ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE

ANNEE 2010 THESE : 2010 – TOU 3 – 4026

CONTROLE ANTIDOPAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE RECOMBINANTE EQUINE CHEZ LE CHEVAL : APPROCHES DIRECTE ET INDIRECTES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

Morgane GRALL
Née le 02 novembre 1985, à Morlaix (29)

Directeur de thèse : M. le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN

JURY

PRESIDENT :	
Mme Bettina COUDERC	Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE
ASSESSEUR :	
M. Pierre-Louis TOUTAIN	Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Mme Séverine BOULLIER	Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'ALIMENTATION DE LA PÊCHE ET DES AFFAIRES RURALES

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE

Enseignement agricole
Formations grandeur nature

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. **A. MILON**

Directeurs honoraires : M. **G. VAN HAVERBEKE**.
M. **P. DESNOYERS**

Professeurs honoraires :

M. **L. FALIU**
M. **C. LABIE**
M. **C. PAVAUX**
M. **F. LESCURE**
M. **A. RICO**
M. **A. CAZIEUX**
Mme **V. BURGAT**
M. **J. CHANTAL**
M. **JF. GUELFI**
M. **EECKHOUTTE**
M. **D.GRIESS**
M. **CABANIE**
M. **DARRE**
M. **HENROTEAUX**
M. **BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE** Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENT CONTRACTUEL

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORRAND Leni**, *Médecine Interne*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Médecine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A la présidente de thèse,

Madame le Professeur Bettina COUDERC
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Médecin biologiste

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

Au jury de thèse,

Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN, directeur de thèse
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Physiologie et Thérapeutique

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour m'avoir aidé et soutenu pendant sa réalisation, veuillez accepter l'expression de ma sincère gratitude.

Madame le Docteur Séverine BOULLIER
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Immunologie générale et médicale

Pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de thèse, veuillez recevoir mes hommages respectueux.

A mes parents pour m'avoir toujours soutenue et aidée au cours de mes études.

A mes grands-parents pour leur soutien inconditionnel, même si malheureusement ils ne sont plus tous présents pour partager ce grand moment avec moi.

A Erwan et Laure pour leurs encouragements.

A Victoria, Julia et au personnel du service de physiologie avec qui j'ai réalisé toute la partie animale de cette thèse.

Au personnel du Laboratoire des Courses Hippiques qui a travaillé à la réalisation de la partie analytique de cette thèse.

Aux Haras Nationaux pour avoir en partie financé ce programme de recherche.

A tous les chevaux du club de l'ENVT et en particulier à ceux qui ont participé à la réalisation de cette thèse pour leur patience et leur gentillesse pendant tout ce que j'ai pu leur faire subir.

A toutes les personnes du club hippique de l'ENVT que j'ai côtoyées pendant ces 5 dernières années et avec qui j'ai passé de très bons moments (concours, anniversaires, repas)

A Bertrand et aux autres personnes qui m'ont fait confiance en me laissant monter leurs chevaux même si les résultats n'ont pas toujours été brillants.

Aux chevaux que j'ai montés pendant ces dernières années (**Phacélia, Offshore, O'belle, Luz, Milton, Dalton, Jadis, Nora et Ronnie**) pour m'avoir permis de m'aérer l'esprit, de me détendre et de sortir en concours.

A tous mes amis de l'école (**Marie-Hélène, Audrey, Cyril, Vanessa, Victoria, Katia, Elodie, Hélène, Marie**, …) pour toutes les soirées et les fou-rires mémorables que nous avons pu partagés. En réponse à Audrey, Elodie et Marie-Hélène, je tiens bien sûr à affirmer ici que bien entendu c'est la BRETAGNE qui est la plus belle région de France !!!!

A **Zorro**, mon joli petit chat dont la disparition récente m'attriste fortement.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....

LISTE DES ABREVIATIONS……..

INTRODUCTION.....

PARTIE I : L'HORMONE DE CROISSANCE EQUINE.....

I. PRESENTATION DE L'HORMONE.....

II. PRODUCTION ET SECRETION.....

III. REGULATION DE LA SECRETION DE L'HORMONE DE CROISSANCE EQUINE...

1. Influence de facteurs environnementaux.....

1.1. Exercice physique

1.2. Alimentation

2. Régulation hormonale.....

2.1. Hormones hypothalamiques

2.2. Facteurs sécrétagogues pour l'hormone de croissance

IV. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE.....

1. Mode d'action de l'hormone de croissance.....

1.1. Sur le foie

1.2. Sur les os

1.3. Sur les muscles

1.4. Sur le tissu adipeux

2. Effets biologiques.....

2.1. Effets directs

2.2. Effets indirects via l'IGF-1

PARTIE II : LA LUTTE ANTIDOPAGE CONTRE L'HORMONE DE CROISSANCE

I. LA LUTTE ANTIDOPAGE EN FRANCE.....

1. Le dopage animal.....

2. Les lois et règlements en France.....

2.1. Animaux de compagnie

2.2. Animaux avec activité sportive

a. Espèces autres que les chevaux

b. Chevaux

3. Substances interdites et prohibées.....

3.1. Courses hippiques

a. Substances totalement interdites

b. Produits autorisés à l'entrainement mais pas le jour de la course

c. Substances prohibées dès la déclaration de partant

d. Substances à seuil

e. Procédés

3.2. Sports équestres

a. Règle à l'entrainement

b. Règle pour les partants

4. Réalisation des contrôles.....

4.1. Chevaux choisis pour les contrôles

a. Courses hippiques

b. Sports équestres

4.2. Réalisation des prélèvements

a. Courses hippiques

b. Sports équestres

4.3. Réalisation des analyses

II. DETECTION DU DOPAGE A L'HORMONE DE CROISSANCE.....

1. Chez l'homme.....

1.1. Détection de la molécule

a. Immunodosage

b. Méthodes physico-chimiques

1.2. Suivi de marqueurs

a. Marqueurs de l'axe IGF/IGFBP

b. Marqueurs de minéralisation et de renouvellement des os et cartilages

c. Leptine

2. Chez le cheval.....

2.1. Détection de la molécule

a. Méthodes physico-chimiques

b. Immunodosage

2.2. Suivi des anticorps anti-reGH

2.3. Suivi de marqueurs

PARTIE III : ETUDE EXPERIMENTALE.....

I. MATERIEL ET METHODES.....

1. Formulation utilisée.....

2. Animaux.....

II. PROCEDURE EXPERIMENTALE.....

1. Conduite de l'expérimentation.....

2. Administration du produit.....

3. Réalisation et conservation des prélèvements.....

3.1. Urine

3.2. Plasma

4. Suivi de la tolérance du traitement.....

5. Effets indésirables du produit administré.....

6. Effectif final à la fin du protocole de traitement.....

7. Analyse des prélèvements.....

7.1. Détection indirecte : dosage des anticorps anti-reGH

7.2. Détection indirecte : approche métabolomique

7.3. Détection directe de la reGH dans le plasma par LC/MS/MS

III. RESULTATS ET DISCUSSION.....

1. Détection indirecte : dosage des anticorps anti-reGH……
2. Détection indirecte : approche métabolomique……..
3. Détection directe de la reGH dans le plasma par LC/MS/MS……

CONCLUSION.....

BIBLIOGRAPHIE.....

ANNEXES.....

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Séquence d'acides aminés de l'hormone de croissance équine (eGH), de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH), de l'hormone de croissance bovine (bGH), de l'hormone de croissance porcine (pGH) et de l'hormone de croissance humaine (hGH)

Figure 2 : Spectre de masse de l'hGH par MALDI/TOF

Figure 3a : Spectre de masse de l'eGH par MALDI/TOF

Figure 3b : Spectre de masse de la reGH par MALDI/TOF

Figure 4a : Spectre de masse de l'eGH après digestion par la trypsine avec un appareil MALDI/TOF

Figure 4b : Spectre de masse de la reGH après digestion par la trypsine avec un appareil MALDI/TOF

Figure 5 : Concentration plasmatique en reGH en fonction du temps après une injection sous-cutanée unique de 14mg de reGH

Figure 6 : Détection de la reGH dans le plasma équin 24h et 48h après une injection sous-cutanée unique de 14mg de reGH

Figure 7 : Cinétique de production des anticorps sériques comparée à celle des anticorps plasmatiques

Figure 8 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH extraits du sérum

Figure 9 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour les chevaux de notre essai

Figure 10 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Lago

Figure 11 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Isis

Figure 12 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Longo1

Figure 13 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Laius

Figure 14 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Haxius

Figure 15 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Nora

Figure 16 : Evaluation de l'impact des administrations de reGH sur les empreintes urinaires de chevaux en utilisant une analyse multivariante

Figure 17 : Chromatogrammes d'ions des peptides caractéristiques du fragment N-terminal de la GH, après purification et passage par le LC/MS/MS

TABLEAUX

Tableau 1: Homologie de séquence entre l'hormone de croissance bovine (bGH) et les hormones de croissance d'autres espèces, en ne tenant compte que de l'isoforme majoritaire pour chaque espèce

Tableau 2 : Concentrations plasmatiques physiologiques d'eGH rapportées dans la littérature

Tableau 3: Liste des substances à seuil

Tableau 4 : Statistiques des contrôles effectués par France Galop d'après le Service des Licences et Livrets de France Galop

Tableau 4a : Contrôles effectués sur les courses de galop

Tableau 4b : Contrôles effectués à l'entrainement

Tableau 4c : Contrôles effectués hors entrainement

Tableau 5 : Statistiques des contrôles effectués par la Société d'Encouragement du Cheval Français

Tableau 6 : Méthodes immunologiques de mesures de l'eGH rapportées dans la littérature

Tableau 7 : Caractéristiques individuelles des chevaux utilisés pour l'essai

Tableau 8 : Volumes d'Equigen ND administrés aux chevaux de l'essai

Tableau 9 : Gradient de la chromatographie en phase liquide

Tableau 10 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Lago

Tableau 11 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Isis

Tableau 12 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Longo1

Tableau 13 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Laius

Tableau 14 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Haxius

Tableau 15 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Nora

Tableau 16 : Comparaison et moyenne des valeurs chiffrées obtenues par WinNonlin pour les 6 chevaux traités à la reGH

ANNEXES

Code des courses au galop : art 198,199, 200, 201 et annexes 5 et 15

Règlement FFE des compétitions 2010 : art 1.3

Règlement SHF 2009 : chap 14

Substances prohibées et/ou métabolites mis en évidence en 2008 dans les courses de trot

Substances prohibées et/ou métabolites mis en évidence en 2008 dans les courses de galop

Substances prohibées mises en évidence en 2008 dans les sports équestres

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone
AFLD : Agence Française de Lutte contre le Dopage
AINS : Anti Inflammatoire Non Stéroïdien
AIS : Anti Inflammatoire Stéroïdien
ALS : Acid Labile Subunit
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique
bGH : hormone de croissance bovine
Da : daltons
DMSO : Diméthyl Sulfoxide
DRJS : Direction Régionale de la Jeunesse et des Sports
eGH : hormone de croissance équine
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPO : Erythropoiétine
FFE : Fédération Française d'Equitation
FEI : Fédération Equestre Internationale
FNCF : Fédération Nationale des Courses Françaises
GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse / Spectrométrie de masse
GH : hormone de croissance
GH-BP : protéine de transport de l'hormone de croissance
GH-R : récepteur de l'hormone de croissance
GHIH : Growth Hormone Inhibiting Hormone = somatostatine
GHRH : Growth Hormone Releasing Hormone = somatolibérine = GRF
GHRP : Growth Hormone Releasing Peptide
hGH : hormone de croissance humaine
HPLC/MS : Chromatographie en phase liquide à haute pression / Spectrométrie de masse
ICTP : Télopeptide C terminal du collagène de type I
IFA : Immuno Functionnal Assay
IGF : Insulin like Growth Factor
IGF-BP : protéine de transport des IGF
IgG : immunoglobulines G
IRMA : Immuno Radio Metric Assay
LC/ESI-MS : spectromètrie de masse à électrospray
LC-HRMS : Chromatographie en phase liquide / Spectrométrie de masse à haute résolution
LCH : Laboratoire des Courses Hippiques
M : mol/L
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MCP : Medication Control Programm
OC : ostéocalcine
pGH : hormone de croissance porcine
PICP : Propeptide C terminal du collagène de type I
P-III-P : extension peptidique N terminale du procollagène de type III
PPI : Préparation Pour Injection
rbGH : hormone de croissance bovine recombinante
RIA : Radio Immuno Assay
reGH : hormone de croissance recombinante
RGHS : récepteur aux sécrétagogues de l'hormone de croissance

SD : Standard Deviation
SHF : Société Hippique Française
SNC : Système Nerveux Central
SPR-BIA : Surface Plasmon Resonance – Biomolecular Interaction Analysis
TOF : spectromètre à temps de vol

INTRODUCTION

La lutte antidopage prend une place de plus en plus importante dans le milieu des courses hippiques et, dans une moindre mesure, dans celui des sports équestres. En effet, la gamme des substances utilisées chez le cheval à des fins dopantes est très vaste.

L'hormone de croissance recombinante équine est classée comme étant une substance anabolisante. A ce titre et comme pour toutes les substances anabolisantes, son usage est formellement interdit chez les chevaux de course et de sport et elle fait donc l'objet d'un contrôle antidopage.

Les professionnels en charge des contrôles chez les chevaux de course et de sport sont actuellement relativement démunis face aux situations de dopage par des hormones polypeptidiques (hormone de croissance, érythropoïétine, …) car elles sont difficiles à détecter dans des prélèvements sanguins pendant des temps suffisamment longs pour couvrir la durée de leurs effets.

En matière de courses hippiques, les règlements internationaux reconnaissent la valeur d'une preuve indirecte d'administration d'une substance dopante. La recherche de biomarqueurs qui seraient plus rémanents que l'hormone de croissance recombinante équine est donc une approche licite dans le cadre de la lutte antidopage.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux caractéristiques de l'hormone de croissance équine et à ses actions biologiques.

Dans un second temps, nous allons décrire l'organisation de la lutte antidopage dans les milieux des courses hippiques et des sports équestres en France et au niveau international. Ensuite, nous allons faire un point sur les méthodes de lutte antidopage actuellement décrites dans la littérature d'une part chez l'homme puis chez le cheval.

Pour finir, nous nous intéresserons à la partie expérimentale en commençant par une description précise du protocole suivi avant de détailler les méthodes d'analyses utilisées et les résultats obtenus.

PARTIE I : L'HORMONE DE CROISSANCE EQUINE

I. PRESENTATION DE L'HORMONE

L'hormone de croissance équine (eGH) est une petite protéine monocaténaire de 190 acides aminés (figure 1).

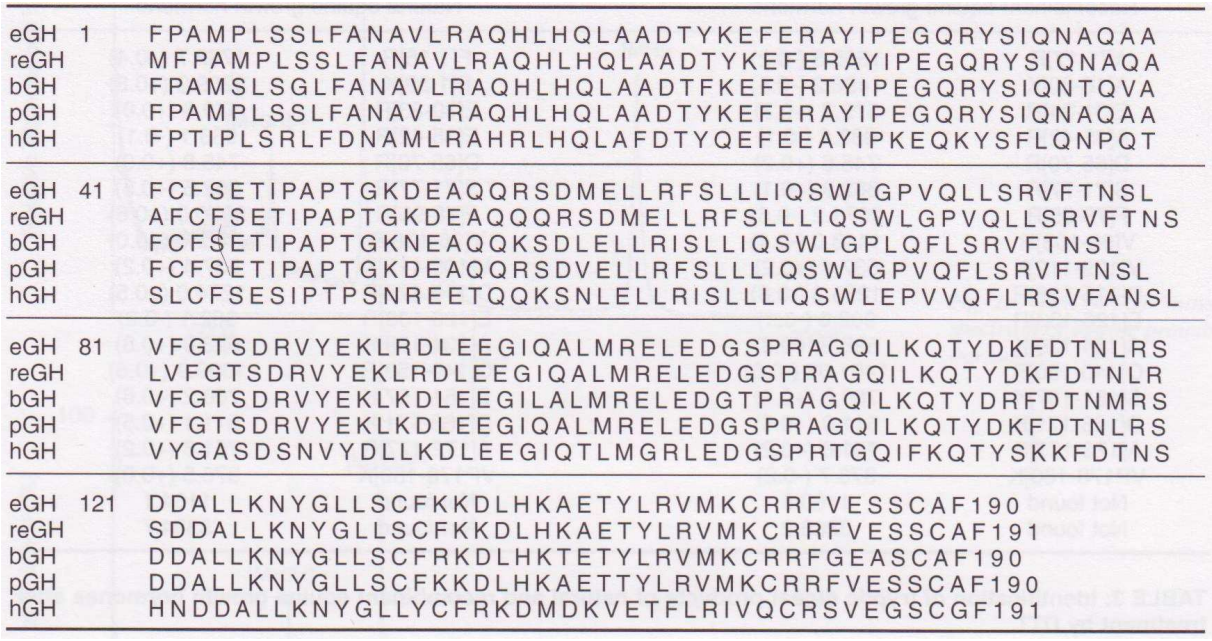


Figure 1 : Séquence d'acides aminés de l'hormone de croissance équine (eGH), de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH), de l'hormone de croissance bovine (bGH), de l'hormone de croissance porcine (pGH) et de l'hormone de croissance humaine (hGH) [*Bonnaire 1998*]
Cette figure montre la séquence en acides aminés de plusieurs hormones de croissance ce qui permet de constater qu'elles sont de taille assez semblable et que leurs séquences en acides aminés sont proches.

Cette hormone est classée parmi les hormones (dites) hydrophiles par opposition aux hormones stéroïdes (dites) hydrophobes.

Son poids moléculaire moyen est de 21757 Da et sa composition en acides aminés est assez similaire à celle des hormones de croissance humaine, bovine, et porcine (tableau 1).

Espèces	Nombre d'acides aminés	Nombre d'acides aminés identiques à bGH	Pourcentage d'homologie	Masse molaire moyenne calculée (Da)
Humaine	191	127	66,5	22228
Equine	190	170	89,5	21757
Porcine	190	172	90,6	21731
Bovine	191	191	100	21791

Tableau 1: Homologie de séquence entre l'hormone de croissance bovine (bGH) et les hormones de croissance d'autres espèces, en ne tenant compte que de l'isoforme majoritaire pour chaque espèce.
Ce tableau illustre l'homologie importante entre les séquences en acides aminés des hormones de croissance animales.

La structure secondaire est constituée de 4 hélices α antiparallèles arrangées en paquet d'hélices. Cette structure particulière est similaire à de nombreuses hormones de croissance.

A l'heure actuelle, on ne dispose pas d'informations précises sur les modifications post-traductionnelles pour la population équine bien qu'il ait été mis en évidence, à partir d'hypophyses de chevaux, une forme où la séquence 76-92 serait absente. [*Cascone 1992*]

La structure tertiaire précise de l'eGH n'a toujours pas été décrite mais elle dépend de ponts disulfures entre les cystéines n°52 et 163 et entre les cystéines n°180 et 188. [*Bonnaire 1998*]

Le récepteur de l'hormone de croissance (GH-R) est une glycoprotéine transmembranaire dont la forme glycosylée peut atteindre 100 kDa. Ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs hématopoiétiques qui comprend le récepteur à la prolactine, à l'érythropoiétine et à certaines interleukines. Ce récepteur a été trouvé dans de nombreux tissus et cellules sauf dans certains organes comme le thymus, les testicules et le cerveau. Son niveau d'expression est très important dans les hépatocytes et les adipocytes.

Ce récepteur est une protéine dimérique qui lie une molécule de GH dans deux régions distinctes nommées sites I et II. Le site I implique les résidus de la partie C-terminale alors que le site II implique les résidus de la partie N-terminale. Lorsque la GH se lie à la première molécule du récepteur, il y a formation d'un complexe inactif. Lors du recrutement de la deuxième molécule de récepteur au niveau du second site de liaison de l'autre côté de l'hormone, l'ensemble du complexe protéique devient fonctionnel et physiologiquement actif.

Chez l'homme, le sang contient deux types de protéines de transport de la GH (GH-BP), l'une de forte affinité pour la GH (GHBP-1) et l'autre de faible affinité (GHBP-2). La protéine de liaison de forte affinité correspond au domaine extracellulaire du récepteur de la GH. En moyenne, il est estimé que 45-50% de la GH circulante (forme 22kDa) est complexée à la GHBP-1. Dans le sérum, la GHBP-2 lie la GH avec une faible affinité. Ces protéines de transport permettent de protéger la GH de la dégradation pour en prolonger le temps de demi-vie et semblent jouer un rôle de régulation (« tampon ») entre les pics de sécrétion de GH et les phases creuses (vallées). En effet, la fraction liée de GH augmente entre les pulses ce qui prolonge la libération de la GH lorsque celle-ci n'est pas sécrétée (libération retardée), alors que la concentration de GH libre augmente pendant les pics de sécrétion, permettant ainsi d'augmenter la clairance de la GH. Cette clairance est non linéaire du fait de la fixation de la GH à sa protéine de transport.

L'action de l'hormone de croissance au niveau de son récepteur passe par 3 étapes :

- la liaison de l'hormone à son récepteur où une molécule de GH se lie à deux molécules de GH-R
- la transmission du message (transduction) passe par au moins deux voies : celle initiée par la phosphorylation de la protéine Janus Kinase 2 qui conduit à la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 ce qui augmente la synthèse protéique ; et celle des médiateurs dérivés de la dégradation des lipides membranaires
- l'activation de phospholipases permet l'hydrolyse des phospholipides et libère ainsi des médiateurs intracellulaires tels que la phosphocholine et le diacylglycérol. Cet effet est suivi de l'activation des protéines kinases C qui stimule l'activation de différents gènes dans l'hépatocyte.

Après la formation du complexe hormone-récepteur, il se produit un processus rapide d'internalisation par endocytose. Après avoir fusionné avec une vésicule de l'appareil de Golgi, le récepteur et l'hormone se dissocient. L'hormone est ensuite transférée dans un lysosome où elle est dégradée. Les molécules du récepteur peuvent être dégradées via le protéasome ou être recyclées en reprenant leur place au niveau de la membrane plasmique. Le recyclage n'exclut pas une néoformation de récepteurs par synthèse protéique. Ce processus d'internalisation du récepteur explique en partie le phénomène de « down-regulation », c'est-à-

dire la diminution du nombre de sites récepteurs lorsque le nombre de molécules apportées par la circulation augmente.

II. PRODUCTION ET SECRETION

L'hormone de croissance équine est synthétisée et sécrétée par des cellules de l'antéhypophyse. A partir de 100g d'antéhypophyse équine, il est possible d'extraire 170mg d'hormone de croissance équine pure. Son activité biologique est de 1,6 « USP units/mg ». [*Conde 1973*]

Dans l'antéhypophyse, il existe deux types de cellules qui sécrètent la GH. Les cellules somatotropes sont des cellules de taille intermédiaire avec des granules au contenu uniforme et dense. Elles représentent 11 à 26% du total des cellules de l'antéhypophyse et sécrètent de la GH uniquement. Les cellules mammosomatotropes produisent des granules qui contiennent de la GH et de la prolactine. Ce sont des cellules non distinguables des lactotropes de type 1 et qui représentent 6,5 à 16,5% du total des cellules de l'antéhypophyse. [*Rahmanian 1997*]

La concentration basale de GH est faible, sa demi-vie est courte et sa sécrétion est pulsatile chez le cheval. [*Thompson 1992*, *DePew 1994*, *Christensen 1997*]

La concentration en GH des chevaux au repos est beaucoup plus faible chez les juments que chez les hongres et les étalons. Il n'y a pas de différence significative sur la valeur de la ligne de base mais la fréquence et l'amplitude des pics de sécrétion sont beaucoup plus importantes chez les étalons et les hongres que chez les juments. [*Thompson 1992*]

A la naissance, la concentration plasmatique en GH est très faible (<20ng/mL). Dans les 40 min post-partum, il se produit une très forte sécrétion de GH qui entraine une augmentation de la concentration jusqu'à ~200ng/mL. Dans l'heure suivante, il y a un retour progressif à la concentration basale. Sur les poulains, le niveau de base et l'amplitude des pics de GH sont plus élevés que chez les adultes. [*Stewart 1993*]

Population	Dosage	Concentrations moyennes (ng/mL)	Auteurs
Cheval	RIA	5 (pics à 40ng/mL)	Thompson et al. 1992
Poulain	RIA	10 à 25	Stewart et al. 1993
Juments	RIA	2,4	Thompson et al. 1994
Etalons		8,6	
Hongres		8,5	
Cheval	RIA	5 à 8	Cahill et al. 1994
Cheval	RIA	1 à 8	Christensen et al. 1997
Cheval	RIA	2 à 3	Kennedy et al. 2002
Cheval	RIA	5 (pics à 20ng/mL)	Dart et al. 2003
Cheval	ELISA	1 à 5	Borromeo et al. 2005
Cheval	ELISA	0,5 à 5 (pics à 50ng/mL)	Borromeo et al. 2007

Tableau 2 : Concentrations plasmatiques physiologiques d'eGH rapportées dans la littérature
Ces valeurs indiquent que les concentrations plasmatiques physiologiques d'eGH se situent entre 1 et 10 ng/mL pour les valeurs basales avec des pics pouvant atteindre 50ng/mL.

Les concentrations circulantes de GH dans le plasma sont en moyenne situées entre 1 et 10 ng/mL pour les valeurs basales (tableau 2). Cette gamme de concentration très faible classe la GH (lorsqu'elle n'est pas mesurée après un pulse naturel ou un exercice physique) parmi les composés se trouvant à l'état de « trace » dans le plasma.

Chez l'homme, des études métaboliques par marquage isotopique de la GH ont été réalisées pour comprendre comment l'hormone de croissance était éliminée de l'organisme. Environ 65% de la clairance de la GH est réalisée via la filtration glomérulaire et la dégradation de la GH se fait dans les cellules du tubule proximal. [*Johnson et Maack* 1977] En raison de cette dégradation très efficace dans le rein, il n'y a qu'une infime partie de l'hormone de croissance intacte qui soit éliminée dans l'urine. [*Popii et Baumann 2004*]

III. REGULATION

1. Influence de facteurs environnementaux

Des facteurs liés à l'état nutritionnel d'un sujet ou à un stress peuvent stimuler ou inhiber la sécrétion de l'hormone de croissance (jeûne, hypoglycémie ou faible concentration sanguine d'acides gras, exercice physique, émotion, traumatisme, deux premières heures de sommeil profond).

1.1. Exercice physique

La sécrétion de GH peut être modifiée par des facteurs environnementaux tels que l'exercice physique ou la stimulation sexuelle chez les étalons. [*Thompson 1992*] L'augmentation de la concentration en GH après l'exercice physique est plus importante chez les hongres que chez les juments et les étalons mais de façon statistiquement non significative. [*Thompson 1994*]

1.2. Alimentation

En situation aiguë, l'hypoglycémie est un stimulus de la sécrétion de GH plus fort que la diminution de l'apport en protéines. En situation chronique, la sécrétion de GH est mieux reliée à la déplétion des cellules en protéines qu'à l'insuffisance en glucose.

Chez les bovins et les ovins , on observe une diminution de la concentration en GH pendant 1 à 2 h après un repas et lorsque ces animaux sont mis à la diète, on observe une augmentation de la fréquence des pics de sécrétion de GH. Par contre chez les porcs, aucun effet de la nourriture sur la sécrétion de GH n'a été décrit. [*Hove et Bloom 1973*]
Une première étude [*DePew 1994*] a été menée sur 8 chevaux (4 étalons et 4 juments) pour évaluer les profils de sécrétion de la GH aux alentours d'un repas. Les dosages de GH ont été effectués toutes les 15 min à partir de 4h avant le repas et jusqu'à 8h après le repas. Sur cette période de 12h, le profil de sécrétion de la GH n'a pas été modifié par l'ingestion de nourriture.
Dans une autre étude [*Christensen 1997*], des dosages de GH ont été effectués toutes les 20 min pendant 24h sur 8 hongres qui ont été nourris 2 fois dans la journée. Les profils observés peuvent être compatibles avec une inhibition après le repas et un pic de concentration correspondant à une anticipation du repas. Le même suivi a été effectué sur 8 juments âgées et il a été observé une inhibition des pics de 1h30 à 5h après le repas. Les auteurs concluent en

suggérant la possibilité de conditionner des chevaux avec des repas distribués à heure fixe pour qu'ils aient des périodes de 2 à 5h sans pic de GH après le repas.
Lorsque les concentrations moyennes de GH sont comparées entre un groupe contrôle et des chevaux mis à la diète pendant 48 h, on observe une augmentation de 80% des concentrations sur les premières 24h de diète puis un retour à la normale au bout de 48h. Lorsque les chevaux à la diète sont réalimentés, on observe un pic très important 3h après le repas puis un retour aux valeurs du groupe contrôle au bout de 24h. [*Christensen 1997*]
Lorsqu'on effectue des dosages de GH sur un groupe de chevaux nourris à volonté et sur un groupe mis à la diète, on observe une concentration moyenne en GH plus élevée chez les chevaux à la diète mais sans différence statistiquement significative. Lorsque les chevaux mis à la diète pendant 72h sont réalimentés, on observe une augmentation de la sécrétion de GH 2h après la distribution du repas. [*Nadal 1997*]
Des juments, mises à la diète pendant 48h, présentent pendant cette période une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des pics de sécrétion de GH par rapport à des juments alimentées à volonté sur la même période. [*Buff 2005*]

La synthèse de ces études nous permet donc de dire que la mise à la diète des chevaux provoque une augmentation de la sécrétion de GH et que la réalimentation est suivie d'un pic de sécrétion dans un délai de 2-3h avant de revenir à un profil normal en 24h environ.

2. Régulation hormonale de la sécrétion de GH

1.1. Hormones hypothalamiques

La régulation de la sécrétion de GH est principalement amorcée par deux hormones peptidiques hypothalamiques délivrées à l'adénohypophyse par la circulation porte hypothalamo-hypophysaire. La somatolibérine (GHRH ou GRF) stimule la sécrétion de GH tandis que la somatostatine (GHIH) l'inhibe. La somatolibérine est sécrétée dans le noyau ventro-médial de l'hypothalamus tandis que la somatostatine est sécrétée dans des régions voisines de l'hypothalamus. Ces messagers chimiques neuro-endocriniens ont pour cellules cibles les cellules somatotropes de l'hypophyse.

L'administration de GHRH induit une augmentation rapide de la concentration en GH chez les juments et les poulains. [*Thompson 1992*] La réponse observée est plus importante chez les étalons que chez les juments et les hongres. [*Thompson 1994*]

L’injection de GHRH provoque l’apparition d’un pic de GH qui a une morphologie similaire aux pics endogènes. La réponse est identique chez de jeunes hongres et des juments âgées. Il semble qu’il existe une période réfractaire. En effet, l’administration de GHRH devient inefficace lorsqu’elle est effectuée dans l’heure suivant un pic endogène de GH. [*Christensen 1997*]

La somatolibérine agit en se fixant sur des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique des cellules hypophysaires sécrétrices de GH. Cette fixation active alors le système de l’adényl-cyclase au sein de la membrane cellulaire et entraîne une élévation du taux intracellulaire d’adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L’effet à court terme est une augmentation du transport calcique intracellulaire d’où, en quelques minutes, la fusion des vésicules de sécrétion de GH à la membrane cellulaire et la libération de l’hormone dans la circulation sanguine. L’effet à long terme est nucléaire avec une augmentation de la transcription des gènes responsables de la synthèse de GH.

Cette sécrétion est l’objet d’un rétrocontrôle négatif.

1.2. Facteurs sécrétagogues pour l’hormone de croissance

Les Growth Hormone Releasing Peptide (GHRP) ou sécrétagogues sont capables d'induire la libération de GH chez l'homme ou l'animal après administration intraveineuse, sous-cutanée, intranasale ou même orale.

Les sécrétagogues présentent des actions centrales et agissent à la fois sur l'hypothalamus et sur l'hypophyse. Leur mode d'action sur les cellules somatotropes est différent de celui de la somatolibérine. En effet, ils activent le calcium intracellulaire et dépolarisent la membrane ce qui en fait des antagonistes fonctionnels de la somatostatine

Les sécrétagogues sont d'une part des oligopeptides contenant quelques résidus d'acides aminés (GHRP-6, GHRP-1, GHRP-2, hexarelin) et d'autre part des molécules synthétiques à structure peptidomimétique (L692419 de Merck, NNC260610 de Novo Nordisk, EP51319 d'Europeptides, …).

La Ghrelin est le ligand endogène du récepteur aux sécrétagogues de la GH (RGHS) au niveau de l’antéhypophyse. Cette hormone peptidique est principalement produite par certaines glandes de l’estomac mais aussi par les intestins, les reins, l’hypothalamus et

l’antéhypophyse. C'est un peptide de 28 acides aminés comportant sur la sérine en position 3 un groupement acide n-octanoïque, seule modification de ce type connue sur un peptide et nécessaire à son activité sécrétagogue.

