

Méthodes indirectes de détection dans la lutte contre le dopage

Professeur Michel AUDRAN
Laboratoire de biophysique & bio analyses
Faculté de Pharmacie de Montpellier

I- Limite des méthodes directes dans le dépistage du dopage

Le dépistage du dopage est basé sur la mise en évidence, dans l'urine ou le sang, des substances interdites ou de leur(s) métabolite(s). Cette approche, bien qu'indispensable, présente un certain nombre de limites. Par exemple il n'existe pas de méthode de dépistage pour toutes les substances interdites (IGF-1, insulines, ACTH,...). De plus, la fenêtre de détection des substances ayant une demi-vie courte telles que la l'hormone de croissance (GH) ou l'érythropoïétine (EPO) est réduite, la détection de la prise de faibles doses de testostérone est difficile à déceler, il est souvent impossible de savoir si les substances bénéficiant d'une AUT allégée ont ou non été prises par les voies autorisées, il est parfois difficile d'établir des critères de positivité (biosimilaires de l'EPO), ...

Ceci explique pourquoi le nombre de cas positifs est aussi faible (aux environs de 2 à 3%) même en effectuant des contrôles inopinés.

Les méthodes indirectes, basées sur l'observation de paramètres biologiques dont les variations anormales sont liées à la prise d'une substance ou d'une classe de substances, pourraient dans certains cas suppléer à ces insuffisances. Cette éventualité est d'ailleurs évoquée dans le code antidopage (présence de marqueurs). Mais les résultats comportent toujours un risque d'erreur et de ce fait sont donnés avec un seuil de probabilité de faux positifs (1/100, 1/1 000, 1/10 000,...).

II- Application des méthodes indirectes à la détection du dopage sanguin

La première tentative d'utilisation d'une méthode indirecte dans le contrôle antidopage remonte aux Jeux Olympiques de Sydney (2000) et concernait le dépistage de l'EPO (Parisotto et al.).

La prise d'EPO conduit à l'augmentation de la masse de globules rouges et donc de l'hématocrite et de l'hémoglobine, du nombre de globules rouges immatures (macro-hypo) mais également de la concentration plasmatique de l'EPO et de celle du récepteur soluble de la transferrine.

	Htc & Hb	EPO	sTFR	%macro	Ret
pendant					
après	élevés	bas	bas		bas

Après le traitement l'hématocrite et l'hémoglobine restent élevés alors que les réticulocytes et la concentration sérique de l'EPO chutent en dessous des valeurs normales. Ces observations avaient conduit à l'élaboration de deux modèles mathématiques, modèle « ON » et modèle « OFF »

$$\text{ON-model} = 3.721\text{Htc} + 0.1871 \ln(\text{EPO}) + 0.1267 \ln(\text{sTFR}) + 0.115 \ln(\%macro + 0.1)$$

$$\text{OFF-model} = 6.149\text{Htc} - 92.87\text{RetHtc} - 0.4631 \ln(\text{EPO})$$

susceptibles de mettre en évidence les tricheurs (score >2.62 chez les hommes >2.47 chez les femmes pour le ON modèle, score >2.24 chez les hommes > 2.08 chez les femmes pour le OFF). Bien que validés sur une population de plus de 1000 athlètes de haut niveau, ces modèles manquaient de sensibilité et ne pouvait détecter que des cas caricaturaux de dopage à l'EPO.

Ils furent améliorés par la suite (modèle de deuxième génération de Gore et al.), mais le dépistage de l'EPO dans l'urine rendit inutile l'usage du modèle « ON », et seul le modèle « OFF » devenu « OFF score »,

