

Le contrôle antidopage des animaux, nouvelles perspectives, nouvelles méthodes

Animal doping control, new aspects, new methods

Yves BONNAIRE, Marie-Agnès POPOT, Louis DEHENNIN

L.A.B.-F.N.C.F., 169, avenue de la division Leclerc - 92290 CHATENAY MALABRY

(Reçu le 2 décembre 1999 ; accepté le 13 janvier 2000)

RÉSUMÉ

Les nouvelles méthodes de détection pouvant être mises en place dans les laboratoires sont principalement axées autour des spectromètres de masse de haute résolution, notamment les appareils de temps de vol (TOF) dont la technologie s'est considérablement améliorée ces dernières années. Ces techniques sont susceptibles d'apporter à la fois une meilleure sensibilité et spécificité. En effet l'accroissement de résolution permet d'augmenter significativement le rapport signal/bruit et dans la mesure où la sensibilité de l'appareil n'est pas altérée en conséquence, le gain en terme de capacité de détection est donc important. Dans le même esprit, de nouveaux couplages de chromatographie liquide capillaire/MS/MS, alliant à la fois la résolution chromatographique des colonnes "micro ou nanobore" aux performances des spectromètres en tandem (MS/MS) récents ou des trappes d'ions permettent d'améliorer significativement les limites de détection des xénobiotiques dopants.

Des exemples de détection de stéroïdes anabolisants dans les milieux biologiques équins illustrent ces nouvelles perspectives analytiques.

Le second axe de développement s'articule autour de la prise en compte de marqueurs biologiques qui peuvent être altérés par l'administration de biomolécules telles que les hormones de croissance par exemple. Le problème principal posé par l'administration de ces peptides réside dans le fait que ces molécules elles-mêmes sont difficiles à détecter du fait de leur poids moléculaire élevé et surtout par le fait que leur demi-vie est très courte. Ces deux phénomènes ont pour conséquence de rendre aléatoire la mise en évidence de la molécule elle-même, une solution possible à cela consiste à prendre en compte les marqueurs biologiques altérés par l'administration de l'hormone protéique. Ainsi un exemple basé sur le suivi de ces marqueurs et en particulier de l'IGF1, après administration d'hormone de croissance recombinante au cheval est exposé.

MOTS-CLÉS

Dopage, Chromatographie Gazeuse Spectrométrie de Masse, Anabolisant, Hormone de Croissance.

SUMMARY

Dope testing laboratories need improved sensitivity for some specific drugs such as anabolic steroids. New generation high resolution mass spectrometers, such as Time Of Flight (TOF) or even magnetic sectors systems, can improve dramatically the sensitivity of detection by improving the signal to noise ratio through increase of resolution without decrease of sensitivity.

In the same spirit micro or nanobore capillary liquid chromatography coupled with MS/MS (quadrupoles or ion trap) can lower significantly the limit of detection of some drugs. Examples involving anabolic steroid detection in horse urine are shown.

Another extension of the dope testing concept needs to be taken into account. Biological macromolecules such as erythropoietin (EPO) or growth hormone (GH) can be monitored by their endogenous markers. The half-life of such peptides is so short that their detection in biological fluids remains uncertain. Therefore, the monitoring of such molecules is far more easier by analysing the effect on the biomarkers, significantly altered by the drug. An example of the variation of plasmatic IGF1 by administration of recombinant GH in the horse is given.

KEY-WORDS

Dope testing, Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Anabolic Steroid, Growth Hormone.

Introduction

Les animaux de sport ou de course sont soumis, comme tous les athlètes à des thérapies variées visant soit à restaurer leurs capacités propres, soit à les améliorer artificiellement. Depuis de très nombreuses années, le contrôle antidopage est mis en place, en France comme dans de le monde entier. Ce contrôle a montré clairement son efficacité mais aussi ses limites, il convient donc de l'adapter à la fois aux nouvelles molécules, mais aussi aux nouvelles pratiques dopantes. Ces évolutions impliquent à la fois une amélioration des processus de détection employés dans les laboratoires de contrôle antidopage, mais aussi une extension du concept du contrôle antidopage lui même.

Évolution des méthodes et des appareillages de contrôle.

