

Détection du dopage : challenges et perspectives

Michel Audran est Professeur émérite à l'Université de Montpellier, laboratoire de Biophysique, UFR de pharmacie, Université Montpellier-I.

Sports et activités physiques sont largement encouragés par les autorités sanitaires pour leurs bienfaits sur la santé et la qualité de vie. Le sport peut cependant présenter quelques aspects négatifs, dont le recours à l'usage de certaines substances ou méthodes qui permettent d'accroître artificiellement les capacités physiques et psychologiques. On parlera de « dopage » si et seulement si ces substances et/ou méthodes figurent sur la Liste des interdictions publiée chaque année par l'Agence Mondiale Antidopage (AMA).

Le dopage est contraire aux valeurs du sport. En outre, il met en danger la santé de

millions de jeunes athlètes dans le monde. Les contrôles antidopage constituent l'un des deux piliers, avec l'éducation, de la lutte antidopage.

1 Les contrôles antidopage : principe

Ces contrôles consistent à rechercher la présence de substances interdites et/ou de leurs métabolites ou marqueurs dans des échantillons biologiques (urine, plasma/sérum, goutte de sang séché) fournis par les sportifs et prélevés en compétition ou hors compétition.

Lors d'un prélèvement urinaire, l'urine est répartie dans deux flacons A et B ; lors d'un

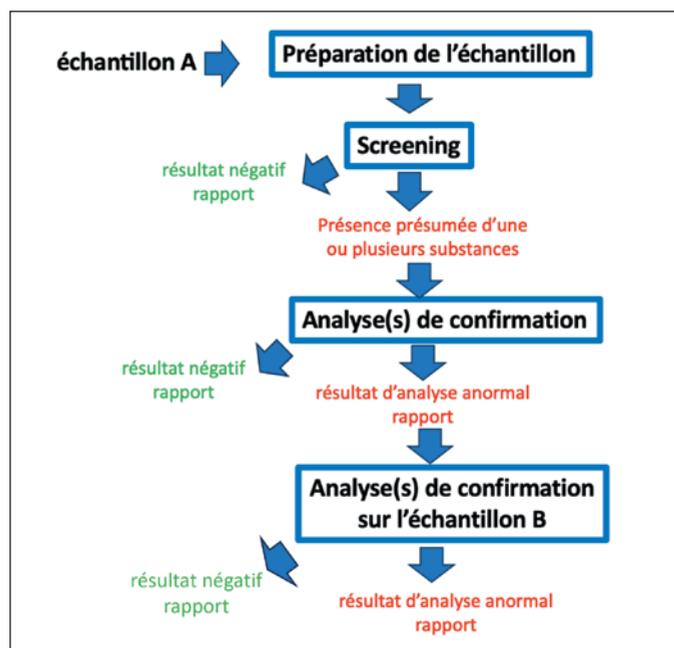


Figure 1

Déroulement des contrôles antidopage.

prélèvement sanguin, deux tubes A et B sont prélevés. Les échantillons, anonymisés (le laboratoire ne connaît jamais l'identité des personnes sur lesquelles les échantillons ont été prélevés), sont envoyés pour analyse, à un laboratoire antidopage. Il en existe une trentaine environ dans le monde. Ils possèdent une double accréditation :

- Accréditation ISO/IEC-17025, norme internationale qui garantit que le personnel, les instruments et les locaux sont aptes à la réalisation des analyses et que l'on peut avoir confiance dans les résultats rendus par le laboratoire.
- Accréditation AMA, plus contraignante, qui implique que le laboratoire travaille selon le « Standard International pour les Laboratoires » (SIL)

édité par l'AMA et dont les règles imposent entre autres un « niveau minimal de performances requises » et la participation au « programme d'évaluation externe de la qualité » de l'AMA. Ce dernier consiste en des tests en simple aveugle (le laboratoire sait que les échantillons sont envoyés par l'AMA) et en double aveugle (le laboratoire ne sait pas que les échantillons sont envoyés par l'AMA) tout au long de l'année.

