



## **Le contrôle antidopage des animaux, de la tolérance zéro à un concept international harmonisé, nouvelles perspectives, nouvelles approches.**

Par :

- Dr Y. Bonnaire, Dr P.Garcia, Dr L.Bailly Chouriberry, Dr M.A. Popot
- LCH 15 rue de Paradis, 91370 Verrieres le Buisson

### **Résumé**

Le contrôle antidopage a évolué de manière significative et doit prendre en compte maintenant des pratiques dopantes de plus en plus sophistiquées tout en respectant la nécessité de traiter des chevaux malades. La maîtrise des techniques de détection et leur harmonisation au niveau international s'est avérée être la meilleure solution afin de respecter les grands principes selon lesquels un cheval malade ne doit pas participer à des compétitions tout en lui permettant d'y participer à nouveau après avoir éliminé les substances thérapeutiques qui constituaient son traitement.

Par ailleurs l'apparition de molécules dopantes à faible demi-vie (protéines), mais dont l'effet demeure après la disparition de la substance, a nécessité une réorientation des stratégies analytiques telles que l'introduction de la transcriptomique et la métabolomique dans les méthodes de détection. De nouvelles perspectives s'ouvrent maintenant à nous et permettent une vue plus optimiste des défis à venir.

**Mots clés : Contrôle antidopage, harmonisation, limites de screening, protéines, métabolomique, transcriptomique.**

### **Summary**

Drug testing has been significantly improved during these last decades and must fit with sophisticated new doping practices as well as new drugs. Nevertheless the principle of drug free competition must live with the obligation of curing sick horses. This could be done through the control of analytical performances during the screening process to avoid reporting irrelevant concentration of legitimate therapeutic drugs. Harmonization of screening limits has a key role to play in that sense.

On the other hand the use of short half-life drugs such as proteins may cause detection difficulties as the effect remains when the drug has already disappeared. New detection strategies such as metabolomics or transcriptomics may help in achieving this goal.

All these new techniques represent very promising approach for the future of drug testing.

**Key-words: Doping control, harmonization, screening limits, proteins, metabolomic, transcriptomic.**

## Introduction

Le contrôle antidopage des animaux est, par essence même, très différent dans son concept du contrôle des athlètes humains. Une vue simplifiée pourrait résumer le contrôle humain à la mise en évidence de dopants vrais (anabolisants, stimulants etc.) c'est-à-dire de substances susceptibles d'améliorer les performances des compétiteurs. En revanche, le contrôle antidopage animal se révèle beaucoup plus complexe dans la mesure où tout ce qui a un effet sur l'organisme du cheval est, par définition, interdit.

Cette mesure vise à protéger non seulement la régularité des courses qui font l'objet de paris, mais aussi la compétition elle-même et surtout la sélection des chevaux et des reproducteurs qui se fait sur la base de leurs performances.

Les bases réglementaires comme l'article 6 de l'accord international de l'IFHA (International Federation of Horseracing Authorities), encadrant ce contrôle fournissent un cadre précis pour la réalisation du contrôle antidopage ([http://www.horseracingintfed.com/resources/2010\\_choose\\_fr.pdf](http://www.horseracingintfed.com/resources/2010_choose_fr.pdf)). Ce texte est en perpétuelle évolution et de nouvelles dispositions vont être mises en place prochainement :

- D'une part une harmonisation de niveau de détection (screening level) pour les substances thérapeutiques : les ISL (International Screening Level).
- D'autre part une extension sans ambiguïté de la liste des substances prohibées en incorporant les substances et les pratiques susceptibles de modifier le génome ou l'expression génique.

