

Le passeport hématologique, approche du laboratoire biologique

Docteur Neil ROBINSON
Laboratoire d'Analyse du Dopage de Lausanne

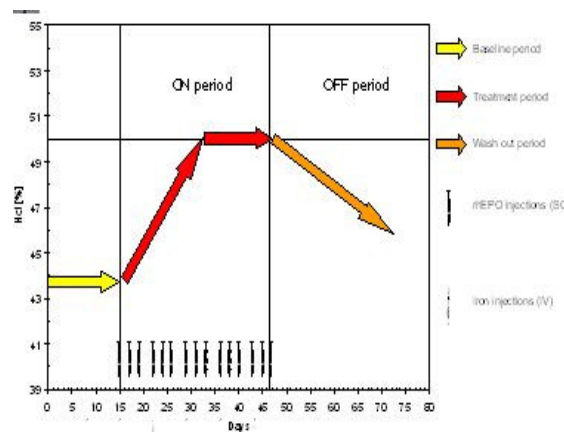
I. L'augmentation de la masse érythrocytaire

Il existe différents moyens d'augmenter sa masse érythrocytaire, c'est-à-dire le nombre de globules rouges. On peut y parvenir en diminuant la pression en oxygène, par exemple en se rendant en altitude ou en utilisant des caissons hypobares, ce qui à l'heure actuelle est tout à fait autorisé, ou encore en procédant à une injection d'érythropoïétine. La méthode la plus ancienne est la transfusion sanguine. Notre idée était de développer un test antidopage permettant d'identifier les individus s'étant dopés.



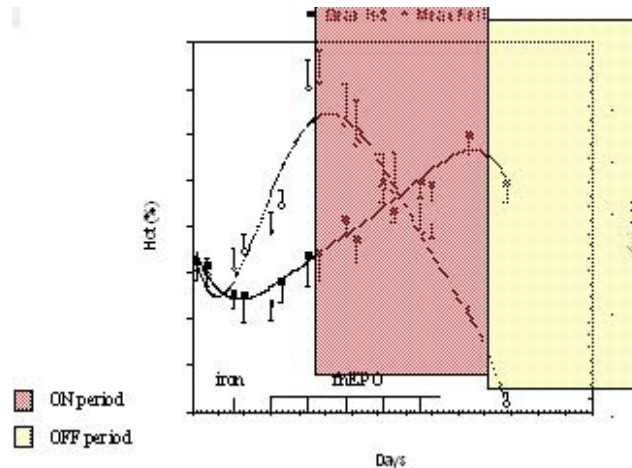
II. Méthodes

Notre approche a consisté en une étude clinique de l'administration d'EPO, avec une phase d'observation des patients, puis d'injection d'EPO (phase ON), et enfin une phase OFF.



Planification de l'étude

Plusieurs modèles de détection existent : ON-he ; ON-hes, OFF-hr et OFF-hre. Ces modèles ont toutefois été élaborés sur la base de traitements continus, ce qui ne correspond pas au cas des athlètes dopés, qui recourent à ces traitements de façon discontinue.



Résultat de l'étude

La solution proposée en 2000, et que Michel Audran vient d'évoquer, consistait à analyser les variations de chaque individu au fil du temps. Cette méthode semble appropriée, mais nécessite la prise de précautions afin d'éviter la production de faux positifs. La première de ces précautions consiste à harmoniser la position physique de l'athlète lors du prélèvement, puisqu'une station debout, assise ou couchée peut faire varier significativement les résultats des tests sanguins.

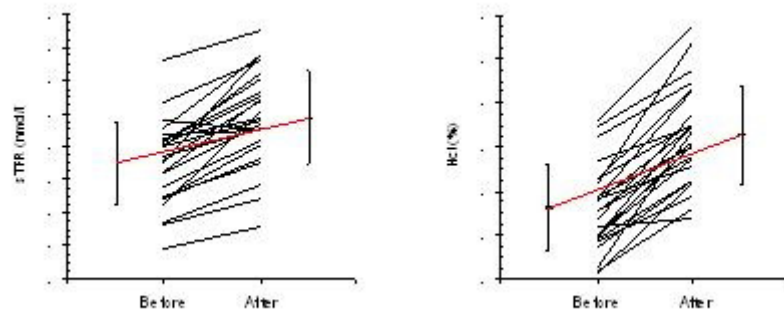
Mean concentrations of the statistically significantly changing haematological tests (Mean \pm S.D. Extreme values in parenthesis on line 2). *p* = the level of statistical significance of the difference between adjacent values and, in the last column, between the standing and supine values

