

Contrôle des substances prohibées chez le chevaux : aspects techniques et nouvelles perspectives

Detection of prohibited substances in horses: technical aspects and new prospects

Par Yves BONNAIRE⁽¹⁾

(communication présentée le 18 novembre 2004)

RÉSUMÉ

Les avancées en matière de contrôle des substances prohibées ont suivi fidèlement l'évolution des méthodes analytiques et de l'instrumentation. Le contrôle est devenu réellement efficace dans les années 1960 avec l'apparition des méthodes de chromatographie, sur papier couches minces, puis en phase gazeuse et enfin en phase liquide à hautes performances. Peu après, l'apparition de la spectrométrie de masse a révolutionné les méthodes de détection en apportant à la fois spécificité et sensibilité. Les différentes étapes du contrôle antidopage qualitatif ou quantitatif sont décrites ainsi que les aspects biologiques, administratifs dans le respect des normes « qualité ».

Les nouveaux défis se situent actuellement dans l'introduction de molécules plus complexes telles que les peptides, dans l'arsenal des substances dopantes. Ainsi, les hormones peptidiques telles que l'hormone de croissance par exemple, représentent un réel défi pour les laboratoires.

Mots-clés : contrôle antidopage, cheval, organisation du laboratoire, recherche.

SUMMARY

Progress in antidoping control has been closely linked with improvements in analytical methods and equipment. Drug testing became really effective in the sixties with the development of paper chromatography, thin-layer chromatography, gas chromatography, and finally high-performance liquid chromatography. Soon afterwards, mass spectrometry revolutionised the detection of drugs by combining both specificity and sensitivity in a single assay. The different steps of qualitative and quantitative antidoping control are described, as well as its biological and administrative aspects defined by recognised quality standards. More complex molecules, such as peptides hormones (e.g. growth hormone) are now being used as doping substances. Their detection represents a real challenge for laboratories today.

Key words: antidoping control, horse, laboratory organisation, research.

(1) Docteur ès Sciences, Laboratoire des courses hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 VERRIERES LE BUISSON

• INTRODUCTION

Le dopage est apparu presque en même temps que la notion de compétition. Dès l'antiquité, on rapporte que les « anciens » utilisaient déjà des décoctions à base de plantes pour améliorer les capacités physiques des athlètes et des animaux. Au 3^e siècle avant J-C, Galien décrit l'emploi de diverses substances par les athlètes pour accroître leurs performances.

Pline le Jeune, au 1^{er} siècle avant J-C, rapporte aussi l'utilisation de décoctions de prêle pour améliorer les performances des coureurs de fond.

Ce n'est que dans les années 1950, avec l'apparition de substances chimiques plus élaborées, que le dopage prend vraiment une importance majeure.

Les athlètes ont sans doute été des précurseurs en matière d'usage de substances dopantes mais les animaux et principalement les chevaux n'ont pas échappé à cette tentation. Le contrôle antidopage est rapidement devenu une nécessité pour garantir l'intégrité des compétitions, pour protéger ou rassurer les parieurs lorsque de l'argent était en jeu, pour protéger les athlètes ou les animaux et enfin pour permettre que la sélection par les performances puisse se faire naturellement sans l'aide de substances susceptibles de masquer des tares ou des défauts.

Comment le contrôle a-t-il évolué ? Les techniques analytiques ont largement progressé depuis ces dernières décennies. Lorsqu'il s'agissait de détecter des substances telles que les alcaloïdes présents en grande concentration dans la salive ou l'urine, les techniques telles que celles des « micro-cristaux » ou les techniques basées sur des réactions colorées, s'avéraient suffisantes en utilisant des réactifs qui paraissent maintenant exotiques comme le réactif de Martini ou les sels d'or. Mais deux phénomènes concurrents, bien que totalement indépendants, ont fait évoluer le contrôle :

- d'une part, l'évolution des pratiques de dopage et l'apparition de nouvelles molécules chimiques actives à de très faibles concentrations, ont obligé les analystes à se doter de moyens de contrôle plus performants et plus sensibles ;
- d'autre part, la nécessité de respecter les droits de la défense a fait en sorte que l'obligation d'apporter la preuve indiscutable de la présence de substances prohibées dans les milieux biologiques, a poussé l'analyste à utiliser des moyens sophistiqués de détection, afin de concilier sensibilité et spécificité. La simple coloration d'un réactif ou l'apparition d'un « spot » coloré sur une plaque de chromatographie ne suffit désormais plus à déclarer un cas « positif » et à défendre, le cas échéant, cette affirmation devant un tribunal ou devant des experts compétents.

