

N° 492 - FÉVRIER 2024

l'actualité chimique

LE JOURNAL DE LA SOCIÉTÉ CHIMIQUE DE FRANCE

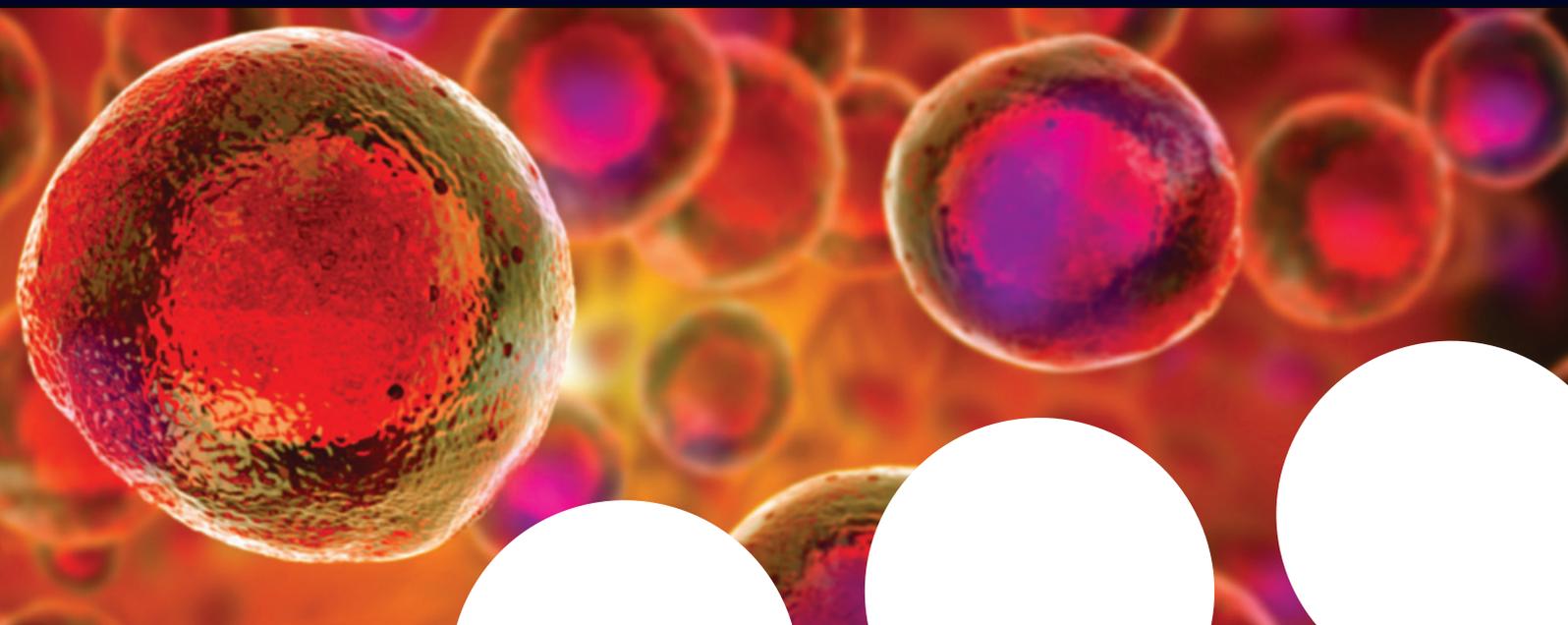


**SPORT
ET DOPAGE**

..... À PROPOS
..... DE XYLÈNES

..... BIOPILES
..... ENZYMATIQUES

Your research is important and needs to be shared with the world



Benefit from the Chemistry Europe Open Access Advantage

- Articles published open access have higher readership
- Articles are cited more often than comparable subscription-based articles
- All articles freely available to read, download and share.

Submit your paper today.



www.chemistry-europe.org

l'actualité chimique

Édité par la Société Chimique de France

250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris

Tél. 01 40 46 71 60 – scf@societechimiquedefrance.fr

www.societechimiquedefrance.fr

Directeur de la publication : Stanislas Pommeret

Partenariats : CNRS, Fondation de la Maison de la Chimie

RÉDACTION

SCF, 28 rue Saint-Dominique, 75007 Paris

Tél. : 01 40 46 71 67 – redaction@lactualitechimique.org

www.lactualitechimique.org

Rédactrice en chef : Patricia Pineau

Rédacteur en chef adjoint : Malik Agina

COMITÉ DE RÉDACTION

J. Barrault, X. Bataille, C. Bresson, K. Cariou, P. Colombar, K. Fajerberg, D. Fauque, J.-P. Foulon, J. Fournier, J.-F. Gérard, E. Gras, N. Griffete, C. Houée-Levin, J. Lalande, F. Launay, J. Livage, E. Marceau, V. Marvaud, R. Messal, P. Moisy, C. Monneret, X. Montagne, N. Moreau, J.-M. Paris, P. Pichat, A.-V. Ruzette, S. Tencé, H. This, H. Toulhoat, P. Walter, S. Younes