Les contrôles sont effectués uniquement sur l'échantillon A, l'échantillon B étant réservé à une contre-expertise en cas de contestation de résultats positifs par l'athlète.

Les analyses sont réalisées en deux temps : une procédure d'analyse initiale ou *screening* destinée à rechercher la présence de l'ensemble des substances interdites, suivie d'une analyse de confirmation en cas de soupçons de présence d'une ou plusieurs de ces substances (Figure 1). Le laboratoire doit fournir des résultats analytiques avec une interprétation sans équivoque et éviter de faire de « faux positifs ».

Qu'il s'agisse du *screening* ou de l'analyse de confirmation, un contrôle se déroule en trois étapes : préparation de l'échantillon, dont le but est d'enlever un maximum de substances interférentes, d'extraire et (généralement) de concentrer l'échantillon ; séparation des divers composés contenus dans l'échantillon et, pour terminer, leur identification.

Une des difficultés des contrôles antidopage réside

dans le nombre et la variété des substances à détecter. La Liste des interdictions comporte environ 300 substances auxquelles il faut ajouter leurs métabolites, quelques composés non interdits mais ayant un métabolite commun avec des substances interdites et des substances permettant de s'assurer de la bonne conservation de l'urine, soit plus de 700 molécules au total. Ces composés sont des médicaments ou candidats médicaments, appartenant à des catégories aussi différentes que celles d'agents anabolisants, d'agents stimulant l'érythropoïèse, d'agents modifiant les activités de l'activine et de la myostatine, par exemple. Ces substances, qui vont des composés gazeux (le xénon) et inorganiques (le cobalt) et autres composés de faible masse moléculaire, aux molécules organiques protéiques de masse moléculaire élevée, possèdent des propriétés physicochimiques (polarité, propriétés acidobasiques) très diverses. Ces caractéristiques sont de grande importance dans la préparation de l'échantillon et la séparation et l'identification des composés.

Une deuxième difficulté est le faible volume d'échantillon, environ 45 ml, sur lequel le laboratoire doit travailler, sachant qu'une recherche d'érythropoïétine (EPO) et/ou de ses analogues, ou encore la confirmation de l'apport exogène de stéroïdes endogènes, peut nécessiter plus de 10 ml d'urine.

Le fait que ces analyses doivent être effectuées dans des temps relativement courts, en général 10 jours ouvrables,

parfois en 24 ou 48 heures lors de grandes compétitions, et à un coût raisonnable, constitue un challenge supplémentaire.

On comprend donc que le dépistage de ces substances ne peut pas être « optimisé » pour chacune d'entre elles et qu'il faut trouver des méthodes de préparation de l'échantillon, de séparation des composés et de leur identification, aussi génériques que possible, mais en respectant les minimums de performances requis par l'AMA.

L'apparition au début des années 2000, à côté du couplage chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), d'instruments couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), s'est révélée révolutionnaire pour le dépistage antidopage. Cette stratégie analytique a permis de développer et d'appliquer des méthodes de tests multi-analytes qui rendent possible la détection de plusieurs centaines de substances en une seule injection (plus de 200 par GC-MS/MS, plus de 500 par LC-MS/MS) et constituent environ 95 % des analyses. Les hormones de masse moléculaire élevée sont, quant à elles, recherchées par immunodosages ou par électrophorèse, et le dépistage du dopage génétique par PCR (*Figure 2*).

La Liste des interdictions évoluant chaque année, les laboratoires doivent régulièrement incorporer de nouvelles molécules dans leur recherche (*Figure 3*), si possible dans les protocoles existants. Cela implique des modifications

