

CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT LORS DE L'ADMINISTRATION DE MEDICAMENTS AUX CHEVAUX ET SES CONSEQUENCES SUR LE CONTROLE ANTIDOPAGE

Par :

Popot M A, Garcia P, Bonnaire Y.

*LCH, Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières
le Buisson, France.*

Résumé

La mise en évidence de substances prohibées, lors du contrôle antidopage, peut parfois être imputable à la contamination de l'environnement du cheval (auto contamination ou contamination croisée). Dans la présente étude, on a observé d'une part une auto contamination de trois des chevaux suite à un traitement de Ventipulmin[®] sous forme de sirop à la dose de 0,8 µg/kg deux fois par jour pendant 10 jours et d'autre part une contamination croisée de trois chevaux lors d'un traitement à la Dipyronne (Calmalgine[®]) par voie IV à la dose de 23 mg/kg deux fois dans la journée du premier jour et 32 mg/kg en une seule fois le midi le second jour. Dans un souci de prévention, il est nécessaire d'informer les professionnels sur les risques de contamination de l'environnement lors de l'administration de médicaments aux chevaux.

Mots-clés : contrôle anti-dopage, urine, litière, auto contamination, contamination croisée.

Summary

In horse doping control, the detection of prohibited substances can be attributed to the contamination of the environment of the horse (i.e. self contamination or cross contamination). In this study, we have observed (i) self contamination of three horses following to a treatment of Ventipulmin[™] syrup at the dose of 0.8 µg/kg twice a day for 10 days (ii) cross contamination of three horses following a dipyronne treatment using calmagine[™] IV route at the dose of 23 mg/kg twice a day the first day and 32 mg/kg once at noon the second day. In order to prevent further risk of contamination, it is necessary to give the appropriate information about this risk to professionals involved in the treatment of horses with therapeutic substances.

Key-words : horse doping control, urine, bedding, self contamination, cross contamination.

Introduction

Dans le cadre du contrôle antidopage réalisé en France, la mise en évidence de substances prohibées semble être parfois imputable à la contamination de l'environnement du cheval (Norgren et al 2001, Wennerlund et al, 2001, Popot et al, 2007a,b). Certaines molécules peuvent être détectées dans les urines des chevaux pendant un temps plus long que celui prévu. Ceci peut être dû à des phénomènes d'autocontamination ou de contamination croisée. On entend par auto contamination, la contamination d'un cheval par ingestion de la paille qu'il a lui-même souillée. La contamination croisée, quand à elle, correspond à la contamination d'un cheval non traité par la paille souillée par les urines ou les crottins d'un autre cheval.

Le but de cette étude est de compléter les informations disponibles concernant ces deux types de contamination. Pour l'auto contamination, nous évoquerons des observations concernant l'élimination urinaire du clenbutérol et pour la contamination croisée, nous nous intéresserons à la détection de l'administration de la dipyronne.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériel et Méthodes

Animaux :

Clenbutérol

Après une étude pilote sur un seul cheval (exp 576), l'étude proprement dite a été réalisée sur deux groupes de trois chevaux. Nous avons sélectionné une jument pur sang âgée de 4 ans pour l'expérimentation pilote, trois hongres (2 selle français et 1 anglo-arabe) âgés de 3 ans pesant de 490 à 540 kg pour le premier groupe (SE 14, SE 15, SE 16) et enfin trois juments de selle, (deux de 4 ans et une de 5 ans pesant de 550 à 600 kg) pour le deuxième (SE 17, SE 18, SE19).

Les chevaux ont reçu un traitement de Ventipulmin® sous forme de sirop (Boehringer Ingelheim France, Reims) à la dose de 1,6 µg/kg par jour en deux prises données avant le repas pendant 10 jours. Des prélèvements urinaires ont été réalisés toutes les douze heures à partir du premier jour après la fin de l'administration jusqu'au 17^{ème} jour après l'administration. L'expérimentation pilote et l'étude proprement dite n'ont pas été réalisées dans le même centre d'expérimentation. La paille a été changée tous les jours pour tous les chevaux.