	Supine	<i>p</i>	Sitting	<i>p</i>	Standing	<i>p</i>
Albumin (g/l)	39.1 (2.8) (31.0-44.0)	**	40.4 (2.7) (35.0-45.0)	***	42.1 (2.8) (35.0-47.0)	***
B-RBC ($\times 10^9/l$)	4.36 (0.18) (3.97-4.72)	**	4.44 (0.19) (3.95-4.83)	***	4.58 (0.23) (4.04-5.14)	***
Hb (g/l)	128 (5.4) (121-140)	**	130 (5.9) (120-144)	***	135 (5.3) (127-148)	***
Haematocrit (%)	0.406 (0.017) (0.38-0.44)	**	0.414 (0.018) (0.38-0.45)	***	0.426 (0.02) (0.39-0.48)	***
Platelets ($10^9/l$)	297 (44) (233-383)	**	313 (46) (236-395)	NS	320 (46) (243-406)	***
WBC ($10^9/l$)	7.37 (1.7) (4.6-10.0)	NS	7.28 (1.6) (4.7-10.3)	*	7.62 (1.9) (4.6-11.4)	*
Lymphocytes, relatives (% WBC)	39 (8) (25-52)	*	37 (9) (25-61)	NS	37 (9) (24-61)	NS
Lymphocytes total ($10^9/l$)	2.85 (0.69) (1.90-4.80)	*	2.63 (0.66) (1.54-4.74)	NS	2.74 (0.62) (1.94-4.20)	NS

NS = not significant. * = *p* < 0.05. ** = *p* < 0.01. *** = *p* < 0.001.

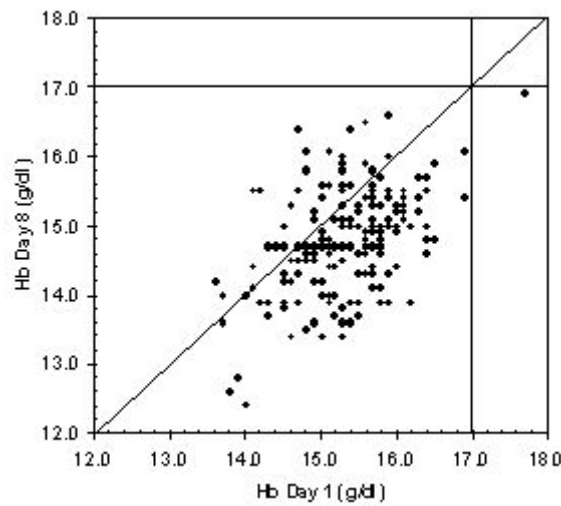
Influence de la position de l'athlète lors du prélèvement

De même, le moment du prélèvement, avant ou après effort, n'est pas sans incidence sur ces tests. Des compétitions s'étendant sur des durées longues, telles que le Tour de France, peuvent également conduire à une variation du volume plasmatique et donc à un affaissement des valeurs d'hémoglobine.