Dans cette optique, les techniques se sont peu à peu affinées, l'apparition de la spectrophotométrie a permis d'identifier les molécules par l'enregistrement de spectres d'absorption dans le rayonnement visible, ultra-violet ou infra-

rouge. Ces identifications prêtaient parfois à confusion mais un premier pas était fait. Un tournant majeur a été pris avec l'apparition de la chromatographie. Cette technique de séparation s'est d'abord pratiquée sur papier, sur « couches minces », en phase gazeuse et enfin en phase liquide.

Ces techniques séparatives ont été une étape majeure pour faire apparaître la notion de « couplage », c'est à dire la combinaison d'une méthode séparative couplée à une méthode d'identification. Sont alors apparus les chromatographes en phase gazeuse avec différents détecteurs, à catharomètre, à ionisation de flamme, à capture d'électrons, puis enfin la vulgarisation de la spectrométrie de masse a réellement changé la perspective de la toxicologie analytique. Cette technique d'identification capable de fournir une « empreinte digitale » de la molécule avec une sensibilité extraordinaire a bouleversé la toxicologie analytique.

Les premiers « couplages » avec la chromatographie en phase vapeur sont apparus dans les années 1960 et depuis cette époque, les innovations sont constantes et régulières. Actuellement, les instruments les plus performants permettent d'obtenir des informations structurales à partir de concentrations aussi faibles que des femtomoles.

Comment toute cette technologie s'intègre-t-elle dans la chaîne du « contrôle » ? Voyons succinctement les différents aspects pratiques de cette chaîne. Le premier maillon est le prélèvement du milieu biologique.

Milieux biologiques utilisés en contrôle.

Les milieux biologiques retenus pour les contrôles sont variés ; les règlements ne sont pas limitatifs en la matière, mais parmi ceux les plus couramment utilisés l'urine est un milieu « riche » : les concentrations y sont souvent importantes et les substances prohibées s'y retrouvent souvent sous la forme de leurs métabolites de phase I ou de phase II (conjugués). Le sang, également très souvent utilisé, apporte un complément d'information: on y retrouvera le plus facilement les molécules de fort poids moléculaire, telles que les peptides. Citons également les crins qui sont parfois recueillis, notamment lorsqu'il est nécessaire d'aller rechercher l'historique des traitements subis par l'animal. Pour mémoire, la salive a été longtemps utilisée mais ne l'est plus guère de nos jours.

La collecte du prélèvement sur le lieu de la course ou de la compétition est un événement particulièrement important, elle est le point de départ de la « chaîne d'évidence » et sa parfaite réalisation, tant au plan technique qu'administratif, est prépondérant. Signalons bien entendu que le respect de l'anonymat est indispensable, l'usage de code à barres s'avère à cet effet particulièrement utile. En règle générale, chaque prélèvement est composé de deux flacons scellés individuellement, qui tiennent lieu respectivement d'expertise et de contre-expertise.

Il convient enfin de préciser que les prélèvements doivent être conservés et acheminés dans les meilleures conditions possibles au laboratoire.

Déroulement typique d'une analyse

Une fois le prélèvement parvenu au laboratoire et après enregistrement et vérification des scellés et des documents, l'analyse peut être effectuée.

Le contrôle des substances prohibées comporte deux temps principaux, un dépistage de première intention ou « screening », et une étape de confirmation éventuelle, si la première phase s'est avérée positive ou douteuse.

Screening

Cette première phase est destinée à mettre en évidence la présence éventuelle des substances interdites, si possible avec une grande sensibilité pour les dopants majeurs ou une sensibilité adaptée aux concentrations jugées inefficaces dans les milieux biologiques, pour les substances thérapeutiques dont l'usage est légitime en dehors des compétitions (TOUTAIN et LASSOURD, 2002). Cette étape peut être réalisée par des méthodes peu spécifiques mais sensibles, telles que les tests immunologiques de groupe : on utilise par exemple des anticorps dont la spécificité vise à détecter des familles de molécules comme les corticostéroïdes, voire des anticorps plus spécifiques. Mais elle peut aussi se faire avec des méthodes plus sophistiquées, en tous points identiques à celles utilisées dans l'étape de confirmation que nous décrivons ensuite. On parle alors de screening « instrumental » : la détection peut alors se faire par des couplages GC/MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) ou LC/MS (chromatographie liquide, couplée à la spectrométrie de masse).