Ces dernières décennies ont connu l'évolution, voire la révolution dans le choix des méthodes analytiques utilisées pour le contrôle antidopage. La disparition des tests à base de chromatographie sur couche mince au profit des chromatographies en phase gazeuse, puis liquide de haute performance et l'apparition de la spectrométrie de masse ont fait considérablement progresser les performances des tests de contrôle antidopage. Néanmoins, les nouvelles molécules et surtout les nouvelles formes d'administration des agents dopants, comme les cocktails ou l'administration de certaines molécules par voie pulmonaire, impose une sensibilité accrue des tests de dépistage.

Parmi les molécules visées par cet abaissement nécessaire du niveau de détection, les stéroïdes anabolisants figurent en tête de liste. Dans cette classe pharmacologique figure une molécule plus particulièrement délicate à détecter : il s'agit du stanozolol, qui certes n'est pas nouveau, mais sa détection dans les milieux biologiques (1) est difficile pour deux raisons principales. La première est liée à un métabolisme complexe, aboutissant à plusieurs métabolites hydroxylés présents à faible concentration ; le second obstacle rencontré est lié aux difficultés chromatographiques associées à la séparation des dérivés silylés du stanozolol et de ses métabolites.

Nous avons ainsi voulu évaluer, à partir d'échantillons biologiques réels obtenus par administration de cette substance au cheval, les améliorations apportées par l'usage de spectromètres de masse haute résolution (2) ou de couplages faisant appel à la chromatographie liquide de haute performance (3), couplée à la spectrométrie de masse de haute résolution TOF, ou même hybride (Q-TOF), comparativement aux instruments de basse résolution employés quotidiennement dans les laboratoires de contrôle.

Matériel et méthodes.

Instruments :

Les instruments employés lors de cette étude sont les suivants :

1. GC-MS, appareil de basse résolution quadripolaire (Hewlett Packard 5973) ; colonne capillaire HP-5 (25m /0.25mm/0.2µm), splitless, 2µL injectés sur 30µL de réactif .
2. GC-HRMS, appareil magnétique, résolution 10000 (MAT 95, Finnigan THERMOQUEST) ; colonne Ultra1 (17m/0.20mm/0.11µm), split 1/20, 2µl sur 30 µL de réactif injectés.
3. LC-Q-TOF, (quadripole + temps de vol), résolution 5500, source electrospray (Micromass) ; colonne 150 x 2mm, 5µm, C18, méthanol-eau, 150 µL/mn, 20µl sur 400µL de solvant de reprise injectés.
4. µHPLC-MS, triple quadripole, source electrospray (Perkin Elmer Sciex 365) ; colonne 50 x 0.3mm, 3µm, C18, acétonitrile-eau-0.1 % acide formique, 4µL/mn, 5µl sur 400µL de reprise injectés.
5. LC-TOF, temps de vol, résolution 5000, source electrospray (Mariner API-TOF, PE Biosystems) ; colonne 150 x 1mm, C18, méthanol-eau-0.2 % acide formique-4 mM acétate d'ammonium, 50µL/mn, 5µl sur 200µL de solvant injectés.

Protocole expérimental

Une dose de stanozolol (Sigma ref S7132) à raison de 0.8 mg/kg a été administrée par voie orale à un cheval pur sang mâle, les urines ont été collectées pendant 72 h. Deux mélanges (pool) urinaires de 150 mL ont été constitués :

- taux moyen (environ 3 ng/mL, urine de 24 h après administration) ;
- taux faible (environ 1 ng/mL, urines de 36 h et 48 h après administration).

Préparation de l'échantillon :

Cinq mL d'urine ont été extraits en phase solide (cartouche C18) avec élution par le méthanol. Les métabolites glucuro- et les sulfoconjugués ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions (DEAE-Sephadex). Les glucuronides ont été hydrolysés par la β-glucuronidase et les sulfates ont été déconjugués par méthanolyse acide. Les métabolites libres ont été extraits à pH 9 avec de l'éther éthylique et les deux fractions ont ensuite été mélangés. Pour l'analyse GC le dérivé bis(triméthylsilyle) a été formé avec 30µL de réactif silylant.

Un témoin contenant 200 ng de stanozolol, 3'-hydroxystanozolol et 16β-hydroxystanozolol a été analysé dans chaque série.

