

Patrick MAGALOFF

Nous nous plaçons pour l'exposé suivant dans le cadre de la lutte contre le dopage. La société Skuld-Tech en relation étroite avec l'Université de Montpellier travaille avec les plus éminentes structures scientifiques d'Australie, des Etats-Unis et de France, en relation avec l'Agence Mondiale Antidopage, sur le sujet (et d'autres) de cette intervention.

Marqueurs moléculaires sanguins de la prise d'EPO chez les sportifs

Docteur David PIQUEMAL
Société Skuld-Tech

Je vais aborder le thème de l'impact de rHuEPO dans les cellules sanguines, de mon point de vue de biologiste moléculaire. Je présenterai d'abord les outils nous ayant permis d'effectuer notre analyse, puis je vous ferai part de deux études précédemment menées. La première concerne la sélection des biomarqueurs spécifiques de la prise de stimulants de l'érythropoïèse (Aranesp), la deuxième concerne la validation des biomarqueurs lors de la prise de micro-doses d'érythropoïétine (Eprex).

1. Le transcriptome

Nous travaillons sur le transcriptome, qui est l'étude de l'ensemble des gènes exprimés dans une cellule. Cela nous permet de sélectionner des marqueurs permettant de développer des outils dans le cadre d'un diagnostic. Nous travaillons à détecter la stimulation dans les cellules sanguines ou non par la prise d'EPO.

A partir de cette question biologique et d'une base d'environ 30 000 gènes, nous effectuons une première sélection d'une centaine de gènes grâce à la technique SAGE (analyse sérielle de tous les gènes exprimés). Afin de gommer les variations interindividuelles qui ne seraient pas liées à la prise d'EPO, nous travaillons sur des *pools* de sang d'individus. Un second outil est alors mis en œuvre : la PCR en temps réel. Il permet de mener à une sélection finale de biomarqueurs ; environ une trentaine de biomarqueurs permettent de détecter la stimulation ou non par la prise d'EPO.

a. Technique SAGE

Entre le gène et son outil (la protéine), se trouvent des molécules intermédiaires, les ARNm. La technique SAGE consiste à extraire de chaque ARN messenger une petite signature (sous la forme d'une séquence). Lorsqu'on établit la comptabilité des signatures de gènes, on observe un écart entre un individu n'ayant pas pris d'EPO et un individu en ayant pris.

Le nombre de signatures extraites s'établit autour de 40 000 à 50 000 ARN messagers. Dans une deuxième phase, ces gènes sont annotés, c'est à dire qu'on leur donne un nom.

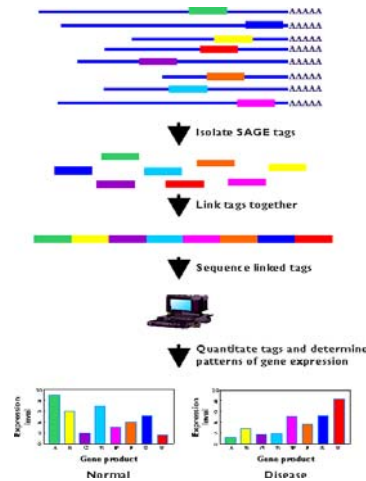
SAGE : principe

cDNA synthesis and enzymatic digestion for generated short sequences (tags)

Concatemer formation and massive sequencing

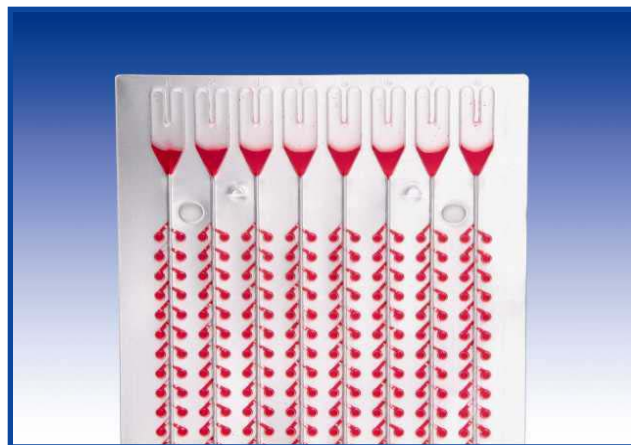
Bioinformatic analysis

Gene identification and analysis of gene profiling



b. PCR en temps réel

Nous utilisons pour notre part la plate-forme TaqMan® Low Density Arrays pour la PCR en temps réel. Des cartes de 396 puits (microréacteurs de 2 microlitres) permettent de réaliser une analyse simultanée de 396 gènes. L'avantage est qu'une faible quantité de sang suffit, et que ces systèmes sont très largement automatisés et reproductibles.