Ce type de dépistage se doit de ne pas générer de faux négatifs, mais peut générer des faux positifs, puisqu'une phase de confirmation permettra ensuite de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus.

Confirmation

Cette étape est cruciale car elle doit apporter la preuve irréfutable de la présence, voire de la quantité de la substance prohibée. Afin d'apporter cette preuve d'une manière indiscutable, il est indispensable d'employer une méthode qui prenne en compte l'intégralité de la molécule et qui mette en évidence sa structure. La technique de choix est sans conteste la spectrométrie de masse. Cette méthode d'identification est connue depuis longtemps mais ne s'est vulgarisée que depuis ces dernières dizaines d'années. Son principe général consiste à ioniser la molécule par différents moyens, puis à la briser en fragments significatifs et enfin à mesurer la masse des ions produits, en les faisant passer au travers d'un filtre de masse. Cette opération permet de réaliser une carte d'identité unique de la molécule ainsi analysée. Les moyens mis en œuvre pour l'ionisation sont variés (impact électronique, ionisation chimique, électrospray, APCI, etc.) ; suivant le cas, ils peuvent être très énergiques et fournir un grand nombre d'ions de faible masse moléculaire ou à l'inverse, plus « doux » et davantage respecter l'intégrité moléculaire de la substance. Cette dernière option est davantage réservée à des molécules

fragiles, labiles ou de fort poids moléculaire. Nous en reparlerons plus loin. Le filtre de masse peut être lui aussi de différente nature, de basse résolution (détermination avec une précision d'une unité de masse) ou de haute résolution (précision de plusieurs décimales). Suivant la technologie employée, on rencontrera des filtres de type quadripolaires, magnétiques, des trappes ioniques ou des spectromètres en « temps de vol », ainsi que des appareils hybrides combinant deux types de filtres ou même davantage. Chacun de ces filtres possède des caractéristiques propres qui lui confèrent des propriétés plus ou moins adaptées à telle ou telle détermination (résolution, sensibilité, rapidité etc.).

Citons également la mesure des rapports isotopiques par spectrométrie de masse (IRMS) qui permet la mesure du rapport C13/C12. Particulièrement utile pour distinguer les molécules endogènes des molécules exogènes, cette méthode a été employée en particulier pour la détection de la testostérone dans les milieux biologiques.

Sur un plan pratique, l'étape de confirmation se fait généralement sur une « séquence » bien particulière, c'est à dire d'au moins trois analyses successives portant sur un échantillon « blanc » donc indemne de toutes substances étrangères, puis l'échantillon à analyser et enfin l'échantillon blanc dans lequel on aura ajouté une quantité connue de la substance que l'on suspecte d'être présente dans l'échantillon à analyser.

Cette étape peut être simplement qualitative ou qualitative et quantitative, cette dernière option n'étant réservée qu'aux substances dites à « seuils ».

Confirmation qualitative

Lorsque la simple identification de la molécule est suffisante, seule compte l'aspect qualitatif de la détermination, c'est le cas des substances exclusivement exogènes. La qualité du spectre obtenu, ainsi que l'écart du temps de rétention chromatographique avec celui d'un témoin, doit être compatible avec des normes établies. Des documents résumant ces critères, notamment celui produit par l'AORC (Association of Official Racing Chemist), qui donne des directives précises quant à la tolérance dans les écarts des rapports d'ions entre ceux du spectre de l'échantillon et ceux du spectre témoin de référence ; de plus, la présence d'ions surnuméraires dans ce spectre est également prise en compte dans les critères d'acceptabilité. Des tolérances portant sur les paramètres purement chromatographiques (écarts de temps de rétention) servent aussi à garantir la fiabilité de la détermination analytique.

Tous ces critères doivent être satisfaits avant de pouvoir déclarer un échantillon positif.