Résultats Discussion

Les figures 1A (concentration moyenne) et 1B (concentration faible) montrent les fragmentogrammes obtenus à basse résolution sur un appareil HP 5973 avec les ions m/z 457 et 472 caractéristiques du stanozolol, le tracé 1B n'est pas interprétable et est représentatif de la limite de détection qualitative.

Les tracés obtenus sur l'appareil MAT95 sont représentés sur les figures 2A et 2B où le fragmentogramme 2B, réalisé sur la faible concentration, rend encore une interprétation possible.

Les analyses réalisées en couplage HPLC/MS semblent prometteuses, les figures 3A et 3B montrent les résultats obtenus en LC/Q/TOF sur le 16β -hydroxystanozolol. Le pic obtenu à partir de la faible concentration est bien individualisé. Il est à remarquer que ces tracés représentent la somme des ions MS/MS obtenus à partir des ions moléculaires en TOF à une résolution de 5500.

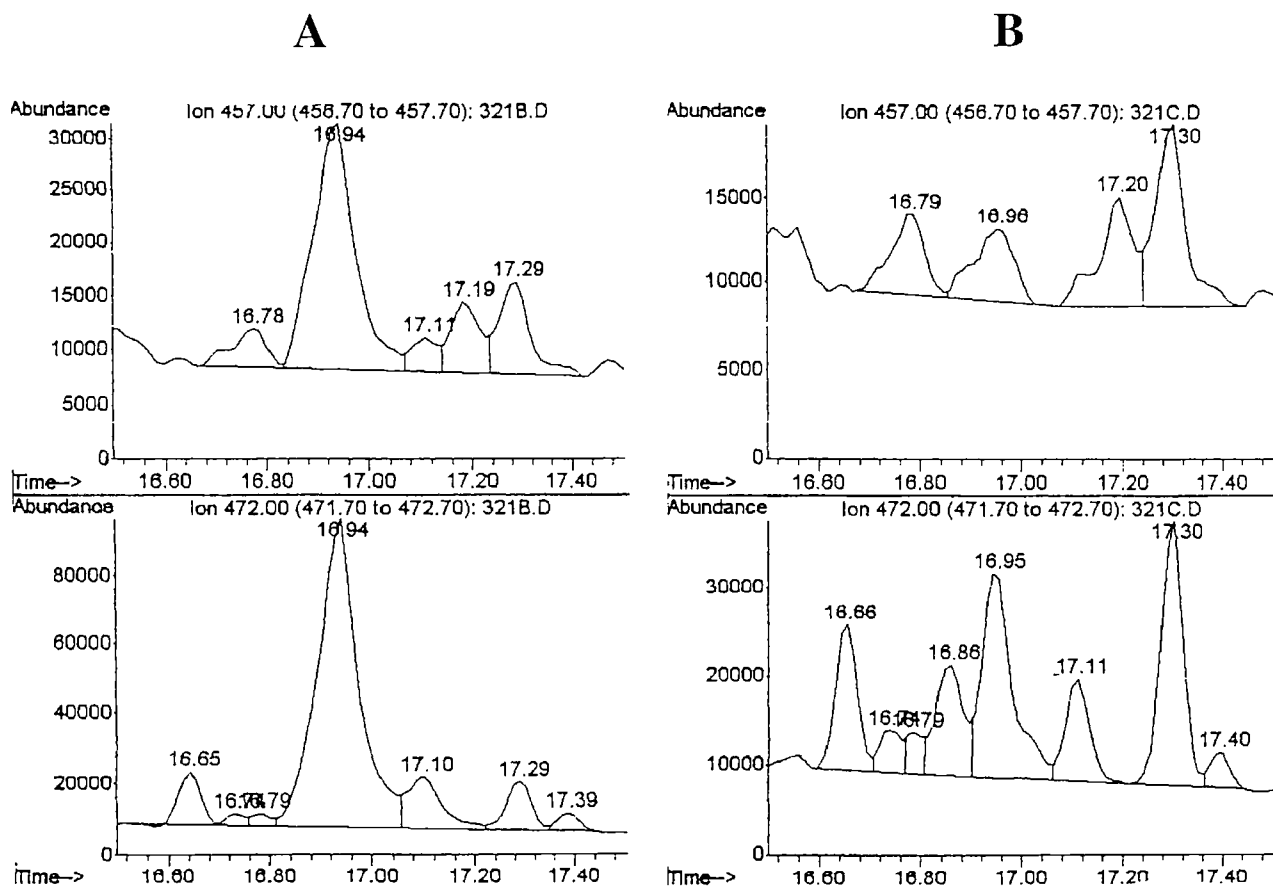
L'analyse par LC/MS/MS sur un triple quadripole représentée sur les figures 4A et 4B est intéressante car elle fait apparaître le 16β -hydroxystanozolol et deux autres dérivés hydroxylés X-OH et Y-OH, dont la