Chez le cheval, plusieurs études rapportent l'augmentation des concentrations de GH circulantes lors de l'utilisation de sécrétagogues : L-163255 de Merck par voie orale [*Christensen 1997*], EP51389 [*Kennedy 2002*] et GHRP-6 [*Borromeo 2005*].

D’autre part, la sécrétion de GH peut être stimulée par les catécholamines, la dopamine et la sérotonine produites par d’autres neurones d’origine hypothalamique ou extra-hypothalamique et libérés dans l’hypothalamus.

La régulation se fait aussi par l’intermédiaire d’un rétrocontrôle négatif exercée par l’IGF-1. Des concentrations sanguines élevées d’IGF-1 mènent à l’inhibition de la sécrétion de GH d’une part par une suppression directe au niveau des cellules somatotropes mais aussi en stimulant la libération de la somatostatine par l'hypothalamus.

De plus, la GH exerce un rétrocontrôle négatif qui inhibe la sécrétion de la somatolibérine et agit probablement également de manière autocrine sur les cellules somatotropes pour inhiber sa propre sécrétion.

C’est l’intégration de tous ces facteurs qui régit la synthèse et la sécrétion de la GH et qui mène au profil pulsatile de la concentration sanguine en GH.

IV. ROLES PHYSIOLOGIQUES

La GH stimule la croissance de pratiquement tous les tissus qui ont la capacité de croître. Elle cause l’augmentation de la taille des cellules, des mitoses et du nombre de cellules ainsi que la différenciation de certains types cellulaires (cellules de l’ostéogenèse, cellules musculaires primitives).

1. Mode d'action de l’hormone de croissance

1.1. Sur le foie

Les cellules du foie subissent l'action directe de la GH ce qui entraîne la synthèse d'un ensemble de facteurs d'origine hépatique, les Insulin-like Growth Factors (IGF). Les

principaux sont l'IGF-1 qui est un peptide de 70 acides aminés et l'IGF-2 qui est constitué de 67 acides aminés. Dans le sang, elles circulent grâce à 6 protéines de transport (IGFBP 1 à 6).

Le traitement de longue durée (1 an) de poulains à l'eGH synthétique entraîne un doublement de la concentration basale d'IGF-1 au cours des 5 premières semaines puis elle reste stable toute la durée restante du traitement. [*Capshaw 2001*]

Une autre étude sur de jeunes chevaux a montré que l'administration de reGH provoque une augmentation de la concentration en IGF-1 dans le liquide synovial. [*Dart 2003*]

1.2. Sur les os

La GH peut agir sur la maturation des cellules germinales de l'os par une action directe sur le cartilage mais de façon moins importante que l'IGF-1. En effet, l'IGF-1 stimule la prolifération des chondrocytes tandis que la GH agit de façon directe en stimulant la différenciation des chondrocytes.

1.3. Sur les muscles

Les effets de la GH sur le muscle squelettique sont directs et indirects via l'IGF-1 qui semble avoir un rôle très important en stimulant la différenciation et la prolifération des myoblastes mais également en augmentant la captation des acides aminés et la synthèse de protéines par les muscles et d'autres tissus.

1.4. Sur le tissu adipeux

Les adipocytes présentent des récepteurs à la GH, son action est donc considérée comme directe.

2. Effets biologiques

La GH est une hormone pléiotrope qui agit comme facteur de croissance (os et muscles), comme facteur de différenciation et comme régulateur métabolique (foie, tissu adipeux et muscles). C'est donc un agent anabolisant physiologique indispensable à la croissance staturale et au maintien de la masse protéique chez l'adulte. Son action sur la croissance s'exerce de manière dépendante de la dose, ce qui n'est pas le cas d'autres hormones comme l'insuline et les hormones thyroïdiennes qui participent aussi à la régulation de la croissance corporelle.

2.1. Effets directs

La GH **stimule l'anabolisme protidique** à partir des acides aminés dont elle favorise le transport à l'intérieur de la cellule. En effet, une diminution des acides aminés utilisés par le foie facilite la disponibilité des acides aminés pour la synthèse protéique par les tissus périphériques et diminue la synthèse hépatique d'urée.

La GH est une hormone **hyperglycémiante** qui active la sécrétion du glucagon.

La GH **stimule la mobilisation des lipides** qui sont catabolisés pour pourvoir aux besoins énergétiques de l'organisme, entraînant une augmentation des acides gras libres non-estérifiés dans le plasma. La glycogenèse peut alors s'effectuer à partir des lipides mobilisés ce qui accroit le pouvoir diabétogène de la GH. L'action de la GH sur la lipolyse est une action directe au niveau des tissus adipeux. Les effets sur le métabolisme des lipides varient selon la balance énergétique de l'animal : si le bilan est négatif, la mobilisation des lipides est augmentée (utilisation des réserves corporelles) et si le bilan est positif, la lipogenèse des tissus est diminuée.

2.2. Effets indirects via l'IGF-1

Effet sur la croissance de l'os et du cartilage : L'hormone de croissance stimule les croissances osseuses et cartilagineuses. La croissance osseuse résulte de plusieurs effets : accumulation de protéines par les chondrocytes et les ostéoblastes, augmentation du rythme de division de ces cellules, et stimulation de la différenciation des chondrocytes en ostéoblastes ce qui entraîne l'accrétion osseuse. La croissance osseuse correspond à deux mécanismes : allongement des os longs au niveau du cartilage de conjugaison (la GH augmente l'activité du cartilage et permet l'allongement de l'os tant que la fusion osseuse n'a pas eu lieu) et formation par les ostéoblastes du périoste et de certaines cavités osseuses d'os nouvellement formé sur les surfaces osseuses plus anciennes (la GH stimule fortement les ostéoblastes donc les os peuvent grandir pendant toute leur existence). Chez le cheval, l'administration de reGH agit sur la vitesse de régénération de l'os. [*Price 2000*] En effet, le traitement a provoqué une augmentation des concentrations en PICP (type 1 collagen carboxyterminal propeptide) et OC (ostéocalcine), marqueurs de la formation de l'os ; et en ICTP (carboxyterminal cross-linked telopeptide du collagène de type 1), marqueur de la résorption osseuse. Malgré cela, de grandes variations interindividuelles sont observées. Le

traitement à la reGH pourrait être un très bon moyen pour accélérer la restructuration de l'os et du cartilage chez le cheval de course, de sport ou le cheval souffrant d'arthrose. [*Dart 2003*]

Effet sur le muscle, la force et la vitesse de cicatrisation : Chez le cheval âgé, il semble que le traitement à la reGH améliore la conformation musculaire mais l'augmentation de la force ou de la performance physique n'a pas été étudiée. [*Malinowski 1997*] D'autres études ont été menées sur la vitesse de cicatrisation de plaies sur les membres mais le traitement à la reGH ne semble pas avoir d'effet significatif sur la guérison immédiate. [*Smith 1999*] Par contre, la vitesse de guérison pourrait être augmentée lorsque la blessure intervient après la fin du traitement à la reGH. [*Dart 2002*]

Ces actions sont théoriques, en pratique, il n'y a pas de preuves de l'action de la GH sur la croissance des animaux. Le traitement quotidien de poulains de 4 à 16 mois d'âge avec 20µg/kg de poids vif d'Equigen en intramusculaire dans l'encolure n'a mis en évidence aucune différence au niveau du poids vif et des mesures corporelles (hauteur au garrot, longueur du corps, largeur du poitrail et de la croupe, circonférence du cœur, longueur de la tête, longueur et circonférence des canons antérieurs et postérieurs, épaisseur de la peau) par rapport à un lot témoin. Toutefois, les injections quotidiennes ont été bien tolérées et elles n'ont pas provoqué de diminution de la consommation de nourriture. [*Capshaw 2001*]

PARTIE II : LA LUTTE ANTIDOPAGE

CONTRE L'HORMONE DE CROISSANCE

I. LA LUTTE ANTIDOPAGE EN FRANCE

1. Le dopage animal

La première définition légale du dopage en France remonte à 1965, en vertu de l'article 1er de la loi n° 65-412 du 1er juin 1965 qui disposait alors que :

"Sera puni d'une amende 500 à 5.000 F quiconque, aura, en vue ou au cours d'une compétition sportive utilisé sciemment l'une des substances déterminées par le règlement d'administration publique, qui sont destinées à accroître artificiellement et passagèrement ses possibilités physiques et sont susceptibles de nuire à sa santé ".
De surcroît l'article 2 dispose que *"Sera puni d'un emprisonnement d'un mois à un an et d'une amende de 500 à 5.000 F ou l'un de ces deux peines seulement quiconque aura, par quelque moyen que ce soit, facilité sciemment l'accomplissement des actes visés à l'article 1er ci-dessus ou aura incité à les accomplir".*

Près de vingt années plus tard, le Législateur modifie la définition du dopage humain d'une part, et crée celle du dopage animal d'autre part. Ainsi l'article 1er de la loi n° 89-432 du 28 juin 1989 dispose tout d'abord :

" Qu'*il est interdit à toute personne d'utiliser, au cours des compétitions et manifestations sportives organisées ou agréées par des fédérations sportives ou en vue d'y participer, les substances et les procédés qui, de nature à modifier artificiellement les capacités ou à masquer l'emploi de substances ou de procédés ayant cette propriété, sont déterminés par arrêté conjoint des ministres chargés des sports et de la santé. Dans les mêmes conditions, il est interdit, sans préjudice du principe de la liberté de prescription à des fins thérapeutiques, d'administrer les substances définies au précédent alinéa ou d'appliquer les procédés visés à cet alinéa, d'inciter à l'usage de telles substances ou de tels procédés ou de faciliter leur utilisation.*

Le médecin qui, a des fins thérapeutiques, prescrit un traitement à une personne est tenu, à la demande de celle-ci, de lui indiquer si ce traitement fait appel à des substances ou des procédés interdits en vertu du premier alinéa du présent article".

Et également :
" Que dans les mêmes conditions que celles définies au paragraphe I du présent article, il est interdit d'administrer ou d'appliquer ***aux animaux*** *des substances ou procédés qui, de nature à produire les mêmes effets que ceux définis au paragraphe I du présent article, sont déterminés par arrêté conjoint des ministres chargés des sports, de la santé et de l'agriculture.*

II est interdit de faciliter l'administration de telles substances ou d'inciter à leur administration ainsi que de faciliter l'application de tels procédés ou d'inciter à leur application".

Plus récemment ces deux définitions ont été amendées par la loi n° 99-223 du 23 mars 1999, puis par la loi n°2006 405 du 5 avril 2006. Les dispositions de ce dernier texte législatif sont désormais intégrées dans le code du sport (Livre II, Titre IV). La nouvelle définition du dopage humain est fixée par l'article L. 232-9, lequel dispose « qu'*il est interdit, au cours des compétitions et manifestations sportives […], ou en vue d'y participer :*
1. D'utiliser des substances et procédés de nature à modifier artificiellement les capacités ou à masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété ;

2. De recourir à ceux de ces substances ou procédés dont l'utilisation est soumise à des conditions restrictives lorsque ces conditions ne sont pas remplies. »

En revanche, la définition du dopage animal demeure inchangée, et continue à s'appuyer sur l'article 1er de la loi n°89-432 (supra).

Dans le milieu des courses, c'est le code des courses, plus restrictif que la loi, qui s'applique. La définition du dopage comporte alors une notion de bonne santé ce qui a conduit à la rédaction des principes fondamentaux du contrôle de la médication :

- 1er principe : un cheval déclaré partant dans une course ou une compétition doit être en bonne santé (critère de bonne santé = absence totale de médicament ou de substance agissant sur son organisme)

- 2ème principe : tout traitement dispensé à un cheval dans le cadre de son entrainement doit l'être de manière transparente et ne doit en aucun cas permettre le maintien à l'entrainement de chevaux présentant des affections incompatibles avec l'effort physique demandé par la compétition

Les motivations de la lutte antidopage sont multiples :

- Assurer le bien-être du cheval
- Préserver une compétition saine
- Protéger la santé des sportifs : jockeys, cavaliers, chevaux
- Protéger l'image des courses et du sport
- Protéger les intérêts des parieurs
- Assurer la sélection des reproducteurs

2. Les lois et règlements en France

2.1. Animaux de compagnie

Pour les animaux de compagnie, il faut se référer à la loi du 8 juillet 2003.
Loi du 8 juillet 2003 autorisant la ratification de la convention européenne pour la protection des animaux de compagnie : article 8: Aucune substance ne doit être administrée à un animal de compagnie (traitements, procédés) afin d'accroître ou de diminuer le niveau naturel des ses performances au cours de compétitions ou à tout autre moment, si cela peut constituer un risque pour la santé ou le bien-être de cet animal

2.2. Animaux avec activité sportive

a. Espèces autres que le cheval (chien, pigeon,...)

Pour les animaux avec activité sportive autres que les chevaux, il faut se référer à la loi du 5 avril 2006.

Loi du 5 avril 2006 relative à la lutte contre le dopage et à la protection de la santé des sportifs ((titre IV « lutte contre le dopage animal » Décret n°2006-1629 du 18/12/2006)) : il est interdit d'administrer ou d'appliquer aux animaux au cours des compétitions et des manifestations sportives organisées ou autorisées par les fédérations concernées, ou en vue d'y participer des substances ou procédés de nature à modifier artificiellement leurs capacités ou à masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété.

Cette loi est issue de la loi Bambuck, très similaire à la loi du 23 mars 1999 à la lutte contre le dopage chez l'homme

La législation pour ces animaux dépend donc du Ministère de la Jeunesse et des Sports et des différentes Fédérations Sportives.

b. Chevaux

Sports équestres :

Au niveau national, il faut se référer à la loi du 5 avril 2006 relative à la lutte contre le dopage et à la protection de la santé des sportifs. Cette législation dépend donc du Ministère de la Jeunesse et des Sports et des différentes Fédérations sportives. (Règlement SHF chapitre 14)

Au niveau international, il faut se référer au règlement FEI (chapitre 6) pour les disciplines suivantes : dressage, CSO, complet, voltige, endurance, attelage, reining.

Courses hippiques :

Il faut se référer au code des courses (art. 198, 200, 201, annexes 5, 15). Cette législation dépend donc du Ministère de l'Agriculture et est appliquée par les deux sociétés mères (France Galop, Cheval Français).

Le code des courses a une très grande force car tous les acteurs de la filière (entraineurs, propriétaires, jockeys et drivers) ont besoin d'un agrément qui leur sera donné lorsqu'ils se seront engagés contractuellement à respecter scrupuleusement le code des courses.

3. Substances interdites et prohibées

3.1. Courses hippiques

Les règles du code des courses s'appliquent à :

- tout cheval, dès lors qu'il est déclaré à l'entrainement en France, même s'il en est sorti provisoirement
- tout cheval entrainé à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entrainement
- tout cheval habituellement entrainé à l'étranger qui est provisoirement stationné ou entrainé en France
- tout cheval déclaré partant même s'il ne prend pas part à la course

a. Substances totalement interdites (« contrôle antidopage »)

Les substances totalement interdites appartiennent aux catégories suivantes :

- stéroïde anabolisant
- facteur de croissance
- substance agissant sur l'érythropoïèse
- transporteur d'oxygène synthétique
- substance ayant des propriétés analogues aux substances ci-dessus
- manipulation sanguine

b. Produits autorisés à l'entrainement mais pas le jour de la course

Toutes les substances autres que celles citées précédemment sont autorisées à l'entraînement si leur usage est justifié par l'état de santé du cheval et si elles sont régulièrement prescrites par un vétérinaire, il n'y donc pas d'entrave aux bonnes pratiques vétérinaires s'il y a une ordonnance.

Il existe un code de pratique des traitements pendant l'entrainement qui a été adopté par la Grande-Bretagne, l'Irlande, l'Italie, l'Allemagne et la France et qui comprend les règles suivantes :

- tous les traitements vétérinaires doivent être dispensés dans l'intérêt de la santé et du bien être du cheval
- chaque traitement doit être totalement justifié par l'état de santé du cheval qui le reçoit
- l'entraîneur doit demander conseil au vétérinaire ayant prescrit le traitement sur le niveau de travail approprié pendant la durée du traitement, ces indications doivent être inscrites sur l'ordonnance
- l'entrainement des chevaux qui ne peuvent travailler du fait d'une blessure ou d'une maladie doit être suspendu et les chevaux doivent recevoir les soins appropriés; les soins vétérinaires ne peuvent être utilisés pour entrainer les chevaux
- l'entraineur doit tenir un registre où sont consignés tous les soins destinés aux chevaux de son effectif et, pour chaque traitement vétérinaire il doit être en possession d'une ordonnance vétérinaire
- aucune substance autre que la nourriture normale ne peut être administrée par voie orale ou parentérale à un cheval le jour de la course, sauf cas de force majeure admis par les commissaires de course, après avis du vétérinaire en service sur l'hippodrome

c. Substances prohibées dès la déclaration de partant (« contrôle des médications)

La mise en évidence de la présence d'une substance prohibée se définit par la mise en évidence de la présence de la substance elle-même ou d'un métabolite de cette substance ou d'un isomère de cette substance ou d'un isomère de ses métabolites. La mise en évidence d'un indicateur scientifique prouvant qu'il y a eu administration ou exposition à une substance prohibée est équivalente à la mise en évidence de ladite substance.

La liste des substances prohibées est définie par rapport à leur action sur l'organisme :

- substances agissant sur le système nerveux
- substances agissant sur le système cardio-vasculaire
- substances agissant sur le système respiratoire
- substances agissant sur le système digestif
- substances agissant sur le système urinaire
- substances agissant sur le système reproducteur
- substances agissant sur le système musculo-squelettique
- substances agissant sur le système hémolymphatique et la circulation sanguine
- substances agissant sur le système immunitaire autres que celles qui sont présentent dans les vaccins agréés
- substances agissant sur le système endocrinien, les sécrétions endocrines et leurs homologues synthétiques
- substances antipyrétiques, analgésiques et anti-inflammatoires
- substances cytotoxiques
- agents masquants

d. Substances à seuil

Il existe deux catégories de substances à seuil. D'une part, certaines substances endogènes du cheval : hydrocortisone, estranediol chez les mâles (sauf hongres), boldénone chez les mâles (sauf hongres), testostérone, dioxyde de carbone libre, méthoxytyramine et d'autre part, certaines substances provenant de la nourriture usuelle du cheval : arsenic, acide salicylique, diméthyl sulfoxyde, théobromine.

Les seuils (tableau 3) sont internationalement définis par les vétérinaires et analystes officiels, puis fixés par les commissaires de France Galop et les Fédérations. Il faut cependant noter que certains seuils ont des valeurs régionales.

Substances	Seuils
Acide salicylique	750µg/mL dans l'urine 6,5µg/mL dans le plasma
Arsenic	0,3µg/mL dans l'urine
Boldénone	0,015µg/mL sous formes libres et conjuguées dans l'urine chez les mâles (à l'exception des hongres)
Diméthyl Sulfoxide	15µg/mL dans l'urine 1µg/mL dans le plasma
Dioxyde de carbone	36mmol/L dans le plasma
Estranediol chez les mâles	Rapport des concentrations de masse des formes libres et conjuguées du 5α-estrane-3β ,17α-diol au 5(10)-estrene-3β, 17α-diol égal à 1 dans l'urine
Hydrocortisone	α1µg/mL dans l'urine
Méthoxytyramine	4µg/mL sous formes libres et conjuguées dans l'urine
Testostérone	0,02µg/mL sous formes libres et conjuguées dans l'urine chez les hongres 0,055µg/mL sous formes libres et conjuguées dans l'urine chez les pouliches et les juments (sauf si gestantes)
Théobromine	2µg/mL dans l'urine

Tableau 3: Liste des substances à seuil
Ce tableau montre les substances à seuil avec les valeurs seuils fixées dans le plasma ou l'urine.

e. Procédés

Certains procédés sont interdits comme les manipulations sanguines (transfusion, autotransfusion, saignée,...) et le barrage, et d'autres sont réglementés comme la manipulation de la gestation et les dispositifs respiratoires.

3.2. Sports équestres

Il y a une discordance des substances prohibées entre le monde des courses et les sports équestres.

D'autre part, même au niveau des sports équestres, il existe des différences de réglementation entre la FFE et la FEI. En effet, la réglementation internationale est moins restrictive du fait de la pression exercée par les nord-américains (ex : Altrenogest, Furosémide, Oméprazole).

a. Règle à l'entrainement

Pour les périodes d'entrainement, rien n'est précisé dans les règlements FEI et SHF alors que pour les compétitions nationales sous la responsabilité de la FFE et qui sont donc régit par la loi du 5 avril 2006, il est précisé qu' « il est interdit d'administrer ou d'appliquer aux animaux au cours (ou **en vue d'y participer**) des compétitions des substances ou procédés de nature à modifier artificiellement leurs capacités ou à masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété ».

b. Règle pour les partants

Aucun cheval participant à un concours jusqu'à 1h (30min) après la (dernière) remise des prix ne doit receler dans ces tissus, fluides corporels ou excrétions, une substance prohibée. Il ne peut pas faire l'objet de l'administration d'une substance prohibée ou d'une manipulation sanguine (sauf après avis du vétérinaire et autorisation du jury).

La FEI a instauré une graduation des sanctions selon les substances utilisées. Les substances prohibées sont ainsi classées dans 3 catégories nommées : dopage, médicaments classe A, médicaments classe B.

Dopage : agents, cocktails ou mélanges de substances qui peuvent affecter les performances; agents masquants; produits généralement non autorisés pour un usage médical chez les chevaux en compétition; produits habituellement prescrits pour l'homme ou d'autres espèces animales; produits utilisés pour hypersensibiliser, désensibiliser les membres ou une autre partie du corps. Cela inclut la liste suivante mais ne se limite pas à elle :

- 2 AINS ou AIS ou plus ou autres combinaisons de produits similaires
- antipsychotiques, antiépileptiques et antihypertenseurs
- antidépresseurs

- tranquillisants, sédatifs, antihistaminiques humains et espèces non équine
- narcoïdes et opioïdes
- amphétamines et autres stimulants du SNC
- bétabloquants
- diurétiques et agents masquants
- stéroïdes anabolisants et facteurs de croissance
- produits hormonaux
- peptides et produits génétiquement recombinants
- substances commercialisées pour l'homme et autres espèces et dont il existe des équivalents pour les équins
- substances hypersensibilisantes ou sensibilisantes (capsaïcine)
- substituts sanguins

Médicaments classe A: substances susceptibles d'influencer les performances en soulageant une douleur, en calmant, en stimulant ou en produisant ou modifiant d'autres effets psychologiques ou comportementaux. Cela inclut :

- anesthésiques locaux
- stimulants cardiaques sympathomimétiques
- stimulants respiratoires et excitants du SNC
- clenbutérol et autres bronchodilatateurs
- un seul AINS +/- métabolites
- un corticoïde
- sédatifs, tranquillisants ou antihistaminiques à usage équin
- myorelaxants
- anticoagulants
- et autres à constitution chimique analogue ou effets comparables

Médicaments classe B : substances ayant un potentiel limité pour améliorer les performances ou auxquels les chevaux ont été accidentellement exposés. Cela inclut :

- isoxuprine
- DMSO > seuil
- mucolytiques et antitussifs
- substances anticholinergiques (atropine, scopolamine)
- méthylxanthines (caféine, theophylline, théobromine)

- terpines et contaminants inorganiques
- « évacuants » (sulfate de magnésium)
- dérivés d'origine animale ou végétale (bufoténine, hordénine, tyrosine,...)

Les substances à seuil et les seuils sont les mêmes que dans les courses hippiques.

4. Réalisation des contrôles

Ils sont propres à chaque discipline et très formalisés pour assurer la régularité, la traçabilité et la force juridique des opérations.

4.1. Chevaux choisis pour les contrôles

a. Courses hippiques

Les contrôles sont effectués sur les 3 premiers des groupes I, les 2 premiers des groupes II, les gagnants de courses principales, les 5 premiers des quintés et des chevaux pris au hasard dans de nombreuses courses.

De plus, des contrôles peuvent être effectués lors des épreuves de qualification des trotteurs, sur des chevaux à l'entrainement ou encore sur des chevaux sortis de l'entrainement.

Tableau 4a : Contrôles effectués sur les courses de galop

	2004	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**
Courses avec contrôles	6516	6611	6718	6789	6832
% de courses contrôlées	97,9	98,8	99,3	99,4	99,6
Chevaux prélevés	7923	7974	8398	8652	8639
Nombre de cas positifs	14	30	18	15	26

Tableau 4b : Contrôles effectués à l'entrainement

	2004	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**
Nombre de visites	154	171	190	198	263
Chevaux prélevés	630	684	761	697	1067
Nombre de cas positifs	6	6	7	8	14

Tableau 4c : Contrôles effectués hors entrainement

	2004	2005	2006	2007	2008
Nombre de visites	9	125	121	123	135
Chevaux prélevés	6	113	114	97	118
Nombre de cas positifs	1	1	0	0	0

Tableau 4 : Statistiques des contrôles effectués par France Galop d'après le Service des Licences et Livrets de France Galop

Ces 3 tableaux illustrent l'évolution du nombre des contrôles effectués par France Galop entre 2004 et 2008. On peut donc constater une augmentation du nombre des contrôles lors des courses mais aussi à l'entrainement et hors entrainement.

		2007	2008
Total des chevaux contrôlés dont		15484	16092
Courses	Nombre de courses	10837	10984
	Nombre de chevaux	12771	13061
	Cas positifs	26	45
Prélèvements bicarbonate ou « Milk Shake » en course	Nombre de courses	29	32
	Nombre de chevaux	377	397
Qualifications	Nombre de réunions	242	251
	Nombre de chevaux	1842	2066
	Cas positifs	3	4
Contrôles à l'entrainement	Nombre d'entraineurs	157	199
	Nombre de chevaux	474	523
	Cas positifs	2	6
Contrôles de chevaux sortis provisoirement de l'entrainement	Nombre de mission	13	29
	Nombre de chevaux	20	45
	Cas positifs	0	0

Tableau 5 : Statistiques des contrôles effectués par la Société d'Encouragement du Cheval Français

Ce tableau illustre l'évolution du nombre des contrôles effectués par le Cheval Français entre 2007 et 2008. On peut donc constater une augmentation du nombre des contrôles lors des courses et des qualifications mais aussi à l'entrainement et hors entrainement.

b. Sports équestres

Les contrôles ne sont pas effectués sur tous les concours.
Au niveau FEI, sont contrôlés les 3 premiers en individuel et en équipe des Jeux Olympiques et des championnats.

D'autres contrôles peuvent être demandés par la SHF, la FFE, la FEI, l'Agence Française de Lutte contre le Dopage et la direction générale des sports. Dans ce cas, ils sont effectués sur des chevaux désignés ou sur un choix aléatoire de chevaux.

4.2. Réalisation des prélèvements

Les prélèvements biologiques sont constitués par le prélèvement d'une quelconque partie du cheval ou d'un élément en contact avec une quelconque partie du cheval. Un prélèvement d'urine est réalisé accompagné ou non d'un prélèvement sanguin selon les cas. Le prélèvement d'urine ne peut s'effectuer que par miction spontanée et le prélèvement sanguin s'effectue par ponction à la veine jugulaire.

Le matériel utilisé est identique entre le monde des sports équestres et celui des courses hippiques. Le laboratoire agréé fournit un kit comprenant tout le matériel nécessaire [*Bruyas 2009*] :

- pots en plastique à usage unique emballés hermétiquement pour le recueil de l'urine
- boîtes en cartons scellées renfermant 3 flacons à bouchons sécurisés emballés individuellement, 1 sachet scellé contenant 1 aiguille à vacutainer et 6 tubes en plastique héparinés de 10mL, un sachet avec 2 paires de gants en latex, une compresse d'antiseptique emballée individuellement, 1 sachet à zip pour retourner la partie du procès verbal de prélèvement au laboratoire et un jeu d'étiquettes avec le même numéro et le même code barre pour identifier les différents échantillons.
- Sacs isothermes et blocs eutectiques pour emballer les échantillons lors des envois
- Gros sacs d'expédition se fermant avec des scellés
- Formulaires de procès verbal de prélèvement à remplir

Le prélèvement biologique sera partagé en deux parties en vue des autres expertises.

a. Courses hippiques

Les prélèvements sont effectués par des vétérinaires salariés et des vétérinaires agréés missionnés par la FNCF.

Les prélèvements peuvent être décidés par les Commissaires de France Galop ou par les Commissaires des Courses sur tout cheval déclaré partant, qu'il prenne part ou non à la course. La décision est notifiée oralement à l'entraîneur concerné ou à son représentant. Celui-ci doit alors emmener directement le cheval à l'endroit de l'hippodrome où a lieu le prélèvement.

Tous les prélèvements sont soumis à l'anonymat.

L'entraîneur ou le représentant qu'il a mandaté à cet effet, doit être présent pendant les opérations de prélèvement. L'absence de l'entraîneur ou de son représentant à toute ou partie des opérations de prélèvement est réputée valoir acceptation expresse de sa part de la régularité des conditions dans lesquelles ont été effectuées ces opérations. Pendant le prélèvement, le cheval doit pouvoir rester sous le contrôle visuel de l'entraîneur ou de son représentant, qui ne doit le perturber en aucune façon.

Lorsque les opérations du prélèvement sont terminées, le procès-verbal de prélèvement s'y rapportant est établi par le vétérinaire responsable des opérations de prélèvement ou par son aide et signé par le vétérinaire. L'entraîneur ou son représentant est dans l'obligation de signer le procès-verbal de prélèvement, qu'il ait ou non assisté aux opérations de prélèvement.

Le vétérinaire responsable des opérations de prélèvement adresse le procès-verbal de chaque prélèvement effectué au Secrétariat de la Fédération Nationale des Courses Françaises. Les prélèvements sont acheminés dans les meilleurs délais au laboratoire de la Fédération Nationale des Courses Françaises. L'entraineur garde le double du procès verbal de prélèvement.

Le second échantillon est stocké, il sera analysé dans un laboratoire étranger désigné par l'association des entraineurs en cas de positivité.

b. Sports équestres

Lorsqu'un cheval a été désigné pour être soumis au prélèvement, le vétérinaire doit choisir un moment de prélèvement qui ne perturbe pas le déroulement sportif (pas entre le 1er parcours et un barrage par exemple), l'idéal est cependant de procéder au prélèvement après une sortie de piste pour avoir le maximum de chance d'obtenir une miction spontanée assez rapidement (si le cheval doit aller à la remise des prix il est surveillé pendant l'attente et ne doit pas retourner au box). Lorsque le vétérinaire a décidé du moment du prélèvement d'un cheval désigné il en informe alors le cavalier, le meneur, ou le longeur. Ce dernier devra d'ailleurs signer la notification de convocation au prélèvement. A partir de ce moment, le cheval est placé sous la surveillance soit du vétérinaire, soit de son aide, soit d'un officiel désigné par le président du jury. Le cheval peut si besoin être marché, il sera dessellé et éventuellement douché, il n'est en revanche rentré dans aucun box autre que celui où sera réalisé le prélèvement. Le signalement du cheval est vérifié pour juger s'il est bien conforme au livret ou au passeport présenté. Son identification électronique est également vérifiée.

Le carton renfermant le matériel de prélèvement est ouvert devant le cavalier ou la personne qu'il désigne pour le représenter. Le vétérinaire ou son aide met des gants puis ouvre un des pots pour recueillir l'urine, pot qui est placé dans un collecteur muni d'un manche. Le cheval est rentré dans le box et la personne chargée du prélèvement d'urine y pénètre également. Il est à noter que lorsque le cheval sort de piste, qu'il a récupéré une respiration de repos et qu'il est placé dans un environnement calme, il y a 75 à 80% de chance qu'il urine dans les 15 minutes qui suivent (un box où règne une semi obscurité est un environnement encore plus favorable).

Une fois l'urine collectée, elle est répartie dans 2 des 3 flacons à bouchon (un pour l'analyse immédiate et un pour l'éventuelle contre expertise), lorsque le bouchon est fermé il assure le scellé du flacon qui ne peut plus être ouvert que par une machine spéciale.

Un prélèvement sanguin est ensuite réalisé par le vétérinaire, 2 tubes de 10 ml sont placés après collage d'une étiquette numérotée dans un sac en plastique scellé qui porte le même numéro, cet échantillon sera analysé à l'arrivée au laboratoire. Deux autres tubes de sang sont placés après apposition d'une étiquette dans le 3ème flacon qui sera bouché. Ces 2 tubes seront utilisés en cas de contre expertise.

En cas d'échec du recueil d'urine, 2 tubes de sang supplémentaires sont recueillis ce qui fait que l'échantillon analysé à l'arrivée au laboratoire est alors constitué de 4 tubes de 10mL de sang.