## 1. La tolérance zéro, un concept en évolution

Le concept de tolérance zéro est un héritage d'un passé pourtant proche. Cette notion était justifiée par la qualité médiocre (à nos yeux actuels) de l'équipement et de l'instrumentation analytique de l'époque. En effet, le contrôle antidopage est dérivé, dans son principe, des méthodes utilisées en médecine médico-légale. C'est ainsi que les techniques dites de « micro cristaux » ou de réactions colorées ont été utilisées au tout commencement de la lutte antidopage, vers les années 1950. Très rapidement des techniques un peu plus évoluées telles que la chromatographie sur papier et ensuite sur couches minces ont été introduites, suivies de la spectrophotométrie ultra-violette et infrarouge, puis de la chromatographie gazeuse et liquide hautes performances. Malgré toutes ces évolutions, l'introduction de la spectrométrie de masse a permis ces dernières décades de franchir un pas décisif aussi bien en termes de sensibilité que de spécificité. Ces progrès étaient indispensables du fait de l'évolution des techniques et des produits utilisés à des fins dopantes.

Notamment en termes de sensibilité, les laboratoires sont passés d'une limite de détection de quelques milligrammes par millilitre à quelques fractions de picogrammes par millilitre (pg/ml). Cette évolution s'avérait indispensable pour certains dopants majeurs, mais en revanche d'autres problèmes sont apparus, notamment pour les substances thérapeutiques. En effet, la détection de quelques pg/ml est nécessaire pour des substances telles que certains anabolisants ou des protéines telles que les hormones de croissance ou les EPOs. En revanche, la capacité à mettre en évidence à de telles concentrations des substances thérapeutiques telles que les anti-inflammatoires par exemple est parfaitement inappropriée.

### 1.1. Vers la maîtrise des performances analytiques pour les substances thérapeutiques

Vers les années 1990, des groupes de travail se sont créés afin de pouvoir envisager des solutions à cette situation. Il est rapidement apparu que seules deux solutions s'imposaient :

- Soit en passant par l'adoption de seuils, mais ces derniers sont réservés soit aux substances dites endogènes, c'est à dire secrétées naturellement par l'organisme (cortisol, testostérone, nandrolone etc.), soit aux substances apportées naturellement par l'alimentation du cheval (théobromine, acide salicylique, DMSO etc.). Cette disposition n'est pas apparue souhaitable pour ce qui concerne les substances thérapeutiques afin de ne pas laisser penser qu'une quelconque médication était autorisée lors des compétitions (ce qui est le cas aux Etats Unis par exemple).

- Soit en maîtrisant la sensibilité des techniques de screening employées lors du contrôle antidopage. Ces sensibilités (limites de détection) devant ensuite être harmonisées au plan international. En effet, un principe de base doit être respecté : la probabilité d'être déclaré positif au contrôle antidopage doit être la même dans tous les pays concernés, ce qui est indispensable dans la mesure où les chevaux voyagent souvent pour participer à des compétitions internationales.

C'est donc vers cette deuxième option que ce sont dirigés les groupes de travail, aussi bien dans l'environnement course (trot, galop) que dans celui du monde équestre (FFE, FEI). Cette option permet d'une façon élégante de conserver la notion de détermination qualitative (substances prohibées à toutes concentrations) tout en conservant une maîtrise sur le niveau de détection lui-même en évitant des délais de rémanence des substances thérapeutiques à des niveaux inappropriés.

Après de nombreuses tentatives et errements divers une méthodologie a été mise en place :

- Tout d'abord, il convient de déterminer la concentration inefficace des substances en question en fonction de leurs propriétés pharmacologiques, ce qui permet d'écarter tout argument suggérant qu'un effet quelconque a pu se manifester lors de la compétition. Pour cela, un modèle a été envisagé par PL Toutain (2002). Le principe consiste à évaluer une concentration efficace, déterminée par la posologie recommandée par le laboratoire fabricant et des données pharmacologiques provenant de la littérature publiée ou d'expérimentations.

- Cette concentration plasmatique efficace (Effective Plasma Concentration, EPC) est ensuite transformée en concentration inefficace (Irrelevant Plasma Concentration, IPC) par l'adoption de facteurs de sécurité (50 pour passer d'une concentration efficace à une concentration inefficace et un facteur 10 pour tenir compte de la variabilité biologique), soit 500 en tout.