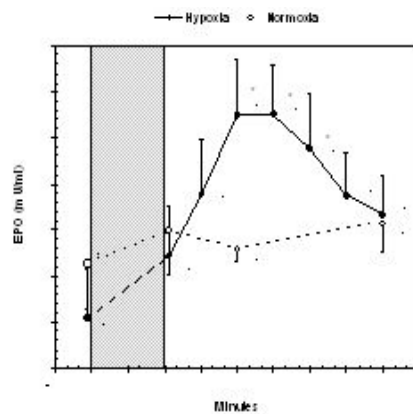


Importance du moment de prélèvement

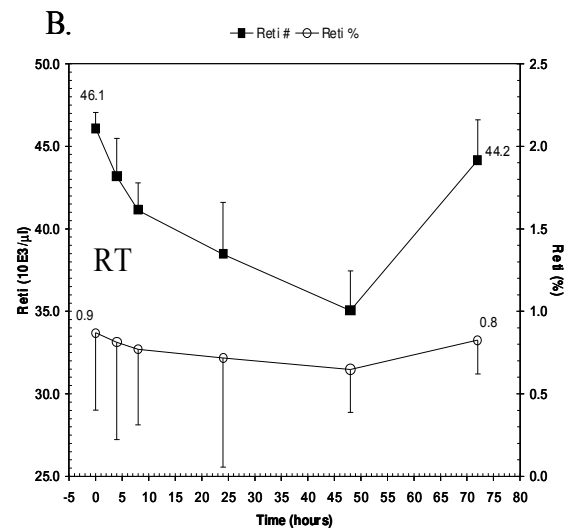
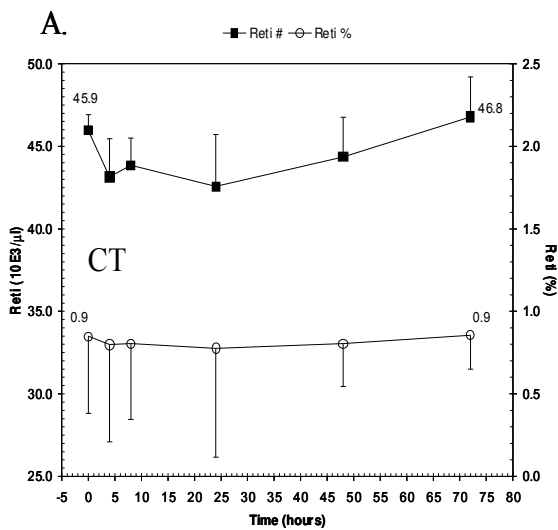
Changement du volume plasmatique lors de grandes compétitions (tour cycliste)



Par ailleurs, l'utilisation de tentes hypoxiques et d'appareils de type « altitrainer », ou tout simplement l'entraînement en altitude, peuvent influencer sur les résultats en augmentant significativement la production endogène d'EPO.



Effet de l'hypoxie sur la production endogène d'EPO



Nous devons tenir compte de ces possibilités au moment du prélèvement et les intégrer à notre étude.

Un autre problème majeur concerne l'acheminement de l'échantillon vers le laboratoire. On note par exemple qu'à température ambiante, les valeurs des réticulocytes décroissent très rapidement, tandis que les paramètres demeurent stables plus longtemps lorsque le transport se fait à température contrôlée. Nos solutions consistent à recourir aux services de transporteurs rapides et à utiliser des contenants spécifiques permettant de contrôler la température des échantillons, dans lesquels nous insérons des « data-logger » traçant avec une grande précision les conditions de transport de l'échantillon.



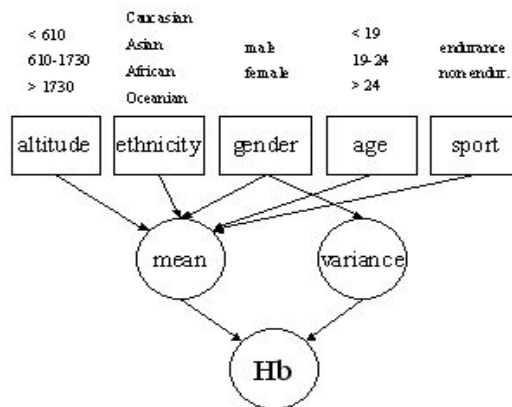
Mode de transport utilisé par le LAD

Nous nous heurtons par ailleurs à l'absence de standardisation, notamment en ce qui concerne les réticulocytes, dont les résultats varient en fonction des technologies utilisées. Nous devons donc fixer au plus tôt des règles standardisées.

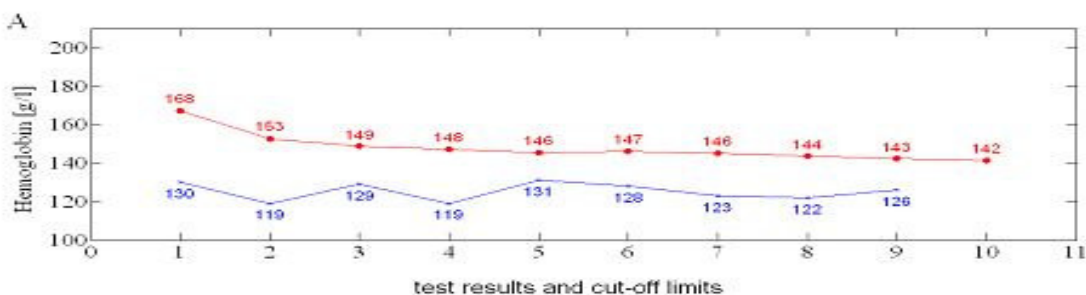
Les résultats sont analysés à travers un algorithme, puis soumis à un panel d'experts qui doivent évaluer les conditions pré-analytiques que je viens d'évoquer, puis les conditions de l'analyse proprement dite ; d'où la nécessité pour le laboratoire de recourir à des contrôles de qualité interne sur trois niveaux. Par exemple, la précision de nos analyses est déterminée par un tube de sang frais mesuré sept fois consécutivement. Enfin, nous devons également faire la preuve de la précision optimale de nos mesures vis-à-vis de notre client, c'est-à-dire la fédération cycliste. A cette fin, nous avons mis en place des contrôles qualité externes sur la base d'un rythme mensuel.