configuration n'est pas entièrement élucidée. La concentration faible montre encore des pics décelables malgré la dilution très importante des extraits chromatographiés.

Enfin les figures 5A et 5B montrent ces extraits analysés en LC/TOF, seule la concentration moyenne est interprétable.

Les cinq types d'analyse ont permis de détecter le stanozolol et ses métabolites dans le mélange à taux moyen. Dans le mélange à taux faible, la détection n'a été possible que par GC-HRMS magnétique, par couplage HPLC capillaire-triple quadripole et par LC-QTOF (par ordre décroissant de performance).

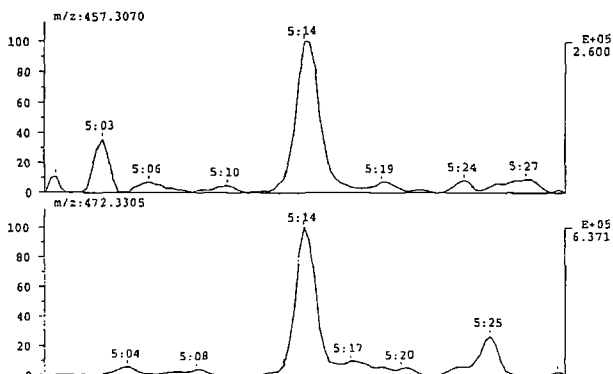
L'amélioration de la détectabilité du stanozolol dans les extraits urinaires destinés aux analyses de dépistage (screening), avec des instruments plus performants que le système de basse résolution classiquement utilisé en dépistage de routine, reste modeste. Cette performance accrue ne pourra atteindre un seuil réellement significatif qu'avec des extraits ayant subi une étape de purification complémentaire, qui permettront aux systèmes de haute résolution de s'exprimer totalement.



Figures 1A et 1B : GC/MS (HP 5973)
 STANOZOLOL, TR = 16,94 mn, ions m/z 457 et 472
 A = concentration moyenne, B = concentration faible

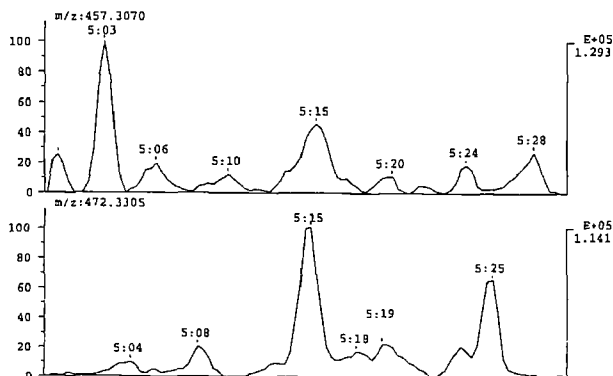
A

CHRO: mhe321b_1 23-Jul-99 Elapse: 01:50.0 1
 Samp: Vial 4 E321B Start: 19:52:26 640
 Com: 200/17/310 # Ultra(17m/0.20mm/0.11um)# Split 1:20 #
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN LR NRM
 Oper: R 10 000 Inlet: GC Vial 4
 Peak: 1.00 mmu Label wndw: 236 > 337 Masses: 455 > 560
 Area: 0, 4.00, 0 Baseline: 30, 3 Label: 3, 10.0