Une fois les prélèvements effectués un procès verbal de prélèvement est rempli, il est signé par le vétérinaire et par le cavalier ou son représentant. Une partie de ce PV est placé avec les échantillons, cette partie ne permet pas d'identifier ni le cheval ni le cavalier. Une partie du PV est également remis au cavalier (ou placé dans le livret du cheval). Les autres parties ou exemplaires du PV seront ensuite envoyées à la FFE ou la SHF, à l'AFLD et la DRJS. En règle générale le vétérinaire signale dans le livre, dans la page prévue à cet effet, que le cheval a été soumis à des prélèvements dans le cadre de la lutte contre le dopage et notifie la nature des prélèvements (sanguins et éventuellement urinaires).

Au retour de sa mission, le vétérinaire se chargera de l'emballage des cartons d'échantillons dans les sacs isothermes avec les blocs eutectiques, du dépôt de ces sacs dans les gros sacs d'expédition sur lequel un scellé est placé puis de l'expédition des échantillons vers le laboratoire. Il envoi par ailleurs par courrier un compte-rendu de mission et les feuillets des procès verbaux à l'AFLD.

Pour la FFE et la SHF, les prélèvements sont effectués par des vétérinaires agréés assermentés missionnés par l'Agence Française de Lutte contre le Dopage ou la SHF.

Pour les épreuves FEI en Europe, ils dépendent d'un programme MCP de vétérinaires agréés missionnés par la FEI : 1 à 3 vétérinaires par pays.

Pour les épreuves FEI hors Europe, les prélèvements sont effectués par un vétérinaire délégué FEI.

Tous les prélèvements sont soumis à l'anonymat. Le premier échantillon est envoyé au LCH pour les compétitions FFE et SHF; tandis que pour les compétitions FEI, il est envoyé dans le seul laboratoire agréé tous les 4 ans (actuellement LCH). Les procès verbaux de prélèvements sont établis par le vétérinaire et sont adressés sous enveloppe scellée à l'AFLD, la SHF ou la FEI. La personne responsable du cheval garde le double du procès verbal de prélèvement. Le second échantillon est stocké. En cas de positivité, il peut être analysé à la demande de la personne responsable du cheval dans le même laboratoire en présence d'un expert et par un autre analyste choisi par la personne responsable dans une liste agréée.

4.3. Réalisation des analyses

Déroulement de la séquence d'analyse :

- Criblage (filtre) :
  - Méthodes générales : GC/MS, HPLC/MS
  - Méthodes ciblées : ELISA

Le criblage est effectué pas catégorie de molécules. Ainsi au LCH, le prélèvement est divisé en plusieurs échantillons qui partent dans chacun des départements d'analyse (alcalins hydrolysés; β-ago-sédatifs; stéroïdes anabolisants; AINS, alcalins; plasmas silylés, méthylés; ammoniums quaternaires; diurétiques, corticoïdes).

- Confirmation : spectrométrie de masse recommandée
- Contre expertise

II. DETECTION DU DOPAGE A L'HORMONE DE CROISSANCE

Le laboratoire de dépistage doit adapter ses procédures d'analyses en fonction des substances recherchées car il faut tenir compte de leurs propriétés physico-chimiques et pharmacologiques et aussi des particularités métaboliques de l'espèce concernée.

De plus, il existe deux types de cas :

- soit la substance ou ses métabolites sont totalement exogènes (xénobiotiques) : dans ce cas, seule la limite de détection de la technique d'analyse et les propriétés cinétiques de la substance dans l'organisme seront à prendre en compte
- soit la substance est endogène : dans ce cas, il est nécessaire de déterminer un seuil au-delà duquel il est possible de déclarer un cas « positif »

La détection des hormones protéiques se révèle difficile d'une part à cause de leur poids moléculaire élevé et d'autre part à cause de leur demi-vie très courte. Les moyens analytiques classiques tels que le couplage spectrométrie de masse/chromatographie en phase gazeuse se révèlent inefficaces sur ces molécules.

De plus, en ce qui concerne l'hormone de croissance, d'autres difficultés se présentent au niveau de sa détection [*Mc Hugh 2005*] :

- la faible différence entre la séquence des acides aminés de la partie principale de la GH produite par la glande pituitaire et celle de la GH recombinante
- la nature hétérogène de la GH

- la présence de protéines transporteurs de GH dans le plasma
- la possibilité de réactions croisées avec des hormones polypeptides homologues (ex : prolactine)
- l'immunoréactivité hétérogène des anticorps monoclonaux utilisés dans les immuno-essais commercialisés
- la demi-vie courte de la GH dans la circulation générale
- la libération physiologique pulsatile de la GH
- l'augmentation physiologique de la concentration 2h après l'exercice

1. Chez l'homme

1.1. Détection de la molécule

a. Immunodosage [*Bonnaire 1995*]

Cette méthode est utilisée quasi-exclusivement pour les procédures de criblage (première phase de détection non spécifique). Elle repose sur une réaction entre un antigène, l'antigène étant la molécule à doser ou à détecter, et un anticorps. Il se produit soit une compétition, soit c'est une méthode « sandwich » où les deux extrémités de la chaîne de l'antigène sont reconnues par les anticorps. On peut utiliser des anticorps monoclonaux, plus spécifiques, ou des anticorps polyclonaux.

La visualisation des résultats se fait par mesure de radio-éléments (radio-immuno-essais) ou par mesure d'activité enzymatique (ELISA).

Cette méthode présente plusieurs types de limites. D'une part, son utilisation sur des matrices urinaires complexes peut provoquer des croisements non spécifiques ce qui peut amener à des réponses faussement positives. D'autre part, les résultats sont exprimés en unités arbitraires qui sont généralement étroitement liées à la méthode utilisée d'où la nécessité de vérifier la corrélation entre les différentes techniques utilisées.

Cette méthode peut être utilisée avec une spécificité suffisante pour distinguer des peptides d'origine humaine ou animale (EPO humaine administrée à un cheval, ACTH synthétique administrée à un cheval).

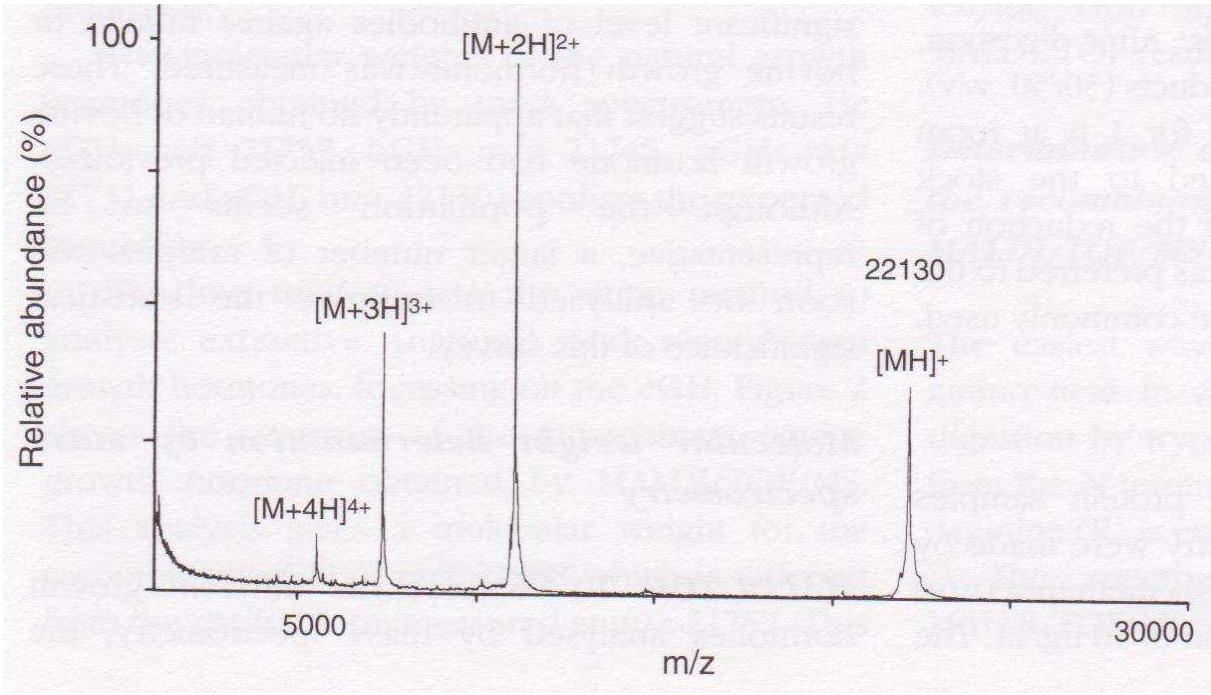
b. Méthodes physico-chimiques [*Bonnaire 1995*]

Le couplage spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse est impossible pour les polypeptides car l'étape de séparation en chromatographie en phase gazeuse limite la gamme des molécules analysées à celles qui sont susceptibles d'être volatilisées à haute température sans être dégradées.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode parfaitement adaptée à la séparation de ces analytes.

Les détecteurs habituels (spectrophotomètres ultra-violets ou visibles) ne sont pas suffisamment spécifiques et sensibles pour pouvoir être employés.

Il existe des spectromètres à « temps de vol » (TOF) qui permettent de détecter et de quantifier des quantités infimes de molécules dont les masses sont supérieures à 20.000Da.



<u>Figure 2</u> : Spectre de masse de l'hGH par MALDI/TOF
Cette figure montre le spectre spécifique de l'hGH obtenu grâce à un spectromètre de masse MALDI/TOF. On constate ainsi que l'hGH pèse environ 22.130Da. [*Bonnaire 1998*]

Par contre, le couplage de l'HPLC avec la spectrométrie de masse est efficace grâce à de nouveaux modes d'ionisation comme l'électrospray ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Ces modes permettent la création d'ions multichargés et leur transfert optimum vers le filtre de masse ce qui rend possible la détermination quantitative et

qualitative de molécules de très haut poids moléculaire (> 100.000 Da). Ces spectromètres sont dits à « trappe d'ions » ou quadripolaires.

Ces techniques ont l'avantage d'allier spécificité et sensibilité et de permettre la réalisation d'un séquençage peptidique.

La GH endogène existe sous plusieurs formes : l'isoforme à 22kDa est la plus abondante et représente 75% de la GH circulante, les autres formes (17 et 20 kDa et autres fragments) sont connues sous le terme de « non-22kDa ». [*Wallace 2001*]
Lors d'un exercice, la concentration sérique en GH augmente fortement mais il existe des différences en fonction de la nature et de la durée de l'exercice, et de l'âge, du sexe, de l'entrainement et de l'alimentation de l'individu. Pendant l'exercice, on observe une augmentation des concentrations de toutes les isoformes bien que l'isoforme 22kDa soit produite majoritairement (73% de la GH totale au pic de concentration). Après l'exercice, il se produit une augmentation de la proportion des isoformes non-22kDa due en partie à des différences de vitesse d'élimination entre les différentes isoformes. [*McHugh 2005*]
La GH recombinante contient seulement l'isoforme 22kDa et l'administration de rhGH mène à une diminution marquée des isoformes non-22kDa endogènes par des mécanismes de rétrocontrôle négatif (l'augmentation de la concentration en IGF-1 induite par l'administration d'une dose supraphysiologique provoque un rétrocontrôle négatif sur l'antéhypophyse ce qui diminue la sécrétion endogène de GH).

La mesure de la GH totale ou de l'isoforme 22kDa est inutile pour la détection des abus à cause de la variabilité interindividuelle de la réponse à l'exercice et de la courte demi-vie de la GH endogène.

Ainsi la présence d'un ratio 22kDa/non-22kDa élevé a été proposé comme un moyen de détection de l'usage de GH exogène. L'âge, le sexe, le statut physiologique et l'état pathologique n'affectent pas les proportions relatives entre les différentes isoformes. L'exercice provoque une augmentation de l'isoforme 22kDa ce qui entraîne une diminution de la sensibilité du test lorsqu'il est fait en post-exercice. Les différents isoformes ont des demi-vies courtes donc la fenêtre de détection est assez restreinte (environ 24h). La sécrétion spontanée de GH revient à sa valeur de base 48h après la dernière administration de GH.

Une autre publication décrit que la détection de l'administration de rhGH par mesure des isoformes de la GH n'est fiable que dans les 3h suivant la dernière dose de GH. De plus, il semblerait que le ratio avec les meilleures sensibilités et spécificités soit rhGH/GHendogène. Ce test ne peut donc pas être appliqué lors des compétitions du fait de la faible fenêtre de détection, par contre il peut être utile lors de tests effectués hors des jours de compétition. [*Wallace 2001*]

Cette méthode ne permet pas de détecter le dopage à base de GH dérivée de la glande pituitaire ou l'utilisation de sécrétagogues ou d'IGF-1.

Les radio-immuno-essais et les IRMA permettent de détecter toutes les isoformes circulantes alors que les essais immunofonctionnels (IFA) ont l'avantage de détecter seulement les isoformes biologiquement actives. Les valeurs obtenues par la méthode IFA sont donc 26,8% plus faibles que celles obtenues par la méthode IRMA. L'IFA est une méthode ELISA qui repose sur deux sites de liaison d'un récepteur transmembranaire : un site de liaison à la GH et un site de liaison pour un anticorps monoclonal.

La présence de fragments d'isoformes, qui peuvent contenir des sites de liaison pour les anticorps, peut mener à une surestimation des concentrations des isoformes totales ou fonctionnelles. [*McHugh 2005*]

1.2. Suivi de marqueurs

Les marqueurs ou traceurs biologiques peuvent être d'autres hormones, peptidiques ou non, dont la production est significativement modifiée ou des altérations de paramètres biologiques dont les valeurs usuelles sont connues.

Les actions anaboliques de la GH mènent à la production de plusieurs protéines. Leurs concentrations sériques ou les ratios de leurs concentrations peuvent être utilisés pour détecter l'administration de GH exogène. De plus, en utilisant des approches statistiques appropriées (fonctions discriminantes) reliant les mesures de plusieurs marqueurs, la sensibilité et la spécificité des tests sont augmentées par rapport aux analyses qui n'utilisent qu'un seul marqueur. [*McHugh 2005*]

L'équipe de recherche GH-2000 a identifié deux types de marqueurs potentiels : les molécules produites par le foie appartenant à l'axe IGF/IGFBP (IGF-1, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3,

ALS) et les marqueurs de la minéralisation et du renouvellement des os et cartilages (ostéocalcine, P-III-P, ICTP, PICP). [*Wallace 2000*]

a. Marqueurs de l'axe IGF/IGFBP

IGF-1 [Wallace *1999, Dall 2001, Minuto 2003, Kniess 2003*]

L'IGF-1 est un candidat marqueur idéal car ses variations au cours de la journée et d'un jour à l'autre sont très faibles. Après administration de GH, on observe une augmentation uniforme dose-dépendante de la concentration d'IGF-1. De plus, sa concentration basale est basse et elle subit peu de modifications avec l'exercice. D'autre part, la cinétique d'élimination de l'IGF-1 suggère une détection possible pendant plusieurs jours après l'arrêt de l'administration de GH.

On utilise la concentration totale en IGF-1 plutôt que la concentration en IGF-1 libre car cette dernière est moins sensible à l'administration de GH.

95% de l'IGF-1 circulante est liée à des protéines de transports (IGFBP 1 à 6) dont la principale est l'IGFBP-3 ce qui module son action et sa biodisponibilité.

L'IGF-1 totale semble donc être un marqueur intéressant pour la détection du dopage avec de la rhGH.

IGFBP-3 [*Wallace 1999*]

La concentration de l'IGFBP-3 augmente après l'administration de GH mais de façon moins uniforme et dose-dépendante que l'IGF-1. Sa concentration est stable au cours de la journée, elle présente peu de changement en fonction de l'exercice et sa cinétique d'élimination suggère une détection possible pendant plusieurs jours après l'arrêt de l'administration de GH. L'IGFBP-3 est donc un marqueur possible pour la détection du dopage avec la rhGH.

IGFBP-2 [*Wallace 1999*]

Lors d'une administration de GH, la concentration d'IGFBP-2 diminue et est quasi-nulle au bout de 3 jours de traitement. Mais la gamme de variation des concentrations en IGFBP-2 est faible. De plus, il existe de grandes variations entre les individus et sous l'effet d'un exercice. Pour finir, après l'arrêt des administrations de GH, il se produit un rebond inexpliqué de la concentration d'IGFBP-2. Toutes ces caractéristiques en font un mauvais marqueur.

IGFBP-1 [*Wallace 1999*]

Cette molécule présente une grande variabilité, c'est donc un mauvais marqueur.

ALS : Acid-labile subunit [*Wallace 1999, Di Luigi 2002, McHugh 2005, Wallace 2000*]

Sa concentration est stable au cours de la journée, l'exercice provoque peu de modifications. L'administration de rhGH provoque une augmentation de la concentration en ALS mais elle est moins importante que celle de l'IGF-1 et de l'IGFBP-3 ce qui en fait donc un moins bon marqueur.

L'IGF-1 et l'IGFBP-3 semblent être des marqueurs spécifiques de l'administration de rhGH mais ils ne semblent pourtant pas être une méthode suffisamment fiable pour détecter le dopage chez tous les individus et en particulier lors de dosages faibles.

b. Marqueurs du renouvellement et de la minéralisation des os et cartilages

Lors d'administration de GH, il se produit une augmentation marquée du turnover de l'os et du collagène. Ces changements ont une durée importante. Normalement ce sont des marqueurs stables. [*Longobardi 2000*]

La pratique d'un exercice de type endurance provoque une augmentation marquée de toute cette catégorie de marqueurs, mais l'administration de GH provoque une augmentation encore plus marquée. Ces changements persistent au moins 96h. [*Wallace 2000*]

Ostéocalcine plasmatique et phosphatase alcaline

L'ostéocalcine et la phosphatase alcaline de l'os sont des marqueurs de la minéralisation osseuse.

La concentration en ostéocalcine augmente de façon non-dose-dépendante après l'administration de GH et les hommes présentent une augmentation supérieure à celle des femmes. Il se produit aussi une légère augmentation 1h après l'exercice mais elle est non significative.

Le taux d'ostéocalcine est toujours élevé à J84 après un traitement de 28 jours à la GH. [*Longobardi 2000*]

La phosphatase alcaline spécifique de l'os (BS-ALP) est dépendante de la posture. Elle présente une augmentation transitoire induite par l'exercice. Par contre, on n'observe pas de différence significative entre un groupe traité à la GH et un groupe placébo avec une semaine

de traitement mais des études sur plusieurs mois mettent en évidence soit une diminution initiale soit une augmentation ce qui en fait donc un mauvais marqueur.

P-III-P : extension peptidique N terminale du procollagène de type III

Le peptide terminal du procollagène III est un marqueur de la formation du collagène de type III (principalement dans les tissus mous) avec des variations de la concentration basale très faible au cours de la journée, d'un jour à l'autre et en fonction des sexes.
Il existe une relation négative significative entre l'âge et ce marqueur.
Le taux de P-III-P est toujours élevé à J84 après un traitement de 28 jours à la GH. [*Longobardi 2000*]
De plus, après administration de GH, il présente une augmentation dose-dépendante. Par contre, comme c'est un marqueur des tissus mous, il peut augmenter lors de blessures et de certaines conditions pathologiques comme les fibroses pulmonaires, les maladies hépatiques et les cirrhoses du foie. Malgré ce dernier point, P-III-P semble être un marqueur intéressant.

ICTP : télopeptide C terminal du collagène de type I

C'est un marqueur de résorption osseuse. Il existe une relation négative significative entre l'âge et ce marqueur.
Il présente une augmentation transitoire induite par l'exercice et aussi par l'administration de GH. La réponse à la GH est dose-dépendante. De plus, après administration de rhGH, la réponse à l'exercice est plus importante. L'ICTP semble donc être un marqueur plutôt spécifique.

PICP : propeptide C terminal du collagène de type I

Ce marqueur présente une augmentation durable induite par l'exercice et aussi par l'administration de GH. Les niveaux sont plus élevés chez les hommes que chez les femmes.
De plus, après administration de rhGH, la réponse à l'exercice est plus importante. Il pourrait donc être un marqueur intéressant.

c. Leptine

La leptine est libérée par les adipocytes en réponse à la GH mais ce marqueur présente trop de variations pour pouvoir être utilisé en pratique. Dans le groupe traité à la GH, il y a de grosses différences entre les individus pendant le début du traitement. Puis, après l'arrêt des injections,

il se produit une forte diminution pour tous les individus. La leptine est donc un très mauvais marqueur.
Les marqueurs les plus spécifiques semblent donc être P-III-P et ICTP car ils présentent peu de modifications avec l'exercice, une réponse significative à l'administration de GH et une persistance d'un taux élevé au moins 96h après l'arrêt des traitements. Leur utilisation permet de séparer le groupe traité du groupe placébo dans 87,5% des cas. [*Wallace 2000*]
Une autre étude montre que 4 jours après l'arrêt du traitement à la GH, les concentrations en P-III-P et ICTP sont encore anormalement élevées. [*Minuto 2003*]
Une dernière étude montre que l'augmentation des concentrations en ostéocalcine et en P-III-P persiste pendant 8 semaines après l'arrêt de l'administration de GH. [*Longobardi 2000*]

Il semble donc que pour augmenter la sensibilité, il serait intéressant de combiner ces marqueurs avec d'autres de l'axe IGF-IGFBP.

Les analyses à partir d'un seul marqueur manquent d'une spécificité suffisante pour détecter l'utilisation abusive de GH exogène. C'est pourquoi l'utilisation de plusieurs marqueurs dans des analyses avec des fonctions discriminantes permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité.

Plusieurs modèles sont proposés. Les ratios IGF-1/IGFBP-2 et IGFBP-3/IGFBP-2 sont tous les deux augmentés jusqu'à 30h après la dernière administration de GH. [*Kicman 1997*] Pour l'équipe GH-2000, la combinaison la plus simple de plusieurs facteurs pour obtenir de meilleures sensibilité et spécificité est celle qui prend en compte l'IGF-1 et la P-III-P. IGF-1*P-III-P et IGF-1*IGFBP-3 présentent une augmentation significative dans une étude sur l'administration de GH. [*Kniess 2003*]

2. Chez le cheval

2.1. Détection de la molécule

a. Méthodes physico-chimiques

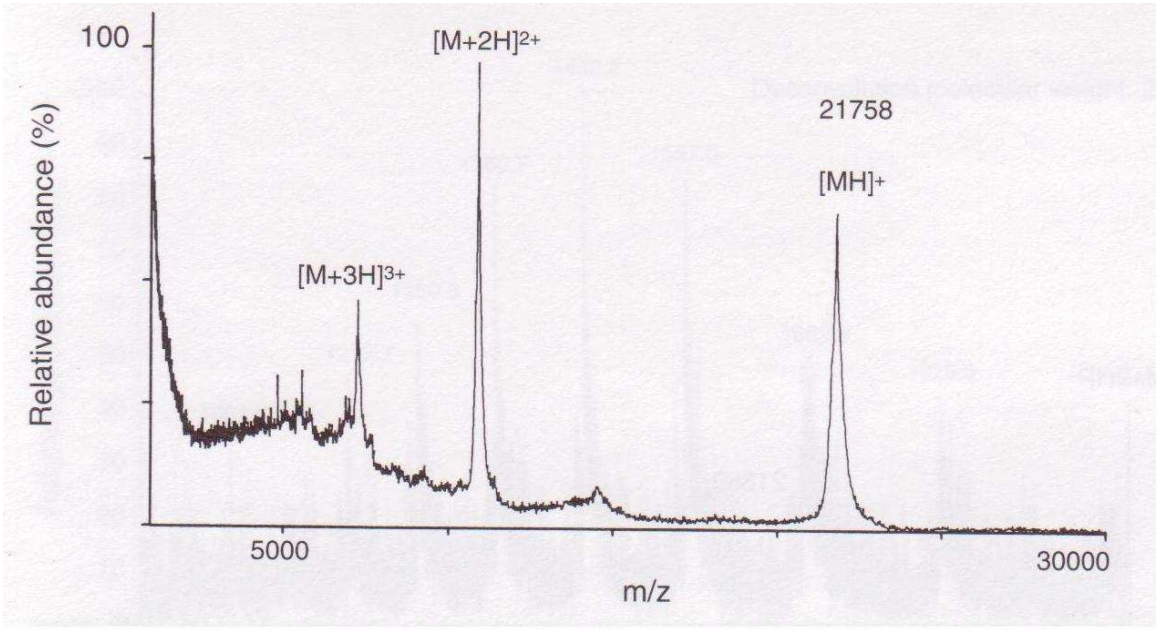


Figure 3a : Spectre de masse de l'eGH par MALDI/TOF
Cette figure montre le spectre spécifique de l'eGH obtenu par un spectromètre MALDI/TOF. On observe ainsi que le poids moléculaire de l'eGH est d'environ 21.758Da. [*Bonnaire 1998*]

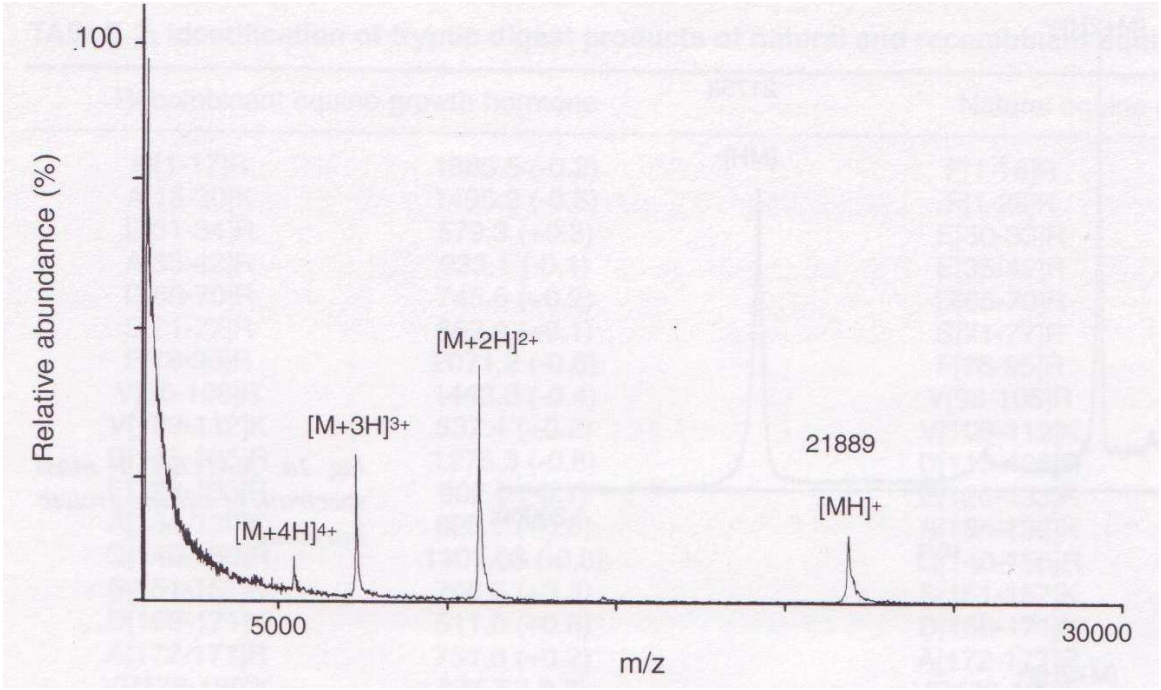


Figure 3b : Spectre de masse de la reGH par MALDI/TOF
Cette figure montre le spectre spécifique de la reGH obtenu par un spectromètre MALDI/TOF. On observe ainsi que le poids moléculaire de la reGH est d'environ 21.889Da. [*Bonnaire 1998*]

Ces deux spectres de masse MALDI/TOF (figures 3a et 3b) mettent en évidence la différence de poids moléculaire entre l'eGH naturelle et la reGH.