Publication analysée ou indexée par :

Chemical Abstracts, base de données PASCAL

ABONNEMENT

SCF, Martine Maman

250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris

Tél. : 01 40 46 71 60/66

abonnement@lactualitechimique.org

FABRICATION

MAQUETTE : Redouane Sahih, sahih.redouane@gmail.com

Mag Design, www.magdesign.fr, mag.design@me.com

IMPRESSION, ROUTAGE : N. Fortin & ses fils imprimeurs

94800 Villejuif, fortimprimerie@wanadoo.fr

PUBLICITÉ

FFE, 15 rue des Sablons, 75116 Paris

Tél. : 01 53 36 20 40 – www.ffe.fr

aurelie.vuillemin@ffe.fr

ISSN version papier 0151 9093

ISSN version électronique 2105 2409

© SCF 2024 – Tous droits de reproduction réservés

Dépôt légal : février 2024

Toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, fait sans le consentement de l'auteur, ou des ayants droits, ou ayant cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal. La loi du 11 mars 1957 n'autorise, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, que les copies et les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective d'une part, et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple ou d'illustration.



Société Chimique de France



Fondation de la Maison de la Chimie



La chimie et les JO

La Rédaction de *L'Actualité Chimique* a relevé un défi : être dans l'actualité des Jeux olympiques et paralympiques à Paris avec le concours et les connaissances de nombreux chimistes.

Un thème était évident, « le dopage », mais nous voulions rester dans la science et vous faire découvrir les avancées dans le domaine des substances et des performances des sportifs : hommes, femmes et animaux.

Le défi de la performance

Pendant les Jeux, les records battus et la moisson des médailles enrichissent les sponsors, les médias, mais aussi les sportifs, au prix de blessures ou souffrances.

La performance est en quelque sorte une récompense et nos auteurs vous révèlent toutes les avancées du dopage et les mises en garde.

En lisant les articles, laissez-vous aller à l'histoire et à la découverte des sportifs de haut niveau.

À l'origine des mots

La rubrique « étymologie » est toujours une source de surprises. Après en avoir lu ce mois-ci l'introduction, vous allez sans doute vous dire à la fin :

« Voilà pourquoi les préfixes habituels *ortho*, *méta*, *para*, des xylènes par exemple, ne s'appliquent pas aux isomères des acides phtaliques, nommés usuellement *phtalique*, *isophtalique* et *téréphtalique* ».

La chimie nous joue des tours, mais nous l'aimons ; une raison de lire « le point sur » les biopiles enzymatiques qui soulève lui aussi une interrogation : utopie ou réalité ?

Bonne lecture !

Patricia Pineau
Rédactrice en chef

ÉDITORIAL

La chimie et les JO, par **P. Pineau**

1

CLIN D'ŒIL ÉTYMOLOGIQUE

À propos de xylènes, par **P. Avenas**

3

SPORT ET DOPAGE

5-42

Coordinateur : Patrick Arpino

Le dépistage : une éternelle lutte entre la lance et le bouclier, par **P. Arpino**

5

L'activité du Laboratoire antidopage français (LADF), par **A. Marchand**

6

Le Passeport biologique de l'athlète, par **E. Varlet** et **M. Audran**

7

Le pouvoir discriminant de l'analyse des cheveux, par **P. Kintz**

12

Le cannabidiol (CBD) est-il un produit dopant ?, par **L. Gheddar** et **P. Kintz**

16

Émergence des bio-thérapeutiques et implications pour le bien-être animal et le contrôle antidopage équin, par **J. Pinêtre, V. Delcourt, F. Becher, B. Chabot, A. Barnabé, F. Fenaille, M.-A. Popot, P. Garcia** et **L. Bailly-Chouriberry**

19

La détection du dopage à l'hormone de croissance : vers le module endocrinien, par **A. Marchand, C. Mongongu, C. Buisson** et **M. Ericsson**

22

The use of dried blood spots in antidoping: advantages and limitations, par **O. Salamin** et **M. Saugy**