$$\text{OFFhr} = \text{Hb} - 60\sqrt{(\text{Ret}\%)}$$

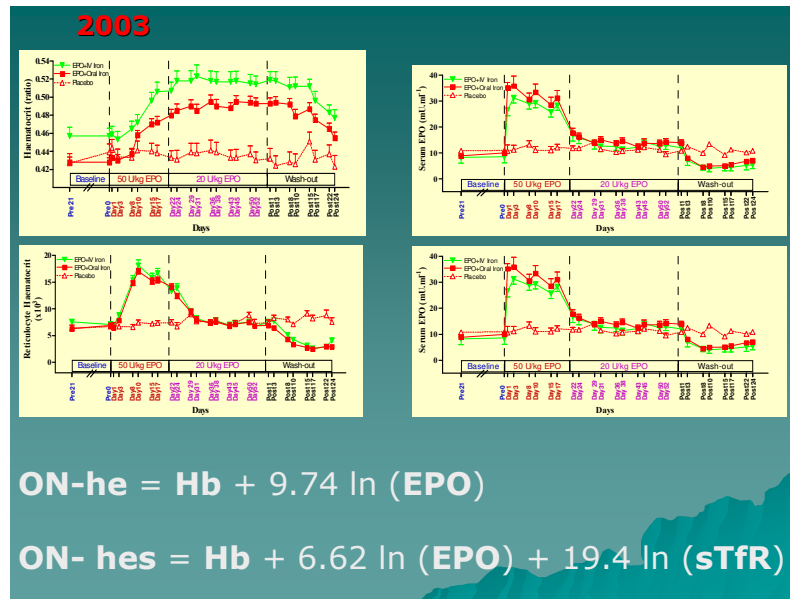
Seuil de 1/1000 Homme ... 125,6 Femme.....113,5

Seuil de 1/10 000 Homme133.2 Femme.....121.4 (hors séjour en altitude)

fût utilisé notamment par l'union cycliste internationale (UCI) dans ses règles de « No start » (ce modèle permettant aussi de détecter une transfusion sanguine).

Cependant, le calcul des seuils tenant compte des variations interindividuelles, ce modèle manquait encore de sensibilité (trop de faux négatifs).

La première étude de faisabilité d'un passeport hématologique pour les athlètes a été proposée en 2003 par L Malcovati. Elle a mis en évidence l'importance des variations inter individuelles des paramètres hématologiques et a conclu à la nécessité de déterminer un domaine de « valeur normales » de ces paramètres pour chaque individu.



Cette idée fût reprise par Sharpe, Ashenden et Schumacher (2006) qui proposèrent un modèle dit de troisième génération consistant à comparer la valeur de l'hémoglobine et/ou du « OFF score » d'un athlète donné à la moyenne de ses valeurs mesurées précédemment :

$$\text{Hbz-score} = (\text{Hbcurrent} - \text{Hbmean}) / \sqrt{(\sigma^2(1+1/n))}$$

proposant que un Zscore $\geq +3.09$ (correspond à un seuil de 1/1000) soit sanctionné par un « No start » .

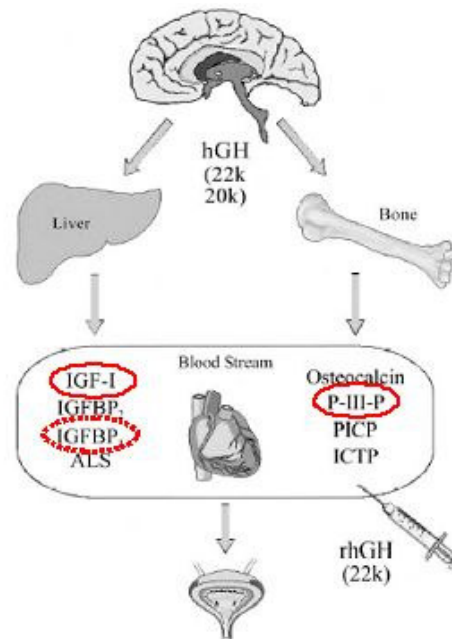
Ce modèle (qui existe aussi avec le OFFhr-score) tient compte des variations intra individuelles (σ) et s'avère plus sensible que les précédents.

L'année dernière l'équipe Suisse du laboratoire de Lausanne proposa une nouvelle approche « the forensic approach ». Dans cette approche, l'effet du dopage n'est plus associé directement à une modification de la valeur du marqueur, mais indirectement à travers la modification de la moyenne et de la déviation standard de ce marqueur. Cette approche multiparamétrique, permet de tenir compte de facteurs pouvant affecter le paramètre choisi. C'est aujourd'hui la meilleure approche possible tant du point de vue de la spécificité que de la sensibilité. C'est la méthode utilisée pour la mise en place du « passeport hématologique », Neil Robinson va vous expliquer tout cela.

III- Méthodes indirectes et dépistage de l'hormone de croissance

Dès 2000, une approche identique, financée par le Comité International Olympique et l'Europe (projet GH 2000) a été expérimentée pour détecter l'hormone de croissance. Le test direct (test sanguin), utilisé lors des Jeux Olympiques d'Athènes et de Turin, n'existait pas encore. Mais cette approche présente toujours un intérêt car la fenêtre de détection du test sanguin, compte tenu de la demi-vie de la GH, est faible (24-36h).