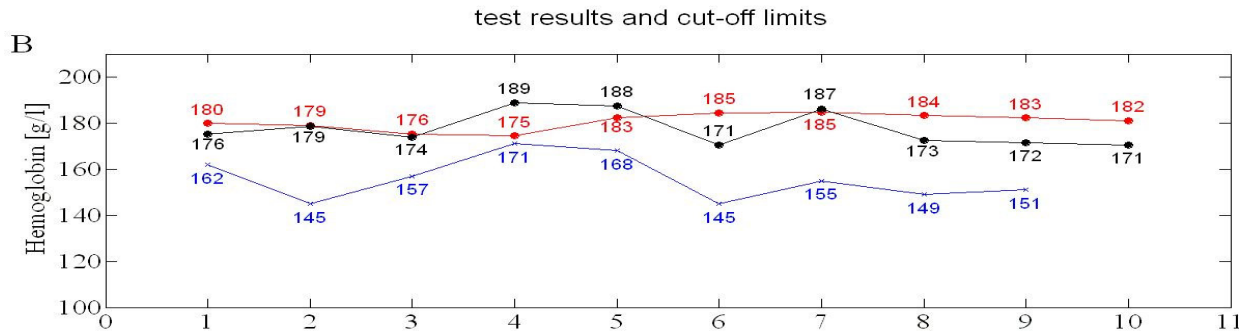
Une solution particulièrement dispendieuse consiste à déplacer l'appareil de mesure par avion privé sur le site de prélèvement. Nous recourons à cette procédure lors des grandes compétitions. Or, nous devons associer les données acquises en compétition avec les données acquises hors compétition, ce qui exclut le recours systématique à la voie aérienne. Notre solution consiste donc à combiner la voie aérienne à la méthode par transporteurs que j'évoquais plus haut.

L'approche consistant à étudier les variations intra-individuelles et non plus inter-individuelles paraît particulièrement prometteuse, comme nous l'avons vu tout à l'heure avec la méthode indirecte de troisième génération proposée par une équipe australienne. Notre laboratoire travaille sur une approche similaire, mais qui inclut de surcroît des facteurs hétérogènes, dont ne tient pas compte le programme australien. Notre approche statistique recourt à des réseaux bayésiens, tenant compte de paramètres aussi variés que l'altitude, les facteurs ethniques, le sexe, l'âge ou la discipline sportive pratiquée. On constate que les limites à ne pas dépasser pour un individu donné s'adaptent progressivement au fur et à mesure de l'acquisition d'informations à son sujet. Ces limites peuvent bien entendu être adaptées en fonction du risque de faux positifs que l'on consent à encourir.