29

Recent advances in peptide analysis by LC-MS for doping controls, par **A. Thomas, F. Leipp** et **M. Thevis**

35

Drugs on the edge of performance enhancement, par **O. Catlin** et **K. Jędrejko**

37

RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT

43

Principes et substances actifs

Nouveaux principes actifs pharmaceutiques et actualités des substances actives phytopharmaceutiques, par **J. Fournier** et **J.-M. Paris**

43

EN BREF

45

LIVRES ET MÉDIAS

51

AGENDA

52

ACTUALITÉS DE LA SCF

53

UN POINT SUR

55

Fiche n° 112 : Applications industrielles des biopiles enzymatiques : utopie ou réalité ?, par **F. Giroud, S. Cosnier, J. Hammond** et **M. Berthuel**

55



Couverture :

© Fondos7.Net.

Conception graphique : Magali Serdel.

À propos de xylènes

Le mot *xylène* provient du nom du bois en grec, *xulon*, pour une raison historique.

Une série aromatique tirée du bois

Le chimiste français Cahours publie en 1850 ses *Recherches sur les huiles légères obtenues dans la distillation du bois*, traitant de différents produits aromatiques obtenus à des températures croissantes.

• « Le produit qui bout entre 108 et 110 degrés est le toluène (benzoène de Deville) $C^{14}H^8$. »

Ici, Cahours est sans doute le premier à employer le mot *toluène*, formé sur le nom du baume de Tolu comme Berzelius l'avait suggéré (cf. *L'Act. Chim.* n° 483, avril 2023). D'autre part, la notation ancienne $C^{14}H^8$ tient compte d'une masse atomique du carbone égale à 6 qui, après hésitation entre 6 et 12, a été fixée à 12 à partir de 1860 : la formule actuelle du toluène est donc C_7H_8 .

• « Le produit qui bout entre 128 et 130 degrés présente de grandes analogies de propriétés avec le toluène, il n'en diffère, au point de vue de la composition, qu'en ce qu'il renferme en plus C^2H^2 [soit CH_2]; c'est donc un homologue de ce corps. »

Ce propos tient compte de la notion de *série homologue*, définie en 1848 par le chimiste français Gerhardt : des composés ne différant les uns des autres que par le nombre de groupes $-CH_2$ présents dans leur structure. Cahours arrive donc à un corps de structure C_8H_{10} , qu'il désigne « sous le nom de xylène ».

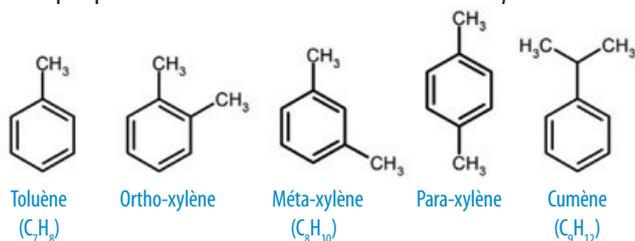
• « Le liquide qui bout à 148 degrés présente la composition et tous les caractères du cumène, $C^{18}H^{12}$ [soit C_9H_{12}]. »

Cahours retrouve ainsi la substance tirée du cumin et qu'il nommait *cumène* dans une publication commune avec Gerhardt de 1841.

En résumé, Cahours a décrit l'obtention de toluène, de xylène et de cumène par distillation du bois. Il confirmait ainsi les noms *toluène* et *cumène*, et il créait le nom *xylène*.

Puis les travaux menés par le chimiste allemand Fittig permettront d'établir les formules développées de ces molécules. En premier lieu, Tollens et Fittig montrent en 1864 que le xylène est un di-méthylbenzène, et non pas son isomère l'éthylbenzène (C_8H_{10}), alors étudié par Berthelot. À ce propos, selon la définition de Gerhardt, c'est l'éthylbenzène qui est vraiment homologue du toluène, et non pas le xylène.

Ensuite, Fittig et ses collaborateurs parviendront à distinguer les trois isomères *ortho*, *méta* et *para*-xylène, avec les trois préfixes grecs employés pour la première fois par le chimiste allemand Körner, assistant de Kekulé, dans une publication de 1866 à propos du « *biiodobenzène* » et du « *iodophénol* ».