Différents marqueurs ont été étudiés : ceux de l'effet de la GH sur le foie (IGF-1, IGF-BPs) ceux de l'effet de la GH sur le métabolisme osseux (procollagène type III, carboxy-terminal propeptide de type I procollagène, carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen).

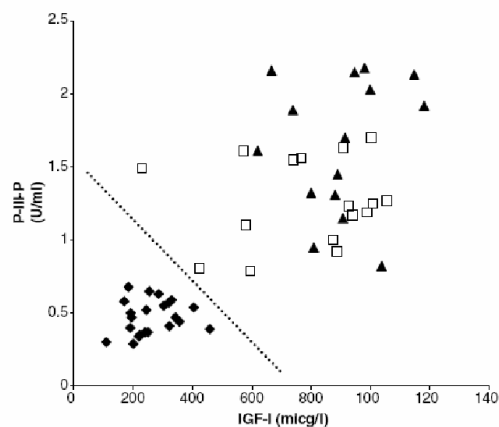


Dans cas encore, il est nécessaire de combiner les paramètres afin de minimiser l'effet de la variabilité inter individuelle. Deux modèles ont été proposés, l'un à partir de la détermination de l'IGF-1 et du procollagène de type III (team GH 2000), l'autre incluant en plus la mesure d'une classe de protéines de liaison de l'IGF (IGF BP 3) (team Kreischa).

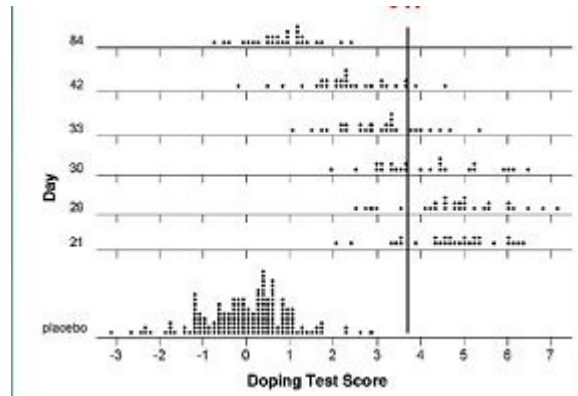
Tout récemment le premier modèle a été affiné en tenant compte en plus de l'âge des sujets (ce qui permet de diminuer de façon notable la variabilité inter individuelle).

$$\text{Men} = -6.586 + 2.905 \log(\text{III-P-III}) + 2.100 \log(\text{IGF-I}) - 101.737/\text{age}$$

$$\text{Women} = -8.459 + 2.454 \log(\text{III-P-III}) + 2.195 \log(\text{IGF-I}) - 73.666/\text{age}$$



Le seuil de positivité choisi (score de 3,7 pour un risque d'erreur de 1/10 000) permet, d'après les auteurs, de détecter 86% des hommes et 60% des femmes recourant à un traitement à la GH, ce qui, sans être satisfaisant, est un premier pas encourageant. Après traitement, ce taux chute rapidement pour n'être que de 20% environ deux semaines après la dernière prise.



Cependant cette approche souffre de deux inconvénients. Le premier est lié au fait que la détermination des marqueurs se fait par dosages immunologiques et que dans ce cas deux dosages avec des anticorps différents doivent être validés. Or, on sait que les valeurs trouvées ne sont pas rigoureusement les mêmes lorsque l'on change de type d'immunodosage.

Le second problème est qu'il va falloir discriminer entre la variation de ces paramètres à la suite de la prise de GH et la variation de ces paramètres à la suite de blessures ou d'éventuelles conditions pathologiques.

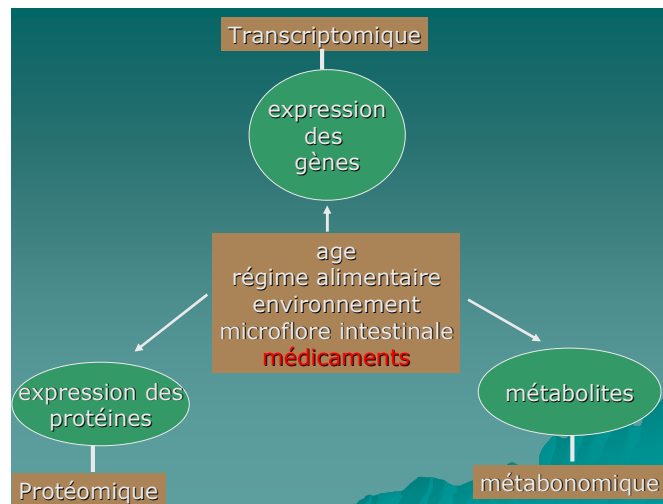
IV- Nouvelles technologies et lutte antidopage