TaqMan® Low Density Arrays

2. Etude ARANESP

En 2004, un premier travail a été financé par l'USADA et l'AMA. Il a porté sur la molécule ARANESP. Le but était de caractériser des gènes régulés dans les cellules sanguines lors de la prise d'ARANESP, afin d'identifier une première série de biomarqueurs potentiels.

Le deuxième but était de développer un outil de détection fiable et rapide pour la détection de la prise d'EPO et le suivi de la santé du sportif.

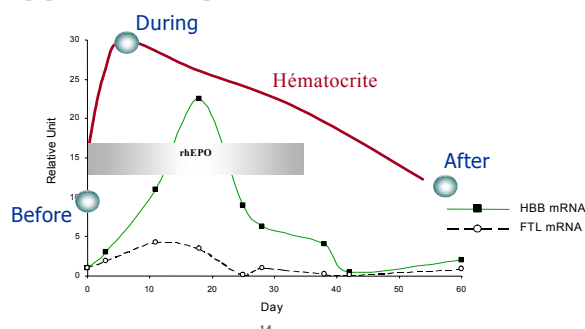
L'étude a été réalisée grâce à 14 individus (7 femmes et 7 hommes) qui ont pris de façon volontaire de l'EPO. Nous avons étudié le contrôle avant traitement, pendant les injections, et jusqu'à plusieurs jours après les injections. L'administration faite aux individus a maintenu le taux d'hématocrite à plus de 47 % chez les femmes et à 50 % chez les hommes. Les sujets ont reçu en moyenne 51.1 ± 2.8 g NESP, correspondant à 0.72 ± 0.01 g/kg. Sachant que 1g de NESP correspond à 200 IU d'EPO recombinante humaine (rHuEPO), les sujets ont ainsi reçu entre 6.000 et 12.000 IU rHuEPO (ARANESP) par semaine. Le protocole prévoyait deux injections par semaines pendant un peu plus d'un mois. On a observé l'hémoglobine et la chaîne légère de la ferritine.

Les inductions de gènes effectivement observées se déroulent sur des périodes temporelles assez courtes, et par ailleurs la marge d'erreur est importante, ce qui justifiait de recourir à une analyse SAGE sur les 30 000 gènes accessibles.

ARANESP : R&D

SkuldTech

Approche expérimentale

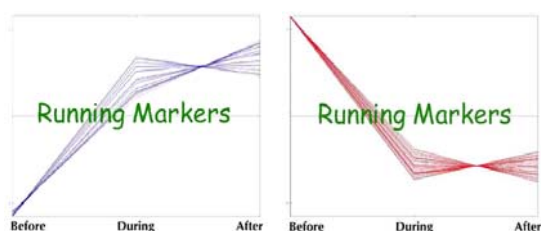


Les résultats nous ont permis de déterminer 154 gènes ou EST (fragments de gènes non encore connus). Il existait deux types de marqueurs : ceux qui étaient induits par la prise d'EPO et demeuraient à un niveau élevé même 17 jours après la prise, et ceux qui étaient inversement diminués et demeuraient à un niveau assez faible. La plupart des marqueurs étaient des gènes induits au cours de la stimulation. D'autres types de marqueurs avaient été conservés, par exemple les gènes qui n'étaient inclus que pendant la prise d'EPO ou au contraire réprimés pendant la prise, ou bien encore induits ou réprimés après la prise d'EPO.

