présents dans l'urine des porcs non traités,
- la prednisolone et les métabolites de la prednisolone ne sont pas détectés dans le foie des porcs non traités.

Plusieurs études ont investigué le mécanisme de formation de prednisolone dans l'urine des bovins, porcins et équins. Ces mécanismes incluent la conversion *in-vitro* de cortisol par des bactéries provenant des fèces et du sol, et la formation *in-vivo* de prednisolone due au stress.

L'état des connaissances actuelles sur la présence de prednisolone dans l'urine chez le porc peut être résumé de la manière suivante:

- la prednisolone, anciennement considérée comme une substance uniquement exogène, est produite de façon endogène chez des porcs non traités et peut être retrouvée dans l'urine;
- Le stress joue un rôle dans la formation endogène de prednisolone (corrélation entre le cortisol et la prednisolone dans l'urine des porcs après stimulation de la glande surrénale par du Synacthen depot® (simulation d'un stress));
- Les métabolites de la prednisolone peuvent être détectés dans l'urine des porcs traités et non traités. Il est à noter que la méthode pour la détection des métabolites est une méthode semi-quantitative;
- Le ratio prednisolone/cortisol dans l'urine des porcs ne permet pas de faire une distinction entre les animaux traités et non traités, car, après 3-4 jours, le ratio chez les animaux traités est au même niveau que chez les animaux non traités;
- La prednisolone n'est pas détectée dans le foie des animaux non traités mais bien dans le foie des animaux traités. L'absence de prednisolone dans le foie est une preuve qu'il n'y a pas eu de traitement.

Etablissement d'une valeur seuil pour la prednisolone dans l'urine des porcs

~~Il n'est pas facile, sur base des connaissances actuelles, d'établir une valeur seuil incontestable pour la prednisolone dans l'urine de porc.~~

~~Des faibles concentrations de prednisolone sont régulièrement mesurées dans l'urine des porcs abattus. Celles-ci pourraient être dues à la stimulation du cortex surrénalien consécutive au stress subi par l'animal, résultant en l'excrétion de cortisol. Mais ces faibles concentrations pourraient être également le résultat de l'administration illégale de faibles doses de prednisolone. Plus de recherches sont nécessaires afin de clarifier ceci.~~

Un seuil de 2 ppb (ng/ml) avait historiquement été admis dans le cadre de l'harmonisation de la méthode d'analyse par chromatographie sur couche mince (TLC - Thin layer chromatography), et était généralement utilisé pour les substances exogènes.

Le laboratoire de référence de l'Union Européenne (European Union Reference Laboratory – EURL) propose une valeur seuil de 5 ng/ml pour la prednisolone dans l'urine de porc.

Le Comité scientifique estime que la valeur seuil de 5 ng/ml pour la concentration en prednisolone dans l'urine de porcs, proposée par l'EURL (2014) est acceptable pour discriminer les porcs non traités des porcs suspects.

~~Le laboratoire de référence de l'Union Européenne (European Union Reference Laboratory – EURL) propose depuis 2012 une valeur seuil (provisoire) de 5 ng/ml pour la prednisolone dans l'urine de porc. Le Comité scientifique estime que ce seuil de 5 ng/ml pourrait être pris comme point de départ pour l'établissement d'une valeur seuil dans l'urine de porc, sachant que cette valeur devrait être confirmée par des études scientifiques à grande échelle.~~

Cependant, le Comité scientifique recommande, pour la détermination d'une valeur seuil, de tenir compte de l'incertitude de mesure qui peut s'élever à 50% comme montré lors d'un ring test organisé par l'AFSCA.

~~Une autre méthode pour l'interprétation de l'origine de la présence de prednisolone dans l'urine de porc consiste à déterminer le rapport prednisolone/cortisol, et donc de prendre en compte les effets du stress sur la sécrétion de corticostéroïdes dans l'urine. En effet, il ressort des expériences limitées réalisées au CER (voir ci-dessus) qu'il semble y avoir une corrélation élevée entre les taux urinaires de prednisolone et de cortisol chez les animaux non traités, ainsi que chez les animaux traités avec la prednisolone échantillonnés 2 jours après le traitement. Par la suite, cette corrélation est moins fiable en raison d'une forte augmentation des niveaux de cortisol (à cause de l'effet feed-back de la glande surrénale), alors que la prednisolone pouvait encore être détectée à de faibles doses suite au traitement. L'application pratique de la mesure simultanée de prednisolone et de cortisol dans les urines pour détecter l'utilisation illégale de prednisolone chez les porcs dont l'histoire n'est pas connue semble donc difficile.~~