Dipyronne

Un cheval RS pur sang de 15 ans a reçu un traitement à la Dipyronne (Calmagine®, Vetoquinol, France) par voie IV à la dose de 23 mg/kg deux fois le premier jour, 32 mg/kg en une seule fois le midi le second jour. Le troisième jour le cheval n'a pas reçu de traitement. Le box n'a pas été nettoyé pendant le traitement. Un premier cheval GR (pur sang de 4 ans) a été placé dans le box contaminé (box 0) et y est resté pendant trois jours. Le cheval RS a ensuite reçu un deuxième traitement de deux jours dans le box 1. Un deuxième cheval SH (pur sang de 6 ans) a été déplacé vers le box contaminé 1 et y est resté pendant trois jours. Le cheval RS a reçu un troisième traitement dans le box 2. Un troisième cheval CH (pur sang de 7 ans) a été déplacé dans le box contaminé 2 et y est resté pendant trois jours. La quantité de nourriture pour les trois chevaux (GR, SH, CH) a été diminuée progressivement pendant leur séjour dans le box contaminé. Des échantillons d'urine ont été collectés chez le cheval traité et les chevaux non traités.

Techniques analytiques

Clenbutérol : Le clenbutérol a été extrait des urines par extraction sur phase solide (cartouche CS Dau 503, Interchim, Montluçon) et analysé par HPLC/ESI/MSⁿ en mode positif. La limite de quantification est de 75 pg/mL.

Dipyronne : La 4 méthylamino antipyrine (4-MAA) marqueur principal de l'administration de la dipyronne a été recherchée et semi-quantifiée par GC/MS selon la méthode développée au LCH, (Popot et al 2001).

2. Résultats et Discussion

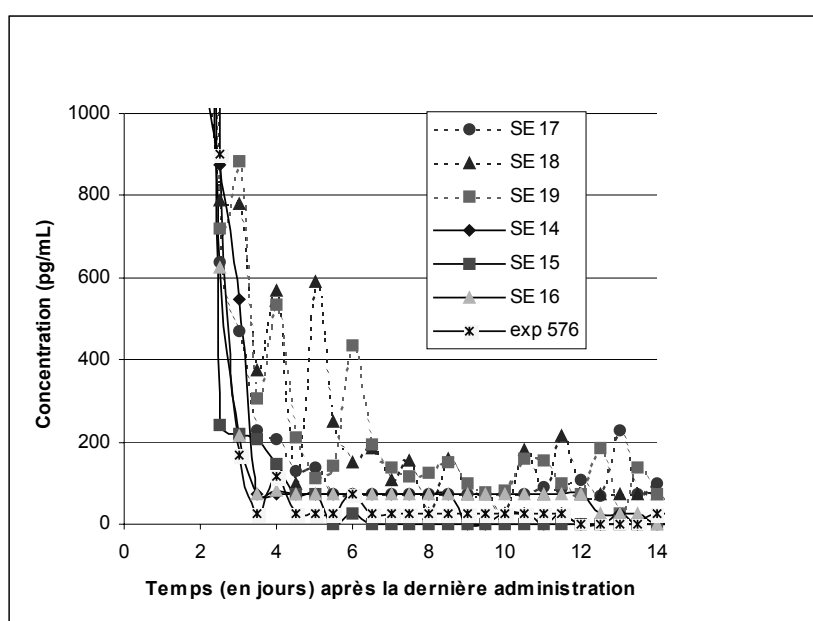
2.1. Auto contamination : cas du clenbutérol

L'observation des courbes d'élimination urinaires (Figure I) montre la diminution progressive attendue pour 4 chevaux à partir du 2^{ème} jour après la fin du traitement (que ce soit le cheval de l'expérimentation pilote ou ceux du premier groupe SE 14, SE 15, SE 16).

Les concentrations urinaires en clenbutérol sont inférieures à 1 ng/mL 2,5 jours après la fin du traitement, inférieures à 500 pg/mL 3,5 jours après la fin du traitement, inférieures à 100 pg/mL 4,5 jours après la fin du traitement et inférieures à la limite de quantification 5,5 jours après la fin du traitement

Les courbes d'élimination urinaire sont à priori en accord avec les travaux de Guan et al (2002) et Soma et al (2004). Pour deux chevaux du deuxième groupe (SE 18 et SE 19), (Figure I) on a observé des rebonds de concentration entre le 3^{ème} jour et le 7^{ème} jour après la fin de l'administration. L'intensité de ces rebonds est de plusieurs centaines de pg/mL. Des rebonds plus discrets de 100 à 200 pg/mL environ sont observés à nouveau pour les trois chevaux du deuxième groupe (SE 17, SE 18 et SE 19) entre le dixième et le quatorzième jour après l'administration. Au vu des résultats, il semblerait que les conditions d'entretien n'ont pas été tout à fait identiques pour tous les chevaux. Figure I: Concentrations urinaires en clenbuterol (en pg/mL) chez 7 chevaux (trois hongres et 4 femelles) prélevés de deux à quatorze jours après la fin d'un traitement de Ventipulmin® (à la dose de 0.8 µg/kg deux fois par jour pendant dix jours).