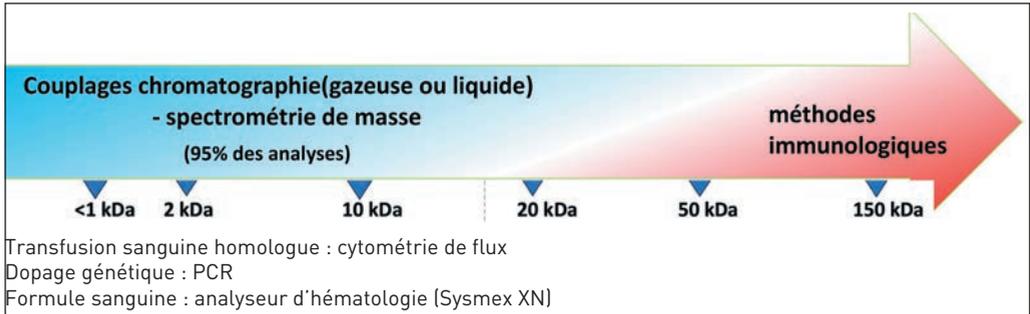


Figure 2

Méthodes analytiques pour les contrôles antidopage.

D'après *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 205 (2021).

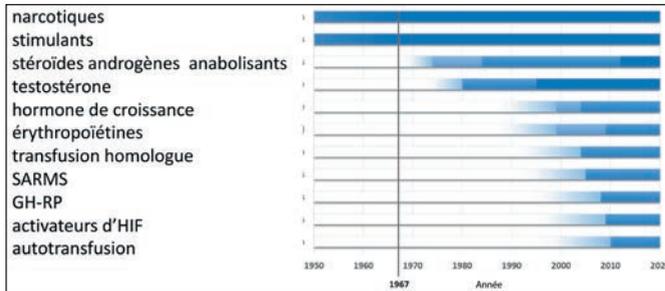


Figure 3

Bref aperçu de la mise en œuvre et du développement des méthodes de test antidopage pour certaines substances interdites et des méthodes de dopage.

régulières de ces protocoles et leur revalidation, ce qui constitue un challenge supplémentaire.

2 Les contrôles antidopage : limites

Malgré les efforts des analyses antidopage et l'augmentation continue de la sensibilité des techniques de détection, il existe encore des substances et des méthodes dopantes qui sont difficilement détectables par les tests antidopage :

- hormones peptidiques à demi-vie courte (desmopressine et

analogues et leurs facteurs de libération) ;

- stéroïdes androgènes anabolisants (SAA) endogènes administrés de façon exogène (type testostérone) ;

- protéines et peptides recombinants dont les structures moléculaires sont identiques aux endogènes (insuline, IGF-1) ;

- microdoses de tout ce qui précède ;

- transfusions sanguines autologues (également en association avec des microdoses d'agents stimulant l'érythropoïèse).

Il est possible de différencier stéroïdes endogènes et stéroïdes endogènes administrés de façon exogène grâce au couplage chromatographie gazeuse-combustion-spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-C-IRMS). Il existe en effet une différence de composition en ^{13}C entre ces deux classes de stéroïdes, les stéroïdes endogènes étant plus riches en ^{13}C , mais cette analyse est longue (2-3 jours) et nécessite un volume

conséquent d'urine ; elle est donc réservée à la confirmation. En outre, elle n'est pas applicable à l'insuline, l'IGF-1 ou encore l'AICAR.

Les analyses antidopage sont basées sur une approche ciblée, c'est-à-dire sur la recherche de substances dont on sait qu'elles sont utilisées dans le dopage. Elles ne permettent pas la détection de substances et/ou d'agents masquants encore inconnus, ni celle des « *designer drugs* », substances ressemblant à des composés connus, mais dont la structure a été volontairement légèrement modifiée pour échapper aux contrôles. Généralement, on apprend l'usage de ces substances par des saisies douanières, des dénonciations ou encore par une veille sur Internet.

3 Les contrôles antidopage : solutions actuelles

3.1. La spectrométrie de masse haute résolution

Pour tenter de pallier l'absence de détection de substances non ciblées, les laboratoires utilisent, pour le *screening*, des couplages chromatographie-spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS ; LC-HRMS). La HRMS offre une précision et une sensibilité inégalées, ce qui en fait un outil précieux pour les analyses complexes. Ces appareils permettent l'acquisition de données non ciblées qui sont stockées et peuvent être utilisées pour la détection rétrospective de substances inconnues au moment de l'analyse des échantillons.