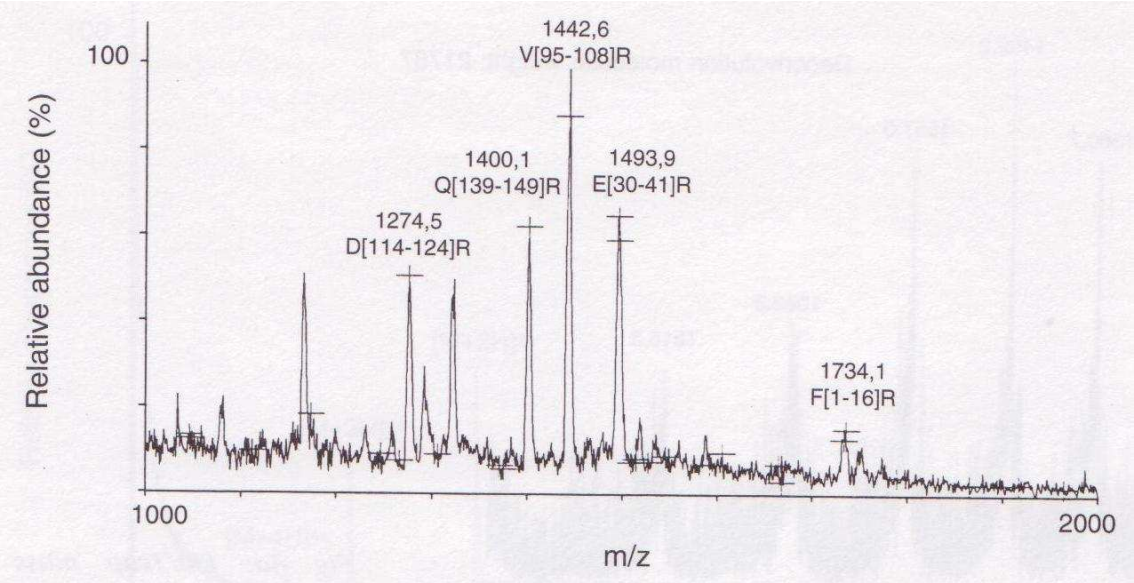


Figure 4a : Spectre de masse de l'eGH après digestion par la trypsine avec un appareil MALDI/TOF
Cette figure illustre le spectre spécifique de l'eGH après digestion par de la trypsine obtenu par un spectromètre MALDI/TOF. On constate alors que le fragment F, qui représente la partie N-terminale de la protéine, possède 16 acides aminés et pèse environ 1734Da. [*Bonnaire 1998*]

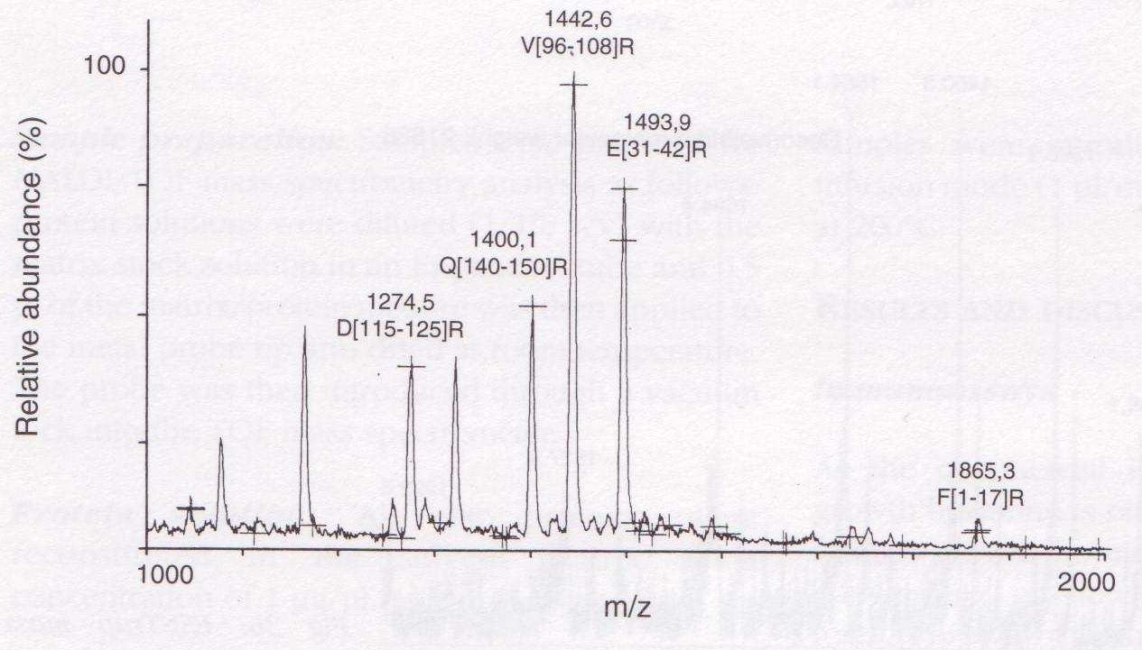
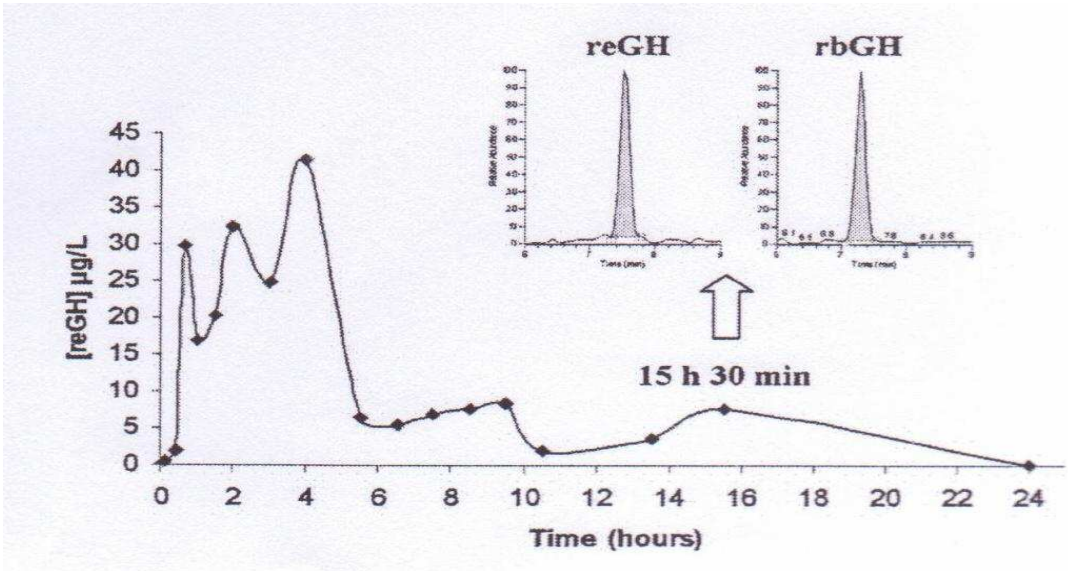


Figure 4b : Spectre de masse de la reGH après digestion par la trypsine avec un appareil MALDI/TOF
Cette figure illustre le spectre spécifique de la reGH après digestion par de la trypsine obtenu par un spectromètre MALDI/TOF. On constate alors que le fragment F, qui représente la partie N-terminale de la protéine, possède 17 acides aminés et pèse environ 1865Da. [*Bonnaire 1998*]

Les spectres de masse MALDI/TOF obtenus après digestion enzymatique de l'hormone de croissance équine naturelle et recombinante (figure 4a et 4b) montrent une différence au niveau du fragment F. En effet, pour l'eGH naturelle, le fragment F est trouvé à la masse 1734,1Da et est constitué des 16 premiers acides aminés de la séquence. Pour la reGH, la masse du fragment F est de 1865,3Da ce qui correspond aux 17 premiers acides aminés. Il y a donc une différence de 131,2Da qui met en évidence la présence de la méthionine qui est ajoutée en position 1 dans la reGH. [*Bonnaire 1999, Bailly-Chouriberry 2008*]

Pour la reGH, les ponts disulfures se trouvent entre les cystéines n°53 et 164 et entre les cystéines n°181 et 189. Il n'y a pas de modification de la localisation des ponts disulfures par rapport à la forme naturelle donc leurs conformations sont identiques à l'exception de la méthionine supplémentaire. [*Bonnaire 1998*]

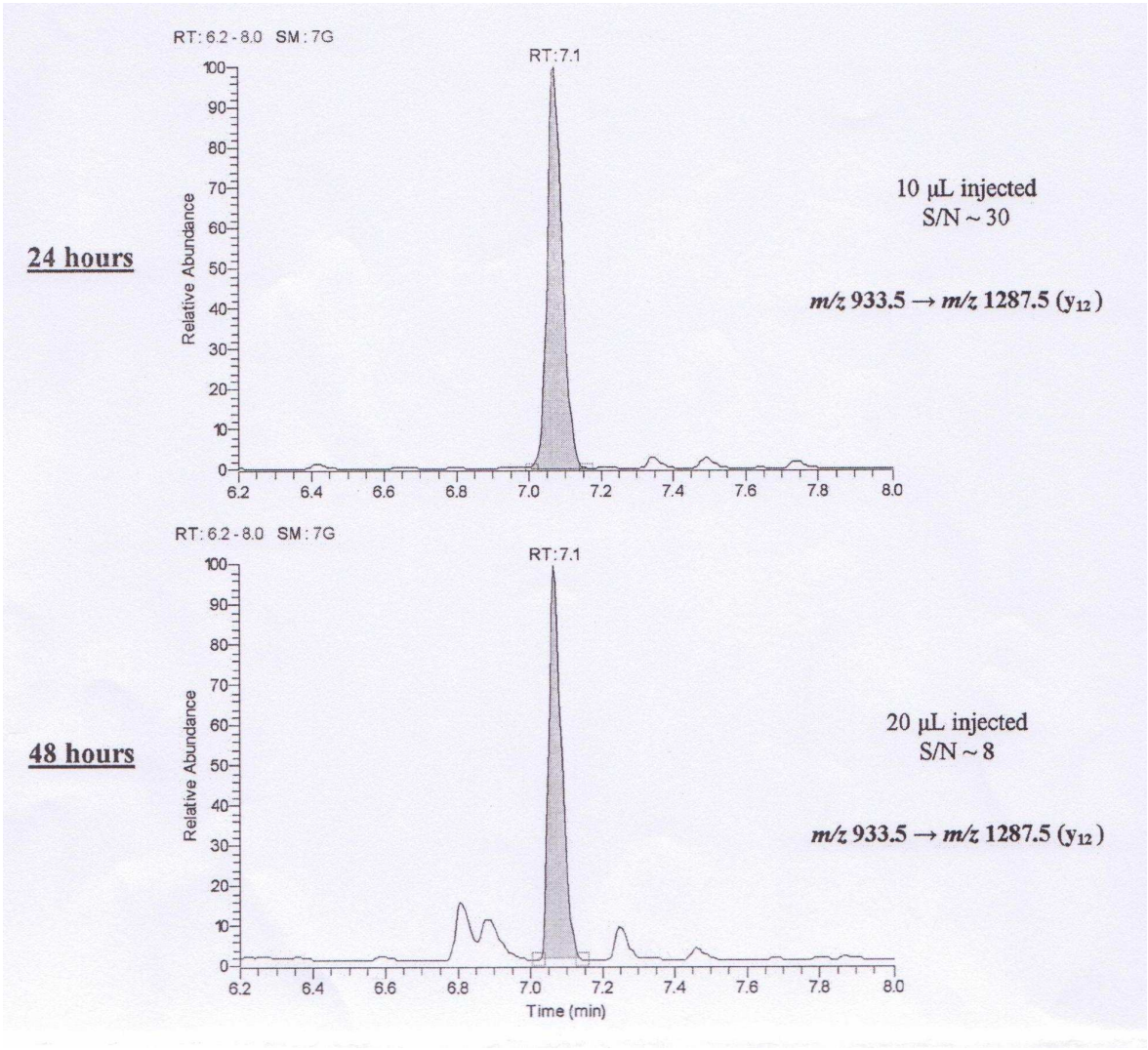
Une technique novatrice de détection de la reGH dans le plasma a été développée par l'équipe du LCH. L'échantillon de plasma est traité avec du sulfate d'ammonium au point isoélectrique de la reGH puis le culot obtenu est purifié par extraction en phase solide. Des peptides spécifiques sont obtenus à partir de la digestion par de la trypsine et analysés par LC-MS/MS. La limite de détection est alors de 1µg/L. En outre, cette méthode a aussi été appliquée avec succès pour déterminer la concentration plasmatique de reGH en fonction du temps en utilisant un analyseur de masse linéaire à trappe d'ions (figure 5). [*Bailly-Chouriberry 2008*]



<u>Figure 5</u> : Concentration plasmatique en reGH en fonction du temps après une injection sous-cutanée unique de 14mg de reGH

Cette figure illustre la cinétique de la concentration plasmatique de reGH après une injection unique sous-cutanée de 14mg de reGH. On constate ainsi, qu'après une augmentation importante pendant les 4 heures suivant l'injection, on revient à des concentrations assez faibles de 5h30 à 15h30 après l'injection. 24h après l'injection, la reGH n'est plus détectée. [*Bailly-Chouriberry 2008*]

Toutefois, dans une autre analyse, la présence de cette hormone prohibée a pu être détectée par un spectromètre de masse quadripolaire plus de 48h après la dernière administration de reGH (figure 6).



<u>Figure 6</u> : Détection de la reGH dans le plasma équin 24h et 48h après une injection sous-cutanée unique de 14mg de reGH
Cette figure illustre la possibilité de détection de la reGH dans le plasma 24 et 48h après une injection sous-cutanée de 14mg de reGH grâce à une méthode LC-MS/MS. [*Bailly-Chouriberry 2008*]

Cette méthode LC-MS/MS est la première avec une spécificité et une sensibilité suffisantes pour la détection de la reGH, la rbGH et de la eGH endogène.

Malheureusement cette différence de structure entre l'hormone naturelle et l'hormone recombinante est difficilement exploitable comme moyen de détection du dopage car la clairance de cette protéine est très rapide dans le sérum. En effet, la GH a une demi-vie de moins de 15 min ce qui offre une fenêtre de détection très courte. [*De Kock 2001*]

b. Immunodosage

Les méthodes de dosage immunologique sont basées sur la détection spécifique d'un épitope immunologique d'une molécule que l'on cherche à mettre en évidence ou à doser. Ces méthodes sont principalement de type radioimmunologique (RIA) ou immunoenzymatique (ELISA). Le mode opératoire principal de ces méthodes est identique et correspond à une adsorption passive ou à une fixation covalente sur une phase solide (plaque 96 puits) d'un anticorps spécifique qui sera exposé à un mélange contenant l'antigène à doser dans l'échantillon (non marqué) et l'antigène marqué (concentration connue). Les molécules d'antigène marqué et non marqué entrent en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps. La quantité d'antigène marqué qui se fixe est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon à doser. Des courbes d'étalonnage sont réalisées à l'aide de quantités connues d'antigène non marqué. Ce type de dosage par compétition utilise un marquage enzymatique dans le cas de l'ELISA ou un marquage radio-isotopique pour le dosage par RIA (tableau 6).

La sensibilité de détection de la GH par ces tests peut atteindre 0,5 à 1µg/L pour les plus performants.

Matrice	Population	Dosage	Auteurs
Plasma	Cheval	RIA	Thompson Jr et al., 1992
Plasma	Poulain	RIA	Stewart et al., 1993
Plasma	Juments, étalons, hongres	RIA	Thompson Jr et al., 1994
Plasma	Cheval	RIA	Cahill et al., 1994
Plasma	Cheval	RIA	Christensen et al., 1997
Plasma	Cheval	RIA	Kennedy et al., 2002
Sérum	Cheval	RIA	Dart et al., 2003
Plasma	Cheval	ELISA	Borromeo et al., 2005
Plasma	Cheval	ELISA	Borromeo et al., 2007

Tableau 6 : Méthodes immunologiques de mesures de l'eGH rapportées dans la littérature
Ce tableau rapporte les différentes techniques de dosage immunologique de l'eGH qui ont été décrites dans la littérature.

2.2. Suivi des anticorps anti-reGH [*Bailly Chouriberry 2008*]

Cette nouvelle approche a récemment été étudiée. Deux chevaux ont été traités à la reGH pendant 14 jours (première semaine à 18µg/kg puis deuxième semaine à 25µg/kg). Des échantillons de plasma ont été collectés de J-7 à J+210.

Une analyse ELISA de ces échantillons permet d'observer l'évolution de la concentration en anticorps spécifique au cours du traitement et après la fin du traitement de J-7 à J+30 (figure 7).

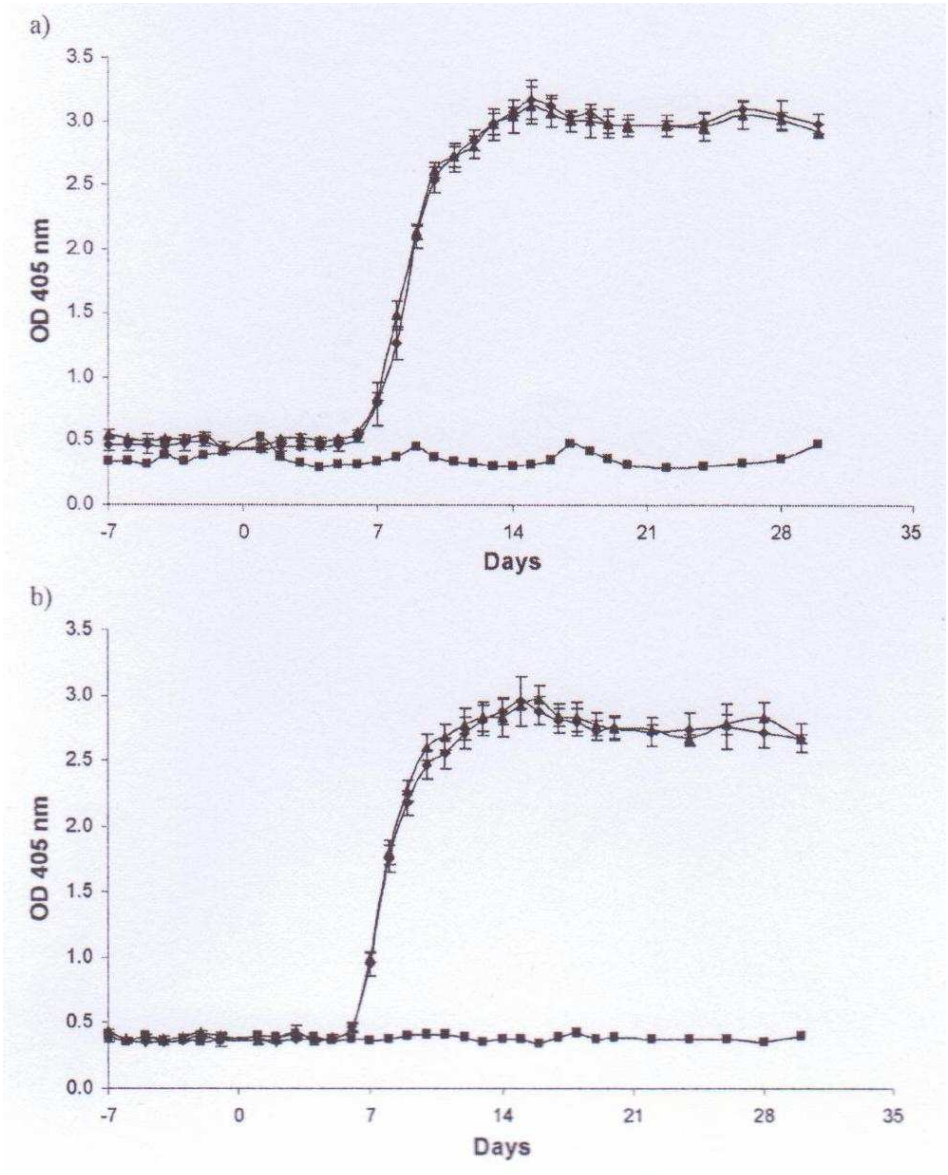


Figure 7 : Cinétique de production des anticorps sériques comparée à celle des anticorps plasmatiques pour les chevaux H497 (a) et H498 (b) : anticorps sériques anti-reGH (◆), anticorps sériques anti-insuline (■) et anticorps plasmatiques anti-reGH (▲).

Cette figure illustre l'évolution des anticorps sériques et plasmatiques par une analyse ELISA de deux chevaux ayant reçu un traitement à la reGH pendant 14 jours de J-7 à J+30. On constate ainsi que les concentrations plasmatiques et sériques sont équivalentes. D'autre part, l'augmentation rapide apparaît à partir du 6ème jour pour atteindre un maximum vers le 15ème jour avant de rester en plateau jusqu'au 30ème jour. [*Bailly-Chouriberry 2008*]

Après une augmentation brutale à partir du 6ème jour du taux d'anticorps anti-reGH, la concentration maximale est obtenue 15 jours après le début du traitement avant de rester stable.

Les mêmes chevaux ont continués d'être prélevés pendant 6 mois et leurs échantillons ont également été analysés par une technique ELISA (figure 8).

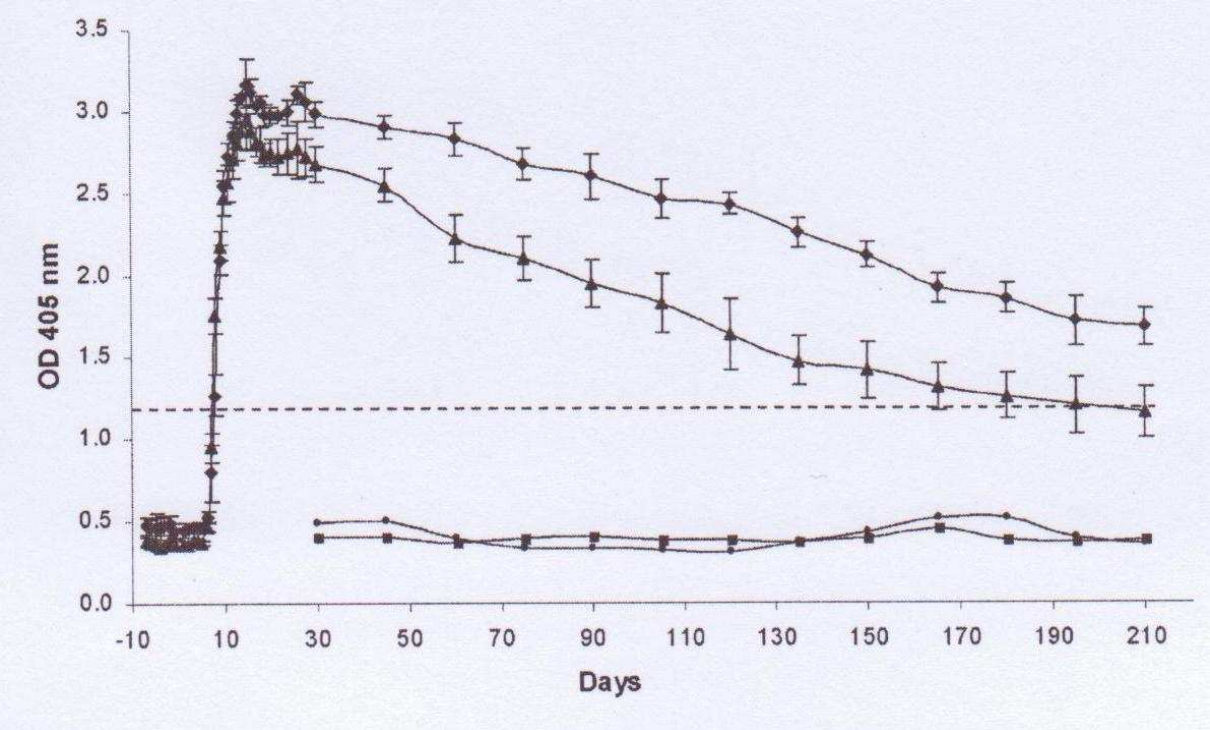


Figure 8 : Cinétique de production des anticorps sériques anti-reGH (H497◆et H498▲) et des anticorps anti-insuline (H497 ■ et H498 ●)
Cette figure illustre la cinétique des anticorps sériques anti-reGH par une technique ELISA de deux chevaux ayant reçu un traitement à la reGH pendant 14 jours de J-7 à J+210. On constate ainsi que les concentrations sériques des anticorps anti-reGH augmentent à partir de J+7 avec un pic autour de J+20 avant de redescendre progressivement à partir de J+30. Toutefois, même à J+210, les OD_{405nm} est toujours supérieurs à 1,2.

Pour la technique ELISA, la valeur seuil a été fixée à OD_{405nm} = 1,2. Cette technique offre donc une fenêtre de détection de 200 jours de J+8 à J+210.

Cette méthode ELISA présente une bonne répétabilité et spécificité ce qui peut en faire une méthode intéressante pour l'étape de criblage.

2.3. Suivi de marqueurs

IGF-1

La concentration en IGF-1 n'est pas soumise à un rythme circadien. Par contre, on observe des variations en fonction de l'âge. En effet, les chevaux de 4-5 ans ou moins présentent une concentration moyenne plus élevée. En ce qui concerne l'influence de l'exercice, aucune différence significative n'a été observée. Sur les chevaux non traités, la concentration maximale observée est de 550ng/mL. Dans le domaine de la lutte antidopage, la valeur critique a été fixée à 700ng/mL. Le traitement à la reGH a provoqué chez tous les chevaux une augmentation de la concentration plasmatique en IGF-1. Par contre, on observe des différences en fonction de l'âge des chevaux traités. Les jeunes présentent une réponse plus rapide dès le début du traitement alors que pour les plus âgés il faut attendre une dizaine de jours de traitement avant de voir apparaître l'augmentation. Comparativement, les jeunes ont aussi une diminution plus rapide après la fin du traitement. Ainsi les jeunes seront au-dessus de la valeur dès les premiers jours de traitement et encore le dernier jour alors que les plus âgés ne vont dépasser ce seuil qu'un seul jour à la fin du traitement. [*Popot 2001*]

En accord avec l'article précédent, cet article ne note pas de rythme circadien pour la concentration en IGF-1 et pas d'influence de l'exercice que ce soit un entrainement, un exercice modéré ou un exercice intense. D'autre part, la concentration est plus élevée chez les étalons que chez les hongres et les juments. Il y a une influence de l'âge avec une diminution de la concentration avec le vieillissement mais cette diminution est moins marquée chez les étalons. [*Noble 2007*]

La sécrétion ou l'administration de GH provoque une augmentation de la sécrétion d'IGF-1 qui dure plus longtemps que celle de GH. Ceci est principalement dû au fait que l'IGF-1 se lie à des protéines de transport (IGFBPs) dans la circulation. Ainsi des études pharmacocinétiques ont montré que seule une très faible partie des IGF-1 n'est pas associée à des protéines de transport. Ces protéines augmentent donc la demi-vie effective de l'IGF-1 et agissent pour créer un réservoir d'IGFs. [*De Kock 2001*] Dans cette étude, il a été mis en évidence que l'administration de GH augmente significativement la concentration en IGF-1. La concentration sérique en IGF-1 totale apparaît donc comme un bon marqueur pour la détection du dopage à la GH avec un facteur de 2,7 entre le groupe traité et le groupe témoin. La concentration en IGF-1 reste élevée quelques jours après l'arrêt du traitement ce qui offre

une fenêtre de détection plus large que lorsqu'on s'intéresse à la concentration en GH. La méthode d'analyse utilisée dans cette étude montre une bonne précision, linéarité et répétabilité. La concentration sérique en IGF-1 libre augmente aussi avec l'administration de GH avec un facteur de 4 à 7 entre le groupe traité et le groupe témoin. Par contre, on observe une diminution qui commence avant la fin du traitement. Ceci peut être expliqué par le fait que la concentration des protéines de transport augmente à cette période. C'est pourquoi l'IGF-1 libre apparaît comme un moins bon marqueur que l'IGF-1 totale.

Une des premières méthodes de quantification de la concentration en IGF-1 était l'IRMA (immunoradiometric assay). Toutefois, l'utilisation de l'IGF-1 comme un moyen de détection du dopage à la GH nécessite une méthode de quantification plus spécifique. Une méthode de spectrométrie de masse à électrospray (LC/ESI-MS) couplée à une chromatographie liquide à haute pression (HPLC) a donc été développée puis évaluée pour l'analyse spécifique de l'IGF-1 à des niveaux faibles comme ceux présents dans le sérum. [*De Kock 2001*]

Malgré ces premières études encourageantes qui présentent l'IGF-1 comme un marqueur intéressant, le dosage de l'IGF-1 comme marqueur d'un traitement à la reGH a fini par être abandonné ces dernières années en raison d'une variabilité trop importante entre les individus.

IGFBPs

Il a été montré que l'administration de GH modifiait les concentrations en IGFBP-1 et -3 mais pas celle de l'IGFBP-4. [*Popot 2000*]

Au niveau de la concentration en IGFBP-3, on observe une augmentation de 165% entre le groupe témoin et le groupe traité. La réponse est plus progressive que pour l'IGF-1 totale et, après arrêt du traitement, les concentrations retournent à leur valeur de base de façon plus lente (13 jours après la fin du traitement, les concentrations sont encore supérieure de 16% aux valeurs moyennes de base). [*De Kock 2000*] De plus, il semble que la concentration en IGFBP-2 ne soit pas modifiée par le traitement à l'eGH.

La seule IGFBP qui semble utilisable comme marqueur est donc l'IGFBP-3.

Ostéocalcine

L'administration de reGH entraîne une augmentation du taux d'ostéocalcine vers la fin du traitement. [*Price 2000*]

Sur des chevaux non traités, on ne note pas d'effet du sexe sur le niveau d'ostéocalcine. Le taux est assez élevé chez les chevaux d'un an environ (35ng/mL) puis il diminue jusqu'à un niveau constant vers 5-7 ans (13 ng/mL). Lors du traitement à la reGH, le taux d'ostéocalcine est multiplié par 1,7. [*De Kock 2000*]

Pour l'ostéocalcine, le taux maximum est atteint 3 jours après la fin du traitement et se maintient pendant 7 jours. Les concentrations sont plus faibles chez les jeunes. [*Popot 2000*]

Le taux d'ostéocalcine semble donc être un marqueur potentiellement utilisable.

PICP

L'administration de reGH entraîne une augmentation du taux de PICP vers la fin du traitement d'où la possibilité de l'utiliser comme marqueur. [*Price 2000*]

On ne note pas d'effet du sexe sur le taux de PICP. Ce taux est assez élevé vers l'âge d'1 an (969 µg/mL) puis il diminue jusqu'à une valeur de 400 µg/mL vers l'âge de 5-7 ans. Lors du traitement à la reGH, le taux de PICP est multiplié par 3. [*De Kock 2000*]

Le taux de PICP semble donc être un marqueur potentiellement utilisable.

ICTP et P-III-NP

L'administration de reGH entraîne une augmentation de leurs taux vers la fin du traitement ce qui les rend potentiellement utilisables comme marqueurs. [*Price 2000*]

Hydroxyproline et phosphatase alcaline

Sur des chevaux jeunes, les taux d'hydroxyproline et de phosphatase alcaline ne sont pas modifiés consécutivement à un traitement à la reGH. [*Popot 2000*]

Ce ne sont donc pas des molécules utilisables dans le domaine de la lutte antidopage dans les courses hippiques où la moyenne d'âge des chevaux est faible.

Actuellement, il existe deux grands types de stratégie pour la mise en évidence du dopage à la reGH chez le cheval : l'une indirecte qui est utilisable pour le dépistage et l'autre directe qui est nécessaire à la confirmation.

Le dépistage est donc réalisé à partir de méthodes indirectes : soit grâce au suivi de marqueurs tels que l'IGF-1 ou l'IGFBP-3 mais ces méthodes tendent à être abandonnées car il existe une variabilité individuelle trop importante, soit grâce au dosage des anticorps anti-reGH mais cette méthode a encore été peu étudiée.

La mise en place d'une lutte efficace contre le dopage à l'hormone de croissance équine recombinante nécessite donc des études supplémentaires. D'une part, nous allons continuer à nous intéresser au dosage des anticorps anti-reGH par ELISA comme possibilité pour une méthode efficace de criblage et au dosage direct de la reGH par LC-MS/MS comme méthode de confirmation. D'autre part, nous nous intéresserons à une approche novatrice qui repose sur de la métabolomique.

PARTIE III : ETUDE EXPERIMENTALE

Cette étude expérimentale a été réalisée grâce à la collaboration de plusieurs équipes : l'UMR 181 INRA,ENVT de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales à Toulouse représenté par le Pr Pierre-Louis Toutain, le LCH à Verrières le Buisson représenté par Yves Bonnaire et Marie-Agnès Popot, et l'UR66 INRA de St Martin-du-Touch représenté par Thierry Pineau. L'intégralité de la partie animale a été réalisée à l'ENVT de début août jusqu'à fin octobre 2007.

L'objectif de cette étude était de travailler sur plusieurs axes afin de trouver de nouvelles méthodes de détection du dopage à l'hormone de croissance recombinante équine chez le cheval.

Des échantillons d'urine et de plasma ont donc été fournis au LCH afin d'effectuer des études supplémentaires sur la méthode de détection directe par LC-MS/MS et sur le dosage des anticorps anti-reGH par ELISA mais aussi pour développer une nouvelle méthode de détection indirecte basée sur une approche métabolomique. Tous les résultats actuellement obtenus vont donc être traités dans cette thèse.

Des échantillons de sang ont également été fournis à l'INRA de St-Martin-du-Touch afin de développer une méthode basée sur la génomique. L'objectif était de comparer l'expression génomique dans les leucocytes entre les chevaux traités et les chevaux du lot témoin. Les résultats de cette partie de l'étude seront traités dans la thèse de Victoria Mercader.

I. MATERIEL ET METHODES

1. Formulation utilisée

L'hormone de croissance testée était l'EquiGen-5^{TM} (methionyl equine somatotropin (eST)) dosée à 10mg par flacon sous forme lyophilisée. Les flacons ont été achetés par le LCH en mars 2007 à BresaGen Limited, Adelaide, Australia puis ont été acheminés à l'UMR 181.

Les flacons ont été stockés au réfrigérateur à environ 6°C.

Le solvant utilisé était de l'eau PPI Aguettant à raison de 2 mL par flacon d'Equigen.

2. Animaux

Seize chevaux de sport (10 hongres et 6 juments) ont été utilisés. Ils étaient âgés de 4 à 19 ans et pesaient de 345 à 610 kg (pesée 2 jours avant la première injection). Leurs caractéristiques individuelles sont données dans le tableau 7.

N° codique	Nom	Sexe	Age (ans)	Poids (kg)	Monté	Logement	Traitement	Sous-groupe
01	**Lago**	H	15	575	Oui	Pré	GH	1
02	**Isis**	F	11	503	Oui	Pré	GH	1
03	**Longo1**	F	5	430	Non	Pré	GH	1
04	**Laïus**	H	8	575	Oui	Pré	GH	1
05	**Dracon**	H	16	594	Oui	Box	GH	2
06	**Dardevil**	H	16	550	Oui	Pré	GH	2
07	**Haxius**	H	12	470	Oui	Pré	GH	2
08	**Nora**	F	6	610	Oui	Pré	GH	2
11	**Mirage**	H	19	545	Oui	Pré	Contrôle	3
12	**Hestia**	F	12	475	Oui	Pré	Contrôle	3
13	**Longo2**	F	4	345	Non	Pré	Contrôle	3
14	**Oscar**	H	5	510	Oui	Pré	Contrôle	3
15	**Gamin**	H	13	574	Oui	Box	Contrôle	4
16	**Milton**	H	7	545	Oui	Box	Contrôle	4
17	**Idefix**	H	11	590	Oui	Box	Contrôle	4
18	**Utopie**	F	17	495	Oui	Pré	Contrôle	4

Tableau 7 : Caractéristiques individuelles des chevaux utilisés pour l'essai
Ce tableau synthétise les caractéristiques individuelles de chevaux utilisés dans cette étude et montrent leur répartition dans les différents sous-groupes.

Les chevaux étaient logés au centre équestre de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, qui représentait leur habitat naturel.

A l'exception des deux jeunes juments non débourrées, les chevaux servaient à l'instruction et étaient montés régulièrement.

Les chevaux étaient logés soit en box individuel dans l'écurie, soit au pré à l'extérieur. Pour les chevaux en box, la litière utilisée était de la paille et les box étaient curés tous les jours. Les chevaux au pré avaient un accès libre à de la paille. Tous les chevaux étaient nourris trois fois par jour (vers 8h, 12h et 19h) avec un aliment complet du commerce (Energy DP Purina Legend, Pommevic, France) à raison de 5 à 6 kg par cheval et par jour, et disposaient d'eau potable à volonté.

Tous les chevaux utilisés étaient sains et aucun traitement médicamenteux y compris des vaccinations n'a eu lieu pendant la phase d'expérimentation.

La répartition des chevaux dans les différents sous-groupes a été faite au hasard en prenant en considération certains facteurs confondants possibles comme le sexe et l'âge des individus.

II. PROCEDURE EXPERIMENTALE

1. Conduite de l'expérimentation

Dans les périodes hors manipulations expérimentales, les chevaux étaient maintenus dans leurs conditions d'entretien habituelles. Pour réaliser les prélèvements et les traitements, les chevaux étaient amenés dans un local dédié muni de 6 boxes.