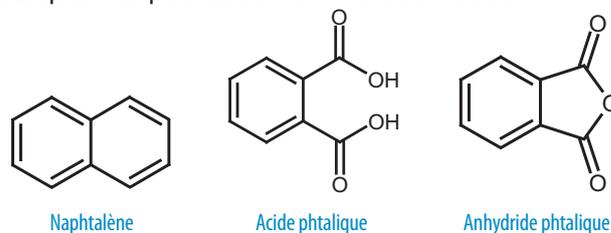


Les préfixes grecs *ortho*, *méta*, *para*

Le préfixe *ortho*- vient de l'adjectif grec *orthos*, d'abord « dressé, droit, direct » (cf. *orthogonal*), puis « juste, sincère » (cf. *orthographe*). Le préfixe *meta*- vient de l'adverbe *meta*, d'abord « au milieu, parmi », puis « à la suite » (cf. *métathèse* et *métamère* en chimie, ou la *métaphysique*). Enfin le préfixe *para*- vient de l'adverbe *para*, d'abord « à côté de, le long de » (cf. *parallèle*), d'où aussi « opposé à » (cf. *paranormal*), mais sans rapport avec l'autre préfixe *para*-, de l'italien *parare*, « parer » (comme *parapluie*, par exemple). On comprend ainsi que dans un benzène di-substitué, la place du substituant 2 peut être directe (*ortho*), médiane (*méta*) ou opposée (*para*) par rapport à celle du substituant 1.

Les acides phtaliques

En dehors des usages comme solvant, les xylènes servent surtout à la production d'acide et anhydride phtalique, qui cependant ont été découverts bien avant le xylène par le chimiste français Laurent. Celui-ci, travaillant en 1835 sur le naphthalène, a obtenu l'acide qu'il a nommé d'abord *naphthalique* puis, en 1842, *phtalique*. La structure bicyclique du naphthalène ne sera établie qu'en 1869 et on comprendra alors que l'acide obtenu par Laurent ne pouvait être que l'isomère *ortho*, le seul dont peut dériver l'anhydride phtalique. Cela explique l'usage resté actuel du terme *acide phtalique* spécifiquement pour l'isomère *ortho* de cet acide.



En 1846, le chimiste français Caillot nomme *acide téréphtalique* l'isomère *para* obtenu en distillant l'essence de térébenthine (cf. *L'Act. Chim.* n° 393-394, février 2015).

Enfin, en 1868, l'isomère *méta* est nommé *acide isophtalique*, comme isomère des acides phtalique et téréphtalique.

Épilogue

Voilà pourquoi les préfixes habituels *ortho*, *méta*, *para* des xylènes – par exemple – ne s'appliquent pas aux isomères des acides phtaliques, nommés usuellement *phtalique*, *isophtalique* et *téréphtalique*.

Pierre AVENAS,
ex directeur de la R & D dans l'industrie chimique.
pier.avenas@orange.fr

"Made in Europe for the World" Oui, avec vos contributions !

Analytical and Bioanalytical Chemistry



L'Actualité Chimique



Société Chimique de France

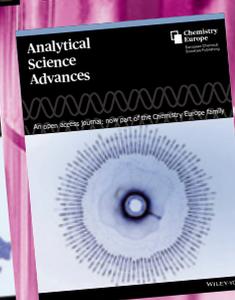
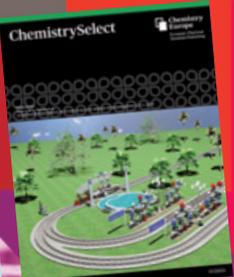
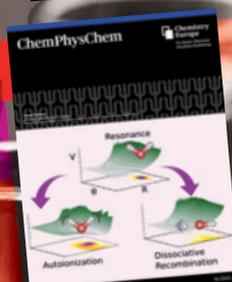
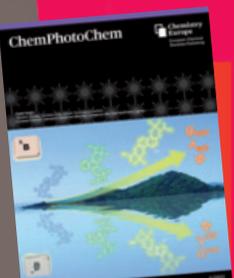
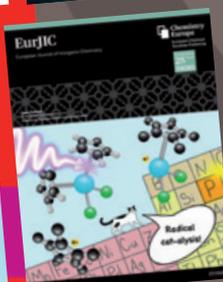
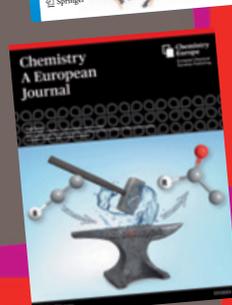
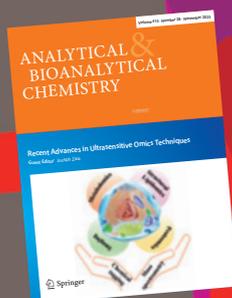
Les journaux de Chemistry Europe*