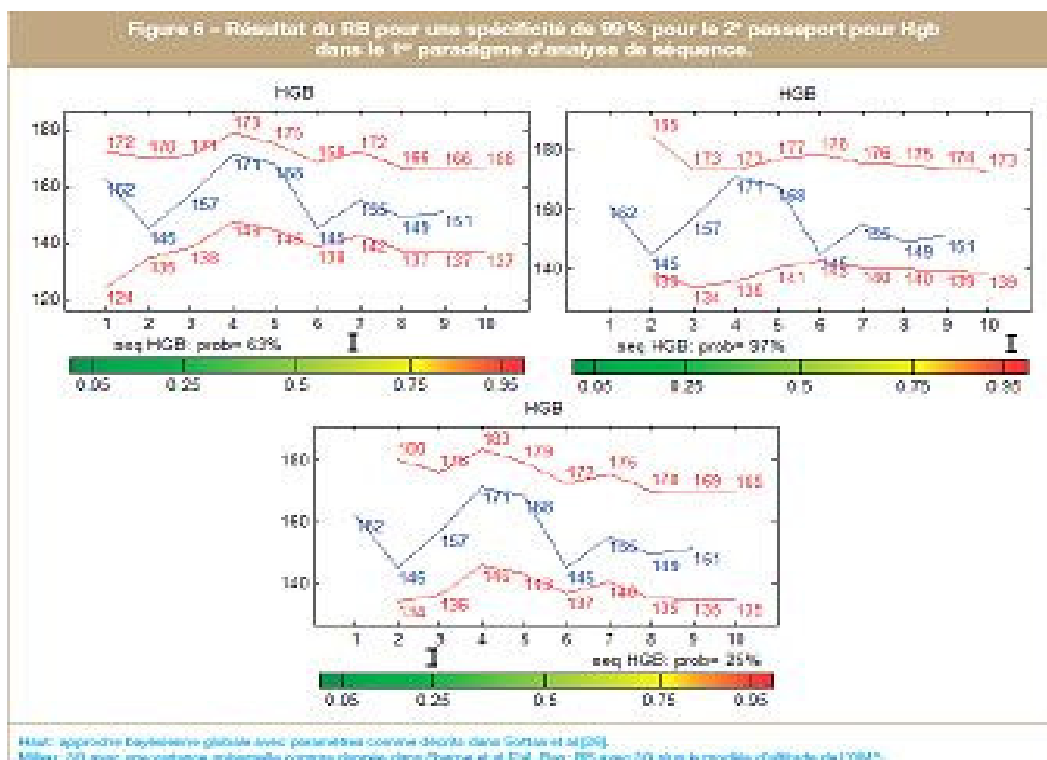


Passeport biologique – réseau Bayésien





Exemple réel du passeport biologique



Exemple réel du passeport biologique

III. Perspectives

La lutte contre le dopage devient de plus en plus compliquée, notamment avec l'arrivée de nouvelles molécules. Son avenir réside dans la génomique, la protéomique et la métabolomique, mais paraît avant tout tributaire de facteurs économiques, puisque la mise au point permanente de nouveaux tests se révèle onéreuse ; or le passeport biologique permet de fournir des indications sur le dopage éventuel d'un individu à des coûts raisonnables.

Questions-réponses avec l'amphithéâtre

Docteur Bruno TOLLENAERE

L'hétérogénéité considérable des réponses individuelles à l'altitude m'incite à douter de l'efficacité du passeport biologique.

Docteur Neil ROBINSON

J'estime qu'il vaut mieux tenir compte de l'altitude de manière imparfaite que de ne pas en tenir compte du tout. Or les approches précédemment proposées ne tenaient aucun compte de ce paramètre.

Docteur Emmanuel PROU

A la Fédération française d'athlétisme, nous procédons à un suivi similaire au vôtre, quoique plus « artisanal », en interprétant de façon dynamique les paramètres d'un individu, dont nous connaissons les modalités d'entraînement et les séjours en altitude. Je souhaitais savoir à quoi servira concrètement le passeport biologique : permettra-t-il d'incriminer *a posteriori* un individu, par exemple en prouvant qu'il a recouru à des produits exogènes prohibés, ou servira-t-il simplement à diligenter un contrôle antidopage ?

Docteur Neil ROBINSON

Le laboratoire analyse l'échantillon et transmet immédiatement le résultat à la fédération. Celle-ci peut ensuite s'appuyer sur ces outils d'aide à l'interprétation ; toutefois, pour qu'elle puisse entreprendre une procédure disciplinaire, un panel d'experts doit analyser en détail les données recueillies, afin d'exclure toute source possible d'erreurs. Le logiciel lui-même ne saurait prendre de décision : la présence d'un faisceau suffisant de preuves reste indispensable.

Docteur Gérard NICOLET

Je souhaitais savoir si le passeport biologique pourra permettre de distinguer nettement entre l'apport exogène d'EPO et le recours à l'entraînement en hypoxie.