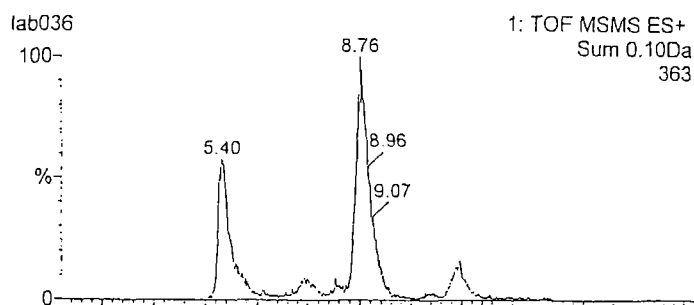
B

CHRO: mhe321c_1 23-Jul-99 Elapse: 03:49.9 1
 Samp: Vial 3 E321C Start: 19:41:05 641
 Com: 200/17/310 # Ultra(17m/0.20mm/0.11um)# Split 1:20 #
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN LR NRM
 Oper: R 10 000 Inlet: GC Vial 3
 Peak: 1.00 mmu Label wndw: 237 > 337 Masses: 455 > 560
 Area: 0, 4.00, 0 Baseline: 30, 3 Label: 3, 10.0

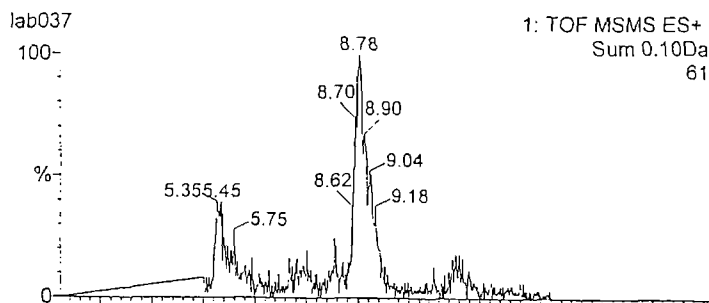


Figures 2A et 2B : GC/HRMS (THERMOQUEST MAT 95)
 STANOZOLOL, TR = 5,14 mn, ions m/z 457,3070 et 472,3305
 A = concentration moyenne, B = concentration faible

A

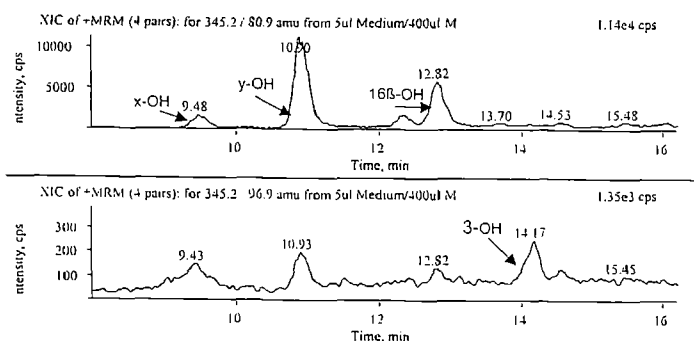


B

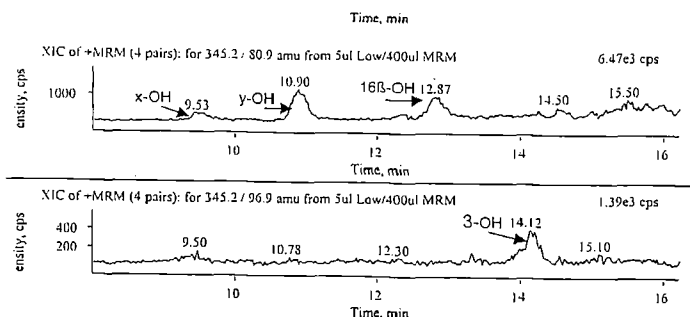


Figures 3A et 3B : LC/Q-TOF (MICROMASS)
 16 β HYDROXYSTANOZOLOL, TR = 8,76 mn et 8,78 mn
 ions m/z 345,26 \rightarrow somme de m/z (81,058 + 95,081 + 121,126)
 A = concentration moyenne, B = concentration faible