- Une fois cette concentration plasmatique déterminée dans le sang (IPC) et après mesure du rapport urine/plasma, la concentration inefficace urinaire est calculée (Irrelevant Urine Concentration, IUC).

- Ces deux valeurs sont ensuite prises en compte lors d'une évaluation du risque « risk management » effectuée en commun avec les décideurs politiques et les scientifiques et praticiens concernés. A l'issue de cet exercice, des sensibilités de méthodes harmonisées ainsi que des temps de détection correspondants sont déterminés.

Il a été récemment décidé au niveau international de publier prochainement ces valeurs de screening : International Screening Limits (ISL) pour les courses hippiques et FSL : FEI Screening Limits pour la FEI. Ces dispositions devraient enfin permettre une réelle harmonisation internationale au niveau des laboratoires qui s'avère de plus en plus nécessaire du fait des mouvements de chevaux à travers le monde.

Les temps de détection correspondants, pour certaines substances thérapeutiques, sont d'ores et déjà disponibles sur certains sites tels que ceux de l'EHSCL (European Horserace Scientific Liaison Committee) de l'AVEF (Association Vétérinaire Equine Française) et de la FEI (Fédération Equestre Internationale). Il est à remarquer que ces valeurs peuvent parfois diverger quelque peu d'une discipline à l'autre. Cette disparité s'explique par des évaluations du risque différentes selon qu'il s'agisse de chevaux de courses, souvent plus jeunes et ne participant qu'à un nombre de compétitions plus limité, alors que les chevaux de sports sont souvent plus âgés et participent plus fréquemment (parfois plusieurs jours de suite) à des compétitions.

Ces dispositions devraient maintenant permettre d'éviter au maximum les risques de cas positifs lors des contrôles antidopage, pour les substances thérapeutiques les plus courantes par méconnaissance des délais de rémanence. Il est à nouveau nécessaire de rappeler que la réalisation d'analyses de dépistage (recherche de la molécule employée avant une compétition) est toujours possible en cas de doute quand à l'élimination complète des substances utilisées.

## **2. Les nouvelles approches pour faire face aux nouveaux défis**

### **2.1. Evolutions analytiques récentes et adaptation des stratégies analytiques**

Comme décrit précédemment les techniques analytiques ont considérablement évolué ces dernières années. L'apparition de spectromètres de masse de plus en plus performants a permis de mettre en évidence des substances que l'on croyait indétectables il y a peu de temps encore. C'est par exemple le cas de substances telles que certains corticoïdes ou stéroïdes anabolisants. Cependant, malgré ces progrès considérables, certaines molécules demeurent délicates à détecter pour deux raisons principales, tout d'abord du fait de leur poids moléculaire très élevé (plusieurs milliers de Daltons) ce qui pose des problèmes analytiques qui peuvent malgré tout être surmontés, mais surtout à cause de leur demi-vie très courte ce qui a pour conséquence une disparition très rapide dans les milieux biologiques (sang et urine).

En d'autres termes comment mettre en évidence une substance qui n'existe plus ? Heureusement les codes des courses (ce n'est pas encore le cas des règlements équestres) prévoient la possibilité de s'adresser à des marqueurs secondaires (voir l'article 6 de l'accord international de la FIAH).

Ces textes ouvrent la voie à des approches complètement différentes telles que la transcriptomique, la métabolomique ou encore la protéomique qui sont davantage le reflet de l'effet et du passage de la

substance dans l'organisme. Toutes ces voies dites « omiques » sont encore relativement nouvelles dans le monde du contrôle antidopage. Elles ont été introduites en France depuis maintenant 5 ans. Des études récentes ont cependant montré que leur usage permet, dans certaines conditions, de mettre en évidence l'emploi de substances dopantes bien après leur disparition des fluides biologiques habituels.