ARANESP : résultats

SkuldTech

1^{er} résultats : 154 gènes et ESTs



ARANESP : résultats

SkuldTech

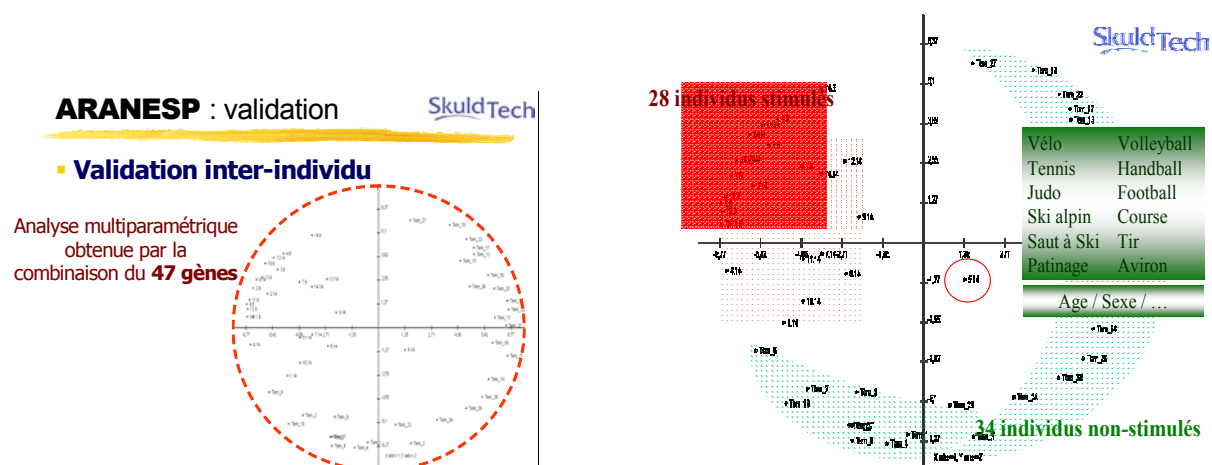
1^{er} résultats



Des filtres ont alors été imposés par informatique. L'EPO rime directement avec l'hématopoïèse, c'est à dire qu'on a retrouvé à peu près sur toutes les cellules sanguines des marqueurs de ces différents types cellulaires. L'EPO a donc un effet beaucoup plus large que sur le réticulocyte, ce qui a été confirmé dernièrement par différents travaux, lesquels indiquent la présence du récepteur de l'EPO dans le macrophage ou le réticulocyte.

D'autres filtres ont été appliqués parce qu'il ne fallait pas confondre le gène régulé par l'EPO avec le gène régulé dans le cas d'une inflammation, ou dans le cas d'autres pathologies.

La deuxième phase était la validation inter-individus, qui se réalise par la PCR en temps réel. Il n'est pas possible pour l'instant, à partir d'un seul gène, de déterminer si l'individu prend ou non de l'EPO. L'analyse multiparamétrique est obtenue par la comparaison de 47 gènes entre une population stimulée et une population non-stimulée.



3. Etude EPREX

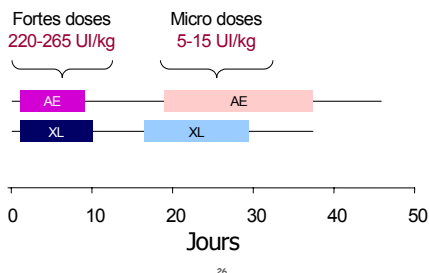
L'étude suivante a été financée par Le Conseil de Prévention et de Lutte contre le Dopage devenu aujourd'hui l'Agence Française de lutte contre le Dopage. Elle a été réalisée pendant ces six derniers mois et a concerné la molécule EPREX. La technique utilisée n'a pas été le SAGE – puisque nous avons déjà sélectionné des biomarqueurs. L'étude a été étendue à 95 biomarqueurs, contre 47 précédemment. L'étude nous a permis de vérifier si ce que nous avons mesuré précédemment était spécifique de l'ARANESP ou de l'érythropoïétine en général. L'étude a également visé à savoir s'il était possible de détecter un sportif sous l'effet de micro-doses. Un objectif était également, comme précédemment, d'obtenir des éléments de suivi de la santé du sportif.

L'approche expérimentale a été menée uniquement auprès de 2 individus sur une période de 38 à 47 jours. Les deux sportifs ont pris de fortes doses d'EPREX pendant quelques jours, puis des micro-doses.