Le Comité scientifique estime, toutefois, que le foie **semble est** un organe cible plus fiable que l'urine pour la détection de l'administration illégale de prednisolone. Les expériences **limitées menées** au CER **Groupe** ont montré que la prednisolone n'est pas détectée dans le foie des animaux non traités, alors qu'elle est détectée en faibles quantités dans le foie des animaux traités (voir point 3.4).

Le Comité scientifique estime qu'il est également important de continuer à investiguer pour identifier des biomarqueurs permettant de détecter l'usage illégal répété à de faibles doses de prednisolone.

Thiouracil

Suivant le CRL (Community Reference Laboratories) guidance paper (2007), une 'recommended value' provisoire de 10 µg/L a été proposée pour le thiouracil (TU) dans l'urine et la thyroïde. La présence de TU à des concentrations plus élevées a été observée dans l'urine de veaux (jusque 34 µg/L) et dans l'urine de moutons (jusque 14 µg/L).

Le Bizec *et al.* (2011) ont suggéré des valeurs seuils pour distinguer les échantillons d'urine conformes des échantillons suspects sur base de la distribution naturelle du TU. Les valeurs suggérées, à un niveau de confiance de 95% et 99%, sont de 5,7 et 9,1 µg/L chez les bovins adultes mâles (6-24 mois), 3,1 et 8,1 µg/L chez les bovins adultes femelles (6-24 mois), 7,3 et 17,7 µg/L chez les veaux (<6 mois), 3,9 et 8,8 µg/L chez les bovins femelles (>24 mois), 2,9 et 4,1 µg/L chez les porcins et 12,9 et 14,3 µg/L chez les ovins. Il faut être prudent avec ces valeurs proposées car les résultats de thiouracil dans l'étude de Le Bizec *et al.* (2011) ne suivent pas une distribution normale (avis 12-2011 du Comité scientifique de l'AFSCA).

Dans son avis 12-2011, le Comité scientifique recommandait pour les résultats d'analyses de TU supérieurs à 10 µg/L d'indiquer que le résultat est non conforme et suggérait de réaliser une enquête approfondie au niveau des autres animaux (prélèvement d'échantillons d'urine) et de l'alimentation dans l'exploitation. Pour les résultats d'analyses de TU supérieurs à 100 µg/L, on doit considérer que l'animal a été traité de manière illégale (Avis 12-2011 du Comité scientifique de l'AFSCA).

Il convient également de souligner que la robustesse de la méthode de quantification du TU et le contrôle de la stabilité de ses résidus sont deux problèmes de premier intérêt, qui sont un véritable pré-requis avant l'implémentation efficace et non ambiguë d'un point de référence pour une action (Le Bizec *et al.*, 2011). L'étude de Le Bizec *et al.* (2011) met en évidence le besoin urgent d'un critère de confirmation, basé sur la découverte d'un biomarqueur discriminant ou la mesure du rapport isotopique. Deux stratégies devraient être envisagées pour la découverte de biomarqueurs, en fonction de l'origine du TU, afin de démontrer soit une origine alimentaire, soit une origine illégale. Les biomarqueurs d'intérêt seraient alors constitués respectivement, de précurseurs végétaux du TU ou des métabolites directs (phase I ou II) du TU administré de façon exogène.

L'EURL a constaté que les niveaux endogènes de TU pouvaient varier en fonction de l'âge et de l'alimentation. Il est recommandé d'être prudent avec l'interprétation des résultats.

3.4. Question 3 : La présence de prednisolone et de thiouracil dans d'autres matrices que l'urine peut-elle également avoir une origine endogène? Si oui, peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier l'origine (endogène versus traitement illégal) pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

Des études expérimentales sur la présence de prednisolone dans le foie de porc ont récemment été réalisées au CER Groupe. La prednisolone a été mesurée dans le foie 2 heures (premier échantillonnage) après administration de prednisolone. La prednisolone était encore présente 98 heures (dernier échantillonnage) après administration. La prednisolone n'a pas été détectée dans les échantillons de foie (n= 22 50) des animaux de contrôle.