*Chemistry Europe regroupe 16 sociétés de chimie européennes, dont la SCF

- Chemistry - A European Journal
- European Journal of Inorganic Chemistry (EurJIC)
- European Journal of Organic Chemistry (EurJOC)
- Analysis & Sensing
- Analytical Sciences Advances (ANSA)
- Batteries & Supercaps
- Chemistry Europe
- ChemBioChem
- ChemCatChem
- ChemElectroChem
- ChemMedChem
- ChemPhotoChem
- ChemPhysChem
- ChemPlusChem
- Electrochemical Science Advances (ELSA)
- ChemSusChem
- ChemSystemsChem
- Chemistry - Methods
- ChemistryOpen
- ChemistrySelect
- ChemViews



WILEY-VCH



**Pour montrer la vitalité de la chimie française,
toutes ces revues attendent vos communications.**

Le dépistage : une éternelle lutte entre la lance et le bouclier

De tout temps, des substances exogènes ont été utilisées pour accroître les performances corporelles et mentales avant d'affronter des combats. Dans la Grèce antique, les athlètes s'entraînaient pour les Jeux olympiques, considérés comme une célébration de l'excellence physique. Les vainqueurs des Jeux étaient très respectés dans la société grecque et souvent récompensés par des honneurs et des richesses [1]. Il est possible que certains athlètes aient utilisé des substances comme le vin, le miel, le figuier ou les feuilles de laurier – les compléments alimentaires de l'époque – pour améliorer leurs performances. Cependant, ces substances étaient considérées comme des remèdes naturels et non comme des drogues.

L'origine du mot *dopage* est soumise à controverse, mais celle la plus fréquemment citée, en particulier dans l'article en ligne que la Société Chimique de France a consacré au dopage [2], est également d'origine guerrière, « dop » tiré du néerlandais, serait le nom d'un breuvage alcoolisé obtenu par fermentation du raisin que des guerriers zoulous sud-africains buvaient avant les combats. Le « pinard » abondamment distribué aux poilus de la Grande Guerre avant de sortir des tranchées relevait des mêmes motivations. Plus tard, les molécules de synthèse remplacèrent les breuvages alcooliques, telles les méthamphétamines que prenaient les combattants allemands lors de la Seconde Guerre mondiale, et en face, le sulfate de benzédrine absorbé par les GI's [3], sans parler de la plus actuelle fénétylline (autrement appelée captagon).

Chez ces guerriers pacifiques des temps modernes que sont les athlètes sportifs, la tentation est grande d'accroître les performances en absorbant diverses substances, tant les récompenses peuvent être grandes, sous forme de rémunération ou d'honneurs. À l'encontre de cette démarche, les risques pour leur santé auxquels s'exposent ceux qui se dopent et l'érosion de l'égalité des chances entre athlètes lors des compétitions. Ainsi, depuis les origines du mouvement olympique, la lutte se poursuit continuellement entre la recherche de nouvelles substances dopantes d'un côté, et les moyens de les débusquer de l'autre, autre forme d'une alternative que l'on résume par la formule de l'opposition de la lance et du bouclier. Comme l'indique à juste titre le dossier du sénat publié en 2013 : « il convient d'avoir une longueur d'avance » [4].

L'Agence mondiale antidopage (AMA) a accrédité à ce jour trente laboratoires dans vingt-sept pays (seuls l'Allemagne, l'Espagne et les États-Unis en comptent deux) [5] pouvant analyser les prélèvements effectués lors des réunions sportives et y rechercher les molécules répertoriées au registre des substances prohibées [6], ainsi que des analyses de sang dans le cadre du Passeport biologique de l'athlète (PBA). Des auteurs travaillant dans deux d'entre eux (France, Allemagne) ont contribué au dossier de ce numéro de *L'Actualité Chimique*, et l'importance du PBA est présenté dans l'article de Michel Audran, le précédent directeur du seul laboratoire français accrédité par l'AMA, alors situé à Châtenay-Malabry, dénommé

laboratoire de l'Agence française de lutte contre le dopage (AFLD). Renommé Laboratoire antidopage français (LADF), il est désormais installé depuis mai 2023 sur le campus universitaire de Paris Saclay et dirigé par Magnus Ericsson (voir encadré).