3.2. La conservation des échantillons pendant une période de dix ans

Lors des grandes compétitions (Jeux olympiques, championnats du monde, grands tours cyclistes, etc.), les échantillons prélevés pour les contrôles antidopage sont conservés pendant dix ans. Les méthodes de détection étant constamment améliorées et actualisées, cette possibilité de stockage offre la possibilité de refaire des tests lorsque des informations sur de nouveaux agents dopants ou de nouvelles méthodes de détection sont disponibles. La nouvelle analyse des échantillons recueillis à Pékin 2008 et à Londres 2012 a, jusqu'à présent, permis de détecter plus de 130 violations des règles antidopage, ce qui souligne clairement l'efficacité d'un tel programme pour assurer une détection plus efficace tout en ayant un effet dissuasif.

3.3. Le passeport biologique (PBA) de l'athlète

Le PBA a été introduit pour compléter l'approche antidopage directe en apportant une preuve indirecte de l'utilisation possible de substances ou de méthodes interdites.

Son principe est basé sur le suivi au fil du temps de variables biologiques spécifiques (biomarqueurs) qui sont à la fois scientifiquement et légalement robustes, et qui indiquent l'utilisation d'une substance ou encore d'une méthode interdite. De la même manière que les

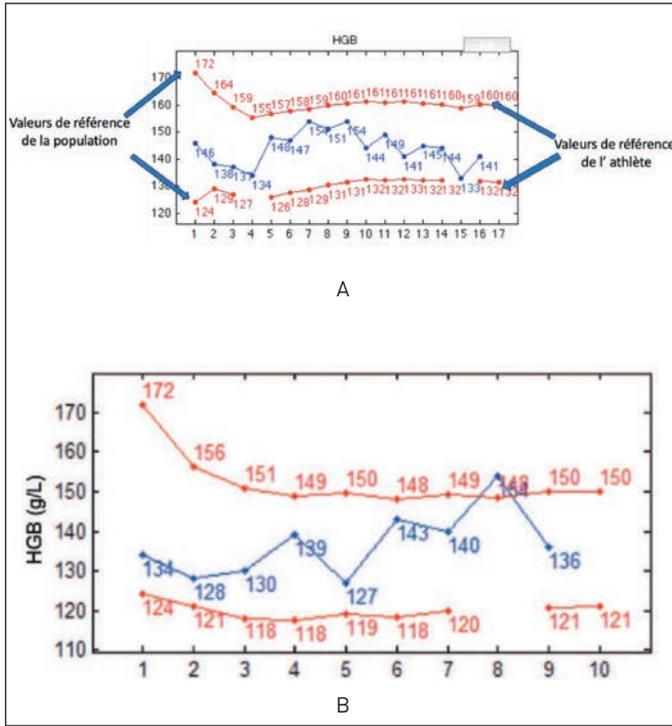


Figure 4

A. Visualisation de l'ajustement du domaine de valeurs normales de population, ici de l'hémoglobine, au domaine de valeurs normales de l'athlète.

B. L'échantillon 8, pourtant dans le domaine de valeurs normales de la population, semble anormal pour l'athlète et sera soumis à l'analyse d'un expert.

biomarqueurs d'une maladie visent à détecter son empreinte biologique, les biomarqueurs du dopage sont utilisés pour détecter l'empreinte biologique du dopage.

Le PBA et ses directives opérationnelles ont été mis en place par l'AMA en 2009. À cette date, il se composait uniquement du module hématologique. En 2014, le module stéroïdien a été incorporé pour surveiller les paramètres stéroïdiens. Le module endocrinologique, introduit en 2023, se concentre principalement sur

la surveillance des facteurs de croissance, tels que l'hormone de croissance (GH), le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) et les substances permettant la libération de la GH.

Chaque variable biologique possède une variabilité naturelle inhérente qui doit être distinguée des effets du dopage. Cette variabilité a une composante biologique et une composante analytique, la première étant éventuellement affectée par l'activité physique de l'athlète. L'enjeu clé de la détection indirecte du dopage est donc la distinction entre variabilité naturelle et variations provoquées par le dopage. Pour éliminer une grande partie de la variabilité biologique, les marqueurs indirects du dopage sont évalués de manière longitudinale et le sportif devient sa propre référence. Lorsqu'un premier échantillon est collecté, des seuils supérieurs et inférieurs sont déterminés avec des références moyennes basées sur la population. Ces limites individuelles sont ensuite adaptées progressivement en fonction des valeurs de chaque athlète, au fur et à mesure que des échantillons supplémentaires sont prélevés (Figure 4).