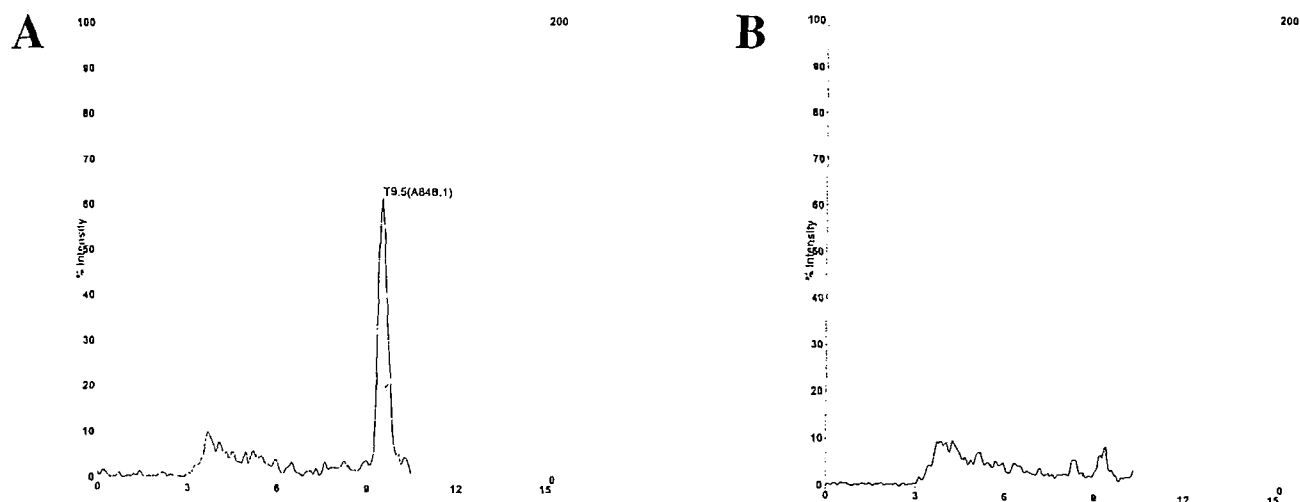
A



B



Figures 4A et 4B : COUPLAGE HPLC CAPILLAIRE/MS TRIPLEQUADRIPOLE
 (PERKIN ELMER SCIEX 365)
 HYDROXYSTANOZOLOLS, TR = 9,48 mn, 10,90 mn et 12,82 mn,
 ions m/z 345,2 \rightarrow 80,9 et 96,9
 A = concentration moyenne, B = concentration faible



Figures 5A et 5B : (PERKIN ELMER BIOSYSTEM, MARINER)
 STANOSZOLOL, TR = 9,5 mn, ion m/z 329,2587
 A = concentration moyenne, B = concentration faible

Évolution du concept de substance prohibée.

Jusqu'à présent seule la mise en évidence de la ou des substances dopantes pouvait être retenue pour matérialiser "un cas positif". Dorénavant l'extension du concept de substance prohibée (article 6 de l'Accord International sur l'élevage et les courses, référence 4) permet de prendre en compte également les "indicateurs scientifiques" prouvant qu'il y a eu administration ou exposition à une substance prohibée. Cette alternative est particulièrement adaptée au cas des hormones peptidiques, telles que l'EPO ou l'hormone de croissance.

Du fait de son action trophique, l'utilisation de l'hormone de croissance est hautement soupçonnée chez les athlètes humains (5). En effet, elle est souvent considérée comme plus active que les stéroïdes anabolisants. De plus, certains athlètes et culturistes l'utiliseraient en association avec les anabolisants pour augmenter la masse musculaire et la force physique.

La détection de son administration doit aussi être une préoccupation des analystes des courses de chevaux. En raison de la demi-vie courte et de la sécrétion pulsatile et accrue après effort physique de l'hormone endogène (6), l'analyse de l'hormone de croissance recombinante équine native ne peut pas résoudre le problème de la détection de son administration. Par contre la quantification de marqueurs endogènes de son administration peuvent constituer la solution. Parmi ces marqueurs, il faut citer l'IGF1, les protéines de transport de l'IGF1 et certains marqueurs osseux. En effet au niveau périphérique, les effets physiologiques de l'hormone de croissance s'exercent par l'intermédiaire

du foie qui produit l'IGF1.

L'IGF1 qui est l'exemple que nous développerons ici, a été étudiée précédemment chez l'homme par Lee *et al.* (7) et Kicman *et al.* (5). Lee *et al.* (7) ont montré l'élévation de l'IGF1 chez des malades traités au long cours par l'hormone de croissance recombinante humaine.