En raison de la lourdeur de la gestion de 16 chevaux en même temps, 8 individus seulement étaient concernés quotidiennement. Ainsi les sous-groupes 1 et 3 ont reçu leur première injection (hormone ou excipient) le 3 août 2007 alors que les sous-groupes 2 et 4 l'ont reçue le 4 août 2007. Le même protocole a été appliqué à chaque demi-effectif en conservant le même décalage d'une journée pendant toute la durée du protocole.

2. Administration du produit

L'hormone de croissance a été administrée par voie sous-cutanée à la dose de 18 µg/kg de poids vif par jour pendant 14 jours consécutifs.

La dose recommandée de 18 µg/kg a été calculée pour chaque cheval en fonction de son poids vif qui a été mesuré moins de 48h avant la première administration (tableau 8).

Cheval	Poids (kg)	Volume calculé (mL)	Volume administré (mL)	Dose finale (µg/kg)
Lago	575	2.07	2.0	17.39
Isis	503	1.81	2.0	19.88
Longo1	430	1.55	1.5	17.44
Laius	575	2.07	2.0	17.39
Dracon	594	2.14	2.0	16.84
Dardevil	550	1.98	2.0	18.18
Haxius	470	1.69	1.5	15.96
Nora	610	2.20	2.0	16.39

Tableau 8 : Volumes d'Equigen ND administrés aux chevaux de l'essai
Ce tableau synthétise les volumes d'Equigen ND administrés aux chevaux du groupe traité. On constate ainsi que la dose finale reste bien proche de la dose de 18µg/kg qui était prévue dans le protocole.

Avant chaque administration, le produit était préparé extemporanément en ajoutant 2mL d'eau PPI aguettant au flacon d'Equigen ND sorti du réfrigérateur. Selon le cheval à traiter, on prélevait 1,5 ou 2 mL de la solution reconstituée avec une seringue de 2mL et une aiguille TERUMO Neolus 0.6×25 bleue.

Les administrations étaient réalisées par voie sous-cutanée dans une zone située dans le creux de l'épaule alternativement à gauche puis à droite. Le site d'injection faisait ensuite l'objet d'un massage manuel.

Les chevaux contrôle ont reçus de la même manière des injections de sérum physiologique.

3. Réalisation et conservation des prélèvements

Des échantillons de sang et d'urine ont été collectés avant, pendant et après les administrations d'eGH.

3.1. Urine

Les prélèvements d'urine ont été effectués à J-2, J-1, J1, J3, J5, J7, J9, J11, J13, J14, J15, J16, J17, J19, J23, J30, J40, J52, J61, J69, J80 ; J0 étant le jour de la première administration d'eGH.

Pour les hongres, l'urine était collectée à partir de mictions spontanées à l'aide de sacs plastiques placés dans des collecteurs urinaires mis en place le matin. Pour les juments, l'urine était collectée soit par mictions spontanées (pour Longo1, Nora et Longo2) à l'aide de sachets plastiques placés dans des pots tenus par un opérateur, soit par sondage urinaire (pour Isis, Hestia et Utopie) à l'aide de sonde gastro-duodénale de type Levin (L125 21FR, Vygon, Ecoven France).

Chaque prélèvement était enregistré sur une feuille de suivi.

L'urine récoltée était ensuite répartie en 4 pots de 25 mL immédiatement identifiés puis placés au congélateur à -20°C.

3.2. Sang

La veille du début du protocole, les veines jugulaires gauche et droite ont été tondues sur tous les chevaux. Les prélèvements destinés à la collecte de plasma ou de leucocytes ont été effectués en utilisant des dispositifs de marque Vacutainer® et des tubes sous vide contenant de l'héparinate de lithium pour le plasma ou de l'héparinate de sodium pour les ARNs leucocytaires.

Les prélèvements de sang ont été effectués à J0 (juste avant la première injection d'eGH), J0+10min, J0+30min, J0+60min, J0+2h, J0+4h, J0+6h, J1, J3, J5, J7, J9, J11, J13 (juste avant la dernière injection d'eGH), J13+10min, J13+30min, J13+60min, J13+2h, J13+4h, J13+6h, J13+8h, J14 (le matin), J14+8h, J15 (le matin), J15+8h, J16, J17, J19, J23, J30, J40, J52, J61, J69, J80 pour les 8 chevaux qui ont reçus le traitement. Pour les chevaux contrôles, les prélèvements de sang ont été effectués à J0 (juste avant la première injection de sérum physiologique), J1, J3, J5, J7, J9, J11, J13 (juste avant la dernière injection de sérum physiologique), J14, J15, J16, J17, J19, J23, J30, J40, J52, J61, J69, J80.

La prise de sang se faisait en alternance au niveau des veines jugulaires gauche et droite avec 5 tubes de 10mL (héparinate de lithium) et 2 tubes de 5mL (héparinate de sodium).

Les tubes de 10mL, destinés à l'obtention de plasma, étaient réfrigérés puis centrifugés moins de 2 heures après le prélèvement pendant 10 min à 3500 tours/min. Le plasma était alors pipeté et réparti en 5 tubes de 4 mL environ qui ont ensuite été stockés au congélateur à -20°C.

Les tubes de 5mL, destinés à la préparation d'ARN, étaient stockés dans de la glace en attendant le traitement dans les locaux de l'UMR-INRA 66 pour hémolyse, collecte des leucocytes et préparation des ARNs totaux avant congélation à -80°C.

Chaque prélèvement était enregistré sur une feuille de suivi.

4. Suivi de la tolérance du traitement

Pendant toute la durée du protocole, les chevaux étaient surveillés quotidiennement en ce qui concernait leur comportement et leur facilité à se déplacer. Afin de surveiller un possible phénomène inflammatoire et une possible induration au site d'injection, des mesures du pli de peau à l'épaule ont été réalisées à l'aide d'un pied à coulisse à affichage digital avant les injections.

5. Effets indésirables du produit administré : EQUIGEN-5^{TM}

Les effets indésirables annoncés de cette hormone recombinante sont :

- une réaction au point d'injection
- un effet diabétogène léger
- une léthargie modérée

Extrait de la notice APVMA - Approval N°55291/0902

Dans les 72h suivant la première injection de l'hormone de croissance recombinante, des effets secondaires sont clairement apparus au niveau des sites d'injection sous la forme de plaques inflammatoires très douloureuses mais de taille variable chez 5 des 8 chevaux traités.

Chez les individus Dardevil et Dracon, les injections d'hormone ont dû être arrêtées respectivement à J4 et J6 car les réactions inflammatoires étaient tellement importantes qu'elles provoquaient une gène à la marche et à la mobilisation de l'encolure.

Pour les trois autres individus moins affectés, les injections quotidiennes d'hormone ont été poursuivies en essayant de répartir les sites d'injection. Lorsque le toucher de la zone inflammée était trop douloureux, la mesure du pli de peau n'a pas été effectuée.

Chez une des juments (Isis), l'inflammation au niveau de l'encolure a été accompagnée d'un œdème des membres antérieurs.

Pour les 5 individus ayant présenté une réaction locale, il a été observé un pic d'inflammation à 5-6 jours après l'injection initiale puis un retour progressif à la normale. A la fin des injections, tous les chevaux avaient recouvré un comportement complètement normal et ne présentaient plus de signes d'inflammation.

6. Effectif final à la fin du protocole de traitement

Malgré la décision d'arrêter les injections d'hormone sur les chevaux Dardevil et Dracon, les prélèvements de sang et d'urine ont été poursuivis. Les résultats ne pourront pas être utilisés dans le cadre du protocole d'administration sur 14 jours mais ils permettront d'illustrer la cinétique de décroissance de l'hormone de croissance au terme d'une administration de courte durée. Le protocole s'est donc achevé avec 6 individus traités.

D'autre part, la jument Hestia qui appartenait au groupe contrôle a dû être euthanasiée le 18 août 2007 après un diagnostic de rupture de l'estomac consécutive à un entrappement néphro-splénique. Cette pathologie survenue fortuitement était sans lien avec le statut d'individu contrôle dans le protocole. Cela explique donc que le protocole ne compte plus que 7 individus contrôles à partir de J15.

7. Analyse des prélèvements

A la fin de l'étude, pour chaque cheval, 4 aliquots de plasma et 3 pots d'urine de chaque prélèvement ont été envoyés par courrier express dans de la glace carbonique et délivré dans les 24h au Laboratoire des Courses Hippiques.

D'autres prélèvements de sang ont été analysés à l'INRA de Saint-Martin du Touch.

7.1. Détection indirecte : dosage des anticorps anti-reGH

Les échantillons utilisés sont les plasmas recueillis de J-1 à J+80.

Préparation des échantillons :
Sur une plaque à 96 puits, ont été mélangés dans chaque cupule 15µL d'acide caprylique, 25 µL d'acide chlorhydrique à 0.5 mol/L et 260 µL d'échantillon de plasma équin. La bonne homogénéité du mélange a été assurée par plusieurs aspirations et rejets du contenu des cupules à l'aide de la pipette. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 15 min

afin de laisser la précipitation se dérouler. Le précipité va contenir les molécules que l'on veut éliminer c'est-à-dire 70% des protéines totales du plasma et principalement de l'albumine. Ensuite le mélange va être centrifugé une première fois à 2000g pendant 20 min. Le surnageant est prélevé car c'est cette phase qui contient les IgG. Ce surnageant va subir une deuxième centrifugation à 2000g pendant 20 min. Le surnageant est de nouveau prélevé et va être dilué 100 fois dans du PBST 2% Sea Block (pH = 7.4) dans une plaque deep-well avec des puits de 1mL. Cette plaque peut se conserver à 4°C une fois qu'elle est fermée par un film plastique.

Préparation des plaques pour l'analyse ELISA :

Les plaques utilisées sont des plaques 96 puits avec support MaxiSorp. La solution d'hormone recombinante est préparée à partir de poudre de reGH ou de rpGH dissoute dans une solution de carbonate/bicarbonate de sodium à 50mmol/L (pH=9.6) pour obtenir une concentration de 5µg/mL. On met 200µL de cette préparation dans chaque puits, puis les plaques sont recouvertes d'un film plastique pour prévenir l'évaporation, les effets de bord et les contaminations croisées avant d'être mise à 4°C pendant une nuit afin de laisser les molécules de reGH s'adsorber sur le support. Le lendemain matin, après avoir laissé la plaque 20 min à température ambiante, on égoutte la plaque et on la rince trois fois avec du PBST 20 0.2% (pH=7.4). Pour bloquer l'espace restant autour des molécules de reGH sur le support MaxiSorp, on utilise 100µL d'une solution de SeaBlock ™ (protéines de poisson non spécifiques) diluée 50 fois dans du PBST pendant une heure à 37°C. Ensuite on effectue trois lavages avec 300µL de PBST dans chaque cupule.

Ajout de l'échantillon :

A cette étape, on ajoute 100µL de l'échantillon dilué pendant 1h30 à 37°C en le dupliquant avant d'effectuer trois lavages avec 300µL de PBST par cupule.

Révélation du résultat :

Après il faut ajouter 100µL d'anticorps polyclonaux « POX-labelled » de chèvre anti-IgG de cheval (dilué au 1/8000 le jour même dans du PBST) dans les puits pendant 1h à 37°C avant d'effectuer trois lavages avec 300µL de PBST par cupule.

Pour finir, on ajoute 100µL d'une solution substrat contenant 5mg/mL d'ABTS et 0.03% de peroxyde d'hydrogène dans un tampon de citrate/phosphate à 150mM (pH=5). La conversion

du substrat se produit en 80 min tandis que l'on effectue des phases de remuage toutes les 20 min à 37°C. La densité optique est lue sur un lecteur de plaques (Opsys MR Reader, Thermo Labsystems) à une absorbance de 405nm. Les densités optiques sont comprises entre 0.00 et 3.50 avec une linéarité de +/- 1.5% au-dessus de 2.50 OD. A chaque test, des témoins positifs et négatifs ont été utilisés. Les analyses ont été effectuées trois jours différents en duplicata.

7.2. Détection indirecte : approche métabolomique

Cette approche est basée sur l'obtention d'empreintes urinaires ou plasmatiques par LC-HRMS et une analyse appropriée des données. Le métabolome est le pool de métabolites (= fingerprint) présents dans un milieu biologique à un moment donné et dans des conditions définies. Les métabolites sont caractérisés par une grande diversité de structure chimique avec des propriétés physico-chimiques différentes. Pour cette raison, il est impossible de couvrir la totalité du métabolome avec une seule méthode analytique.

Échantillons utilisés :
Dans cette étude, ce sont les échantillons d'urine et de plasma de 6 chevaux traités et de 7 chevaux contrôles à J0, J3, J5, J7, J11, J15, J23 et J69 qui ont analysés.

Préparation des échantillons :
Les échantillons d'urine (1mL) ont été filtrés sur des membranes présentant un seuil de coupure de 10kDa à 4000 rotations par minute pendant 30 min à 6°C. Cette méthode permet d'être le plus exhaustif possible en éliminant seulement les molécules de haut poids moléculaire. Les échantillons ont ensuite été lyophilisés pendant 48 h afin de normaliser la matière sèche. La masse sèche de chaque extrait a été pesée et reprise dans de l'eau. Les volumes d'eau ajoutés ont été calculés en fonction des quantités de matière sèche pesées. Il a été décidé que l'échantillon qui posséderait la plus grande quantité de matière sèche serait repris dans 1mL d'eau et que les volumes d'eau à ajouter pour les autres échantillons ont été calculés selon une règle de proportionnalité ce qui correspond globalement à une concentration finale de 30mg/mL pour tous les échantillons.

Les échantillons plasmatiques vont subir de la même façon l'étape de filtration, par contre on n'effectue pas l'étape de lyophilisation.

Chromatographie en phase liquide :

La chromatographie est effectuée sur une colonne greffée Uptisphère C18 (Interchim, 150*2.1mm, 3µm) avec une pré-colonne C18 (10mm*2mm, 2µm). La colonne est placée dans un four à 30°C avec un débit de phase mobile fixée à 200µL/min. Le volume injecté est de 5µL. La phase mobile A est de l'eau avec 0.1% d'acide acétique et la phase mobile B est de l'acéto-nitrile avec 0.1% d'acide acétique. L'élution est conduite avec un gradient linéaire partant de 100% de A vers 100% de B en 30 minutes. Pendant 10 minutes, on reste à 100% de B (conditions isocratiques) puis on revient à 100% de A en 20 minutes. Le temps total d'analyse est donc de 60 minutes.

Spectrométrie de masse haute résolution :

L'ionisation des molécules est effectuée par électro spray avec une tension du capillaire de 5kV et une tension de cône de 30V. Cette ionisation peut être effectuée sous un mode positif (ESI +) ou négatif (ESI -). La spectrométrie de masse est effectuée avec un Time Of Flight (TOF au LCH) ou un Orbitrap (Nantes). La résolution est fixée à 30000. L'acquisition des données se fait avec un scan complet de m/z = 50 à 800.

Traitement des données :

L'ensemble des données a été retraité par le logiciel XCMS (version 1.12.1) dans le système opérateur R (version 2.6.0) puis analysé par le logiciel SIMCA-P. Pour éliminer les signaux non spécifiques, les pics chromatographiques sont filtrés (S/N>3). De légères différences entre les échantillons analysés sont corrigées. Une visualisation des données permet de voir les ions sélectionnés de façon classée en fonction de leur valeur p ($p<0.05$ valeur statistique permettant la discrimination du pouvoir des ions).

L'Orthogonal Partial Least Square (OPLS) a été choisie pour construire un modèle descriptif durant le traitement à la reGH avec les signaux obtenus par spectrométrie de masse et qui constituent les empreintes. L'OPLS a l'avantage de prendre en compte une variable Y (statut de l'animal : traité ou non) dans le développement du modèle. L'OPLS offre une représentation graphique avec 2 axes principaux :

- axe 1 : combinaison linéaire des ions sélectionnés après traitement des données qui permet d'expliquer au mieux la séparation entre les animaux traités et non traités.

- axe 2 (orthogonal à l'axe 1) : combinaison linéaire des ions sélectionnés par le traitement des données qui a pour but d'expliquer la variabilité totale.

Dans cette étude, la préparation des échantillons a été délibérément réalisée de façon non spécifique pour obtenir une gamme large de composés représentant d'une empreinte. Par conséquent, les conditions analytiques de la chromatographie et de la spectrométrie de masse sont standardisées pour mener à la séparation et l'ionisation d'un maximum de molécules.

7.3. Détection directe de la reGH dans le plasma par LC/MS/MS

Préparation des échantillons :

1) Précipitation au sulfate d'ammonium

On mélange 4mL de plasma avec 18mL de tampon phosphate (0.1M, pH=6.9). Puis, à température ambiante, il faut ajouter 18mL d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH=6.9) au goutte à goutte en remuant doucement jusqu'à atteindre 45% de saturation.

La solution protéique est mélangée sous agitation magnétique modérée pendant 90min à température ambiante après quoi le mélange est mis à décanter pendant 15 heures à 4°C afin de provoquer la précipitation des protéines.

Pour obtenir le culot de protéines contenant la reGH, une centrifugation est réalisée à 3000g pendant 20min à température ambiante. Le surnageant est éliminé par retournement du tube et le culot est dissous dans 4mL de tampon phosphate (0.1M, pH=6.0).

Les échantillons sont stockés à 4°C pendant le conditionnement des cartouches SPE. Les tubes collecteurs de fractions en verre sont lavés à l'eau puis à l'acétone avant d'être séchés à 60°C.

2) Extraction en phase solide

Dans des cartouches C48PE (500mg, 6mL, 300A), obtenues auprès d'Inter (Montluçon France), on ajoute successivement 10mL de méthanol, 10mL d'eau et 10mL de tampon phosphate (0.1M, pH=6.0) ce qui constitue l'étape de conditionnement. L'échantillon est ensuite chargé dans la colonne et passe par le lit de la colonne suivi par un lavage avec 5mL d'eau contenant 0.1% de TFA et ensuite avec 5mL d'un mélange eau/acétonurie (70/30) contenant 0.1% de TFA ce qui constitue les étapes de lavages.

Pour finir intervient la phase d'élution, les analytes d'intérêt sont élués avec 7mL d'un mélange eau/acétonitrile (20/80) avec 0.1% de TFA. La phase éluée est séchée jusqu'à obtenir 1mL sous vapeur de nitrogène à 48°C dans un Turbo Vap LV Evaporator (Zymark, Hopkinton, MA).

3) Précipitation au méthanol

5mL de méthanol froid (-20°C) sont lentement ajoutés à la solution éluée. La précipitation est réalisée pendant 90min au congélateur. Le culot protéique (non visible) est obtenu par centrifugation des tubes à 3000g pendant 15 min à 4°C. 5mL de surnageant sont rejetés et le 1mL restant est évaporé à 48°C sous flux d'azote pendant au moins 25 min.

4) Digestion à la trypsine

Le tube « bien sec » est repris par 120µL d'EPAB (pH=7.9) et 20µL d'acétonitrile et le mélange est remué doucement par aspirations répétées avec la pipette. Le mélange est transféré avec précaution dans l'insert d'un vial HPLC où 10µL de trypsine séquence grade à 200ng/µL sont ajoutés et mélangés. La réaction de trypsinolyse est effectuée à 37°C pendant 17h +/-2h.

Au terme de l'hydrolyse trypsique, l'insert HPLC contenant les peptides est évaporé à 48°C pendant 1h30 sous un léger flux d'azote en utilisant des pipettes Pasteur comme embouts à usage unique. Les peptides sont ensuite dissous dans 40µL d'un mélange eau/acétonitrile (70/30, v/v, 0.2% d'acide formique) avant l'analyse de l'échantillon par RP-HPLC-ESI-(+)-MS/MS. La limite de détection dans le plasma a été abaissée à 1µg/L après la réalisation de toutes les optimisations en axant la recherche et le développement de la méthode sur la SPE C4.

Les échantillons ainsi préparés peuvent être conservés pendant une semaine à 4°C avant l'analyse sans nuire à l'intégrité de l'échantillon.

Mesures LC-MS/MS :

L'analyse des peptides est menée sur un spectromètre de masse linéaire à trappe d'ions (LTQXL, ThermoScientific, California, USA) avec une source d'ionisation à électro spray (ESI) en mode positif qui interfère avec une « pompe série 1200 » (Agilent technologies, California, USA).

La séparation est réalisée sur une colonne UPW5C4 à pores larges (300A, 250mm*20mm, 5µm) avec une pré-colonne (2.0mm*10mm). Le débit de la chromatographie en phase liquide est de 300µL/min.

La phase mobile est constituée d'un mélange eau/acétonitrile complémenté avec 0.2% d'acide formique dont les proportions respectives évoluent en fonction du temps (tableau 9).

Temps (min)	Eau + 0.2% d'acide formique (%)	Acétonitrile + 0.2% d'acide formique (%)
0	70	30
5	50	50
12	40	60
17	0	100
22	0	100
27	70	30
35	70	30

Tableau 9 : Gradient de la chromatographie en phase liquide
Ce tableau illustre les modifications de proportion entre le mélange Eau + 0.2% d'acide formique (%) et le mélange Acétonitrile + 0.2% d'acide formique (%) dans la phase liquide au cours de la chromatographie.

Le volume d'échantillon injecté est de 20µL.

Le spectromètre de masse linéaire à trappe d'ions a été calibré mensuellement selon les instructions du manuel d'utilisation. Les paramètres de la source d'ionisation (ESI) sont optimisés avec la GH, la rGH et des peptides standards (10ng/mL) dans un mélange méthanol/eau (50/50, v/v) contenant 0.1% d'acide formique et directement introduits dans l'analyseur à 8µL/min grâce à un pousse-seringue incorporé dans le spectromètre de masse.

Les paramètres du spectromètre de masse linéaire à trappe d'ions sont de 270°C pour la température du capillaire pour le transfert d'ions et de 4.9kV pour la tension de « l'aiguille ESI ». Le gaz « sheath » et le gaz auxiliaire sont respectivement de 45 et 10 unités arbitraires. Le Qz d'activation à 0.26 avec une activation de 45ms est utilisé pour l'isolation des 3 ions précurseurs spécifiques $[M+2H]^{2+}$. La dissociation induite par les collisions des ions précurseurs $[M+2H]^{2+}$ se fait dans le mode MS2 et les ions fragmentés qui en résultent sont répertoriés.

Une énergie de collision de 28 est utilisée pour la fragmentation de l'ion précurseur du peptide N-terminal de la reGH $[M+2H]^{2+}$ (m/z 933.5). La MS2 est réalisée en mode sélection du suivi de réaction (SRM) avec 2 transitions ioniques: m/z 933.5 → m/z 1287.5 et m/z 933.5

→ m/z 794.0. La largeur des pics Q1 et Q3 est de 0.70 m/z. Pour augmenter la sélectivité de la détection, le scan sur la largeur de Q3 se fait avec une précision de 0.01m/z.

Toutes les données sont acquises et analysées par le logiciel Xcalibur version 2.0 (Thermofisher Scientific).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Détection indirecte : dosage des anticorps anti-reGH (figure 9)

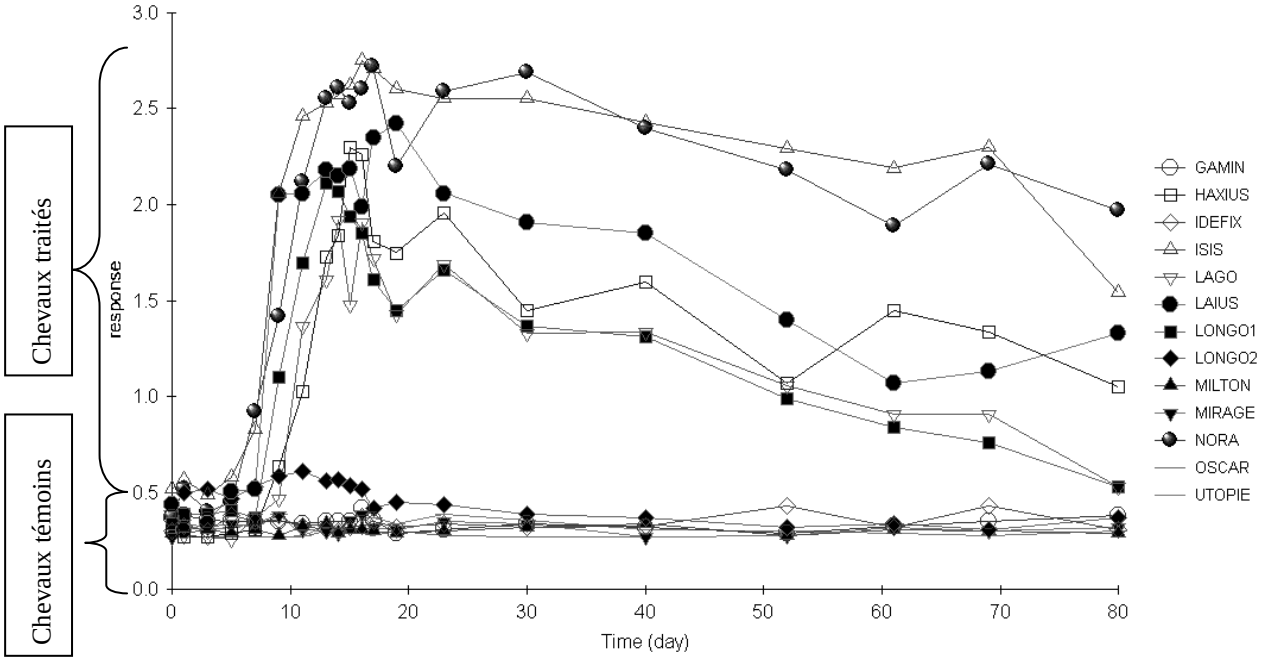


Figure 9 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour les chevaux de notre essai
Cette figure illustre l'évolution de la concentration plasmatique en anticorps anti-reGH sur toute la durée de l'étude et pour tous les chevaux. On constate ainsi que, pour les chevaux du groupe témoin, les concentrations restent faibles et constantes tout au long de l'étude. Par contre, pour les chevaux traités, les concentrations augmentent de façon très importante à partir de J+7 pour atteindre un maximum aux alentours de J+15 avant de redescendre progressivement. Malgré tout, à J+80, on observe encore une différence entre les chevaux traités et les témoins.

Pour les chevaux du groupe contrôle, on ne constate aucune évolution de l'OD_{405nm} de J-1 à J+80 avec une valeur moyenne de 0,4. Ces résultats présentent une bonne concordance avec les résultats d'une étude précédente.

Pour les chevaux du groupe traité, on constate de grandes variations de l'OD_{405nm} au cours de l'étude. On observe une interaction spécifique entre les puits couverts de reGH et les échantillons de J+7 à J+80 pour 4 chevaux (Nora, Isis, Laius et Haxius) et de J+7 à J+40 pour 2 chevaux (Lago et Longo1) avec un maximum entre J+13 et J+17. A J+80, il y a de grosses différences chez les chevaux traités (de 0,5 à 2,0).

On ne note aucun effet de l'âge ou du sexe.

Afin d'obtenir plus de précision, les données brutes (évolution au cours du temps des densités optiques) ont été ajustées avec un modèle développé dans WinNonlin, un logiciel dédié à la pharmacocinétique (WinNonlin professional package (version 5.2.1) ; Pharsight Corporation, Mountain View, California 90040).

Les densités optiques (sans unité) ont été ajustées avec une équation polyexponentielle de la forme Eq.1 :

$$C(t) = \frac{Load * K_a}{(K_a - K_{10})}\left[\exp(-K_{10} * (t - Tlag)) - \exp(-K_a * (t - Tlag))\right] + Baseline \qquad \text{Eq.1}$$

Ou *C(t)* est la densité optique observée au temps *t* (en jour), *Load* est homogène à la dose (inconnue) d'anticorps formés à la suite de l'administration de reGH, K_a (unité en Jour^{-1}) correspond à la constante de temps d'apparition des anticorps dans le plasma, K_{10} (unité en Jour^{-1}) est la constante de temps de disparition des anticorps, *Tlag* est le délai entre le temps d'administration de la reGH (ici temps 0) et l'apparition des anticorps et *Baseline* est la densité optique obtenue avant la réponse à la GH (bruit de fond également retrouvé chez les chevaux témoins). Cette équation est classiquement utilisée pour les modèles monocompartimentaux avec une phase d'absorption mais la présence d'un signal avant l'administration de la GH a obligé à développer cette équation dans le module « User Model » de WinNonlin.

Les ajustements ont été réalisés par régression non-linéaire en minimisant un critère de moindre carré avec un algorithme de Gauss-Newton avec la modification proposée par Hartley and Levenberg (WinNonlin user guide, version 5.2.1). Aucun facteur de pondération n'a été utilisé.

Des paramètres dérivés ont été obtenus avec :

$$T1/2_Ka = LN(2)/Ka$$

Avec $T1/2K_a$, le temps de demi-apparition des anticorps dans le plasma après *Tlag*.

$$T1/2_K10 = LN(2)/K10$$

Avec $T1/2K_{10}$, le temps de demi-vie plasmatique des anticorps.

$$T\max = \frac{LnKa - LnK10}{Ka - K10} + Tlag$$

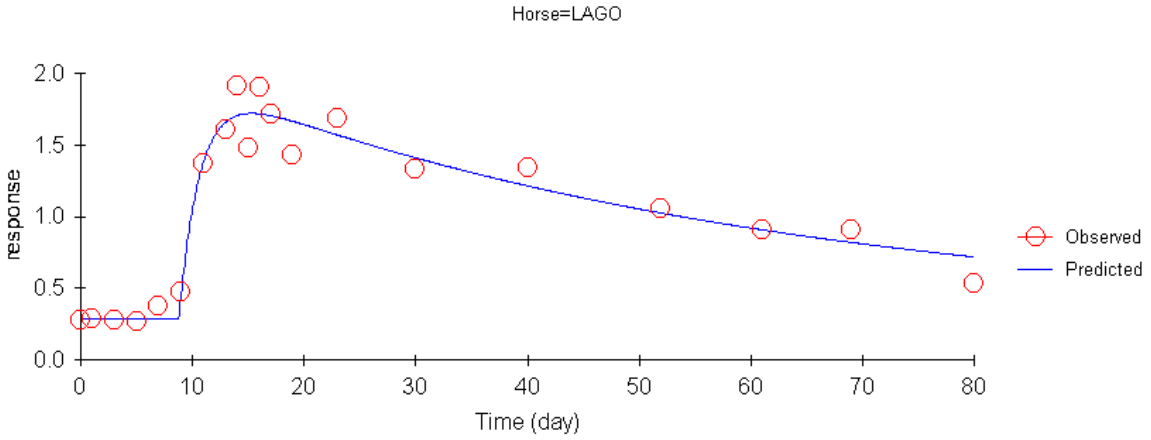
Avec *Tmax*, le temps d'occurrence du maximum de la réponse immunitaire.

La réponse maximale (Cmax dans le programme) a été évaluée en remplaçant le temps *t* par *Tmax* dans l'équation 1. Le rapport Cmax/Baseline donne le rapport signal de la réponse sur le bruit de fond témoin.

L'importance globale de la réponse immunitaire a été évaluée par l'aire sous la courbe des densités optiques (AUC dans le programme) qui est au dessus de la Baseline. L'AUC a été obtenue en intégrant algébriquement l'équation 1 avec :

$$AUC = (\frac{Load * ka}{(ka - k10)}) / K10 - (\frac{load * ka}{(Ka - k10)} / ka$$

Les ajustements ont été réalisés pour chaque cheval traité avec la reGH et les statistiques descriptives ont été directement obtenues par l'outil statistique de WinNonlin.



<u>Figure 10</u> : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Lago
Cette figure nous permet de voir la correspondance entre les valeurs de concentrations en anticorps mesurées chez Lago et celles obtenues comme estimation par le logiciel WinNonlin. On remarque ainsi que l'on obtient une corrélation assez bonne qui nous permet d'obtenir des données chiffrées utilisables pour analyser la production des anticorps anti-reGH par Lago.

	Estimation
Valeur de base	0.28 UA
Délai de réponse	8.8 j
Temps de demi-apparition	1.3 j
Concentration maximale	1.72 UA
Temps de concentration maximale	15.3 j
Cmax / valeur de base	6.14
Temps de demi-disparition	36.3 j
Aire sous la courbe	85.3 UA.j

<u>Tableau 10</u> : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Lago
Ce tableau récapitule les valeurs chiffrées obtenues par la modélisation de la cinétique de la production des anticorps anti-reGH chez Lago.