Il n'est pas possible de couvrir en un seul dossier un sujet aussi vaste que le dépistage du dopage sportif, mais les articles proposés au lectorat de *L'Actualité Chimique* en montrent les récentes tendances. En raison du manque d'outils analytiques facilement disponibles et pouvant fournir des résultats quelques heures seulement après la fin des épreuves, les dépistages d'athlètes contrôlés positifs à des substances interdites ne fut véritablement mis en place qu'à partir des Jeux olympiques de 1984 à Los Angeles. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) fut déterminante lors du scandale médiatique du dépistage positif de Ben Johnson à un anabolisant prohibé, le stanozolol, aux J. O. de 1988 à Séoul [7]. Quelques années plus tard, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) permit de révéler les conduites fautives de nombreux athlètes de premier plan dont la carrière fut irrémédiablement entachée [8]. Ces deux méthodes, ainsi que les dosages immunologiques, sont aujourd'hui largement mises en œuvre dans les laboratoires accrédités, comme on le lira dans les articles de ce dossier.

Le dépistage des anabolisants naturels (par exemple la testostérone) et les molécules de synthèse analogues – les premières à être contrôlées – sont toujours recherchées, notamment lors du suivi régulier afin d'établir le PBA. Des molécules endogènes, tels l'érythropoïétine, des petits peptides ou des protéines de masses plus élevées, comme l'hormone de croissance (GH), sont de plus en plus fréquemment retrouvées dans le panel des substances dopantes et posent de nouveaux défis analytiques, d'une part en raison des limites des méthodes actuelles devant être à la fois fiables, d'un coût acceptable et pouvant être mises en œuvre rapidement. D'autre part, il faut aussi pouvoir différencier les molécules naturelles endogènes de celles pouvant être produites en laboratoire. Le cas de l'hormone de croissance traité par Alexandre Marchand et ses collaborateurs du LADF est instructif de ce point de vue.

Le cheval est cet athlète olympique parfois dopé à son insu, et les méthodes de dépistage sont souvent les mêmes que celles visant au contrôle des athlètes humains. Le Laboratoire des courses hippiques (LCH) de Verrières-le-Buisson est en pointe dans ce domaine. Ludovic Bailly-Chouriberry et son équipe traitent du dosage de ces grosses protéines dopantes que sont les macromolécules bio-thérapeutiques, tels les anticorps monoclonaux et les protéines de fusion.

Le prélèvement des échantillons joue un rôle primordial dans le dépistage du dopage. Il a été longtemps limité à la collecte des urines, méthode peu invasive facilement tolérable

par les athlètes, et au prélèvement sanguin, plus difficilement supporté, surtout s'il est fréquemment pratiqué. La méthode de la gouttelette de sang séché (dried blood spot ou DBS), issue des travaux en médecine néonatale et adaptée au dépistage du dopage sportif, s'affirme comme une méthode d'avenir en dépit de certaines limites, ainsi que le présentent Olivier Salamin et Martial Saugy. Le cheveu conserve longtemps, jusqu'à plusieurs mois, la mémoire des molécules absorbées, qui peuvent être ainsi retrouvées. Pascal Kintz est le grand spécialiste de cette méthode de prélèvement, encore maintenue à la porte des laboratoires accrédités par les instances olympiques, mais qui reste un sujet d'étude.

Les compléments alimentaires occupent cette zone grise entre un apport alimentaire bénéfique, et celle des produits prohibés véritablement dopants. Ils visent à améliorer le corps, mais aussi l'esprit – on parle de nootropes – afin de permettre de mieux supporter la charge mentale au cours de la préparation et du déroulement des compétitions. Ils sont souvent disponibles à la vente en ligne sur Internet comme l'indique Olivier Catlin, grand spécialiste de ce sujet.

En attendant de pouvoir dire cet été « que le meilleur gagne ! », je tiens à remercier ici tous les auteurs ayant contribué à la constitution de ce dossier, et souhaiter qu'il puisse instruire utilement le lectorat de *L'Actualité Chimique*.

- [1] https://fr.wikipedia.org/wiki/Jeux_olympiques_antiques
- [2] <https://new.societechimiquedefrance.fr/produits/le-dopage>
- [3] <https://museumofhealthcare.blog/benzedrine-sulfate-from-military-stimulant-to-weight-management>
- [4] www.senat.fr/rap/r12-782-1/r12-782-15.html (consulté le 11/01/24).
- [5] www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/list-wada-accredited-laboratories
- [6] www.wada-ama.org/en/prohibited-list
- [7] P. Arpino, Séoul 1988 : l'analyse qui renversa l'idole, *L'Act. Chim.* 422-423, 2017, p. 9.
- [8] P. Arpino, L'affaire Balco ou quand le couplage LC/MS s'impose dans le contrôle antidopage, *L'Act. Chim.* 452, 2020, p. 17.