Dans l'étude de Kicman *et al.* (5), des volontaires sains ont reçu pendant trois jours de l'hormone de croissance recombinante humaine. Une augmentation significative de l'IGF1 a été enregistrée. Ils ont ainsi suggéré de prendre en compte ce marqueur pour développer un test de détection de l'administration de l'hormone de croissance chez les sportifs. Chez le cheval, les valeurs basales de ce paramètre ont fait l'objet de quelques déterminations. Malinowski *et al.* (8) ont étudié les effets de l'âge et de la race chez des juments de 1 à 18 ans. La concentration en IGF1 plasmatique varie avec l'âge, augmentant du jour de la naissance jusqu'au 9^{ème} mois pour diminuer ensuite, ces observations étant en accord avec ce qui a été observé chez l'homme et les bovins. Thomas *et al.* (9) ont déterminé les concentrations plasmatiques d'hormone de croissance et d'IGF1 chez des jeunes chevaux "quater horse" et des poneys et ils n'ont pas trouvé de différences entre les deux races.

Dans la présente étude, on se propose d'étudier les concentrations plasmatiques d'IGF1 dans une population de chevaux surveillée et les évolutions de sa concentration plasmatique après administration d'hormone de croissance chez deux chevaux. En ce qui concerne les valeurs basales nous avons étudié les variations de la concentration plasmatique chez trois chevaux prélevés régulièrement.

Matériel et méthode

Variation nycthémerale de la concentration.

Trois chevaux (un mâle, un hongre et une femelle) ont été sélectionnés pour cette étude. Des échantillons ont été obtenus toutes les heures de 5 h à 21 h.

Étude de population.

Des chevaux (170) de l'Institut du Cheval à Pompadour, âgés de 1 à 26 ans, ont été sélectionnés pour cette étude. L'âge et le sexe étaient connus pour tous, la race était connue pour bon nombre d'entre eux.

Administration d'hormone recombinante équine à deux chevaux.

L'hormone "Bresagen" recombinante équine lyophilisée a été utilisée pour cette expérimentation et reconstituée dans de l'eau distillée en une solution à 2,5 mg/ml.

Deux chevaux de 10 et 11 ans ont reçu pendant 14 jours des injections journalières de cette solution à la dose de 18 µg/kg la première semaine et de 25 µg/kg la deuxième semaine. Des prélèvements sont faits un, deux et trois jours avant administration, ensuite tous les jours pendant 35 jours, et enfin 45, 55, et 60 jours après administration.

Type de prélèvements :

Les prélèvements sanguins ont été faits dans des tubes contenant de l'héparinate de lithium. Les prélèvements

ont ensuite été centrifugés à 2 000 tours/mn pendant 20 minutes à température ambiante. Les plasmas sont prélevés immédiatement et congelés jusqu'au moment de l'analyse.

Méthode analytique

L'IGF1 totale a été dosé par dosage radioimmunométrique (IRMA) à l'aide d'une trousse du Laboratoire Biocode (Liège, Belgique).

Cent µl d'échantillon sont préalablement extraits à l'éthanol acide, neutralisé par un tampon TRIS et sont soumis au dosage. Une aliquote de 25 µL de la solution d'extraction sont utilisés pour le dosage. Chaque échantillon a été dosé en double.

Résultats - Discussion

Variation des concentrations basales d'IGF1 pour trois chevaux :

Le suivi des concentrations d'IGF1 pendant 18 heures est résumé dans le tableau 1 et montre que ce paramètre est stable chez les chevaux de sexe différent au cours d'un cycle de 18 heures à la différence de l'hormone de croissance elle-même, aussi bien chez la femelle que l'étalon (6).

Étude de population

Considérant la population dans son ensemble, la moyenne est de 299 ± 96 ng/ml avec un maximum de 550 ng/ml et un minimum de 55 ng/ml. L'étude des valeurs de concentrations par classe d'âge est donné dans le tableau 2

Tableau I : Étude des concentrations plasmatiques en IGF1 au cours du cycle nycthémeral.

	Moyenne (ng/ml)	Écart type (ng/ml)	Minimum (ng/ml)	Maximum (ng/ml)
Cheval 1	210	15	165	225
Cheval 2	279	51	170	279
Cheval 3	266	36	190	266

Tableau II : Concentrations plasmatiques en IGF1 par âge ou classe d'âge.