~~Le foie est plus utilisé que l'urine en Europe pour le contrôle de l'usage des corticostéroïdes. Les expérimentations récentes réalisées au CER ont montré que le foie semble être une matrice très intéressante pour démontrer un traitement illégal de prednisolone.~~

Le foie est plus utilisé que l'urine dans d'autres Etats membres pour le contrôle de l'usage illégal des corticostéroïdes.

Les expériences menées au CER Groupe ont montré que la prednisolone n'est pas détectée dans le foie des animaux non traités, alors qu'elle est détectée en faibles quantités dans le foie des animaux traités.

Le foie apparaît être un organe cible plus fiable que l'urine pour la détection de l'administration illégale de prednisolone. L'absence de détection de prednisolone dans le foie est une preuve qu'il n'y a pas eu de traitement.

Le thiouracil est aussi présent de manière endogène dans la glande thyroïde. Il est remarqué que le prélèvement correct de la thyroïde n'est pas facile. Le thiouracil a également été détecté sporadiquement dans la viande.

Pour l'instant, le Comité scientifique ne dispose pas d'éléments suffisants pour pouvoir différencier une présence endogène d'un traitement illégal pour le thiouracil dans une matrice autre que l'urine.

4. Conclusions

Trois questions ont été posées au Comité scientifique sur la présence d'origine endogène de substances anabolisantes et/ou interdites chez les animaux producteurs de denrées alimentaires, à savoir:

- question 1 : Parmi les substances recherchées, quelles sont celles dont la présence dans une matrice d'origine animale est susceptible d'avoir une origine endogène (métabolisme, alimentation animale, ...)?
- question 2 : Dans quelles matrices⁹ et pour quelles espèces¹⁰ (catégories) animales, la présence d'origine endogène des substances peut-elle être constatée?
 - o Peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier une présence d'origine endogène et un traitement illégal pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?
- question 3 : La présence de prednisolone et de thiouracil dans d'autres matrices que l'urine peut-elle également avoir une origine endogène?
 - o Si oui, peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier l'origine (endogène versus traitement illégal) pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

Le Comité scientifique a entrepris une revue de la littérature pour répondre aux questions posées.

Pour répondre à la question 1, le Comité scientifique a classé les substances de la demande d'avis en trois groupes:

- groupe 1: substances avec une origine endogène connue ou suspectée à un certain niveau via le métabolisme et/ou l'alimentation;
- groupe 2: substances dont la présence dans une matrice d'origine animale peut être liée à une contamination accidentelle ou environnementale;
- groupe 3: substances pour lesquelles il n'y a pas de raison de suspecter une origine endogène.

Les substances dont la présence dans une matrice d'origine animale est connue ou suspectée d'avoir une origine endogène et que l'on peut classer dans le groupe 1 sont: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone, 17 α -boldenone, progesterone, 17 β -testosterone, 17 α -testosterone, 17 β -œstradiol, 17 α -œstradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone et thiouracil.

Pour répondre à la question 2, les substances du groupe 1 ont été étudiées plus en détail pour les combinaisons substances/espèces animales/matrices. Les substances du groupe 2 et du groupe 3 n'ont pas été étudiées en détail.

Il ressort d'une étude de la littérature étendue que pour les substances suivantes une origine endogène peut être observée:

- dans l'urine de bovins: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone et 17 α -boldenone
- dans le sang chez les bovins, porcs, volailles, ovins, caprins, chevaux, cervidés et poissons: progesterone, testosterone, œstradiol, cortisol et cortisone
- dans l'urine de plusieurs espèces animales: zeranol et taleranol
- dans l'urine de bovins, porcs et chevaux: prednisolone
- dans l'urine de bovins, porcs et ovins: thiouracil

Plusieurs approches sont en développement pour distinguer une origine endogène d'une administration exogène. Des techniques telles que la recherche de biomarqueurs et des méthodes utilisant le rapport isotopique présentent un intérêt croissant.