Le PBA a prouvé son efficacité, et pas seulement par son effet dissuasif, même si les matrices utilisées pour la surveillance longitudinale (urine et sang) sont soumises à de nombreux facteurs confondants intrinsèques (par exemple génétiques) et extrinsèques (conditions environnementales).

4 Les contrôles antidopage : les perspectives

4.1. Anticiper le détournement de nouvelles substances

Les études sur le protéome et le peptidome humain ont ouvert de nouvelles options thérapeutiques. Le développement d'anticorps monoclonaux, de protéines thérapeutiques et de médicaments peptidiques a fait de grands progrès au cours de la dernière décennie grâce aux nouvelles technologies de production. Une grande variété de peptides naturels et modifiés, couvrant de multiples domaines thérapeutiques, a été obtenue. Les thérapies protéiques/peptides approuvées et expérimentales comprennent plusieurs candidats médicaments dotés de propriétés pouvant potentiellement améliorer les performances sportives. Les laboratoires doivent assurer une veille scientifique de façon à repérer ces candidats médicaments susceptibles d'être détournés de leur usage thérapeutique à des fins de dopage et mettre en place des tests permettant leur dépistage. L'AMA a su sensibiliser l'industrie pharmaceutique à ce problème de détournement de substances et, bien souvent, les laboratoires peuvent avoir accès à ces nouvelles molécules encore en étude préclinique, et mettre au point des tests de dépistage avant leur mise sur le marché. Un bon exemple est celui des modulateurs des récepteurs aux androgènes (SARMs), substances anabolisantes dont aucune n'a à ce jour obtenu

d'autorisation de mise sur le marché, mais qui sont régulièrement détectées lors des contrôles antidopage.

4.2. Améliorer la détection par le dépistage ciblé

Cette amélioration peut se faire par une meilleure connaissance du métabolisme des substances. La découverte de métabolites en très faible concentration, mais demeurant plus longtemps dans l'organisme (métabolites long terme), a permis ces dernières années d'augmenter la fenêtre de détection de certains SAA, la faisant passer de quelques jours à une ou plusieurs semaines, selon la substance.

L'amélioration de la sensibilité et de la spécificité des analyses reste un objectif majeur des laboratoires antidopage. L'utilisation d'anciennes méthodes améliorées pourrait permettre d'accroître la sensibilité et la spécificité de la détection, par exemple :

- la chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (SCF-MS/MS) ;
- ou de nouvelles méthodes telles que le couplage chromatographie liquide – mobilité ionique – à la spectrométrie de masse haute résolution masse précise (LC-IM-HRAM/MS), au pouvoir de résolution élevé et qui permet la détection d'analyses à de faibles concentrations et l'identification précise des composants, même s'ils ont une masse moléculaire similaire.

Cependant, l'augmentation de la sensibilité analytique

conduit aussi à l'augmentation de la mise en évidence de dopages par inadvertance à l'instar des contaminations par les aliments (Clenbutérol et autres promoteurs de croissance dans les viandes, Clomifène dans les œufs, Higénamine dans certaines plantes) ou encore par contact par la peau (SAA), la salive (SAA), la cocaïne ou le liquide séminal (SAA, anti-œstrogènes).

4.3. Développer des méthodes analytiques

Le développement de méthodes analytiques permet en effet de répondre à un large éventail de substances sans limiter l'objectif à l'avance (analyses non ciblées).