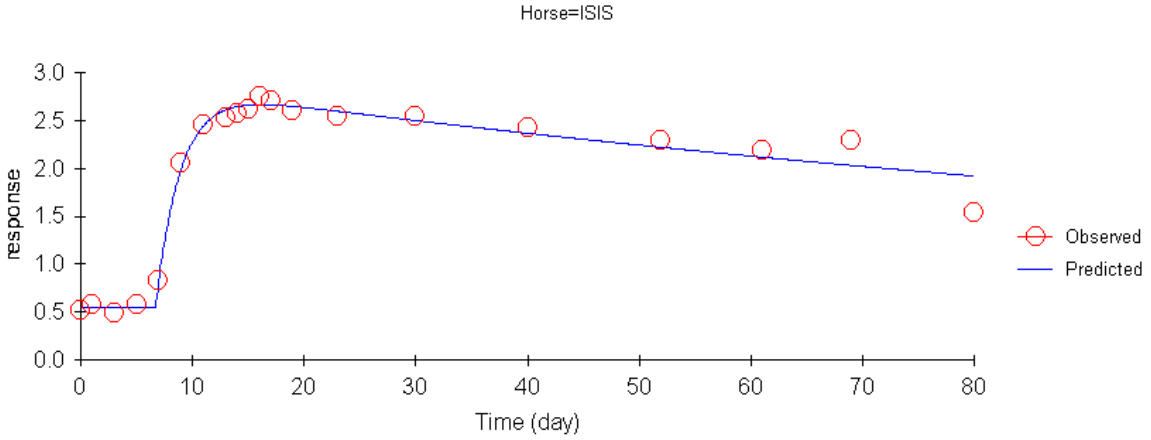


Figure 11 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Isis
Cette figure nous permet de voir la correspondance entre les valeurs de concentrations en anticorps mesurées chez Isis et celles obtenues comme estimation par le logiciel WinNonlin. On remarque ainsi que l'on obtient une corrélation assez bonne qui nous permet d'obtenir des données chiffrées utilisables pour analyser la production des anticorps anti-reGH par Isis.

	Estimation
Valeur de base	0.54 UA
Délai de réponse	6.7 j
Temps de demi-apparition	1.54 j
Concentration maximale	2.67 UA
Temps de concentration maximale	16.1 j
Cmax / valeur de base	4.94
Temps de demi-disparition	98.9 j
Aire sous la courbe	323.2 UA.j

Tableau 11 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Isis
Ce tableau récapitule les valeurs chiffrées obtenues par la modélisation de la cinétique de la production des anticorps anti-reGH chez Isis.

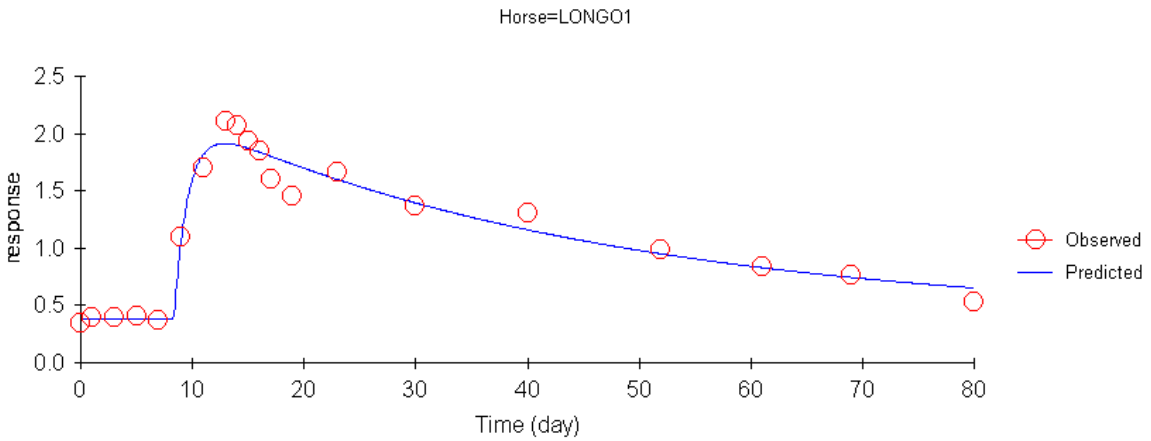


Figure 12 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Longo1
Cette figure nous permet de voir la correspondance entre les valeurs de concentrations en anticorps mesurées chez Longo1 et celles obtenues comme estimation par le logiciel WinNonlin. On remarque ainsi que l'on obtient

une corrélation assez bonne qui nous permet d'obtenir des données chiffrées utilisables pour analyser la production des anticorps anti-reGH par Longo1.

	Estimation
Valeur de base	0.37 UA
Délai de réponse	8.3 j
Temps de demi-apparition	0.90 j
Concentration maximale	1.91 UA
Temps de concentration maximale	12.9 j
Cmax / valeur de base	5.16
Temps de demi-disparition	26.6 j
Aire sous la courbe	66.54 UA.j

Tableau 12 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Longo1
Ce tableau récapitule les valeurs chiffrées obtenues par la modélisation de la cinétique de la production des anticorps anti-reGH chez Longo1.

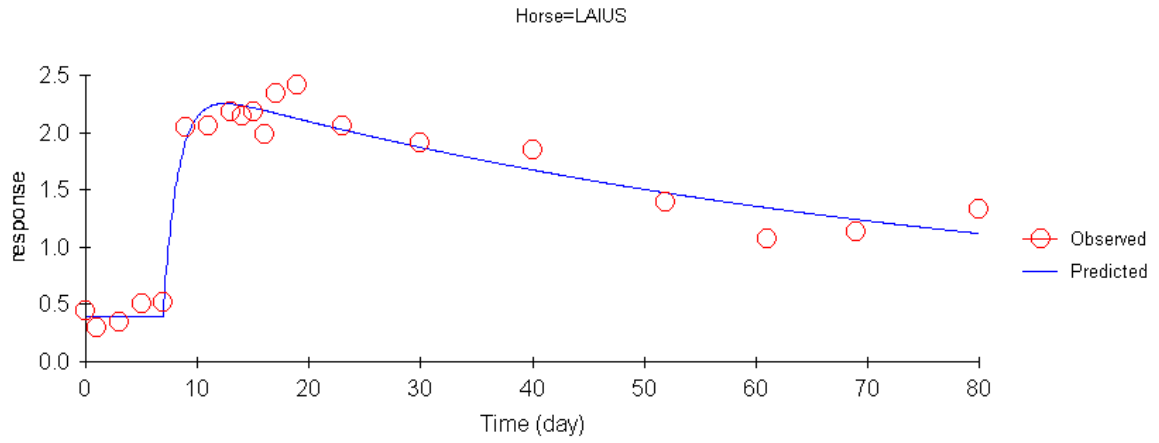


Figure 13 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Laius
Cette figure nous permet de voir la correspondance entre les valeurs de concentrations en anticorps mesurées chez Laius et celles obtenues comme estimation par le logiciel WinNonlin. On remarque ainsi que l'on obtient une corrélation assez bonne qui nous permet d'obtenir des données chiffrées utilisables pour analyser la production des anticorps anti-reGH par Laius.

	Estimation
Valeur de base	0.39 UA
Délai de réponse	6.9 j
Temps de demi-apparition	0.95 j
Concentration maximale	2.25 UA
Temps de concentration maximale	12.4 j
Cmax / valeur de base	5.77
Temps de demi-disparition	48.6 j
Aire sous la courbe	141.0 UA.j

Tableau 13 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Laius
Ce tableau récapitule les valeurs chiffrées obtenues par la modélisation de la cinétique de la production des anticorps anti-reGH chez Laius.

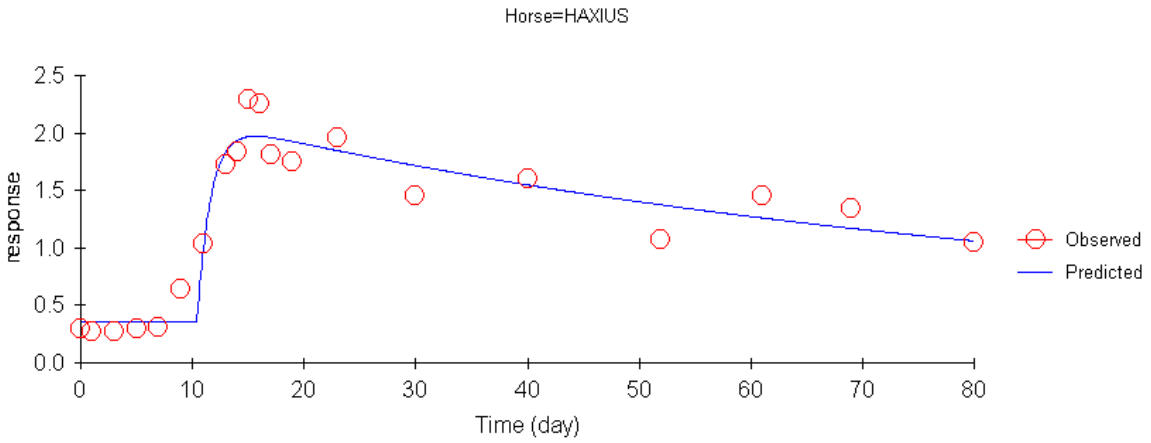


Figure 14 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Haxius
Cette figure nous permet de voir la correspondance entre les valeurs de concentrations en anticorps mesurées chez Haxius et celles obtenues comme estimation par le logiciel WinNonlin. On remarque ainsi que l'on obtient une corrélation assez bonne qui nous permet d'obtenir des données chiffrées utilisables pour analyser la production des anticorps anti-reGH par Haxius.

	Estimation
Valeur de base	0.35 UA
Délai de réponse	10.4 j
Temps de demi-apparition	0.86 j
Concentration maximale	1.97 UA
Temps de concentration maximale	15.6 j
Cmax / valeur de base	5.63
Temps de demi-disparition	52.9 j
Aire sous la courbe	132.9 UA.j

Tableau 14 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Haxius
Ce tableau récapitule les valeurs chiffrées obtenues par la modélisation de la cinétique de la production des anticorps anti-reGH chez Haxius.

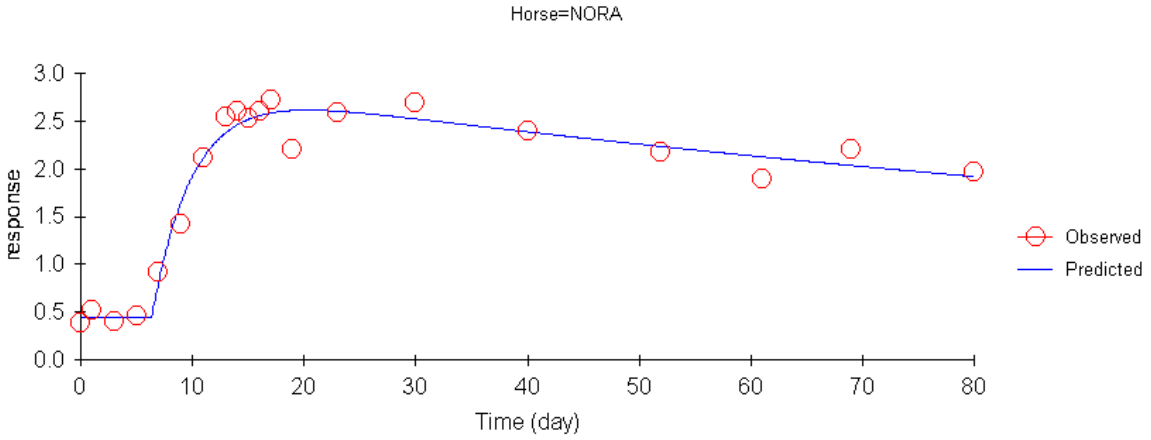


Figure 15 : Cinétique de production des anticorps anti-reGH pour Nora
Cette figure nous permet de voir la correspondance entre les valeurs de concentrations en anticorps mesurées chez Nora et celles obtenues comme estimation par le logiciel WinNonlin. On remarque ainsi que l'on obtient

une corrélation assez bonne qui nous permet d'obtenir des données chiffrées utilisables pour analyser la production des anticorps anti-reGH par Nora.

	Estimation
Valeur de base	0.44 UA
Délai de réponse	6.3 j
Temps de demi-apparition	2.6 j
Concentration maximale	2.62 UA
Temps de concentration maximale	20.2 j
Cmax / valeur de base	5.95
Temps de demi-disparition	100.6 j
Aire sous la courbe	348.1 UA.j

Tableau 15 : Valeurs chiffrées obtenues grâce au logiciel WinNonlin pour matérialiser la cinétique de production des anticorps anti-reGH chez Nora
Ce tableau récapitule les valeurs chiffrées obtenues par la modélisation de la cinétique de la production des anticorps anti-reGH chez Nora.

	Lago	Isis	Longo1	Laius	Haxius	Nora	Moyenne	SD
Valeur de base (UA)	0.28	0.54	0.37	0.39	0.35	0.44	**0.39**	**0.09**
Délai de réponse (j)	8.8	6.7	8.3	6.9	10.4	6.3	**7.9**	**1.5**
Temps de ½ apparition (j)	1.3	1.5	0.90	0.95	0.86	2.6	**1.3**	**0.65**
Concentration maximale (UA)	1.72	2.67	1.91	2.25	1.97	2.62	**2.19**	**0.39**
Cmax / valeur de base	6.14	4.94	5.16	5.77	5.63	5.95	**5.60**	
Temps de concentration maximale (j)	15.3	16.1	12.9	12.4	15.6	20.2	**15.4**	**2.8**
Temps de ½ disparition (j)	36.3	98.9	26.6	48.6	52.9	100.6	**60.6**	**31.7**

Tableau 16 : Comparaison et moyenne des valeurs chiffrées obtenues par le logiciel WinNonlin pour les 6 chevaux traités à la reGH
Ce tableau permet de constater une bonne homogénéité des valeurs obtenues sauf pour le temps de ½ disparition qui apparaît très variable d'un cheval à l'autre. On peut également noter que la réponse apparaît une semaine environ après le début du traitement et qu'elle est ensuite rapide car on atteint le maximum à J+15 environ. Pour finir, on remarque que la production d'anticorps anti-reGH provoquée par le traitement est significativement importante car, en moyenne, il existe un facteur de 5,6 entre la concentration maximale et la valeur de base.

Ce tableau récapitulatif permet de tirer plusieurs conclusions :

- la valeur de base est de 0.39 ce qui est comparable à celle trouvée pour le groupe de chevaux témoins
- le délai d'apparition des anticorps anti-reGH est d'environ 8 jours avec ensuite un temps de ½ apparition rapide d'environ 1.3 jours
- la concentration maximale atteinte est en moyenne de 2.2 UA, ce qui correspond à 5.6 fois la valeur de base
- la concentration maximale est atteinte au bout de 15.5 jours avec un temps de ½ disparition lent d'environ 61 jours

On constate donc que le traitement à la reGH entraîne une augmentation significative de la concentration plasmatique en anticorps anti-reGH (× 5.6) avec une réponse rapide à partir d'une semaine de traitement. La décroissance de ce taux est ensuite lente ce qui permet une bonne discrimination du groupe traité et du groupe témoin pendant plus de 80 jours après le début du traitement avec la reGH.

Dans une étude précédente menée sur deux chevaux, un seuil de détection avait été fixé à DO_{405nm}=1.2 et la fenêtre de détection avec les anticorps anti-reGH était de 200jours.

Les points forts de cette méthode sont donc la sensibilité de la détection, la capacité importante de traitement des échantillons grâce aux plaques 96 puits et la répétabilité des mesures grâce au « laveur automatique » ce qui en fait une méthode très intéressante et facilement utilisable pour l'étape de criblage.

2. Détection indirecte : approche métabolomique (figure 16)

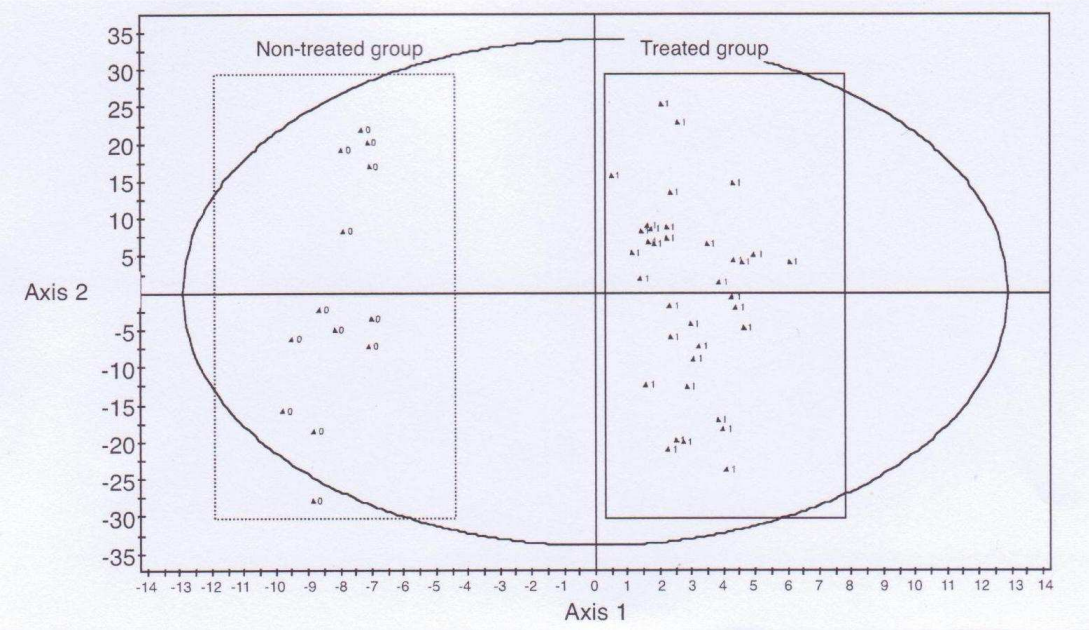


Figure 16 : Evaluation de l'impact des administrations de reGH sur les empreintes urinaires de chevaux en utilisant une analyse multivariante
Cette figure illustre la bonne séparation des groupes traité et non-traité après l'analyse multivariante des empreintes urinaires.

Les analyses spectrométriques des urines des chevaux traités et des chevaux témoins après chromatographie en phase liquide permettent d'obtenir des spectres spécifiques à chaque groupe. La comparaison de ces deux spectres permet de mettre en évidence des ions spécifiques qui sont intéressants pour distinguer les deux groupes.

L'analyse OPLS a ainsi été menée sur environ 1000 ions détectés pendant les premières étapes d'analyse. Les résultats de l'OPLS révèlent une très bonne séparation entre les urines collectées avant et après traitement. Cette discrimination entre les groupes contrôles et traités, quel que soit le temps de récolte de l'échantillon après le traitement (entre 3 et 69 jours), est intéressante pour la mise en place d'un outil de criblage pour la recherche d'utilisation abusive de la reGH.

Cette nouvelle approche mérite cependant des études complémentaires afin de pouvoir standardiser la méthode ce qui rendrait son usage plus facile en routine pour l'étape de criblage.

D'autre part, cette méthode offre d'autres perspectives. En effet, il serait intéressant de sélectionner les ions les plus discriminants entre les groupes traités et témoins afin de s'y intéresser plus précisément, de déterminer leur structure et donc les identifier clairement. Ainsi, de nouveaux marqueurs indirects du traitement à la reGH seraient identifiés.

3. Détection directe de la reGH dans le plasma par LC/MS/MS (figure 17)

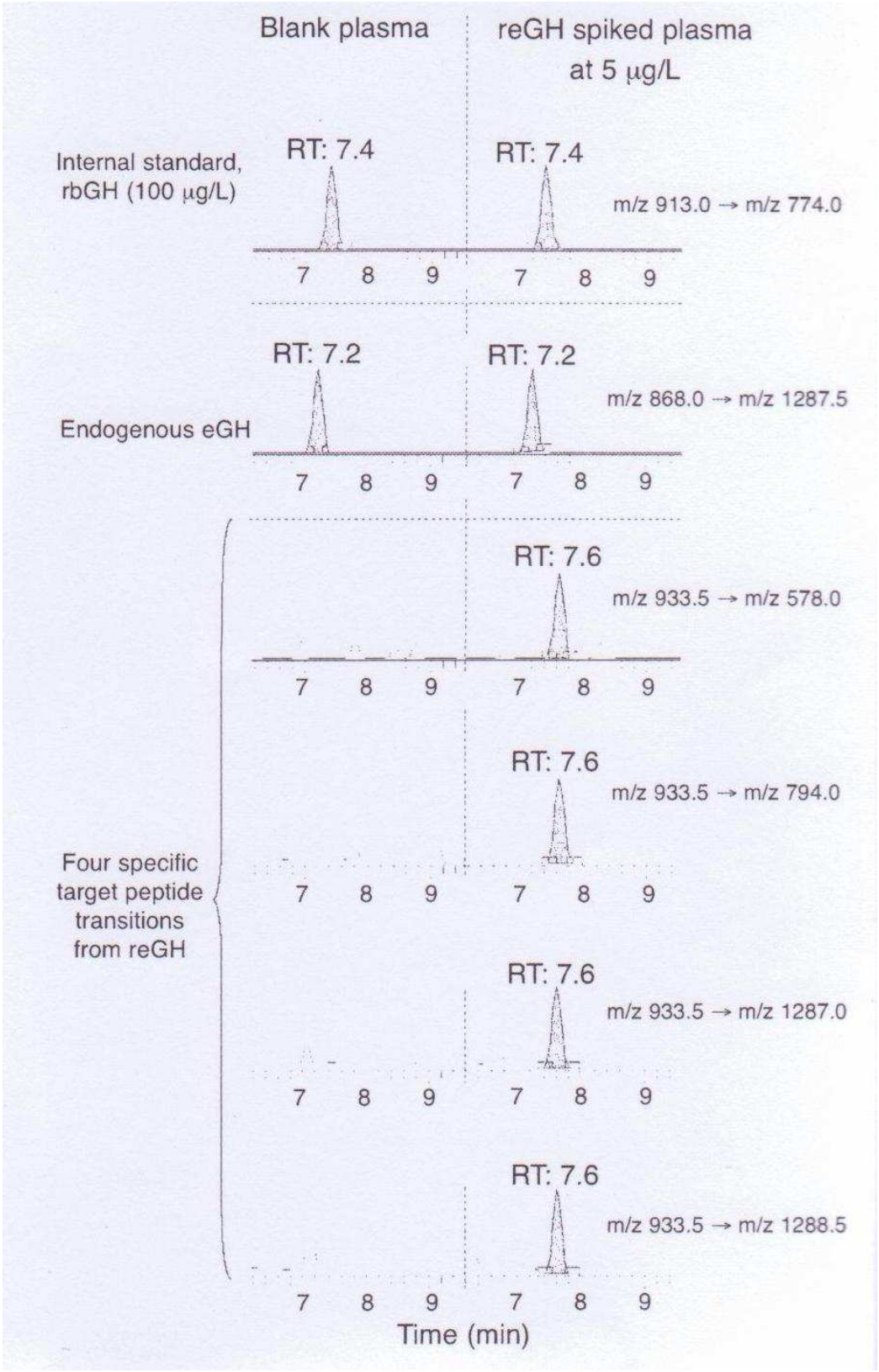


Figure 17 : Chromatogrammes d'ions des peptides caractéristiques du fragment N-terminal de la GH, après purification et passage par le LC/MS/MS

Cette figure illustre les chromatogrammes spécifiques obtenus lorsque de la reGH est présente dans un échantillon.

On observe une bonne identification de l'étalon interne (rbGH à 100µg/L) grâce au scan des ions produits après la fragmentation du $[M+2H]^{2+}$ (m/z 913.0) jusqu'à m/z 774.0 avec un temps de rétention de 7.4min.

L'analyse d'autres aliquots du même pool de plasmas équins enrichis à 5µg/L de reGH permet, en accord avec les critères de l'AORC MS pour les petites molécules, une identification non ambiguë de la reGH grâce à 4 transitions ioniques spécifiques avec un temps de rétention de 7.6min après purification et détection LC/MS/MS du fragment peptidique N-terminal caractéristique ($[M+2H]^{2+}$, m/z 933.5).

Le fait que la comparaison des chromatogrammes entre les contrôles et les plasmas enrichis confirme la spécificité de la méthode et donc la capacité à identifier la reGH dans les plasmas équins enrichis à la concentration requise de 1 à 10µg/L a été démontré avec succès.

De plus, pour l'évaluation de la limite de détection de 1 à 10µg/L, une recherche de la GH pituitaire, naturellement présente dans le plasma à la concentration recherchée de 1 à 10µg/L, a été réalisé dans la même analyse pour la détection du peptide N-terminal caractéristique ($[M+2H]^{2+}$, m/z 868.0). Ce peptide cible est clairement identifié à un temps de rétention de 7.2min ce qui est compréhensible en considérant sa nature hydrophobe comparée avec les deux autres peptides (reGH ou rbGH).

L'identification de l'eGH endogène dans les plasmas équins blancs indique que la méthode a une sensibilité adéquate et cohérente face aux résultats obtenus en RIA (Thompson 1992) et en ELISA (Borromeo 2005) dans la détection de l'eGH.

Cette méthode est la première permettant une identification non ambiguë de la GH endogène et sa différenciation avec la forme recombinante dans le plasma équin.

D'autre part, la réalisation des cinétiques de concentration plasmatique de la reGH chez les chevaux traités était prévue mais des problèmes techniques (manque de disponibilité de la rbGH qui est l'étalon interne pour le spectromètre de masse) ont empêché leur réalisation.

CONCLUSION

Notre étude nous a donc permis de bien avancer dans le domaine des techniques analytiques utilisables dans le cadre de la lutte antidopage contre l'hormone de croissance recombinante équine.

D'une part, nous avons pu confirmer l'efficacité de la méthode directe de détection de la reGH dans le plasma par LC/MS/MS qui permet désormais de faire la différence entre l'hormone naturelle et la recombinante. Malheureusement, des problèmes techniques (manque de disponibilité de la rbGH qui est l'étalon interne pour le spectromètre de masse) ont empêché la réalisation des cinétiques de la concentration plasmatique de reGH chez les chevaux traités. Cette technique représente donc la méthode de choix pour la confirmation d'un cas positif, même si des études supplémentaires seraient intéressantes.

D'autre part, nous avons également continué de travailler sur la mise au point d'une technique de détection indirecte utilisable pour la première étape de criblage, le dosage des anticorps plasmatique anti-reGH. Les résultats sont très intéressants et offrent une discrimination aisée entre les chevaux traités et les chevaux témoins sur une période de plus de deux mois après la fin du traitement.

Pour finir, nous avons mis au point une nouvelle technique de détection indirecte basée sur la métabolomique. Cette méthode offre déjà des résultats intéressants pour la discrimination des chevaux traités par rapport aux chevaux témoins même si elle ne paraît pas utilisable en routine immédiatement. Des études complémentaires vont permettre d'affiner la méthode et d'aller plus loin en essayant d'identifier précisément les ions identifiés comme les plus discriminants dans l'urine.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE

Direction de l'Enseignement et de la Pédagogie

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle GRALL Morgane

a été admis(e) sur concours en : 2005

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juillet 2009

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Pierre-Louis TOUTAIN, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle GRALL Morgane

intitulée :

« Contrôle antidopage de l'hormone de croissance recombinante équine chez le cheval : Approches directe et indirectes. »

Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Pierre-Louis TOUTAIN

Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE * DIRECTION ENSEIGNEMENT *

Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Bettina COUDERC

Vu le : 04/02/10
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER

UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

BIBLIOGRAPHIE

1. -BAILLY-CHOURIBERRY L., CHU-VAN E., PINEL G., GARCIA P., POPOT M.A., ANDRE-FONTAINE G., BONNAIRE Y. and LE BIZEC B.: **Detection of secondary biomarker of met-eGH as a strategy to screen for somatotropin misuse in horseracing**. *Analyst*, 2008, **133**: 270-6.

2. -BAILLY-CHOURIBERRY L., PINEL G., GARCIA P., POPOT M.A., LE BIZEC B. and BONNAIRE Y.: **Identification of recombinant equine growth hormone in horse plasma by LC-MS/MS: a confirmatory analysis in doping control.** *Anal Chem*, 2008, **80**: 8340-7.

3. -BIDLINGMAIER M., WU Z. and STRASBURGER C.J.: **Doping with growth hormone.** *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2001, **14**: 1077-83.

4. -BONNAIRE Y.: **Les problèmes actuels du contrôle antidopage équin.** *Revue française des laboratoires*, 1999, **310**: 73-76.

5. -BONNAIRE Y., BOBIN S., POPOT M.A., TABET J.C. and CLOSSET J. **Studies of the structures of extractive and recombinant growth hormone from different species by mass spectrometry.** in *12th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 1998. Vancouver, Canada.

6. -BONNAIRE Y. and LAFARGUE J.: **Peptides et dopage : un nouveau challenge pour les laboratoires.** *Sciences & Sports*, 1995, **10**: 83-85.

7. -BORROMEO V., ABBATE F., BERRINI A., BARTOLONE A. and SECCHI C.: **Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine growth hormone in plasma.** *Veterinary Research Communications*, 2005, **29**: 173-176.

8. -BORROMEO V., ABBATE F., BERRINI A., BARTOLONE A. and SECCHI C.: **Heterophile antibody interference in a solid phase sandwich immunoassay for detection of equine growth hormone in plasma.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, **115**: 1-9.

9. -BRUYAS J.F. **Aspects pratiques des missions des vétérinaires agréés dans le cadre de la lutte contre le dopage animal en France.** in *AVEF*. 2009. Deauville, France.

10. -BUFF P.R., MORRISON C.D., GANJAM G.K. and KEISLER D.H.: **Effects of short-term feed deprivation and melatonin implants on circadian patterns of leptin in the horse.** *J Anim Sci*, 2005, **83**: 1023-1032.

11. -CAHILL C.M., VAN DER HOLK H., GOODE J.A. and HAYDEN T.J.: **Development of homologous radioimmunoassays for equine growth hormone and equine prolactine and their application to the detection of circulating levels of hormone in horse plasma.** *Reproduction, Nutrition, Development*, 1994, **34**: 309-328.

12. -CAPSHAW E.L., THOMPSON D.L., JR., KULINSKI K.M., JOHNSON C.A. and FRENCH D.D.: **Daily treatment of horses with equine somatotropin from 4 to 16 months of age.** *J Anim Sci*, 2001, **79**: 3137-47.

13. -CASCONE O., FUKUSHIMA J.G., MIHAJLOVICH V., SANTOME J.A. and BISCOGLIO DE JIMÉNEZ BONINO M.: **An equine growth hormone molecular species lacking the 76-92 peptidic fragment.** *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1992, **39**: 397-400.

14. -CHRISTENSEN R.A., MALINOWSKI K., MASSENZIO A.M., HAFS H.D. and SCANES C.G.: **Acute effects of short-term feed deprivation and refeeding on circulating concentrations of metabolites, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, somatotropin, and thyroid hormones in adult geldings.** *J Anim Sci*, 1997, **75**: 1351-8.

15. -CHRISTENSEN R.A., MALINOWSKI K., SCANES C.G. and HAFS H.D.: **Pulsatile release of somatotropin related to meal feeding and somatotropin response to secretagogues in horses.** *J Anim Sci*, 1997, **75**: 2770-7.

16. -CONDE R.D., PALADINI A.C., SANTOME J.A. and DELLACHA J.M.: **Isolation, purification and characterization of equine growth hormone.** *Eur J Biochem*, 1973, **32**: 563-8.

17. -DALL R., LONGOBARDI S., EHRNBORG C., KEAY N., ROSEN T., JORGENSEN J.O., CUNEO R.C., BOROUJERDI M., CITTADINI A., NAPOLI R., CHRISTIANSEN J.S., BENGTSSON B.A., SACCA L., BAXTER R., BASSET E.E. and SONKSEN P.H.: **The effect of four weeks of supraphysiological growth hormone administration on the insulin-like growth factor axis in women and men. GH-2000 Study Group.** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001, **85**: 4193-4200.

18. -DART A., LITTLE C., HUGHES C., CHU Q., DOWLING B., HODGSON D., ROSE R. and JOHNSON K.: **Recombinant equine growth hormone administration: effects on synovial fluid biomarkers and cartilage metabolism in horses.** *Equine Veterinary Journal*, 2003, **35**: 302-307.

19. -DART A.J., CRIES L., JEFFCOTT L.B., HODGSON D. and ROSE R.J.: **The effect of equine recombinant growth hormone on second intention wound healing in horses.** *Veterinary surgery*, 2002, **31**: 314-319.

20. -DE KOCK S.S., RODGERS J.P. and SWANEPOEL B.C.: **Growth hormone abuse in the horse: preliminary assessment of a mass spectrometric procedure for IGF-1 identification and quantitation.** *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, **15**: 1191-7.

21. -DE KOCK S.S., RODGERS J.P., SWANEPOEL B.C., FAUSTINO-KEMP J., JACKSON L.S., HOUGHTON E., NOBLE G.K. and SILLENCE M.N. **Growth hormone abuse in the horse: establishment of an insulin-like growth factor-1 database.** in *13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 2000. Cambridge, United Kingdom.