## 2.2. Transcriptomique

La transcriptomique est une discipline de la génomique. En effet, au sein de la génomique, il existe deux grandes parties, la génomique structurale associée au séquençage du génome entier et la génomique fonctionnelle qui vise à déterminer la fonction et l'expression des gènes séquencés. L'ensemble des gènes qui s'expriment forme alors le transcriptome : « l'empreinte génique ».

Dans le cadre de la lutte contre le dopage aux substances à faibles durées de vie dans l'organisme tels que l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine (EPO), il a été montré que ces substances continuaient d'exercer des effets prolongés dans les tissus cibles, tel que le sang, en modifiant le niveau d'expression de groupes de gènes cibles : « l'empreinte génique ». Pour le contrôle antidopage, l'objectif n'est plus de détecter la substance dopante elle-même, mais ses effets plus durables sur le niveau d'expression des gènes des cellules sanguines (leucocytes).

Dans ce contexte, différentes expérimentations animales ont été réalisées. En premier lieu, dans le cadre de la lutte contre le dopage à l'EPO humaine recombinante, différentes molécules ont été administrées à plusieurs chevaux (Eprex, Dynepo, Aranesp, Mircera) couvrant ainsi le panel de générations de molécules disponibles sur le marché. En second lieu, une étude conséquente regroupant 16 chevaux, a été réalisée pour lutter contre le dopage à l'hormone de croissance équine recombinante. Dans cette étude, 8 chevaux ont reçu le traitement et les 8 autres ont servi de témoin.

Pour l'ensemble de ces études, les prélèvements sanguins ont permis de mettre en évidence, d'une part des empreintes spécifiques de la prise d'EPO humaine recombinante (26 gènes cibles et 2 gènes de référence), (Bailly-Chouriberry, 2008b ; Bailly-Chouriberry, 2010a ; Bailly-Chouriberry, 2010b) et d'autre part des empreintes spécifiques de la prise d'hormone de croissance équine recombinante (Bailly-Chouriberry, 2008a) (8 gènes cibles et 2 gènes de référence). Au cours de ces études, il n'est pas apparu de gènes capables à eux seuls de caractériser le dopage. En revanche, le recours à l'utilisation de logiciels statistiques performants a permis de développer, par l'usage d'analyses multivariées supervisées ou non, des modèles mathématiques prédictifs permettant de mettre en évidence la prise illégale de ces substances plusieurs mois après la fin du traitement.

Ces techniques sont maintenant introduites en « routine » pour l'élaboration et le suivi du passeport biologique qui est réalisé sur un nombre limité de chevaux.

## 2.3. Métabolomique

Pour sa part, l'approche métabolomique consiste à s'intéresser à l'étude de la variation du profil d'élimination de métabolites (métabolome) susceptible d'évoluer en fonction ou non d'un traitement par une quelconque substance. La métabolomique correspond ainsi à l'étude de l'empreinte urinaire ou plasmatique de molécules du métabolisme équin. Pour interpréter les données obtenues, il est nécessaire de créer des modèles statistiques via des logiciels adaptés permettant de discriminer les échantillons provenant d'animaux ayant reçus des substances illicites d'animaux témoins. Ainsi, un certain nombre de biomarqueurs sont sélectionnés. L'ultime étape de cette étude consiste à identifier les différents métabolites sélectionnés. Dans le cadre du laboratoire, l'outil analytique de choix pour mener à bien cette approche est la spectrométrie de masse en haute résolution. Il y a quelques années, une étude métabolomique a été initiée dans le but d'améliorer le contrôle antidopage de l'hormone de croissance (GH) dans l'urine et le plasma de chevaux en comparant des échantillons provenant d'individus traités avec de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH) et d'individus témoins (Bailly-Chouriberry, 2008a ; Kieken, 2009 ; Kieken, 2011). Aujourd'hui, cette approche métabolomique est utilisée régulièrement dans le cadre du suivi longitudinal. Afin d'étendre cette approche à une discrimination plus générale de l'utilisation de facteurs de croissance, une étude complémentaire réalisée sur d'autres molécules (rpGH, IGF-1) est en cours de développement.