Confirmation quantitative

La simple présence d'une substance prohibée n'est pas forcément suffisante pour pouvoir déclarer un cas positif, en effet s'il s'agit d'une substance endogène ou susceptible d'être apportée par l'alimentation normale du cheval, des seuils sont fixés réglementairement et une quantification

est nécessaire. Citons par exemple la testostérone dont la concentration ne doit pas dépasser 20ng/ml pour les hongres ou 55ng/ml pour les femelles non gestantes. Des seuils sont aussi fixés pour le cortisol, la boldénone ou la nandrolone chez le mâle. Pour ces molécules, la méthode analytique utilisée doit avoir été validée préalablement de façon rigoureusement quantitative. La concentration rapportée doit être assortie d'une incertitude de la mesure et doit être supérieure à la valeur seuil indiquée dans le règlement.

Un rapport d'analyse est alors établi et sera transmis aux autorités compétentes pour toute décision disciplinaire. En règle générale, une contre-expertise systématique est réalisée afin de conforter les résultats obtenus sur le premier échantillon.

La qualité dans les laboratoires de contrôle

À côté de l'aspect purement technique, il est également important de respecter l'aspect « qualité » au sein des laboratoires officiels, des normes ont été établies afin de conférer au travail de laboratoire une rigueur et une transparence indispensable. La norme NF EN ISO/CEI 17025 est celle qui s'applique actuellement et qui sert de base à l'accréditation des laboratoires de contrôle. Des organismes nationaux indépendants sont chargés d'accréditer les laboratoires sur cette norme après un audit initial. Des audits réguliers servent ensuite à contrôler périodiquement que les laboratoires ainsi accrédités veillent à maintenir leur système qualité en état et à ce que la traçabilité soit toujours possible.

Recherche et nouvelles perspectives

Le contrôle antidopage des chevaux, tout comme celui des athlètes, est par essence même une discipline évolutive. Nous l'avons laissé entendre dès le début, de nouvelles molécules apparaissent régulièrement et il est nécessaire de faire évoluer parallèlement les moyens mis en œuvre pour leur détection. Depuis quelques années, l'emploi des substances peptidiques a révolutionné les pratiques en matière

de dopage. Citons pour exemple l'hormone corticotrope (ACTH), l'érythropoïétine (EPO) ou l'hormone de croissance (GH). L'abord du contrôle de ces molécules est beaucoup plus complexe et nécessite une approche à la fois biologique et analytique. Plusieurs voies d'approche sont possibles : soit il est possible de s'intéresser à la molécule elle-même, soit l'étude des marqueurs secondaires peut s'avérer plus aisée. Un exemple typique est celui des hormones de croissance. Leur demi-vie étant relativement courte et leur production naturelle étant souvent pulsatile, il s'avère délicat de fixer un seuil portant sur la molécule elle-même. Seule la mise en évidence de formes différentes (isoformes ou différenciation des hormones naturelles et recombinantes) peut être utilisable, mais la fixation d'un seuil portant sur un marqueur secondaire comme par exemple l'IGF1 (insuline growth factor) permet parfois de régler le problème d'une manière plus simple.

L'étude de ces peptides, notamment par spectrométrie de masse, a obligé les analystes à employer des techniques d'ionisation particulières du fait du poids moléculaire élevé (plusieurs dizaines de milliers de daltons) et de la fragilité de ces molécules impliquant des filtres de masse appropriés aux poids moléculaires élevés, tels que les trappes d'ions ou les appareils en « temps de vol ».

À côté de ces molécules biologiques, bien d'autres substances nouvelles synthétiques ou naturelles obligent les laboratoires à entretenir une recherche active et imaginative. Les liens avec le monde universitaire et l'industrie chimique et pharmaceutique sont indispensables, afin de garder une dynamique de progrès nécessaire à un contrôle efficace.

Le but de cet article n'est pas de rentrer dans le détail des méthodes de toxicologie analytiques mais plutôt de souligner les difficultés croissantes que représente le contrôle antidopage des animaux face à l'évolution constante des pratiques de dopage et à la complexité des molécules employées.

BIBLIOGRAPHIE

• BONNAIRE Y, LAFARGE JP (1995) Peptides et dopage : un nouveau challenge pour les laboratoires. *Sciences et Sports*, **10**, 83-85.

• TOUTAIN PL, LASSOURD V (2002) Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentrations in postcompetition samples for drug control in horse. *Equine Vet. J.*, **34**, 242-249.