EPREX : R&D



■ **Approche expérimentale : 2 individus**

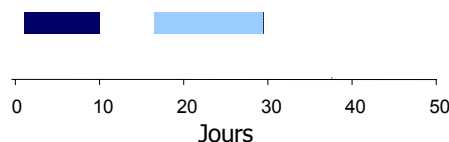


26

EPREX : R&D



■ **Approche expérimentale : suivi bihebdomadaire**



27

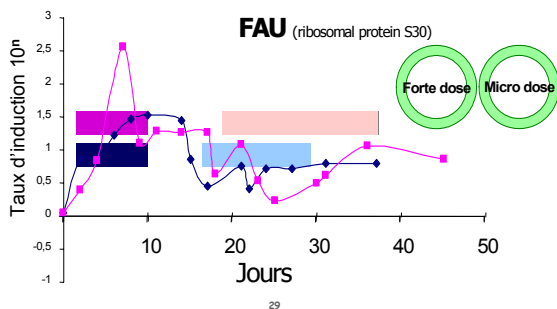
Un suivi bihebdomadaire était réalisé. Les résultats montrent entre autres, comme attendu, qu'on assiste à une explosion du pourcentage de réticulocytes, et à une descente en dessous du seuil de 1 dans le cas de microdoses. Par PCR, nous avons réussi à différencier deux groupes de biomarqueurs.

Nous nous sommes aperçus qu'avec le premier groupe de biomarqueurs, les sportifs réagissent comme attendu en cas de fortes doses à la prise d'EPREX ; en revanche en cas de faibles doses, nous sommes incapables de déterminer à partir du premier groupe de biomarqueurs si le sportif prend ou non des microdoses d'EPO. Heureusement, avec le deuxième groupe de biomarqueurs, on a assisté en cas de fortes doses à une induction assez puissante du gène et également à un niveau d'expression élevé du gène en cas de faibles doses. Nous nous sommes surtout aperçus qu'avec le second groupe de biomarqueurs, même lorsque l'effet des microdoses était terminé, on assistait toujours à un niveau élevé d'expression une dizaine de jours après la première injection de microdoses. Ces biomarqueurs sensibles aux fortes comme au faibles doses représentent 50 % des gènes, soit un nombre de 47 marqueurs.

EPREX : résultats



■ **1^{er} résultats : 2 groupes de biomarqueurs**

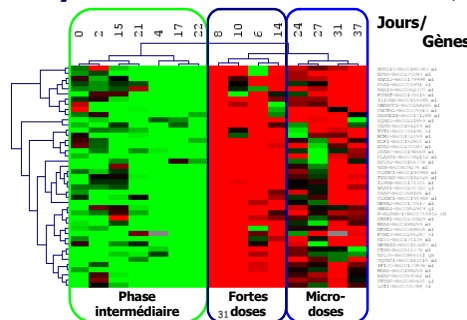


29

EPREX : résultats



■ **Analyse multifactorielle : 47 biomarqueurs**



Pour les analyser, nous faisons appel aux statistiques. Un premier tri statistique a permis de rassembler les profils d'expression. A partir de seuils de 1 %, nous avons isolé des marqueurs. Les deux groupes faibles/fortes doses se différencient parfaitement.

Je tiens à signaler que Michel AUDRAN nous a particulièrement aidés, notamment dans l'étude sur l'EPREX

Questions-réponses avec l'amphithéâtre

Olivier HERMINE, professeur des Universités

Vous avez déclaré que des gènes étaient induits à différents moments dans tous les types cellulaires au-delà des réticulocytes. Avez-vous renouvelé les mêmes expériences *in vitro* en

étudiant séparément ces types, afin de déterminer si l'érythropoïétine induisait des gènes particuliers ? Car vos résultats suggèrent que des mécanismes indirects retentissent sur des gènes *in vivo*, qui retentissent sur l'activation des leucocytes et des macrophages. Par ailleurs, le système sur l'EPREX a-t-il été validé à partir des réticulocytes ou à partir du sang total ?

David PIQUEMAL

Nous travaillons sur le sang total, dans l'optique des tests de détection puisqu'il n'est pas possible de demander à un sportif de réaliser au bord du terrain une purification des cellules sanguines.

S'agissant de votre première question, les connaissances à ce jour ne permettent pas de savoir s'il existe une action directe de l'EPO sur les cellules citées ou bien s'il s'agit d'une communication intracellulaire entre les macrophages et les leucocytes.