22. -DE KOCK S.S., RODGERS J.P., SWANEPOEL B.C. and GUTHRIE A.J.: **Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins.** *J Endocrinol*, 2001, **171**: 163-71.

23. -DE KOCK S.S., RODGERS J.P., SWANEPOEL B.C., PRICE J.S., NOBLE G.K. and SILLENCE M.N. **Potential markers of bone formation and growth hormone treatment in the horse.** in *13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 2000. Cambridge, United Kingdom.

24. -DEPEW C.L., THOMPSON D.L., JR., FERNANDEZ J.M., STICKER L.S. and BURLEIGH D.W.: **Changes in concentrations of hormones, metabolites, and amino acids in plasma of adult horses relative to overnight feed deprivation followed by a pellet-hay meal fed at noon.** *J Anim Sci*, 1994, **72**: 1530-9.

25. -DI LUIGI L. and GUIDETTI L.: **IGF-1, IGFBP-2, and -3: do they have a role in detecting rhGH abuse in trained men?** *Medicine and Science in sports and exercise*, 2002, **34**: 1270-1278.

26. -EHRNBORG C., LANGE K.H., DALL R., CHRISTIANSEN J.S., LUNDBERG P.A., BAXTER R.C., BOROUJERDI M.A., BENGTSSON B.A., HEALEY M.L., PENTECOST C., LONGOBARDI S., NAPOLI R. and ROSEN T.: **The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis hormones and bone markers in elite athletes in response to a maximum exercise test.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**: 394-401.

27. -FAUSTINO-KEMP J., HOUGHTON E., JACKSON L.S. and WILLIAMS R.B. **The use of IGF-1 as a marker for detecting administration of growth hormone.** in *13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 2000. Cambridge, United Kingdom.

28. -HEALY M.L., DALL R., GIBNEY J., BASSETT E., EHRNBORG C., PENTECOST C., ROSEN T., CITTADINI A., BAXTER R.C. and SONKSEN P.H.: **Toward the development of a test for growth hormone (GH) abuse: a study of extreme physiological ranges of GH-dependent markers in 813 elite athletes in the postcompetition setting.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, **90**: 641-9.

29. -HOVE K. and BLOM A.K.: **Plasma insulin and growth hormone in dairy cows; diurnal variation and relation to food intake and plasma sugar and acetoacetate levels.** *Acta Endocrinologica*, 1973, **73**: 289-303.

30. -JOHNSON V. and MAACK T.: **Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone.** *The American Journal of Physiology*, 1977, **233**: 185-196.

31. -KELLER A., WU Z., KRATZSCH J., KELLER E., BLUM W.F., KNIESS A., PREISS R., TEICHERT J., STRASBURGER C.J. and BIDLINGMAIER M.: **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GH: dependence on route and dosage of administration.** *Eur J Endocrinol*, 2007, **156**: 647-53.

32. -KENNEDY S., THOMPSON D.L., PRUETT H., BURNS P. and DEGHENGHI R.: **Growth hormone response to a novel growth hormone-releasing tripeptide in horses: interaction with gonadotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and sulpiride.** *Journal of Animal Science*, 2002, **80**: 744-750.

33. -KICMAN A.T., MIELL J.P., TEALE J.D., POWRIE J., WOOD P.J., LAIDLER P., MILLIGAN P.J. and COWAN D.A.: **Serum IGF-1 and IGF binding proteins 2 and 3 as potential markers of doping with human GH.** *Clinical Endocrinology*, 1997, **47**: 43-50.

34. -KNIESS A., ZIEGLER E., KRATZSCH J., THIEME D. and MÜLLER R.K.: **Potential parameters for the detection of hGH doping.** *Anal Bioanal Chem*, 2003, **376**: 696-700.

35. -LONGOBARDI S., KEAY N., EHRNBORG C., CITTADINI A., ROSEN T., DALL R., BOROUJERDI M.A., BASSETT E.E., HEALY M.L., PENTECOST C., WALLACE J.D., POWRIE J., JORGENSEN J.O. and SACCA L.: **Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85**: 1505-12.

36. -MALINOWSKI K., CHRISTENSEN R.A., KONOPKA A., SCANES C.G. and HAFS H.D.: **Feed intake, body weight, body condition score, musculation, and immunocompetence in aged mares given equine somatotropin**. *J Anim Sci*, 1997, **75**: 755-60.

37. -MCHUGH C.M., PARK R.T., SONKSEN P.H. and HOLT R.I.: **Challenges in detecting the abuse of growth hormone in sport.** *Clin Chem*, 2005, **51**: 1587-93.

38. -MINUTO F., BARRECA A. and MELIOLI G.: **Indirect evidence of hormone abuse. Proof of doping?** *Journal of Endocrinological Investigation*, 2003, **26**: 919-923.

39. -NADAL M.R., THOMPSON D.L., JR. and KINCAID L.A.: **Effect of feeding and feed deprivation on plasma concentrations of prolactin, insulin, growth hormone, and metabolites in horses.** *J Anim Sci*, 1997, **75**: 736-44.

40. -NOBLE G.K., HOUGHTON E., ROBERTS C.J., FAUSTINO-KEMP J., DE KOCK S.S., SWANEPOEL B.C. and SILLENCE M.N.: **Effect of exercise, training, circadian rhythm, age, and sex on insulin-like growth factor-1 in the horse.** *J Anim Sci*, 2007, **85**: 163-71.

41. -NOBLE G.K. and SILLENCE M.N. **The potential of mediator hormones as markers of growth hormone abuse in racehorses.** in *13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 2000. Cambridge, United Kingdom.

42. -POPII V. and BAUMANN G.: **Laboratory measurement of growth hormone.** *Clinica Chimica Acta*, 2004, **350**: 1-16.

43. -POPOT M.A., BOBIN S., BONNAIRE Y., DELAHAUT P.H. and CLOSSET J.: **IGF -I plasma concentrations in non-treated horses and horses administered with methionyl equine somatotropin.** *Res Vet Sci*, 2001, **71**: 167-73.

44. -POPOT M.A., BOBIN S., BONNAIRE Y., MONGET P., TOQUET M.P., FORTIER G., DELAHAUT P.H. and CLOSSET J. **Study related to the detection of recombinant equine growth hormone administration in the horse.** in *13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 2000. Cambridge, United Kingdom.

45. -POPOT M.A., BOBIN S., BONNAIRE Y., PIRENS G., DELAHAUT P.H., LYAZRHI F. and TABET J.C. **IGF-1 concentrations in the horse: detremination of a threshold value.** in *14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. 2001. Florida, USA.

46. -POPOT M.A., WOOLFITT A.R., GARCIA P. and TABET J.C.: **Determination of IGF-I in horse plasma by LC electrospray ionisation mass spectrometry.** *Anal Bioanal Chem*, 2008, **390**: 1843-52.

47. -PRICE J.S., JACKSON B., NOBLE G.K., HORNER C., JACKSON L.S., EASTELL R., HOUGHTON E. and SILLENCE M.N. **Growth hormone administration increases bone turnover in horses.** in *13th Conference of International Racing Analysts and Veterinarians*. 2000. Cambridge, United Kingdom.

48. -RAHMANIAN M.S., THOMPSON D.L., JR. and MELROSE P.A.: **Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the equine pituitary.** *J Anim Sci*, 1997, **75**: 3010-8.

49. -SMITH L.A., THOMPSON D.L., FRENCH D.D. and LEISE B.S.: **Effects of recombinant equine somatotropin on wound healing, carbohydrate and lipid metabolism, and endogenous somatotropin responses to secretagogues in geldings.** *Journal of Animal Science*, 1999, **77**: 1815-1822.

50. -SONKSEN P.H.: **Insulin, growth hormone and sport.** *J Endocrinol*, 2001, **170**: 13-25.

51. -STEWART F., GOODE J.A. and ALLEN W.R.: **Growth hormone secretion in the horse: unusual pattern at birth and pulsatile secretion through to maturity.** *The Journal of Endocrinology*, 1993, **138**: 81-89.

52. -THOMPSON D.L., JR., DEPEW C.L., ORTIZ A., STICKER L.S. and RAHMANIAN M.S.: **Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone.** *J Anim Sci*, 1994, **72**: 2911-8.

53. -THOMPSON D.L., JR., RAHMANIAN M.S., DEPEW C.L., BURLEIGH D.W., DESOUZA C.J. and COLBORN D.R.: **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**: 1201-7.

54. -WALLACE J.D., CUNEO R.C., BAXTER R., ORSKOV H., KEAY N., PENTECOST C., DALL R., ROSEN T., JORGENSEN J.O., CITTADINI A., LONGOBARDI S., SACCA L., CHRISTIANSEN J.S., BENGTSSON B.A. and SONKSEN P.H.: **Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport.** *J Clin Endocrinol Metab,* 1999, **84**: 3591-601.

55. -WALLACE J.D., CUNEO R.C., BIDLINGMAIER M., LUNDBERG P.A., CARLSSON L., BOGUSZEWSKI C.L., HAY J., BOROUJERDI M., CITTADINI A., DALL R., ROSEN T. and STRASBURGER C.J.: **Changes in non-22-kilodalton (kDa) isoforms of growth hormone (GH) after administration of 22-kDa recombinant human GH in trained adult males.** *J Clin Endocrinol Metab,* 2001, **86**: 1731-7.

56. -WALLACE J.D., CUNEO R.C., BIDLINGMAIER M., LUNDBERG P.A., CARLSSON L., BOGUSZEWSKI C.L., HAY J., HEALY M.L., NAPOLI R., DALL R., ROSEN T. and STRASBURGER C.J.: **The response of molecular isoforms of growth hormone to acute exercise in trained adult males.** *J Clin Endocrinol Metab,* 2001, **86**: 200-6.

57. -WALLACE J.D., CUNEO R.C., LUNDBERG P.A., ROSEN T., JORGENSEN J.O., LONGOBARDI S., KEAY N., SACCA L., CHRISTIANSEN J.S., BENGTSSON B.A. and SONKSEN P.H.: **Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult males**. *J Clin Endocrinol Metab,* 2000, **85**: 124-33.

ANNEXES

CODE DES COURSES au galop :

Deuxième partie : Contrôle de l'absence de substance prohibée dans le prélèvement biologique effectué sur le cheval

ART. 198

PRINCIPE GÉNÉRAL

I. Aucun cheval, dès lors qu'il a été déclaré à l'entraînement en France, même s'il en est sorti provisoirement, aucun cheval entraîné à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, et aucun cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France, ne doit faire l'objet de l'administration :

- d'un stéroïde anabolisant,
- d'un facteur de croissance,
- d'une substance agissant sur l'érythropoïèse,
- d'un transporteur d'oxygène synthétique,
- ou d'une substance ayant des propriétés analogues aux substances ci-dessus,

Ce cheval ne doit pas non plus receler dans ses tissus, fluides corporels ou excrétions, ou dans toute partie de son corps, un métabolite ou un isomère de l'une des substances ci-dessus, ou l'un des métabolites de cet isomère. Il ne doit pas non plus faire l'objet d'une manipulation sanguine.

Ce cheval ne doit en outre pas receler dans ses tissus, fluides corporels ou excrétions, une autre substance prohibée dont la présence ne peut être justifiée par l'administration de soins prescrits par une ordonnance.

Les personnes titulaires d'une autorisation d'entraîner ont l'obligation de respecter les dispositions de l'annexe 15 du présent code, relative au code de pratique des traitements administrés aux chevaux à l'entraînement.

II. Aucun cheval déclaré partant dans une course ne doit, à partir de la déclaration de partant, même s'il ne prend pas part à la course, jusqu'au moment où il est prélevé, faire l'objet de l'administration d'une substance prohibée ou d'une manipulation sanguine ni receler dans ses tissus, fluides corporels ou excrétions, une substance prohibée telle que définie au paragraphe III ci-après, ou l'un de ses métabolites, ou un isomère de cette substance ou de l'un de ses métabolites.

Si après avoir été déclaré partant dans une course, un cheval a besoin de soins nécessitant l'administration d'une substance prohibée, l'entraîneur doit déclarer le retrait du cheval de la course et fournir un certificat vétérinaire.

III. Une substance prohibée est une substance appartenant à l'une des catégories de substances figurant sur la liste publiée en annexe 5 du présent Code.

Sauf justification prévue au second alinéa du paragraphe I du présent article, l'analyse des prélèvements biologiques effectués sur :

- un cheval ayant été déclaré à l'entraînement en France, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement.
- un cheval entraîné à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, ou un cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France,
- un cheval déclaré partant même s'il ne prend pas part à la course, ne doit pas faire apparaître la présence d'une substance prohibée ou d'un métabolite d'une telle substance, d'un isomère de cette substance ou d'un de ses métabolites.

Les exceptions à cette interdiction qui ne peuvent être appliquées qu'aux substances endogènes chez le cheval ou aux substances provenant de la nourriture normale du cheval, sont énoncées ci-après :

a) S'il s'agit d'une des substances endogènes chez le cheval pour lesquelles un seuil a été fixé, le prélèvement ne peut être déclaré positif que si la concentration de la substance dépasse le seuil physiologique normal défini internationalement par les analystes et vétérinaires officiels, adopté par les Commissaires de France Galop et publié au Bulletin Officiel des courses de galop.

Quand l'analyse d'une substance endogène donne un résultat positif, les Commissaires de France Galop peuvent décider de faire procéder à tous examens et analyses complémentaires. Le propriétaire ou l'entraîneur peut demander que le cheval soit soumis, à ses frais, à tous examens et analyses complémentaires dans les conditions fixées par les Commissaires de France Galop afin de vérifier si la quantité de substance incriminée est produite naturellement ou non.
b) S'il s'agit d'une substance provenant de la nourriture normale du cheval, le prélèvement ne peut être déclaré positif que si la concentration de la substance dépasse le seuil internationalement défini par les analystes et vétérinaires officiels et adopté par les Commissaires de France Galop. De tels seuils peuvent être fixés pour des substances provenant d'aliments normaux, c'est-à-dire de plantes traditionnellement broutées ou récoltées.
c) Des seuils peuvent être aussi établis pour des substances trouvées en très faible quantité dans les aliments semi-manufacturés et qui proviennent de contamination en cours de fabrication ou de transport ou apportées par des facteurs d'appétence (voir annexe 5 du présent Code).
IV. D'autre part, la mise en évidence par l'analyse d'un indicateur scientifique prouvant qu'il y a eu administration d'une substance prohibée ou exposition à une substance prohibée est équivalente à la mise en évidence de ladite substance prohibée.
V. L'entraîneur est dans l'obligation de protéger le cheval dont il a la garde et de le garantir comme il convient contre toute infraction au principe général édicté au présent Code et son personnel doit se conformer à cette obligation.
Il est notamment responsable de la nourriture, des conditions de vie et d'hébergement, de la protection et de la sécurité des chevaux dont il a la garde.
Il lui appartient, en conséquence, avant d'entraîner ou de faire courir un cheval qui vient de rentrer dans son effectif à l'entraînement, de s'assurer par tous contrôles et analyses biologiques qu'il juge nécessaires que ce cheval ne recèle pas une substance prohibée dans ses tissus, fluides corporels, excrétions ou tout autre partie de son corps.
VI. L'entraîneur doit se tenir précisément informé de tout traitement ou produit administré à ses chevaux et des conséquences des thérapeutiques qui leurs sont appliquées.
Pour chaque traitement nécessitant l'utilisation d'un ou plusieurs produits entrant dans l'une des catégories de substances prohibées, l'entraîneur doit être en possession d'une ordonnance qu'il est dans l'obligation de pouvoir présenter au moment du contrôle effectué à la demande des Commissaires de France Galop. L'ordonnance doit préciser le nom du cheval ou le numéro "Sire" si celui-ci n'est pas encore nommé, le nom (ou la dénomination) du médicament, la posologie et la durée du traitement ainsi que les précautions à prendre avant de faire recourir le cheval.
Il est tenu de numéroter chronologiquement chaque ordonnance au fur et à mesure des traitements prescrits aux chevaux dont il a la garde et de conserver toutes les ordonnances dans un classeur pendant au moins douze mois.
L'entraîneur doit tenir ce classeur à la disposition des Commissaires de France Galop ou de toute personne mandatée par ces derniers. Lorsqu'une enquête est ouverte sur la présence d'une substance prohibée dans le prélèvement effectué sur :
- un cheval ayant été déclaré à l'entraînement en France, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement.
- un cheval entraîné à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, ou un cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France,
- un cheval déclaré partant, même s'il ne prend pas part à la course, l'entraîneur doit fournir ce classeur aux Commissaires de France Galop et à toute personne mandatée par ces derniers.
Si l'enquête concerne un cheval sorti provisoirement de l'entraînement, la personne à qui a été confié le cheval doit fournir, au moment du contrôle, au vétérinaire mandaté par les Commissaires de France Galop, l'ordonnance justifiant la présence de ladite substance prohibée.
VII. En sa qualité de gardien du cheval l'entraîneur est toujours tenu pour responsable lorsque l'analyse du prélèvement effectué sur :
- l'un des chevaux qu'il a déclaré dans son effectif à l'entraînement en France,
- l'un des chevaux déclaré dans son effectif à l'entraînement à l'étranger, qui est engagé dans une course régie par le présent Code, ou un cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France.
- l'un des chevaux ayant été déclaré partant, même s'il ne prend pas part à la course.

fait apparaître la présence d'une substance prohibée.
Si la présence d'une substance prohibée dans le prélèvement biologique du cheval, résulte d'une administration faite pendant la sortie provisoire du cheval de l'entraînement, la responsabilité incombera, selon les résultats de l'enquête, à la personne ayant été chargée de la surveillance du cheval pendant cette sortie provisoire et/ou à toute personne, soumise au Code, jugée fautive de l'infraction.

ART. 199

MESURE DE PROTECTION

I. Matériel interdit dans les écuries de l'hippodrome. - Seuls les vétérinaires autorisés par les Commissaires des Courses peuvent pratiquer des soins médicaux dans l'enceinte de l'hippodrome lors des réunions de courses. En conséquence, aucune autre personne ne doit utiliser ni introduire dans les écuries d'un hippodrome, les jours de courses, un produit contenant une substance prohibée, une seringue, une aiguille hypodermique ou tout autre moyen d'administrer un tel produit ainsi que tout moyen de procéder à une manipulation sanguine. Toute personne autorisée à pénétrer dans les écuries d'un hippodrome doit se soumettre à toute investigation permettant de contrôler l'application des dispositions qui précèdent.

II. Interdiction des traitements de cryothérapie. - Sur les hippodromes et terrains placés sous l'autorité des sociétés de courses, il est interdit d'utiliser sur un cheval déclaré partant avant qu'il ait couru tout dispositif ou appareil de cryothérapie.

III. Sanction du refus de se soumettre au contrôle prévu pour les mesures de protection et sanction de l'introduction et de l'utilisation de produit et de matériel interdits dans les écuries de l'hippodrome. – Toute personne qui enfreint les dispositions du paragraphe précédent, toute personne qui refuse de se soumettre aux investigations prévues ci-dessus est passible d'une amende de 800 euros au moins et de 15.000 euros au plus, infligée par les Commissaires de France Galop, qui peuvent, en outre, suspendre ou retirer son autorisation de faire courir, d'entraîner et de monter et suspendre temporairement ou retirer son autorisation d'accéder aux installations, enceintes et terrains ou à tout autre lieu placé sous l'autorité des sociétés de courses.
Si les Commissaires des Courses, ou leur préposé constatent qu'un entraîneur, ou son représentant, manipule auprès du cheval avant la course, un produit contenant une substance prohibée, une seringue, une aiguille hypodermique ou tout autre moyen d'administrer une substance prohibée ou de procéder à une manipulation sanguine ou utilise un dispositif ou un appareil de cryothérapie, ils doivent interdire au cheval de courir.

ART. 200

PRÉLÈVEMENT BIOLOGIQUE SUR LES CHEVAUX

I. Prélèvements biologiques sur les chevaux déclarés à l'entraînement en France, sur les chevaux entraînés à l'étranger ayant été engagé dans une course régie par le Code ou sur les chevaux venant d'un autre pays qui sont provisoirement stationnés ou entraînés en France. - Les Commissaires de France Galop peuvent faire procéder par un vétérinaire qu'ils ont mandaté, au contrôle :
- de tout cheval déclaré à l'entraînement en France,
- de tout cheval entraîné à l'étranger ayant été engagé dans une course régie par le présent Code et de tout cheval venant d'un autre pays qui est provisoirement stationné ou entraîné en France.

Ils peuvent notamment faire effectuer et analyser des prélèvements biologiques sur ses tissus, fluides corporels ou excrétions ou sur toute autre partie de son corps dans les conditions prévues au règlement particulier publié en annexe 5 du présent Code.
Dans tous les cas, l'entraîneur, ou son représentant, est tenu de mettre immédiatement à la disposition du vétérinaire mandaté le cheval ou les chevaux sur lesquels celui-ci a mission d'effectuer des prélèvements biologiques ou tout autre contrôle et d'assister aux opérations de prélèvements. S'il n'est ni présent, ni représenté, aucune réclamation sur la régularité des prélèvements ne pourra être effectuée.

II. Prélèvements biologiques sur les chevaux sortis provisoirement de l'entraînement. - Les Commissaires de France Galop peuvent faire procéder par un vétérinaire qu'ils ont mandaté, que se soit en France ou à l'étranger, au contrôle de tout cheval sorti provisoirement de l'entraînement, ou dont la déclaration de sortie définitive de l'entraînement a été annulée conformément au paragraphe V de l'article 32 du présent Code.

Le cheval doit se trouver sur le lieu de stationnement dont l'adresse doit avoir été obligatoirement déclarée à France Galop par l'entraîneur ayant sorti le cheval de son effectif ou par le propriétaire ou son mandataire, comme l'exigent les dispositions du § II de l'article 32 du présent Code.
L'entraîneur, ou le propriétaire ou son mandataire, doit préalablement obtenir l'accord écrit de la personne à qui il confie son cheval pendant la sortie provisoire de l'entraînement, selon lequel elle s'engage à mettre immédiatement à la disposition du vétérinaire mandaté tout cheval sur lequel celui-ci a mission d'effectuer des prélèvements biologiques ou tout autre examen, à assister aux opérations de prélèvements et à se conformer aux dispositions du présent Code réglementant ces opérations.
Cet accord écrit, qui doit être obligatoirement adressé à France Galop, peut être soit une convention particulière établie entre l'entraîneur, ou éventuellement le propriétaire ou son mandataire, et le dépositaire du cheval pendant la sortie provisoire de l'entraînement, soit un engagement général de ce dernier pour tout cheval qu'il prend en charge pendant sa sortie provisoire de l'entraînement.
Même en absence d'accord écrit, les Commissaires de France Galop pourront faire application, selon le cas, des dispositions du paragraphe III du présent article sanctionnant l'absence du cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique de l'adresse déclarée à France Galop, des dispositions du paragraphe V du présent article sanctionnant la non présentation du cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique, des dispositions du paragraphe VI du présent article sanctionnant les perturbations du cheval pendant l'opération de prélèvement ou des dispositions du paragraphe VIII du présent article sanctionnant le refus ou l'omission de la signature du procès verbal de prélèvement.
Si cette personne n'est ni présente, ni représentée lors des opérations de prélèvement, aucune réclamation sur la régularité des prélèvements ne pourra être effectuée.
III. Sanction de l'absence du cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique, de son lieu de stationnement déclaré à France Galop. - Si, lors du contrôle effectué en France ou à l'étranger, le cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique est absent :
- soit de l'établissement de son entraîneur déclaré à France Galop,
- soit du lieu de son stationnement pendant sa sortie provisoire de l'entraînement déclaré à France Galop, sans que cette absence soit due à un cas de force majeure admis par les Commissaires de France Galop, le cheval ne peut plus courir pendant le mois qui suit l'examen de cette infraction par les Commissaires de France Galop.
Dans le cas de l'absence du cheval de son établissement d'entraînement, l'entraîneur est, en outre, passible d'une amende de 300 euros à 800 euros.
L'entraîneur ou éventuellement, le propriétaire ou son mandataire, ou la personne à qui est confié le cheval pendant sa sortie provisoire de l'entraînement, que ce soit en France ou à l'étranger, doit indiquer immédiatement au vétérinaire mandaté, ou dans les huit jours suivant le contrôle à France Galop, l'adresse du lieu où stationne réellement le cheval afin que le prélèvement biologique soit effectué le plus rapidement possible. Si l'adresse n'est pas communiquée dans le délai fixé ci-dessus, le cheval ne peut plus courir pendant les six mois qui suivent ce contrôle.
Si lors du contrôle suivant ce cheval est à nouveau absent du lieu dont l'adresse a été déclarée à France Galop ou au vétérinaire mandaté, les Commissaires de France Galop doivent, sauf cas de force majeure préalablement indiqué par le propriétaire ou son mandataire et admis à leur satisfaction, lui interdire de courir pour une durée de six mois au moins et de deux ans au plus.
En cas de nouvelle absence du cheval de l'établissement d'entraînement, les Commissaires de France Galop doivent infliger à l'entraîneur fautif une amende de 500 euros à 1.500 euros et peuvent également lui suspendre ou lui retirer les autorisations de faire courir et d'entraîner lui ayant été délivrées.
En cas de nouvelle récidive, les Commissaires de France Galop doivent interdire au cheval de courir pour une durée un an au moins et de deux ans au plus et doivent infliger à l'entraîneur fautif une amende de 1.500 euros à 15.000 euros, les autorisations de faire courir et d'entraîner pouvant, en outre, lui être suspendues ou retirées.
Le propriétaire s'expose aux mêmes sanctions s'il est jugé fautif de l'absence de son cheval lors des contrôles.
Toute manœuvre frauduleuse de la part d'un entraîneur, ou d'un propriétaire ou de la personne à qui celui-ci a confié son cheval pendant sa sortie provisoire de l'entraînement, tendant à soustraire le cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique, pourra être sanctionnée par le retrait des agréments et par une interdiction définitive pour le cheval de courir.

La personne complice d'une telle manœuvre s'expose aux mêmes sanctions.

IV. Prélèvements biologiques sur les chevaux déclarés partants. - Les Commissaires de France Galop et les Commissaires des Courses peuvent procéder ou faire procéder par une ou plusieurs personnes qualifiées de leur choix, avant ou après la course, à l'examen de tout cheval déclaré partant dans cette course et prendre telles mesures qu'ils jugent utiles, notamment faire effectuer et analyser des prélèvements biologiques de ses tissus, fluides corporels ou excrétions ou toute autre partie de son corps, dans les conditions prévues par le règlement particulier publié en annexe 5 et conformément à une instruction de la Fédération Nationale des Courses Françaises destinée aux vétérinaires chargés de ces opérations.

Les Commissaires des Courses, lorsqu'ils disposent des moyens nécessaires, doivent faire effectuer les prélèvements biologiques réglementaires sur tout cheval dont le comportement pendant la course ne leur a pas paru normal ou dont le propriétaire ou l'entraîneur le leur demande pour le même motif.

Dans tous les cas, l'entraîneur est tenu de présenter immédiatement son cheval au service chargé des prélèvements biologiques et d'assister aux opérations de prélèvement ou, à défaut, de se faire représenter dans les conditions prévues par le règlement particulier publié en annexe 5 du présent Code. S'il n'est ni présent, ni représenté, il ne pourra effectuer aucune réclamation sur la régularité des prélèvements.

V. Sanction de la non présentation ou du refus de présentation du cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique.

Cheval entraîné ou stationnant en France ou à l'étranger

Les Commissaires de France Galop doivent interdire de courir pour une durée de six mois au moins et de deux ans au plus au cheval déclaré à l'entraînement, que ce soit en France ou à l'étranger, que son entraîneur a refusé de soumettre aux prélèvements prescrits conformément aux § I et IV ci-dessus.

Les Commissaires de France Galop doivent infliger à l'entraîneur une amende de 1.200 euros au moins et de 15.000 euros au plus et peuvent suspendre ses agréments.

L'entraîneur est dans tous les cas tenu pour responsable du refus de son représentant et est passible, dans ce cas, de la sanction ci-dessus.

Cheval sorti provisoirement de l'entraînement

Les Commissaires de France Galop doivent interdire de courir pour une durée de six mois au moins et de deux ans au plus au cheval désigné pour être soumis à un prélèvement biologique pendant sa sortie provisoire de l'entraînement, que ce soit en France ou à l'étranger, si la personne à qui il est confié, ou son représentant, refuse de le mettre à la disposition du vétérinaire mandaté pour effectuer le prélèvement.

Si l'enquête établit que l'entraîneur ou le propriétaire est responsable de ce refus, les Commissaires de France Galop peuvent lui infliger une amende de 1.200 euros au moins et de 15.000 euros et suspendre ou retirer ses agréments.

Si la personne à qui est confié le cheval et qui a refusé que soit effectué le prélèvement est titulaire d'un agrément délivré par les Commissaires de France Galop, ceux-ci peuvent lui appliquer les sanctions ci-dessus.

Toute récidive pourra entraîner le retrait de l'autorisation de faire courir, d'entraîner et de monter, ainsi que l'exclusion des installations et des terrains d'entraînement placés sous l'autorité des Sociétés de courses.

Cheval déclaré partant

Les Commissaires de France Galop doivent interdire de courir pour une durée d'un an au moins et de deux ans au plus, au cheval désigné pour subir un prélèvement biologique, si son entraîneur, ou son représentant, refuse ou omet de le soumettre à ce prélèvement.

Ils doivent, s'il à couru, distancer le cheval de la course à l'occasion de laquelle le prélèvement a été refusé ou n'a pu être effectué.

Les Commissaires doivent en outre mettre l'entraîneur à l'amende de 1.200 euros au moins et de 15.000 euros au plus et peuvent suspendre ses agréments.

L'entraîneur est, dans tous les cas, tenu pour responsable du refus ou de l'omission de son représentant et, dans ce cas, est passible de la sanction ci-dessus.

Toute récidive peut entraîner le retrait de l'autorisation de faire courir, d'entraîner et de monter, ainsi que l'exclusion des installations et terrains d'entraînement placés sous l'autorité des Sociétés de Courses.

VI. Sanctions de la perturbation du cheval pendant l'opération de prélèvement. - Les Commissaires de France Galop peuvent mettre une amende de 800 euros au moins à 15.000 euros au plus et suspendre ou retirer ses agréments à l'entraîneur qui perturbe son cheval pendant l'opération de prélèvement. L'entraîneur est dans tous les cas tenu pour responsable du comportement de son représentant et, dans ce cas, est passible de la sanction ci-dessus.
Si la personne à qui est confié le cheval pendant sa sortie provisoire de l'entraînement, ou son représentant, que ce soit en France ou à l'étranger, le perturbe pendant l'opération du prélèvement, cette personne peut être sanctionnée par les Commissaires de France Galop si elle est titulaire d'un agrément ayant été délivré par ces derniers.
Si le prélèvement n'a pu être obtenu à la suite d'actes commis pour perturber le cheval pendant l'opération de prélèvement, les Commissaires de France Galop doivent interdire au cheval de courir pour une durée d'un an au moins et de deux ans au plus. Ils doivent, en outre, si le cheval a couru, le distancer de la course à l'occasion de laquelle le prélèvement n'a pu, pour cette raison, être effectué.
VII. Mesures applicables pour un cheval ayant des difficultés ou dans l'incapacité d'uriner. - Les Commissaires de France Galop ou les Commissaires des courses peuvent ordonner au vétérinaire de garder pendant tout le temps nécessaire le cheval ayant des difficultés à uriner.
VIII. Refus ou omission de la signature du procès-verbal de prélèvement. - L'entraîneur qui omet ou qui refuse de signer le procès-verbal de prélèvement, sans avoir mentionné sur celui-ci de raisons jugées valables pour ce refus, peut être sanctionné d'une amende de 150 euros et portée à 800 euros en cas de récidive. Il est dans tous les cas tenu pour responsable de l'omission ou du refus de son représentant et est passible de la sanction ci-dessus.
Le propriétaire encoure la même sanction s'il est établi qu'il est à l'origine du refus de la signature dudit document de la part de la personne à qui il a confié son cheval pendant la sortie provisoire de l'entraînement.
Cette personne s'expose à la mêmesanction si elle est titulaire d'un agrément délivré par les Commissaires de France Galop.