La méthode de dépistage ciblé actuellement utilisée dans le contrôle du dopage nécessite des modifications fréquentes (ajout de substances supplémentaires à la liste, nouveaux

métabolites) et de posséder une référence pour mettre en place le *screening*. Des méthodes non ciblées qui permettent d'identifier toutes les substances d'une même famille – par exemple, rechercher la présence de SAA en mesurant l'activité androgénique d'un échantillon – ont été proposées. La possibilité d'identifier toutes les substances présentes dans un échantillon, y compris celles dont on ne soupçonne même pas l'existence, est l'objectif à atteindre : l'évolution récente de la spectrographie de masse à haute résolution et la mise au point d'algorithmes d'analyse des données de masse pourraient constituer une avancée significative dans ce domaine.

4.4. Les méthodes « omiques »

Les substances médicamenteuses agissent sur nos gènes, nos protéines, et l'ensemble de notre métabolisme ou métabolome¹ (Figure 5).

Les effets de ces actions – activation ou répression du fonctionnement des gènes, augmentation ou diminution de la production de certaines protéines, ou de certains métabolites – peuvent être étudiés respectivement par la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique.

Leur usage, et plus particulièrement celui de la métabolomique, a suscité beaucoup d'espoir quant à la découverte

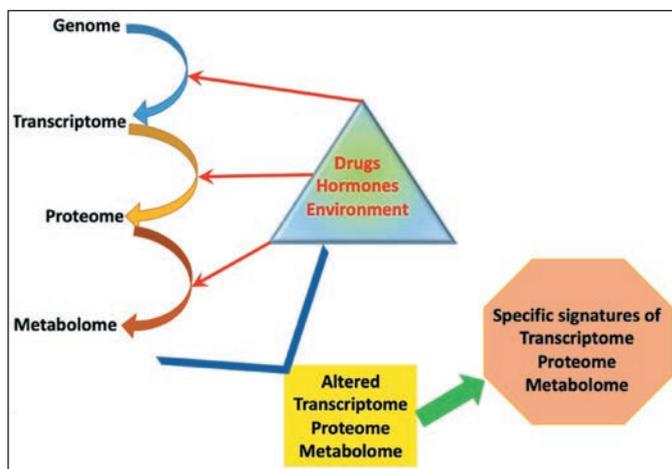


Figure 5

Les méthodes « omiques » (d'après Current Pharmaceutical Analysis, 2018, vol. 14, n° 3).

1. Ensemble de petites molécules telles que acides aminés, sucres, acides gras, triglycérides, hormones, vitamines...

de nouveaux biomarqueurs du dopage, mais ces méthodes manquent encore de spécificité pour différencier les effets produits par le recours à des substances/méthodes dopantes de ceux dus à d'autres causes, notamment environnementales (mode et lieu de vie, alimentation, exercice physique...).

4.5. Le dopage génétique

Le dopage génétique fait référence à l'utilisation de techniques de génie génétique pour améliorer les performances sportives. Il existe plusieurs méthodes, et plusieurs types de dopage génétique, chacune présentant ses propres avantages et inconvénients :

- La thérapie génique implique l'introduction d'une copie saine d'un gène dans les cellules d'une personne.
- La modification épigénétique implique de modifier la façon dont les gènes sont exprimés sans changer la séquence d'ADN réelle. Par exemple, en modifiant les étiquettes chimiques (telles que les groupes méthyle) attachées à l'ADN, il serait possible d'activer ou de désactiver des gènes, ce qui peut affecter les performances sportives.
- L'édition génétique implique l'utilisation d'outils moléculaires tels que CRISPR/Cas9 pour modifier avec précision la séquence d'ADN d'un organisme. L'édition génétique pourrait être utilisée pour améliorer les performances sportives en introduisant des mutations bénéfiques ou en supprimant celles qui sont nuisibles.