Figure I : Clenbuterol concentrations (in pg/mL) in urine from 7 horses (3 geldings and 4 mares) from 2 days up to fourteen days after the end of the 10-day treatment of Ventipulmin[™] syrup given at the dosage of 0.8 µg/kg twice a day.



Guan et al (2002), Soma et al (2004) n'ont pas observé de phénomènes de rebonds de concentration du clenbutérol dans l'urine dans la mesure où les urines étaient collectés grâce à un dispositif évitant la contamination de la paille.

Les résultats obtenus dans cette étude sont à rapprocher de l'étude de Harkins et al (2001) réalisée sur 5 femelles pur sang à l'issue d'un traitement par voie orale de clenbutérol (Ventipulmin[®], sirop) à la même dose de 0,8 µg/kg deux fois par jour et pendant la même durée de 10 jours. Ces chevaux sont restés en paddock tout le temps de l'expérimentation. Des phénomènes de rebonds de la concentration en clenbutérol dans l'urine de plusieurs ng/mL ont été observés chez tous les chevaux du 8^{ème} au 11^{ème} Jour, ces résultats ont été notifiés par les auteurs mais sont restés sans explication.

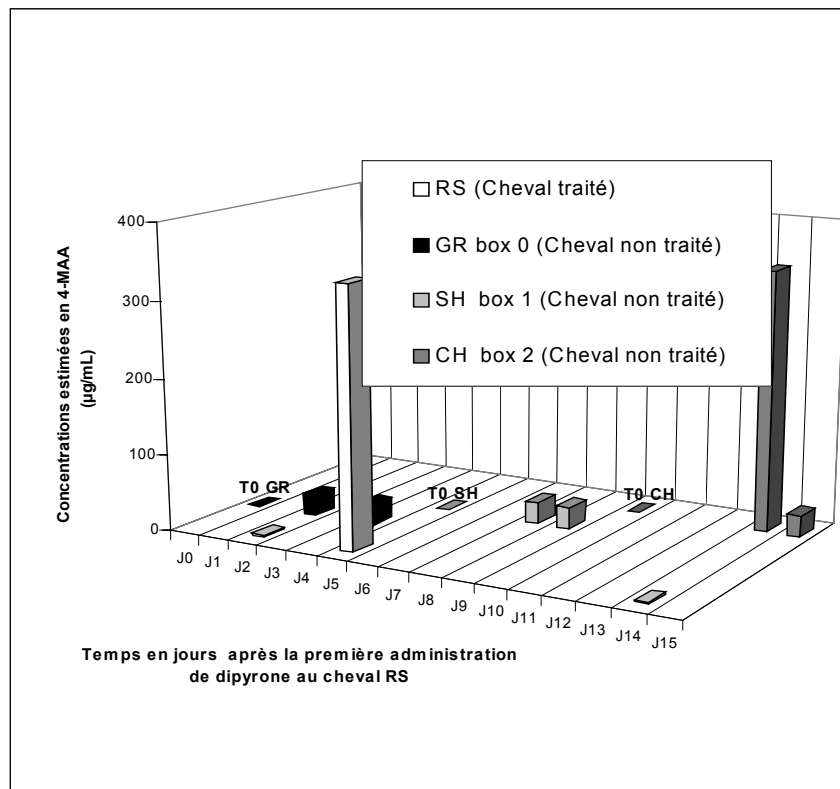
Auparavant, nous avons observé ce phénomène d'auto contamination à plusieurs reprises en particulier avec l'acide méclofénamique administré par voie intraveineuse à la dose 2,2 mg/kg (Popot et al, 2007a) dans le cas où la paille était partiellement changée tous les jours. Dans ce cas, le remplacement de la paille par des copeaux de bois ne s'est pas révélé efficace puisque certains chevaux les mangent (Popot et al, 2007a). Ce problème a aussi été observé avec la flunixin (Popot et al, 2007b).

2.2. Contamination croisée: cas de la Dipyronne

Les échantillons urinaires du cheval RS, collectés avant administration de Calmagine[®] et ceux des autres chevaux collectés au début de l'étude, se sont révélés négatifs. Dans les autres échantillons urinaires prélevés après administration pour le cheval RS ou après passage dans un box contaminé pour ce qui concerne les trois autres chevaux (GR, SH et CH), la 4-MAA a été détectée à des concentrations élevées (Figure II). Ce phénomène de contamination croisée a aussi été observé dans le cas de l'Histabiosone[®] administré à un seul cheval en intramusculaire à la posologie de 20 mL par jour pendant 4 jours.