Les approches rapportées dans la littérature pour différencier une origine endogène d'un traitement illégal ont été présentées pour la nortestosterone (nandrolone), la boldenone, les

⁹ Pour les matrices suivantes : urine, fèces, graisse, muscle, foie et poils

¹⁰ Pour les espèces suivantes : bovins, porcs, ovins, caprins, équins, cervidés, volailles, poissons

hormones naturelles (testostérone, progestérone, œstradiol, hydrocortisone), le zeranol et taleranol, la prednisolone et le thiouracil. Les recherches sur l'origine endogène de la prednisolone sont peu avancées et les connaissances actuelles ne permettent pas de différencier avec certitude une origine endogène d'un traitement illégal.

~~Les résultats d'une étude expérimentale préliminaire menée chez le porc ont permis de donner des pistes pour différencier la présence de prednisolone d'origine endogène de celle résultant d'un traitement illégal.~~

Les résultats d'études expérimentales récentes (CER Groupe, 2014) sur les résidus de prednisolone dans l'urine de porcs ont permis de différencier la prednisolone d'origine endogène (échantillons d'urine conformes) et les échantillons suspects pour une administration illégale de prednisolone.

La présence de prednisolone et de thiouracil d'origine endogène dans d'autres matrices que l'urine a été investiguée pour répondre à la question 3. Il ressort d'études expérimentales préliminaires que le foie pourrait être une matrice intéressante pour démontrer un traitement illégal de prednisolone.

Le thiouracil est présent de manière endogène dans la glande thyroïde. Pour l'instant, le Comité scientifique ne dispose pas d'éléments suffisants pour pouvoir différencier une présence d'origine endogène d'un traitement illégal pour le thiouracil dans une matrice autre que l'urine.

5. Recommandations

Le Comité scientifique recommande d'être prudent lors de l'interprétation des résultats de la présence de substances anabolisantes et/ou interdites avec une origine endogène possible dans les matrices issues du bétail tant que des valeurs seuils ne sont pas clairement établies.

Le Comité scientifique encourage le développement de méthodes analytiques (ex. GC-C-IRMS), la recherche de biomarqueurs et la détermination de ratios de concentrations entre substances permettant de distinguer une origine endogène d'une administration exogène.

Le Comité scientifique recommande la mise au point d'un matériel de référence pour la prednisolone

Pour le Comité scientifique,

Prof. Em. Dr. Pharm. C. Van Peteghem (Sé.)
Président

Bruxelles, le 13/03/2013

Références

Andersen J. H., Hansen L. G., Pedersen M. 2008. Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 617, 216–224.

Arts C. J., van Baak M. J., den Hartog J. M. 1991. Control system for detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves. *Journal of chromatography*, 564 (2), 429-444.

Balitz G., Jainz A., Horvatovich P. 2005. Investigation of the feeding effect on the ¹³C/¹²C isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067, 323–330.

Berendsen B., Stolker L., de Jong J., Nielen M., Tserendorj E., Sodnomdarjaa R., Cannavan A., Elliott C. 2010. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1955–1963.

Biddle S., Teale P., Robinson A., Bowman J., Houghton E. 2007. Gas chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry analysis to determine natural and post-administration levels of oestrogens in bovine serum and urine. *Analytica Chimica Acta*, 586, 115-121.

Buisson C.C, Hebestreit M., Preiss Weigert A., Heinrich K., Fry H., Flenker U., Banneke S., Prevost S., Andre F., Schaenzer W., Houghton E., Le Bizec B. 2005. Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17β-estradiol administration to cattle. *Journal of Chromatography A*, 1093 69–80.

De Brabander H. F., Poelmans S., Schilt R., Stephany R. W., Le Bizec B., Draisci R., Sterk S. S., van Ginkel L. A., Courtheyn D., Van Hoof N., Macri A., De Wasch K. 2004. Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21 (6), 515–525.

De Brabander H.F, Noppe H., Verheyden K., Vanden Bussche J., Wille K, Okerman L., Vanhaecke L., Reybroeck W., Ooghe S., Croubels S. 2009. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7964–7976.

Debruyckere G., Van Peteghem C. 1991. Detection of 19-nortestosterone and its urinary metabolites in miniature pigs by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 564, 393–403.