J'ai volontairement renoncé à évoquer le dépistage de la prise des anabolisants à partir de l'étude du profil urinaire stéroïdien. Il me semble que les choses ne sont pas encore bien claires dans ce domaine, mais des propositions ne vont pas tarder à sortir : il faut trouver un moyen de pallier au manque de sensibilité du rapport testostérone/épitestostérone (T/E) quant à la détection des faibles doses de cette hormone (patch, gels).

En revanche je souhaiterais, pour terminer cette présentation, vous présenter deux nouveaux types d'approches indirectes qui pourraient, dans un proche avenir, venir renforcer la lutte antidopage.

Ces techniques se fondent sur le fait que la prise de médicaments (ainsi que celle d'un certain nombre de paramètres tels que l'âge, le régime alimentaire, l'environnement, la microflore intestinale,...) exerce une influence sur l'expression de nos gènes, de nos protéines, et sur le métabolisme cellulaire.

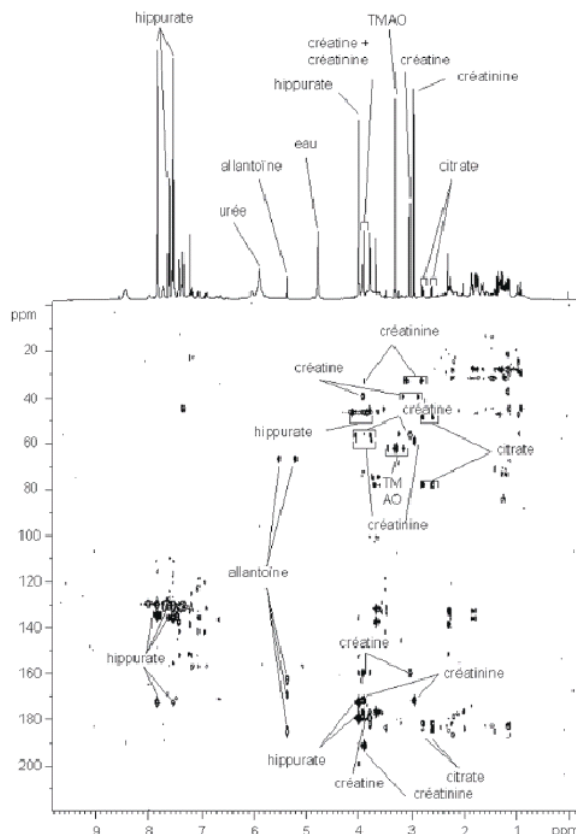
Ces deux méthodes indirectes, l'une basée sur la modification du métabolisme général, l'autre sur la modification de l'expression de gènes, à la suite de la prise de substances médicamenteuses sont soutenues par l'Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD) et l'Agence Mondiale de Lutte contre le Dopage (AMA).



1- La métabonomique

Cette méthode consiste à l’exploration la plus exhaustive possible du métabolisme (nucléosides, vitamines, antioxydants, catécholamines, ...). Méthode pluridisciplinaire, elle associe la physiologie, la biochimie, la chimie analytique ainsi que la statistique et permet de déceler les différenciations métaboliques d’origine génétique, pathologiques, dues à l’alimentation ou bien encore dues à des traitements pharmacologiques.

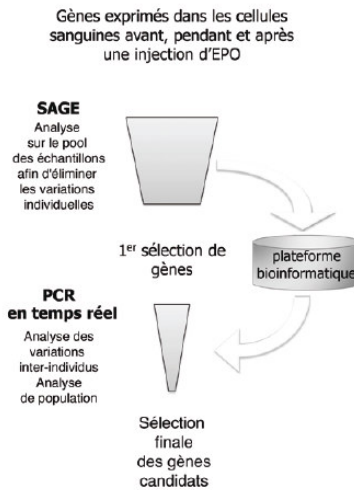
Elle a déjà été utilisée avec succès par le groupe d’Alain Paris (INRA Toulouse) pour discriminer entre bovins normaux et bovins traités aux stéroïdes anabolisants.