Age ou intervalle	1	2	3-4	5-10	11-28
n	27	25	34	35	49
Moyenne (ng/ml)	333	349	328	282	248
Écart-type (ng/ml)	107	89	87	81	83
Minimum (ng/ml)	185	245	200	55	160
Maximum (ng/ml)	449	550	535	465	480

Moyenne : 299±96 ng/ml

Concentration d'IGF1 après administration d'hormone recombinante équine.

Après administration d'hormone recombinante équine, chez deux chevaux de 10 et 11 ans, les concentrations maximum observées d'IGF1 étaient respectivement de 708 ng/ml et 844 ng/ml. Le maximum est observé pendant un temps court. Le retour à des valeurs physiologiques chez ces chevaux apparaît avant la fin de l'administration. Cette étude est en cours d'évaluation chez des chevaux plus jeunes.

L'étude d'autres paramètres est en cours d'investigations : protéines de transport de l'IGF1 principalement les BP1, BP3 et marqueurs osseux comme l'ostéocalcine et la fraction osseuse de la phosphatase alcaline.

Ces résultats sont préliminaires et montrent bien la difficulté de fixer des normes susceptibles de s'appliquer à toute une population, en conséquence il est probable que la solution réside dans un concept multi-factoriel, placé lui même dans le cadre d'un contrôle continu de l'animal. Ce concept est aussi connu sous le vocable de contrôle longitudinal des athlètes.

En conclusion, il paraît évident que le contrôle antidopage est à un carrefour et la route à prendre est longue et coûteuse. Il ne convient pas de renoncer au travail effectué auparavant mais il faut le compléter et l'enrichir avec un concept plus global alliant à la fois toxicologie et biologie endocrinienne.

Remerciements

Dr P. Delahaut, CER, Laboratoire d'Hormonologie, Marloie, Belgique ; Dr J. Closset, Université de Liège, Belgique ; Dr S. Horning, Thermoquest Bremen, Allemagne ; Pr G. Moneti, CISM, Université de Florence, Italie ; Dr B. Casetta, PE Biosystems, Trieste, Italie ; Dr G. Kearney, Micromass Applications Laboratory, Manchester, Grande Bretagne.

Références

1. De Brabander H.F., De Wasch K., Van Ginkel L.A. et al. Multi-laboratory study of the analysis and kinetics of stanozolol and its metabolites in treated calves. *Analyst*. 1998 ; 123 : 2599-2604
2. Schänzer W., Delahaut P.H., Geyer H., Machnik M., Horning S. Longterm detection of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography / high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 1996 ; 687 : 93-108
3. Mück W.M., Henion J.D. High performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry: its use for the identification of stanozolol and its major metabolites in human and equine urine. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1990 ; 19 : 37-51
4. Accord International sur l'élevage et les courses et annexes. Fédération Internationale des Autorités Hippiques de Courses au Galop. 46, Place Abel Gance - 92655 Boulogne.
5. Kicman A.T., Miell J.P., Teale J.D. et al. Serum IGF-1 and IGF binding proteins 2 and 3 as potential markers of doping with human growth hormone. *Clin. Endocr.* 1997 ; 47 : 43-50.
6. Thompson Jr D.L., Rahmanian M.S., De Pew C.L. et al. Growth hormone in mares and stallions : Pulsatile secretion response to growth hormone-releasing hormone, and effects of exercise, sexual stimulation and pharmacological agents. *J. Anim. Sci.* 1992 ; 70 : 1201-1207.
7. Lee P.D.K., Durham S.K., Martinez V. et al. Kinetics of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein responses to a single dose of growth hormone. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1997 ; 82 : 2266-2274.
8. Malinowski K., Christensen R.A., Hafs H.D., Scanes C.G. Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF)-I and binding proteins in female horses. *J. Anim. Sci.* 1996 ; 74 : 1936-1942.
9. Thomas M.G., Bennett K., Wimbush P., Keisler D.H., Loch W.C. Plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-I in prepubertal quarter horses and ponies. *J. of Equine Vet. Sci.* 1998 ; 18 : 52-55.