Dehennin L., Bonnaire Y., Plou P. 2007. Detection of nandrolone administration to the entire male horse by a provisional concentration threshold for urinary oestradiol determined by gas chromatography–mass spectrometry. *Equine Veterinary Journal*, 39, 186–188.

Delahaut P., Demoulin L., Gillard N., Fichanta E., Courtheyn D. 2014. Preliminary study on the presence of prednisolone in porcine urine and liver – How to distinguish endogenous from therapeutically administered prednisolone. *Drug Testing and Analysis*, 6 (4), 325–335.

Destrez B., Bichon E., Rambaud L., Courant F., Monteau F., Pinel G., Antignac J.-P., Le Bizec B. 2009. Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle 2. Direct measurement of 17b-boldenone sulpho-conjugate in calf urine by liquid chromatography–high resolution and tandem mass spectrometry. *Steroids*, 74, 803–808.

Dickson L. C., Costain R., McKenzie D., Fesser A. C. E., Macneil J. D. 2009. Quantitative Screening of Stilbenes and Zeranol and Its Related Residues and Natural Precursors in Veal Liver by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6536–6542.

Dusi G., Arioli F., Ghidelli V., Casati A., Hathaway T., Pompa G., Bertocchi L. 2012. Investigation on the origin of prednisolone residue in cow urine. Proceedings of EuroResidue VII, 297-302.

EFSA, 2007. Opinion of the Scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission related to hormone residues in bovine meat and meat product. The EFSA Journal, 510, 1-62.

EURL (European Union Reference Laboratory), 2014. EURL Reflection paper: Natural growth promoting substances in biological samples. Presence – and formation – of hormones and other growth promoting substances in food producing animals. Current approaches for enforcement and research needs for full implementation in residue control. Rikilt Wageningen UR.

Grace P., Drake E., Teale P., Houghton E. 2008. Quantification of 19-nortestosterone sulphate and boldenone sulphate in urine from male horses using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 22, 2999–3007.

Heitzman R. J. 1992. Residues in food-producing animals and their products: Reference materials and methods. Commission of the European Communities, Directorate-General for Agriculture, Veterinary drug residues. EUR 14126.

Ho E.N.M., Yiu K.C.H., Tang F.P.W., Dehennin L., Plou P., Bonnaire Y., et al. 2004. Detection of endogenous boldenone in the entire male horses. Journal of Chromatography B, 808, 287–294.

Houghton E., Teale P., Dumasia M.C. 2007. Studies related to the origin of C18 neutral steroids isolated from extracts of urine from the male horse: the identification of urinary 19-*oic* acids and their decarboxylation to produce estr-4-ene-17 α -*ol*-3-one (19-nortestosterone) and ester-4-ene-3,17-dione (19-norandrost-4-ene-3,17-dione) during sample processing. Analytica Chimica Acta, 586, 196–207.

IFHA (International Federation of Horseracing Authorities) 2012. International agreement on breeding racing and wagering. http://www.horseracingintfed.com/resources/2012_choose_eng.pdf

Kennedy D. G., Hewitt S. A., McEvoy J. D. G., Currie J. W., Cannavan A., Blanchflower W. J., Elliot C. T. 1998, Zeranol is formed from *Fusarium spp.* toxins in cattle *in vivo*. Food Additives and Contaminants, 15, 393–400.

Kennedy D. G., Shortt H. D., Crooks S. R.H., Young P. B., Price H. J., Smyth W. G., Hewitt S. A. 2009. Occurrence of α - and β -nortestosterone residues in the urine of injured male cattle. Food Additives and Contaminants, 26 (5), 683–691.

Janssens G., Courtheyn D., Mangelinckx S., Prévost S., Bichon E., Monteau F., De Poorter G., De Kimpe N., Le Bizec B. 2013. Use of Isotope Ratio Mass Spectrometry to differentiate between endogenous steroids and synthetic homologues in cattle: a review. Analytica Chimica Acta, *article in press*

Launay F.M., Ribeiro L., Alves P., Vozikis V., Tsitsamis S., Alfredsson G., Sterk S. S., Blokland M., Iltia A., Lövgren T., Tuomola M., Gordon A., Kennedy D. G. 2004. Prevalence of zeranol, taleranol and *Fusarium spp.* toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. Food Additives and Contaminants, 21 (9), 833–839.