Empreintes métaboliques obtenues sur des bovins traités aux stéroïdes anabolisants

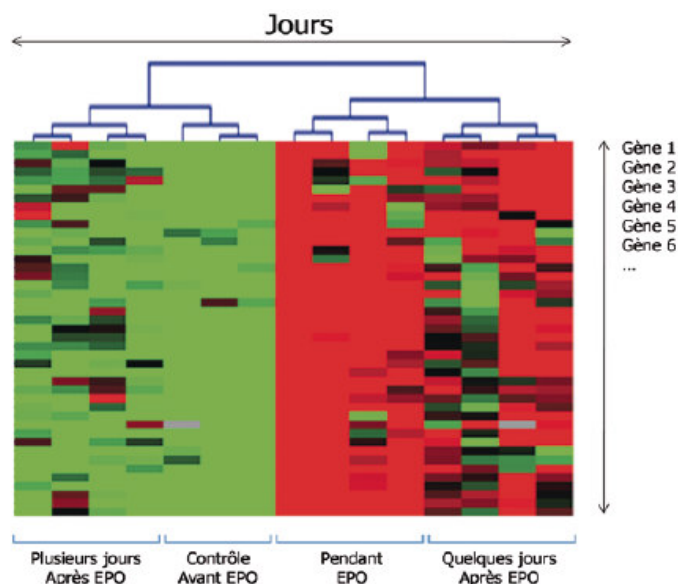
2- La transcriptomique

Cette méthode consiste à mesurer le niveau d'expression des gènes dans diverses situations (avant, pendant et après un traitement médicamenteux par exemple) et à mettre en évidence des modifications dans le niveau d'expression des gènes dans ces diverses situations. L'analyse des profils d'expression de gènes est de plus en plus utilisée pour découvrir de nouveaux marqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques (application à la classification des cancers).



Transcriptomique : basée sur la cartographie complète des gènes exprimés dans un tissu (le sang pour ce qui concerne l'application au dopage)

Nous étudions actuellement ses possibilités dans le domaine d'un dépistage de la prise d'EPO ou d'autres agents stimulant l'érythropoïèse).



D Piquemal

V- Conclusion

L'idée que des méthodes indirectes pouvaient être utilisées dans la lutte contre le dopage a fait son chemin ces dernières années et est en passe d'aboutir.

Aujourd'hui elles servent d'outil de suspicion et de ciblage d'athlètes tricheurs. Mais à terme certaines d'entre elles pourraient conduire à des sanctions disciplinaires comparables à celles des méthodes directes.

La première méthode indirecte utilisée sera vraisemblablement le passeport hématologique. Il faut bien comprendre qu'on n'est plus dans le cadre du suivi biologique mais dans le cadre d'une accusation de dopage. Si, au moins dans un premier temps et dans le cyclisme, on utilise ce passeport hématologique pour décider si oui ou non un athlète peut prendre le départ de l'épreuve, la raison du refus d'autoriser le sportif à prendre part à la compétition ne sera pas une raison médicale. (Par exemple un hémocrite trop élevé au départ peut engendrer un problème de santé suite à une hémococoncentration au cours de la compétition). La raison sera la conviction que l'athlète a tenté de tricher.

Questions-réponses avec l'amphithéâtre

Docteur Mario ZORZOLI

e groupe travaillant sur la transcriptomique a-t-il eu des contacts avec le groupe de Seibersdorf ?

LProfesseur Michel AUDRAN

A ma connaissance, l'étude de ce groupe portait sur des souris, or je ne suis pas persuadé qu'il soit judicieux d'appliquer ce type de techniques à l'animal, dont le métabolisme diffère fortement du métabolisme humain. Je rappelle par ailleurs que nous n'en sommes qu'au tout début de ces recherches, qui ne tiennent pas encore compte des effets de l'entraînement ou de l'altitude.

Docteur Mario ZORZOLI

Il faudra également tenir compte des associations de médicaments.

Professeur Michel AUDRAN

Tout à fait.

Docteur Thierry VILLEY

Avez-vous une idée du coût de ces différentes explorations ?

Professeur Michel AUDRAN

Ce coût dépendra du nombre de gènes sélectionnés à terme. On constate qu'en trois ans, les coûts ont déjà chuté de moitié, voire davantage. Nous pouvons espérer que d'ici à la validation de ces méthodes, les coûts ne seront pas plus élevés que ceux d'une analyse chimique traditionnelle.