Patrick ARPINO*, enseignant à ChimieParisTech, ancien directeur de recherche au CNRS, et ancien président de la division de chimie analytique de la Société Française de Chimie (2000-2005).

*patrick.arpino@chimieparistech.psl.eu

L'activité du Laboratoire antidopage français (LADF)

Le LADF fait partie de la trentaine de laboratoires antidopage accrédités dans le monde par l'Agence mondiale antidopage (AMA) pour procéder aux analyses des échantillons sanguins et urinaires et, depuis peu, à partir de matrices DBS prélevées sur des sportifs dans le cadre des contrôles antidopage. Il est également accrédité suivant la norme ISO17025 par le Comité français d'accréditation (COFRAC). Intégré à l'Agence française de lutte contre le dopage (AFLD) lors de sa création en 2006, le LADF est passé sous tutelle de l'université Paris-Saclay au premier janvier 2022.

La première mission du LADF est l'identification et, si nécessaire, la quantification des substances figurant sur la Liste des substances et méthodes interdites de l'AMA dans les échantillons de contrôle antidopage envoyés par ses clients (l'AFLD en charge de contrôler les sportifs français mais aussi des fédérations sportives internationales, des organisations antidopage étrangères, ainsi que les comités organisateurs de grands événements sportifs). Le nombre d'échantillons progresse régulièrement et la barre des **22 000 échantillons annuels** a été franchie en 2023.

Chaque échantillon, en plus du menu d'analyse standard qui conduit déjà à **rechercher plus de 650 molécules interdites**, est susceptible d'être aussi analysé avec des techniques « spécialisées » pour la recherche de certaines molécules pour mieux identifier certains types de dopage en lien avec les particularités des disciplines sportives (force, endurance...) ou dans le cadre de suspicion sur des athlètes en particulier (hormone de croissance, facteurs de libération de l'hormone de croissance dans l'urine, agents stimulant l'érythropoïèse) et l'origine exogène de composés stéroïdiens, comme la testostérone, par analyse GC-C IRMS (isotopic ratio mass spectrometry). Elles représentent une part non négligeable de l'activité d'analyse du laboratoire.

Chaque année, sur l'ensemble des échantillons reçus par le laboratoire par ses clients (AFLD et tiers), **un faible pourcentage d'échantillons positifs (autour de 1 %)** est identifié pour une (ou plusieurs) substance(s) interdite(s), en grande majorité dans l'urine. **Les substances les plus retrouvées sont les agents anabolisants, suivis de près par les diurétiques, les stimulants et les glucocorticoïdes.** Les sports conduisant proportionnellement au plus grand nombre de cas positifs sont les sports de force (par exemple boxe, kickboxing, mixed martial arts ou MMA, powerlifting) : ces disciplines conduisent à des abus principalement d'agents anabolisants et de diurétiques. Du côté des sports d'endurance (par exemple, cyclisme et athlétisme moyenne-longue distance), les agents stimulant l'érythropoïèse restent en vogue.

Dans une perspective d'amélioration continue, le laboratoire dispose d'une équipe d'analystes dédiés à l'activité de développement, indispensable à l'évolution et à l'efficacité des analyses antidopage. Le laboratoire conduit aussi des travaux de recherche plus exploratoires dans le domaine de la lutte antidopage. Ces projets font régulièrement l'objet de publications scientifiques et participent à diffuser le savoir, améliorer les méthodes de détection et évoluer vers la recherche de nouveaux produits dopants.

Après son déménagement en mai 2023 sur le campus universitaire d'Orsay, le bâtiment entièrement rénové a permis au laboratoire de gagner en surface, de se réorganiser et de s'équiper en vue du flux important d'échantillons et de la cadence d'analyse attendue pendant les Jeux olympiques et paralympiques (JOP) cet été. Cette opportunité et un important travail de développement et modernisation permettent ainsi au LADF de se positionner en tant que laboratoire de référence pour la lutte antidopage à l'orée des JOP de Paris 2024.

Alexandre MARCHAND*, responsable d'unité biologie R&D.