Le Bizec B., Pinel G., Antignac J.-P. 2009. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1216, 8016–8034.

- Le Bizec B., Bichon E., Deceuninck Y., Prévost S., Monteau F., Antignac J.-P., Dervilly-Pinel G. 2011. Toward a criterion for suspect thioracil administration in animal husbandry. *Food additives and Contaminants*, 28 (7), 840-847.
- Leporati M., Capra P., Cannizzo F.T., Vincenti M., Biolatti B. 2012. Evaluation of prednisolone metabolism in calves. *Proceedings of EuroResidue VII*, 883-888.
- Möstl E., Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 67–74.
- Nebbia C., Urbani A., Carletti M., Gardini G., Balbo A., Bertarelli D., Girolami F. 2011. Novel strategies for tracing the exposure of meat cattle to illegal growth-promoters *The Veterinary Journal* 189, 34–42.
- Pinel G., Weigel S., Antignac J.-P., Mooney M.H., Elliott C., Nielen M.W.F., Le Bizec B. 2010. Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *Trends in analytical chemistry*, 29 (11), 1269-1280.
- Roig M., Segura J., Ventura R. 2007. Quantitation of nandrolone metabolites in boar and horse urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 586, 184–195.
- Scarth J., Akre C., van Ginkel L., Le Bizec B., De Brabander H., Korth W., Points J., Teale P., Kay J. 2009. Presence and metabolism of endogenous androgenic–anabolic steroid hormones in meat producing animals: a review. *Food Additives and Contaminants*, 26 (5), 640–671.
- Scarth J. P., Clarke A., Hands J., Teale P., Mill A. C., Macarthur R., Kay J., De Brabander H. 2010. Validation of an Analytical Biomarker Approach for the Detection of Nandrolone Abuse in the Porcine. *Chromatographia*, 72 (3/4), 2097-305.
- Scarth J., Clarke A., Teale P., Mill A., Macarthur R., Kay J. 2011. Detection of endogenous steroid abuse in cattle: results from population studies in the UK. *Food Additives and Contaminants*, 28 (1), 44-61.
- Scarth J. P., Kay J., Teale P., Akre C., Le Bizec B., De Brabander H.F., Vanhaecke L., Van Ginkel L., Points J. 2012. A review of analytical strategies for the detection of 'endogenous' steroid abuse in food production. *Drug Testing and Analysis*, 4 (S1), 40-49.
- Schmidt K. S., Stachel C. S., Kunath K., Uhlig S., Gowik P. 2012. Statistical evaluation of levels of endogenous steroids in bovine animals. *Proceedings of EuroResidue VII*, 149-154.
- Sterk S. S., de Rijke E., Rijk C.W., Zoontjes P. W., Samson D., van Ginkel L.A. 2012. Prednisolone a new natural occurring steroid? *Proceedings of EuroResidue VII*, 401-408.
- Stolker A. A. M., Groot M. J., Lasaroms J. J. P., Nijrolder A. W. J. M., Blokland M. H., Riedmaier I., Becker C., Meyer H. H. D., Nielen M. W. F. 2009. Detectability of testosterone esters and estradiol benzoate in bovine hair and plasma following pour-on treatment *Analytical Bioanalytical Chemistry* 395, 1075–1087.
- Vincenti M., Leporati M., Capra P., Gatto S., Attucci A., Barbarino G., Nebbia C. 2012. A field survey on the presence of prednisolone and prednisole in urine samples from untreated cows. *Food Additives and contaminants*, 29 (12), 1893-1900.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, L. De Zutter, J. Dewulf, P. Gustin, L. Herman, P. Hoet, H. Imberechts, A. Legrève, C. Matthys, C. Saegerman, M.-L. Scippo, M. Sindic, N. Speybroeck, W. Steurbaut, E. Thiry, M. Uyttendaele, T. van den Berg, C. Van Peteghem†

Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêts n'a été constaté.

Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé des membres suivants :

Membres du Comité scientifique
Experts externes

Delahaut P. (Rapporteur), Scippo M.-L.,
Daeseleire E. (ILVO), De Backer P. (Ugent),
Maghuin-Rogister G.(ULg), Vanhaecke L.
(Ugent)

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 09 juin 2011.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.