ART. 201

SANCTIONS DES PRÉLÈVEMENTS POSITIFS

I. Sanctions applicables au cheval.-

Présence dans le prélèvement biologique d'un stéroïde anabolisant, d'un facteur de croissance, d'une substance agissant sur l'érythropoïèse, d'un transporteur d'oxygène synthétique ou d'une substance ayant des propriétés analogues, ou preuve ou reconnaissance de l'administration d'une telle substance :

Si l'analyse du prélèvement biologique effectué sur :
- un cheval ayant été déclaré à l'entraînement en France, même si le prélèvement est effectué pendant sa sortie provisoire de l'entraînement,
- un cheval entraîné à l'étranger ayant été engagé dans une course régie par le présent Code, ou un cheval venant d'un autre pays qui est provisoirement stationné ou entraîné en France, même si le prélèvement est effectué pendant sa sortie provisoire de l'entraînement,
- un cheval déclaré partant, même s'il ne prend pas part à la course, fait apparaître la présence :
- d'un stéroïde anabolisant,
- d'un facteur de croissance,
- d'une substance agissant sur l'érythropoïèse,
- d'un transporteur d'oxygène synthétique,
- ou d'une substance ayant des propriétés analogues aux substances ci-dessus,

ou la présence d'un métabolite d'une des substances indiquées ci-dessus ou d'un isomère d'une telle substance ou d'un métabolite de cet isomère.
Les Commissaires de France Galop doivent ouvrir une enquête.
Les Commissaires de France Galop peuvent interdire au cheval de courir avant la fin de l'enquête et avant d'avoir statuer sur l'infraction.
A l'issue de l'enquête, ils doivent interdire à ce cheval de courir pour une durée de six mois au moins et de deux ans au plus, qui peut prendre effet à compter de la date de la première notification d'interdiction de courir du cheval faite au propriétaire, et, s'il a couru, le distancer de la course à l'occasion de laquelle a été effectué le prélèvement.

Les Commissaires de France Galop doivent prendre les mêmes mesures si un cheval, même en l'absence d'analyse révélant la présence d'une telle substance, a fait l'objet de son administration reconnue par son entraîneur ou par toute autre personne, ou a fait l'objet d'une telle administration dont la preuve est établie.

Présence d'une autre substance prohibée dans le prélèvement biologique et manipulations sanguines :

Si l'analyse du prélèvement biologique effectué sur ce cheval fait apparaître la présence d'une autre substance prohibée ou si l'enquête révèle une manipulation sanguine, les Commissaires de France Galop doivent ouvrir une enquête.

Les Commissaires de France Galop peuvent interdire au cheval de courir avant la fin de l'enquête, et tant qu'ils n'ont pas statué sur l'infraction.

A l'issue de l'enquête, ils doivent, si le cheval a couru, le distancer de la course à l'occasion de laquelle a été effectué ce prélèvement ou a été faite la manipulation sanguine, le distancement pouvant être prononcé avant la fin de l'enquête.

Ils peuvent à l'issue de l'enquête interdire au cheval de courir pour une durée déterminée ou le disqualifier.

II. Sanctions applicables à l'entraîneur du cheval déclaré partant ou à l'entraînement ou du cheval stationnant en France, dont l'analyse du prélèvement révèle la présence d'une substance prohibée ou ayant fait l'objet d'une manipulation sanguine.

Cheval déclaré partant

Les Commissaires de France Galop peuvent infliger une amende dont le montant ne peut excéder 15.000 euros à l'entraîneur du cheval déclaré partant, même s'il ne prend pas part à la course, dont l'analyse du prélèvement biologique fait apparaître la présence d'une substance prohibée telle que définie aux § I et II de l'article 198 du présent Code. Ils peuvent, en outre, suspendre ou retirer ses agréments.

Les Commissaires de France Galop peuvent prononcer les mêmes sanctions si l'entraîneur reconnaît avoir administré ou fait administrer une substance prohibée à l'un de ses chevaux déclarés partants ou est convaincu d'avoir effectuer ou fait effectuer une telle administration, même en l'absence d'analyse révélant la présence d'une substance prohibée.

L'entraîneur s'expose aux mêmes sanctions si lui ou son représentant reconnaît ou est convaincu d'avoir procédé à une manipulation sanguine.

Cheval entraîné en France ou à l'étranger, cheval stationnant en France :

Les Commissaires de France Galop peuvent prononcer les mêmes sanctions à l'encontre de l'entraîneur :

- du cheval déclaré à l'entraînement en France,
- du cheval entraîné à l'étranger ayant été engagé dans une course régie par le présent Code, ou du cheval venant d'un autre pays qui est provisoirement stationné ou entraîné en France, si l'analyse du prélèvement biologique effectué sur ce cheval révèle la présence :
- d'un stéroïde anabolisant,
- d'un facteur de croissance,
- d'une substance agissant sur l'érythropoïèse,
- d'un transporteur d'oxygène synthétique,
- ou d'une substance ayant des propriétés analogues aux substances ci-dessus.

Ils peuvent également appliquer ces sanctions à l'entraîneur ayant reconnu avoir administré ou fait administrer une telle substance ou qui est convaincu d'avoir pratiqué ou fait pratiquer une telle administration au cheval, même en absence d'analyse révélant la présence d'une telle substance.

L'entraîneur s'expose aux mêmes sanctions si lui ou son représentant reconnaît ou est convaincu d'avoir procédé à une manipulation sanguine.

Si l'analyse de ce prélèvement biologique révèle la présence d'une autre substance prohibée sans que l'entraîneur ne puisse justifier cette présence par l'administration de soins prescrits par une ordonnance, les Commissaires de France Galop peuvent infliger à l'intéressé une amende de 150 à 1.500 euros qui peut aller en cas de récidive jusqu'à la suspension des agréments de l'intéressé.

L'ordonnance doit être répertoriée dans un classeur qui doit être tenu à jour et être obligatoirement présenté lors du contrôle du vétérinaire mandaté pour effectuer les prélèvements.

Les Commissaires de France Galop peuvent également prononcer la même sanction à l'encontre de l'entraîneur qui ne tient pas à jour un classeur des ordonnances ou qui n'est pas en mesure ou refuse de le présenter à la personne mandatée par les Commissaires de France Galop pour effectuer le contrôle.

III. Sanctions applicables à la personne responsable du cheval sorti provisoirement de l'entraînement dont l'analyse du prélèvement révèle la présence d'une substance prohibée ou qui a fait l'objet d'une manipulation sanguine. - Selon les résultats de l'enquête, la responsabilité de la présence d'une substance prohibée dans le prélèvement biologique d'un cheval sorti provisoirement de l'entraînement pourra incomber à la personne à qui a été confié le cheval pendant cette sortie provisoire, à l'entraîneur ou éventuellement au propriétaire.

A moins que l'enquête n'établisse que la présence de la substance prohibée retrouvée dans le prélèvement biologique effectué sur un cheval sorti provisoirement de l'entraînement résulte d'une administration antérieure à cette sortie, les Commissaires de France Galop peuvent infliger une amende dont le montant ne peut excéder 15.000 euros et suspendre ou retirer ses agréments à la personne jugée responsable de l'infraction, si l'analyse du prélèvement biologique révèle la présence :

- d'un stéroïde anabolisant,
- d'un facteur de croissance,
- d'une substance agissant sur l'érythropoïèse,
- d'un transporteur d'oxygène synthétique,
- ou d'une substance ayant des propriétés analogues aux substances ci-dessus.

Ils peuvent appliquer ces sanctions à la personne ayant reconnu avoir administré ou fait administrer une telle substance ou qui est convaincu d'avoir pratiqué ou fait pratiquer une telle administration au cheval, même en absence d'analyse révélant la présence d'une telle substance.

Cette personne s'expose aux mêmes sanctions si elle reconnaît ou est convaincue d'avoir procédé ou fait procéder à une manipulation sanguine.

Si l'analyse des prélèvements biologiques révèle la présence d'une autre substance prohibée sans que cette présence puisse être justifiée par l'administration de soins prescrits par une ordonnance devant être présentée au vétérinaire mandaté au moment du contrôle, les Commissaires de France Galop peuvent mettre la personne responsable à l'amende de 150 à 800 euros. En cas de récidive, ils peuvent suspendre les agréments de l'intéressé.

IV. L'entraîneur du cheval peut, à la demande du propriétaire, accepter de conserver sa responsabilité sur le cheval pendant sa sortie provisoire de l'entraînement. L'entraîneur s'expose alors aux sanctions prévues en cas d'infraction aux dispositions des articles 198 et 200 du présent Code, commise pendant la sortie provisoire du cheval de l'entraînement.

Cette acceptation doit être transmise par écrit aux Commissaires de France Galop.

V. Les Commissaires de France Galop peuvent infliger une amende de 150 à 800 euros et, en cas de récidive, suspendre ses agréments ou lui interdire de faire courir un cheval dans les courses régies par le présent Code, à toute personne titulaire d'une autorisation d'entraîner qui enfreint les dispositions de l'annexe 15 du Code édictant le Code de pratique des traitements administrés aux chevaux à l'entraînement.

Ils peuvent exiger avant tout engagement du cheval concerné par l'infraction aux dispositions de l'annexe 15 du présent Code, un certificat vétérinaire attestant son aptitude à être entraîné et courir et interdire à ce cheval de courir en cas de récidive.

ANNEXE 5
RÈGLEMENT FIXANT LES CONDITIONS DANS LESQUELLES SONT EFFECTUÉS ET ANALYSÉS LES PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES PRÉVUS À L'ARTICLE 200
I - LES PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES

I.-1 les prélèvements biologiques sont effectués en application du Code des Courses au Galop.

Ils sont constitués par le prélèvement d'une quelconque partie du cheval ou d'un élément en contact avec une quelconque partie du cheval.

Il est notamment procédé à des prélèvements d'urine et à des prélèvements de sang. Le prélèvement de sang est effectué sur tout cheval n'ayant pas fourni suffisamment d'urine. Il peut être cependant effectué sur un cheval ayant fourni suffisamment d'urine.

Le prélèvement biologique est partagé en deux parties.

I-2. Les prélèvements peuvent être décidés par les Commissaires de France Galop ou par les Commissaires des Courses sur tout cheval déclaré partant, qu'il prenne part ou non à la course.
La décision est notifiée oralement à l'entraîneur concerné ou à son représentant.
Celui-ci doit alors emmener directement le cheval à l'endroit de l'hippodrome où a lieu le prélèvement.
Les prélèvements peuvent être en outre effectués sur décision des Commissaires de France Galop :
- sur tout cheval ayant été déclaré à l'entraînement en France même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement,
- sur tout cheval dont la déclaration de sortie définitive de l'entraînement a été annulée conformément aux dispositions du paragraphe V de l'article 32 du présent Code,
- sur tout cheval entraîné à l'étranger ayant été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, et sur un cheval venant d'un autre pays qui est provisoirement stationné ou entraîné en France.
Dans ces cas, l'entraîneur ou la personne à qui a été confié le cheval pendant sa sortie provisoire de l'entraînement, ou leur représentant, doit mettre immédiatement le cheval à la disposition du vétérinaire mandaté pour effectuer le prélèvement.
En sa qualité de gardien du cheval, il appartient à l'entraîneur ou à son représentant de surveiller et de protéger le cheval désigné comme il convient contre toute absorption ou administration avant que le prélèvement ne soit effectué.
Les opérations de prélèvements sont effectuées sous la responsabilité d'un vétérinaire agréé par la Fédération Nationale des Courses Françaises, assisté éventuellement par un ou plusieurs aides placés sous son autorité.
L'entraîneur ou le représentant qu'il a mandaté à cet effet, doit être présent pendant les opérations de prélèvement.
L'absence de l'entraîneur ou de son représentant à toute ou partie des opérations de prélèvement est réputée valoir acceptation expresse de sa part de la régularité des conditions dans lesquelles ont été effectuées ces opérations.
Pendant le prélèvement, le cheval doit pouvoir rester sous le contrôle visuel de l'entraîneur ou de son représentant, qui ne doit le perturber en aucune façon.
L'organisme représentant les entraîneurs, ou en cas de pluralité, l'organisme jugé le plus représentatif par France Galop, peut mandater sur les hippodromes un vétérinaire ou toute autre personne pour assister aux opérations de prélèvement et témoigner des conditions dans lesquelles celles-ci ont été effectuées.
Ce mandat doit être écrit et préalablement présenté aux Commissaires des Courses.
Lorsque les opérations du prélèvement sont terminées, le procès-verbal de prélèvement s'y rapportant est établi par le vétérinaire responsable des opérations de prélèvement ou par son aide et signé par le vétérinaire.
Il doit également porter la signature de l'entraîneur ou de son représentant et le cas échéant, la signature de la personne mandatée par l'organisme représentant les entraîneurs ou, en cas de pluralité, par l'organisme jugé le plus représentatif par France Galop.
L'entraîneur ou son représentant est dans l'obligation de signer le procès-verbal de prélèvement, qu'il ait ou non assisté aux opérations de prélèvement.
L'absence ou le refus de signature constitue une entrave aux opérations de prélèvement passible des sanctions prévues par le § IV de l'article 200 du présent code.
Dans ce cas les opérations de prélèvement sont toutefois réputées avoir été effectuées en toute régularité.
Le vétérinaire responsable des opérations de prélèvement adresse au Secrétariat de la Fédération Nationale des Courses Françaises, le procès-verbal de chaque prélèvement effectué.
Les prélèvements sont acheminés dans les meilleurs délais au laboratoire de la Fédération Nationale des Courses Françaises.

II. - L'ANALYSE DES PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES

Les analyses des prélèvements biologiques sont effectuées dans les conditions suivantes :
La première partie du prélèvement est analysée par le laboratoire d'analyses de la Fédération Nationale des Courses Françaises.

Lorsque ce laboratoire conclut à la présence d'une substance prohibée, la Fédération Nationale des Courses Françaises le signale aux Commissaires de France Galop et prévient l'organisme représentant les entraîneurs ou, en cas de pluralité, l'organisme jugé le plus représentatif par France Galop, pour que celui-ci désigne un des laboratoires inscrits sur la liste des laboratoires agréés par France Galop sur proposition de la Fédération Nationale des Courses Françaises, qui est publiée au Bulletin Officiel des Courses de la spécialité, afin que ce laboratoire procède à l'analyse de la deuxième partie du prélèvement.
Dès que cette analyse est commencée, l'anonymat est levé et France Galop informe l'entraîneur du cheval concerné du résultat de l'analyse de la première partie du prélèvement.
Exceptionnellement, pour certaines substances le nécessitant, l'organisme représentant les entraîneurs peut désigner le laboratoire de la Fédération Nationale des Courses Françaises pour effectuer également l'analyse de contrôle.
Dans ce cas, un expert désigné par l'organisme représentant les entraîneurs, sur une liste d'experts publiée au Bulletin Officiel des Courses de Galop et indépendant du laboratoire de la Fédération Nationale des Courses Françaises, assiste à l'analyse de contrôle pour le compte de celui-ci.
Dans le cas où ce laboratoire confirme la présence de la substance prohibée, il adresse un rapport d'analyse à la Fédération Nationale des Courses Françaises qui le transmet ensuite aux Commissaires de France Galop avec le rapport de l'analyse de la première partie du prélèvement et le procès-verbal du prélèvement correspondant.
A réception de ces documents, les Commissaires de France Galop engagent la procédure prévue par le présent Code.
Substances prohibées
Sont prohibées les substances suivantes :
· Substances susceptible d'agir à tout moment sur un ou plusieurs des systèmes corporels des mammifères, ci-après :
système nerveux
cardio-vasculaire
système respiratoire
système digestif
système urinaire
système reproducteur
système musculo squelettique
système hémolymphatique et la circulation sanguine
système immunitaire à l'exception des substances présentes dans les vaccins agréés pour la lutte contre les agents infectieux
système endocrinien
· Sécrétions endocrines et leurs homologues synthétiques
· Agents masquants
Seuils Internationaux définis par les analystes et les vétérinaires officiels et fixés par les Commissaires des Sociétés Mères.
Les substances présentes à des concentrations inférieures aux seuils ci-dessous ne donnent pas lieu à poursuite :
Acide salicylique - 750 microgrammes d'acide salicylique par millilitre dans l'urine ou
- 6,5 microgrammes d'acide salicylique par millilitre dans le plasma.
Arsenic - 0,3 microgramme d'arsenic total par millilitre dans l'urine.
Boldénone - 0,015 microgramme de boldénone sous formes libre et conjuguées par millilitre dans l'urine chez les mâles (à l'exception des hongres).
Diméthylsulfoxyde - 15 microgrammes de diméthythylsulfoxyde par millilitre dans l'urine ou
- 1 microgramme de diméthythylsulfoxyde par millilitre dans le plasma
Dioxyde de carbone - 36 millimoles de dioxyde de carbone disponible par litre dans le plasma.
Estranediol chez les mâles (à l'exception des hongres) - rapport des concentrations de masse des formes libres et conjuguées du 5_-estrane-3_, 17_-diol au 5(10)-estrene-3_, 17_-diol chez les mâles (à l'exception des hongres) égal à 1 dans l'urine.
Hydrocortisone - 1 microgramme d'hydrocortisone par millilitre dans l'urine

Méthoxytyramine - 4 microgrammes de 3-méthoxytyramine sous formes libre et conjuguées par millilitre dans l'urine.
Testostérone - 0,02 microgramme de testostérone par millilitre dans l'urine sous formes libre et conjuguées pour les hongres ou - 0,055 microgramme de testostérone sous formes libre et conjuguées par millilitre dans l'urine pour les pouliches et les juments (sauf si gestantes).
Théobromine - 2 microgrammes de théobromine par millilitre dans l'urine.
NOTA BENE : La substance conjuguée est la substance qui peut être libérée de ses formes conjuguées

ANNEXE 15
CODE DE PRATIQUE DES TRAITEMENTS ADMINISTRÉS AUX CHEVAUX A L'ENTRAÎNEMENT
Tous les traitements vétérinaires doivent être dispensés dans l'intérêt de la santé et du bien-être du cheval.
a) Chaque traitement doit être totalement justifié par l'état de santé du cheval qui le reçoit.
b) L'entraîneur doit demander conseil au vétérinaire ayant prescrit un traitement sur le niveau de travail approprié pendant la durée du traitement. Ces indications doivent être inscrites sur l'ordonnance.
c) L'entraînement des chevaux qui ne peuvent travailler du fait d'une blessure ou d'une maladie doit être suspendu et ils doivent recevoir les soins appropriés. Les soins vétérinaires ne peuvent être utilisés pour permettre d'entraîner les chevaux.
d) L'entraîneur doit tenir un registre où sont consignés tous les soins dispensés aux chevaux de son effectif et, pour chaque traitement vétérinaire, il doit être en possession d'une ordonnance vétérinaire.
e) Aucune substance autre que la nourriture normale ne peut être administrée par voie orale ou parentérale à un cheval le jour de la course, sauf cas de force majeure admis par les Commissaires de Courses, après avis du vétérinaire en service sur l'hippodrome.

REGLEMENT FFE des compétitions 2010

Art. 1.3 – Lutte contre le dopage
Les lois en vigueur définissent le dopage humain et animal.
Il est interdit d'administrer ou d'appliquer aux animaux, au cours des compétitions et manifestations sportives, des substances ou procédés de nature à modifier artificiellement leurs capacités ou à masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété.
La liste des substances ou procédés mentionnés au présent article est fixée par arrêté conjoint des ministres chargés des sports, de la santé et de l'agriculture en date du 21 novembre 1996 relatif aux substances et procédés mentionnés à l'article 1er, paragraphe II, de la loi n° 89-432 du 28 juin 1989 relative à la prévention et à la répression de l'usage des produits dopants à l'occasion des compétitions et manifestations sportives.
Les organisateurs de compétitions et les Officiels de compétition doivent prévenir les risques de dopage.
La FFE est compétente pour prendre toute disposition et sanction de lutte contre le dopage à l'encontre de ses licenciés, conformément à ses statuts et règlements intérieurs.
L'Agence Française de Lutte contre le Dopage diligente toute mesure de contrôle. Tous les organes, les agents et les licenciés de la FFE sont tenus de prêter leur concours à la mise en œuvre des enquêtes, contrôles, perquisitions et saisies organisés par l'AFLD selon le Code du Sport. Décret 2006-1629 du 18 décembre 2006.
Lors d'une opération de contrôle, à compter de la notification à l'intéressé et jusqu'aux opérations de prélèvement et de dépistage, la personne contrôlée doit être accompagnée dans tous ses déplacements par la personne chargée du contrôle ou par une escorte. Cette obligation ne concerne pas le dopage animal.
A - Procédure Club et Ponam
En compétition Club et Ponam, l'engageur est responsable en cas de dopage du poney / cheval.
Le concurrent et le propriétaire peuvent être associés à cette responsabilité.
B - Procédure Amateur et Pro
En compétition Amateur et Pro, le concurrent est le responsable en cas de dopage du poney / cheval.
Le propriétaire et l'engageur peuvent être associés à cette responsabilité.

Chap. 14. LUTTE CONTRE LE DOPAGE DES CONCURRENTS ET DES CHEVAUX

141. **Contrôle antidopage des concurrents**

La S.H.F. pourra à l'occasion des épreuves d'élevage faire effectuer des contrôles antidopage sur les concurrents à la demande et aux frais du Ministère charge des Sports.

Les modalités des opérations techniques de contrôle et d'analyse sont celles définies au Règlement General F.F.E.

142. **Contrôle antidopage des chevaux**

Les lois en vigueur définissent le dopage humain et animal.

Il est interdit d'administrer ou d'appliquer aux chevaux et poneys, au cours des compétitions et manifestations sportives, des substances ou procédés de nature à modifier artificiellement leurs capacités ou a masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété.

La liste des substances ou procédés mentionnes au présent article est fixée par arrêté conjoint des Ministres charges des sports, de la sante et de l'agriculture en date du 21 novembre 1996 relatif aux substances et procédés mentionnes a l'article 1er paragraphe II de la loi n° 89-432 du 28 juin 1989 relative a la prévention et a la répression de l'usage des produits dopants a l'occasion des compétitions et manifestations sportives.

Les organisateurs de compétitions et les techniciens habilités par la S.H.F. doivent prévenir des risques de dopage.

La S.H.F. est compétente pour prendre toute disposition et sanction de lutte contre le dopage conformément à ses statuts et règlement intérieur.

1421. **Conditions techniques du contrôle**

Pour le contrôle, il est procédé à des prélèvements d'urine et/ou de sang. Le prélèvement d'urine ne peut s'effectuer que par miction naturelle. Le prélèvement de sang s'effectue par ponction de la veine jugulaire. Sur présentation de leur ordre de mission la société organisatrice du concours doit mettre a la disposition des équipes de prélèvement tous moyens et assistance nécessaires a la réalisation de leur mission.

Dans chaque épreuve, le jury peut tirer au sort les chevaux a contrôler. En outre, le Président de la S.H.F., le Vétérinaire charge des contrôles ainsi que le Président du Jury ont la possibilité de désigner pour le contrôle antidopage tout jeune cheval qu'ils estiment nécessaire de faire contrôler.

Lorsqu'un contrôle supplémentaire est demande par le Président du Jury, les frais d'analyse de l'échantillon A sont a la charge de la société organisatrice.

Des lors que la personne responsable (au sens de l'article 124) aura été informée que son cheval a été désigné pour être contrôlé, celle-ci est tenue de faire conduire son cheval, muni de son document d'identification agréé par le Ministre charge de l'Agriculture, au lieu de prélèvement. Elle a le droit d'assister à toutes les opérations.

Si elle n'exerce pas ce droit, cela signifie qu'elle accepte les dispositions prises. Le refus de le laisser contrôler ou de laisser effectuer les prélèvements relevé des mêmes sanctions que celles prévues au chapitre 15.

Les modalités des opérations techniques de contrôle et d'analyse sont celles définies au Règlement General de la F.F.E.

1422. **Substances interdites**

Pour prendre part aux épreuves et a leur préparation, un cheval ne doit présenter dans ses tissus, fluides corporels ou excrétions aucune substance prohibée ou métabolite(s) de cette substance.

Une substance prohibée est une substance appartenant a l'une des catégories de substances figurant dans l'arrêté conjoint des Ministres charge des Sports, de la Sante et l'Agriculture publie au Bulletin de la S.H.F.

1423. **Analyse et analyse de contrôle**

Les prélèvements sont conditionnes en double : échantillons A et B.

Les analyses de contrôles doivent être réalisées dans un même laboratoire figurant sur la liste des laboratoires agréés à cet effet par les Ministres charges de l'Agriculture et des Sports.

Les échantillons A et B sont expédiés en même temps à ce laboratoire.

L'échantillon A sert à réaliser l'analyse. Le résultat de celle-ci doit être notifie a la S.H.F. dans les 24 heures suivant la fin des opérations.

Dans le cas ou l'échantillon A recèle une substance prohibée, la personne responsable est avertie officiellement par la S.H.F. par lettre recommandée avec accuse de réception, du résultat de l'analyse et de son droit de demander une analyse de contrôle en désignant un autre expert en toxicologie analytique figurant sur la liste fixée par Arrêté Ministériel.
S'il s'agit d'un concurrent mineur la notification en est faite a son représentant légal.
A réception de la notification, la personne responsable dispose d'un délai maximum de 5 jours pour designer a ses frais cet expert. En cas de refus ou de non-retrait de la notification, la personne responsable est réputée avoir renonce a son droit de faire procéder a une analyse de contrôle. Le résultat de cette analyse de contrôle effectuée dans le laboratoire ayant réalisé l'analyse est notifie a la S.H.F.

1424. **Commission vétérinaire d'interprétation**

Une commission vétérinaire d'interprétation des résultats des analyses et analyses de contrôle composée de trois vétérinaires, dont les noms sont publies par la S.H.F au Bulletin de la S.H.F., procédé à l'étude des résultats fournis par le laboratoire et a leur interprétation. Elle établit, dans les 10 jours à compter de sa saisine, un rapport écrit qu'elle adresse au Directeur de la S.H.F., charge de l'instruction qui au vu de celui-ci diligente la procédure prévue a l'article 1423.

1425. **Obligation en cas de traitement des chevaux en cours de compétitions**

En aucun cas un cheval auquel une substance prohibée a été administrée a l'occasion d'une compétition ne peut être autorise a poursuivre la compétition.
De plus, mention doit être notifiée au procès-verbal par le Président du Jury.

Substances prohibées et/ou métabolites mis en évidence en 2008 dans les courses de trot

Substances et/ou métabolites	Mode d'action	Nombre de détections
Bétaméthasone	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire	3
Boldénone	Anabolisant	1
Butorphanol	Analgésique morphinique	1 (entrainement)
Caféine et théobromine	Stimulant cardiaque et respiratoire	4 dont 1 en qualification
Caféine et théophylline	Stimulant cardiaque et respiratoire, vasodilatateur et diurétique	1
Caféine, théobromine et théophylline	Stimulant cardiaque et respiratoire, vasodilatateur et diurétique	15 dont 2 à l'entrainement et 1 en qualification
Caféine, théobromine et paraxanthine	Stimulant cardiaque et respiratoire	2
Dexaméthasone	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire	2
Dexaméthasone et bétaméthasone	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire	1
Dexaméthasone et kydrochlorothiazide	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire et diurétique	1
Dexaméthasone et triamcinolone acétonide	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire	1 (entrainement)
Dexaméthasone et trochlorméthiazide	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire et diurétique	1

Diclofenac	Anti-inflammatoire, antalgique, anti-pyrétique	1 (entrainement)
Etodolac	Anti-inflammatoire, analgésique	1
Flunixine et hydrochlorothiazide	Anti-inflammatoire, antalgique et diurétique	1
Ipratopium	Bronchodilatateur cholinergique	1
Kétoprofène	Anti-inflammatoire, antalgique , anti-pyrétique	2
Lidocaïne (métabolite)	Anesthésique local	1
Meloxicam	Anti-inflammatoire, analgésique	1
Naproxène	Anti-inflammatoire, analgésique	1 (qualification)
Oméprazole (métabolite)	Anti-ulcéreux	2
Oxazepam	Anxiolytique (benzodiazépine)	1
Salbutamol	Bronchodilatateur, anti-asthmatique	3
Salbutamol et prednisolone	Bronchodilatateur, glucocorticoïde, analgésique, anti-inflammatoire	1
Testostérone > seuil	Hormone androgène	1
Triamcinolone	Corticoïde général, anti-inflammatoire	2 dont 1 à l'entrainement
Triamcinolone acétonide	Corticoïde général, anti-inflammatoire	3 dont 1 à l'entrainement
PMSG et estrane-diol (gestation)	Pregnant Mare Serum Gonadotropin hormone (gestation)	1

Substances prohibées et/ou métabolites mis en évidence en 2008 dans les courses de galop

Substances et/ou métabolites	**Mode d'action**	**Nombre de détections**
Acépromazine	Tranquillisant	5
Azapérone	Sédatif	1
Bétaméthasone	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire	2
Caféine, théobromine et théophylline	Stimulant cardiaque et respiratoire, vasodilatateur et diurétique	2
Clenbutérol	Bronchodilatateur	1
Dantrolène	Myorelaxant	1
Dexaméthasone	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire	2
Dexaméthasone et ipratopium	Glucocorticoïde, anti-inflammatoire, bronchodilatateur cholinergique	1

DMSO > seuil	Anti-inflammatoire	1
Estrane Diol Boldenone	Stéroïde	1
Flunixine	Anti-inflammatoire, antalgique et anti-pyrétique	1
Flunixine et hydrochlorothiazide	Anti-inflammatoire, antalgique et diurétique	1
Hydrochlorothiazide	Diurétique	1
Hydroxymépivacaïne	Anesthésique local	1
Ipratopium	Bronchodilatateur cholinergique	2
Kétoprofène	Anti-inflammatoire, antalgique , anti-pyrétique	1
Morphine	Analgésique	1
Phénylbutazone oxyphon	Anti-inflammatoire, analgésique, anti-pyrétique	1
Romifidine	Sédatif	1
Salbutamol	Bronchodilatateur	3
Testostérone > 20ng/mL	Hormone androgène	1
Testostérone > 55ng/mL	Hormone androgène	2
Théophylline	Stimulant respiratoire	1
Triamcinolone	Corticoïde général, anti-inflammatoire	1
Triamcinolone acétonide et dexaméthasone	Corticoïde général, anti-inflammatoire, glucocorticoïde	1
Triamcinolone et méthylprednisolone	Corticoïde général, anti-inflammatoire, glucocorticoïde	1
Vedaprofene	Anti-inflammatoire, antalgique	1
Vedaprofene et flunixine	Anti-inflammatoire, antalgique, anti-pyrétique	1

Substances prohibées mises en évidence en 2008 dans les sports équestres

Substances	Mode d'action	Nombre de détections
Acépromazine	Tranquillisant	2
Altrenogest		1
Dexaméthasone	AIS	1
Flunixine + méthylaminoantipyrine	AINS	1
Meloxicam	AINS	1
Méthylprednisolone	AIS	1

Nimésulide (Nexem ND)		1
Phénylbutazone	AINS	8

Toulouse, 2010

NOM : GRALL Prénom : Morgane

TITRE : CONTROLE ANTIDOPAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE RECOMBINANTE EQUINE : APPROCHES DIRECTE ET INDIRECTES

RESUME :

La lutte antidopage prend une place de plus en plus importante dans le milieu des courses hippiques et des sports équestres. L'hormone de croissance recombinante équine étant classée dans les substances anabolisantes, son usage est formellement interdit chez les chevaux de course et de sport. Malheureusement les méthodes classiques de lutte antidopage sont inefficaces face aux situations de dopage par des hormones peptidiques. Notre étude a donc permis de mettre en place de nouvelles méthodes indirectes et directe utilisables respectivement pour le criblage ou la confirmation. L'analyse LC/MS/MS permet ainsi de distinguer l'hormone naturelle de l'hormone recombinante dans le plasma équin ce qui en fait la méthode de choix pour la confirmation tandis que le dosage des anticorps plasmatiques anti-reGH par ELISA est une méthode facilement utilisable pour l'étape de criblage. L'approche métabolomique semble prometteuse pour l'utilisation de matrices urinaires lors de l'étape de criblage mais des études supplémentaires seront nécessaires avant qu'elle puisse être utilisée en routine.

MOTS-CLES : dopage équin, lutte antidopage, hormone de croissance, hormone de croissance recombinante, chevaux.

ENGLISH TITLE: DOPING CONTROL OF RECOMBINANT EQUINE GROWTH HORMONE: DIRECT AND INDIRECT APPROACHES

ABSTRACT:

Doping control has got a permanent importance for racing horses and also sport horses. Recombinant equine growth hormone being classified as anabolic substance, its use is strictly prohibited in racing horses and sports horses. Unfortunately, regular methods of doping control are ineffective in situations of doping by peptide hormones. Our study was aimed to establish new direct and indirect methods used respectively for confirmation or screening. The LC/MS/MS analysis allowed to distinguish the natural hormone from the recombinant hormone in the equine plasma which makes the method usable for confirmation while the determination of serum antibodies anti-reGH by ELISA was shown to be a method easily usable at the screening stage. The metabolomic approach seems promising for the use of urinary matrix in screening step but further studies are needed before it can be used routinely.

KEYWORDS: equine doping, growth hormone, recombinant growth hormone, horses, doping control.