En parallèle, pour un domaine d'application identique, la même approche métabolomique est en cours de développement au laboratoire dans l'optique d'améliorer une nouvelle fois le contrôle antidopage de l'érythropoïétine (EPO) dans l'urine équine afin de compléter les analyses réalisées en couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem par une approche transcriptomique. L'étude porte ainsi sur plusieurs formes d'EPO (Eprex, Dynepo, Aranesp et Mircera). Comme précédemment, le métabolisme des individus traités est affecté. Comme pour l'hormone de croissance, un modèle statistique a été mis en place et nécessite des analyses supplémentaires afin de pouvoir être appliqué dans le cadre du suivi longitudinal.

## Conclusions

Des étapes importantes ont été franchies ces dernières années, de nombreux mythes ont été brisés, le contrôle antidopage est entré dans une phase plus complexe faisant appel à des disciplines plus variées. Cette évolution était nécessaire afin d'éviter de ne sanctionner que « les maladroits » et surtout de ne pas pénaliser inutilement les vétérinaires praticiens dont le devoir est de soigner les chevaux, ni les responsables, entraîneurs ou cavaliers faisant appel à leur services.

## Remerciements

Nous tenons à remercier plus particulièrement l'IFCE pour son soutien financier qui nous a permis de mener à bien de nombreux programmes de recherche.

Les centres d'administration et de prélèvements de Coye la Forêt, de Chamberet et de Toulouse.

## Références

Bailly-Chouriberry, L., Kieken, F., Cormant, F., Martin, P., Grall, M., Mercadier, V., Pinel, G., Garcia, P., Antignac, J., Toutain, P., Pineau, T., Popot, M., Le Bizec, B., and Bonnaire, Y. 2008a. Detection of recombinant equine growth hormone administrations: innovative methods in equine doping control, in *17<sup>th</sup> International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, pp 51-57, R & W Publications (Newmarket) Limited, Antalya, Turkey.

Bailly-Chouriberry, L., Noguier, F., Manchon, L., Piquemal, D., Garcia, P., Popot, M., and Bonnaire, Y. (2008b) Identification of a blood RNA fingerprint to screen for EPO abuse in horseracing, in *17<sup>th</sup> International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, pp 58-64, R & W Publications (Newmarket) Limited, Antalya, Turkey.

Bailly-Chouriberry, L., Noguier, F., Manchon, L., Piquemal, D., Garcia, P., Popot, M. A., and Bonnaire, Y. 2010a. Blood cells RNA biomarkers as a first long-term detection strategy for EPO abuse in horseracing, *Drug Test Anal* 2, 339-345.

Bailly-Chouriberry, L., Noguier, F., Pierrat, F., Glavieux, Y., Piquemal, D., Garcia, P., Popot, M., and Bonnaire, Y. 2010b. Evaluation of mRNA biomarkers in equine EPO doping control, in *18<sup>th</sup> International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, p submitted, R & W Publications (Newmarket) Limited, Queenstown, New Zealand.

Kieken F., Pinel G., Antignac J-P., Monteau F., Paris A C., Popot M-A., Bonnaire Y. & Le Bizec B., 2009. Development of a metabonomic approach based on LC-ESI-HRMS measurements for profiling of metabolic changes induced by recombinant equine growth hormone in horse urine. *Anal Bioanal Chem* 394:2119-2128.

Kieken F., Pinel G., Antignac J-P., Paris A-C., Garcia P., Popot M-A., Grall M., Mercadier V., Toutain P-L., Bonnaire Y., Bizec B. 2011. Generation and processing of urinary and plasmatic metabolomic fingerprints to reveal an illegal administration of recombinant equine growth hormone from LC-HRMS measurements. *Metabolomics*, 7, 1, 2011, 84-93.

Toutain, P.L. and Lassourd, V, 2002. Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentration in post competition samples for drug control in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 34: 3, 242-249.