Les cibles du dopage génétique sont les gènes qui régulent la performance sportive ou l'apparence physique. Ceux-ci incluent des gènes qui contrôlent la croissance musculaire (ex. : hormone de croissance, IGF-1, FST, MSTN), le métabolisme de l'oxygène et l'endurance (ex. : EPO, VEGF). Le dopage génétique vise à introduire ou à modifier ces gènes cibles pour améliorer les performances sportives au-delà des limites normales. Le transfert de séquences d'ADN transgénique peut être réalisé à l'aide de diverses stratégies, notamment l'utilisation de systèmes de vecteurs viraux recombinants (tels que les systèmes adénoviraux ou viraux adénoassociés, AAV) ou de vecteurs non viraux (tels que les plasmides bactériens ou les ADN en minicercle). Bien que les vecteurs viraux restent les systèmes de vecteurs de thérapie génique les plus couramment utilisés en raison de leur efficacité de transduction plus élevée et de leur expression plus stable, les plasmides, dont la « construction » est plus simple, sont toujours utilisés dans un nombre important d'essais cliniques de thérapie génique, et les thérapies géniques basées sur les plasmides sont déjà entrées sur le marché pharmaceutique. L'application pratique de la thérapie génique dans le sport devient un scénario de plus en plus probable. Fin 2003, deux produits à base de plasmides supposés contenir l'un des gènes d'EPO, l'autre des gènes d'IGF-1, et destinés à être injectés par voie intramusculaire, ont été trouvés sur Internet. Des tests

de dépistage faisant appel à la technologie PCR existent déjà, mais les laboratoires antidopage travaillent à leur amélioration : augmentation de la sensibilité, détection simultanée de plusieurs gènes en une seule analyse, réduction du temps d'analyse.

4.6. L'intelligence artificielle (IA)

Les tests de dopage génèrent de grandes quantités de données : par exemple, les échantillons de sang et d'urine prélevés en compétition et hors compétition sur de longues périodes et analysés dans des laboratoires à la recherche de traces de substances interdites

ou de méthodes d'entraînement illégales. D'autres informations relatives aux athlètes sont également recueillies : les contrôles antidopage pouvant avoir lieu n'importe où et à tout moment, les sportifs sont tenus de communiquer les informations de leur localisation, ce qui permet de situer l'athlète pour des contrôles hors compétition. Toutes ces données pourraient être introduites dans les systèmes d'IA pré-entraînés pour vérifier les signes de manipulation et cibler les tricheurs.

Malheureusement, l'IA pourrait aussi contribuer à la création de substances dopantes indétectables telles que les « *designers drugs* ».

Conclusion

Les avancées majeures dans les connaissances sur le métabolisme des médicaments, les améliorations de l'instrumentation analytique, les analyses rétrospectives, la mise en place du passeport biologique de l'athlète ont considérablement limité les possibilités d'usage de substances et de méthodes de dopage. Néanmoins, il existe toujours des substances et des méthodes qui ne sont pas ou sont difficilement détectables et, davantage que le dopage génétique, le nombre croissant de nouveaux composés et candidats médicaments susceptibles de présenter des propriétés ergogéniques et la production d'hormones et de peptides identiques aux composés endogènes continuent de représenter un défi pour les laboratoires de dépistage du dopage.

BIBLIOGRAPHIE POUR APPROFONDIR

Rabin, O., Corazza, O. (eds). *Emerging Drugs in Sport*, Springer, 2022.

Lu, Y., Yan, J., Ou, G., Fu, L. A Review of Recent Progress in Drug Doping and Gene Doping Control Analysis. *Molecules*. 2023; 28: 5483.

<https://doi.org/10.3390/molecules28145483>

Thomas, A., Thevis, M. Recent advances in mass spectrometry for the detection of doping. *Expert Review of Proteomics*. 2024.

<https://doi.org/10.1080/14789450.2024.2305432>

Thevis, M., Walpurgis, K., Thomas, A. Analytical Approaches in Human Sports Drug Testing: Recent Advances, Challenges, and Solutions. *Anal Chem*. 2020 Jan 7;92(1):506-523. doi: 10.1021/acs.analchem.9b04639.2020 jan 7;92(1)

Thevis, M. Sports Drug Testing. Section Editor: Mario Thevis. https://fis-db.dshs-koeln.de/ws/portalfiles/portal/14210476/Chapter_4.pdf

Le passeport biologique de l'athlète. *L'actualité chimique*, n° 492, février 2024.

Varlet, E., Audran, M. Sport et dopage. *Revue francophone des laboratoires*, vol. 2022, n° 547, décembre 2022.

Liste des Interdictions : <http://wada-ama.org>