Docteur Neil ROBINSON

J'ai conduit une seule étude sur l'hypoxie, centrée sur « l'altitrainer ». En consultant la littérature, j'ai observé que les effets de l'altitude étaient appréhendés de façon très divergente selon les études. Je pense qu'un grand volume d'informations devra encore être recueilli avant que nous ne soyons en mesure d'intégrer rigoureusement l'apport des caissons hypobares – sans compter la notion d'effort, qui pourra à son tour modifier la réponse. Actuellement, le nombre de protocoles possibles est tel qu'il doit nous inciter à beaucoup de précaution dans la manipulation de ces paramètres.

Docteur Mario ZORZOLI

Je rappelle que malgré la variabilité inter-individuelle des réponses à l'altitude, l'objectif du passeport biologique reste d'observer toujours le même athlète, et non de le comparer aux autres.

En termes de sanctions, l'AMA a déjà commencé, me semble-t-il, à s'engager dans la voie de la prise en compte des valeurs atypiques et à définir les violations des règles antidopage sur la base d'informations obtenues autrement que par un résultat positif à un test.

Professeur Michel AUDRAN

Je précise qu'il existe deux façons de lire le test présenté par Neil Robinson : soit on observe à un instant donné si un prélèvement s'écarte de l'intervalle fixé pour un individu ; soit on effectue une lecture d'une séquence dans son ensemble, qui, même si elle reste dans le domaine de normalité défini pour l'individu en question, peut révéler des variations suspectes.

Docteur Neil ROBINSON

Tout à fait. Il peut effectivement se révéler intéressant d'entamer précocement le suivi de l'athlète et d'établir un profil sur le long terme, ce qui permet notamment de détecter assez aisément une éventuelle hémodilution.

Docteur Peter JENOURE

Je souhaiterais obtenir quelques précisions sur le rôle du médecin dans ce suivi longitudinal de l'athlète.

Docteur Neil ROBINSON

En tant que laboratoire, nous ne nous occupons pas de la gestion des données. Il revient aux juristes de décider qui peut y avoir accès. Nous nous intéressons plutôt à l'aspect scientifique. Je pense que Mario ZORZOLI est mieux placé que moi pour répondre à la question que vous soulevez.

Docteur Mario ZORZOLI

Je pense que l'implication de l'AMA suffit à prouver que ce suivi relève de la lutte antidopage. Je souligne à ce sujet qu'il est possible d'utiliser des données de la lutte antidopage à des fins médicales, tandis que l'inverse est impossible.

Daniel BAAL

Je ne suis ni scientifique, ni médecin, mais votre dernière diapositive m'a interpellé. Je comprends parfaitement le sens de votre démarche, mais on se rend aujourd'hui compte des coûts très élevés qu'induit la mise en place du passeport biologique. Avez-vous une idée du nombre de prélèvements

nécessaires dans l'année pour assurer un suivi efficace dans le cadre du passeport biologique ? Et quel sera le coût moyen pour un athlète suivi dans le cadre du passeport biologique ?

Docteur Neil ROBINSON

Je reprendrai la distinction opérée par Michel Audran : pour comparer une valeur à une valeur précédente, un seul prélèvement suffit en théorie. En revanche, pour une analyse de séquence, six valeurs sont nécessaires. Ces données doivent être acquises dans les conditions pré-analytiques que j'ai décrites, et qu'il faudra standardiser. Le coût proprement dit dépendra du réseau de laboratoires ; plus ce dernier se développera, moins l'acheminement des échantillons sera coûteux. Actuellement, peu de laboratoires existent, en raison d'un risque financier encore important lié au nombre réduit d'échantillons à analyser et à la grande réactivité exigée ; or, dès lors que de nombreux échantillons devront être analysés, des structures se mettront en place, qui permettront de réduire les coûts de façon spectaculaire.

Docteur Maurice VRILLAC

Je souhaitais savoir si vous aviez obtenu des résultats comparables à ceux que nous avons obtenus il y a longtemps déjà, avant les Jeux Olympiques de Mexico, à savoir une variabilité liée à l'altitude beaucoup plus forte chez les étudiants en sport que chez les athlètes confirmés ?

Docteur Neil ROBINSON

Chaque individu se compare à soi-même : un individu habituellement stable, y compris en altitude, présentant soudainement des variations importantes, paraîtra plus suspect qu'un individu présentant habituellement une variabilité importante.

Docteur Maurice VRILLAC

J'ai bien compris que la comparaison se faisait de façon intra-individuelle, mais la différence considérable entre sportifs non entraînés et très entraînés nous avait tout de même beaucoup frappés.