Figure II : Estimation des concentrations en 4-MAA observées dans les urines des quatre chevaux du protocole. La dipyronne (Camalgine[®]) a été administrée au cheval RS pendant deux jours et ce traitement a été répété trois fois, l'administration a été conduite respectivement dans le box 0, le box 1 et le box 2. Les trois autres chevaux n'ont pas reçu de traitement mais ont séjourné pendant trois jours dans un box non nettoyé.

Figure II : Estimated concentrations of 4-MAA metabolites observed in urine collected from the four horses involved in this animal experiment. Dipyronne (Camalgine[™]) was administered to the horse Raft song for two days and this treatment was repeated three times, the administration had been done respectively in box 0, box 1 and box 2. The three other horses did not receive any treatment but had stayed for three days on uncleaned bedding.



En effet, les quatre chevaux non traités ayant séjourné dans le box du cheval traité auraient pu être déclarés positifs s'ils avaient été contrôlés à l'issue d'une course puisque les deux métabolites principaux de la chlorphéniramine ont été détectés dans leurs urines (Popot et al, 2007b).

Conclusion

Les risques d'auto contamination et de contamination croisée sont réels lors de traitements couramment utilisés en thérapeutique équine. Pour les éviter, il est indispensable de respecter les recommandations décrites notamment celles du guide de bonnes pratiques à l'écurie (ENESAD, 2005). Ces recommandations non exhaustives portent essentiellement sur les conditions d'hébergement, de distribution des aliments aux chevaux, et des soins. Toutefois, des études complémentaires sont en cours afin de pouvoir les compléter. Par ailleurs les efforts d'harmonisation du contrôle anti-dopage entrepris au niveau de l'European Horserace Scientific Liaison Committee (EHSLC) doivent permettre d'éviter des cas positifs dès lors que ces bonnes pratiques à l'écurie sont mises en œuvre.

Remerciements

Les phases animales ont été réalisées au centre d'administration et de prélèvements de Coye la Forêt et à la station expérimentale des Haras Nationaux de Chamberet. La phase animale relative à la dipyrone a été initiée par le Dr A Duluard.

Bibliographie

ENESAD 2005, guide de bonnes pratiques à l'écurie, BP 87 999, 21 079 Dijon.

Guan F, Uboh CE, Soma LR, Luo Y, Li R, Birks EK, Teleis D, Rudy JA, Tsang DS (2002). Quantification of clenbuterol in equine plasma, urine and tissue by liquid chromatography coupled on-line with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 16 (17):1642-1651.

Harkins JD, Woods WE, Lehner AF, Fisher M, Tobin T. (2001) Clenbuterol in the horse: urinary concentrations determined by ELISA and GC/MS after clinical doses. *J Vet Pharmacol Therapeutics*, 24: 7-14.

Norgren A, Ingvast-Larsson C, Kallings P, Fredriksson E, Bondesson U, (2001) Contamination and urinary concentration of flunixin after repeated administration in the horse. *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (2000)*, Cambridge, 377-380.

Popot MA, Jaubert M, Balssa F, Bonnaire Y, (2001). Detection of dipyrone administration in the horse by GC/MS. *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, (2000) Cambridge, 386-390.*

Popot MA, Menaut L, Boyer S, Bonnaire Y, Toutain PL, (2007a). Spurious urine excretion drug profile in horse due to bedding contamination and drug recycling: The case of meclofenamic acid. *J Vet Pharmacol Therapeutics*, 30: 179 -184.

Popot MA, Garcia P, Bonnaire Y, Duluard A, (2007b). Contamination de l'environnement lors de l'administration de médicaments aux chevaux et ses conséquences sur le contrôle antidopage. *Revue des Haras nationaux, équi'idée*, Automne 2007, 60: 44-46.

Soma LR , Uboh CE, Guan F, Moate P, Luo Y, Teleis D, Li R, Birks EK, Rudy JA, Tsang DS.(2004) Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse. *J Vet Pharmacol Therapeutics*. 27(2):71-77.

Wennerlund I, Ingvast-Larsson C, Kallings P, Fredriksson E, Bondesson U, (2001), Pharmacokinetics and urinary excretion of naproxen after repeated oral administration. *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, (2000), Cambridge, 195-200.