*a.marchand-ladf@universite-paris-saclay.fr



Le Passeport biologique de l'athlète

Résumé Les considérations autour de la santé des athlètes et de l'intégrité du sport ont conduit à l'interdiction de l'usage de certaines substances et méthodes. Jusqu'aux années 2000, les programmes de contrôle antidopage étaient synonymes de recherche des substances interdites et/ou de leurs métabolites dans l'urine ou le sang. Ce système a ses limites en raison de la fenêtre de détection de ces substances, du calendrier de prélèvement des échantillons et de la sophistication de certains régimes antidopage. Pour rendre le programme antidopage plus efficace, l'Agence mondiale antidopage a lancé en 2009 le programme du Passeport biologique de l'athlète. Ce programme ne repose pas sur la détection d'une substance interdite particulière : il consiste en un suivi longitudinal de biomarqueurs du dopage qui sont à la fois scientifiquement et légalement robustes. Ce programme est constitué par trois modules d'investigation : hématologique, stéroïdien et endocrinologique.

Mots-clés Sport, dopage, Passeport biologique de l'athlète.

Abstract **The Athlete Biological Passport**

Concern for the health of athletes and integrity of sport resulted in the banning of specific substances and methods. Until 2000s doping control programs were synonymous with research of prohibited substances and/or their metabolites in urine or blood. This system has its limits due to the detection window of these substances, the timing of sample collections and the sophistication of some doping regimens. The Athlete Biological Passport (ABP) program was initiated in 2009 by the World Anti-Doping Agency (WADA) for making the anti-doping program more effective and stronger. ABP does not rely upon the detection of a particular prohibited substance but it reflects the changes in biological markers, both scientifically and legally robust. This passport consists in three modules: hematological, steroidal, endocrinal modules.

Keywords Sports, doping, Athlete Biological Passport.

La lutte antidopage

Le souci de préserver la santé des athlètes et de renforcer l'intégrité du sport a conduit à la création en 1999 de l'Agence mondiale antidopage, dont la première mission fût de promulguer un Code mondial antidopage et d'éditer une liste de substances et méthodes interdites dans les compétitions sportives. Le premier moyen utilisé par les autorités sportives pour lutter contre le dopage a consisté en la détection de ces substances interdites et/ou de leurs métabolites dans les fluides biologiques, essentiellement l'urine, accessoirement le sang, grâce au couplage chromatographie-spectrométrie de masse. Cette approche s'est avérée efficace pour la détection d'un grand nombre de substances. Néanmoins, malgré les efforts des analystes antidopage et l'augmentation continue de la sensibilité des techniques de détection, il existe encore des substances et des méthodes dopantes qui ne sont pas détectables par les tests antidopage (ou difficilement) :

- substances et/ou agents masquants encore inconnus (par exemple : stéroïdes de synthèse, hormones peptidiques biosimilaires, modulateurs métaboliques et substances à usage vétérinaire, ou en essais précliniques, ou cliniques encore dénommées substances non approuvées) ;
- hormones peptidiques à demi-vie courte (desmopressine et analogues) et/ou leurs facteurs de libération ;
- protéines et peptides recombinants dont les structures moléculaires sont identiques aux endogènes (insuline, IGF-1) ;
- stéroïdes pseudo-endogènes de type testostérone (en particulier les préparations avec une signature isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ semblable à l'hormone l'endogène) ;
- microdoses de tout ce qui précède ;
- transfusions sanguines autologues (également en association avec des microdoses d'agents stimulant l'érythropoïèse).

En outre, la détection est rendue plus compliquée à cause d'une supervision médiocre et sophistiquée des protocoles de dopage. Des stratégies alternatives ont donc dû être développées pour maintenir l'intégrité du sport. Pendant de nombreuses années, l'idée de la surveillance de marqueurs biologiques pour identifier l'usage de médicaments interdits a été explorée. Les marqueurs indirects du dopage offrent une alternative avantageuse aux tests directs, car ils ne cherchent pas à détecter la présence du produit dopant dans les matrices biologiques, mais les modifications sur des paramètres biologiques induites par son administration. Lorsque l'érythropoïétine humaine recombinante (rh-EPO) a commencé à être employée, le concept de suivi longitudinal s'est développé assez rapidement. Suite à l'usage abusif de la rh-EPO par les athlètes d'endurance au cours des années 90, plusieurs possibilités d'utilisation de marqueurs biologiques caractéristiques du dopage sanguin ont été proposées [1-4]. Toutes les connaissances concernant les biomarqueurs du dopage acquises au cours de cette décennie ont été formalisées au début des années 2000 dans le programme appelé « Passeport biologique de l'athlète ».

Le Passeport biologique de l'athlète

Le Passeport biologique de l'athlète (PBA) et ses directives opérationnelles ont été mis en place par l'Agence mondiale antidopage (AMA) en 2009. À cette date, il se composait uniquement du module hématologique. Il fut adopté en France en 2012 sous l'appellation « Profilage biologique de l'athlète ». Ensuite, 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

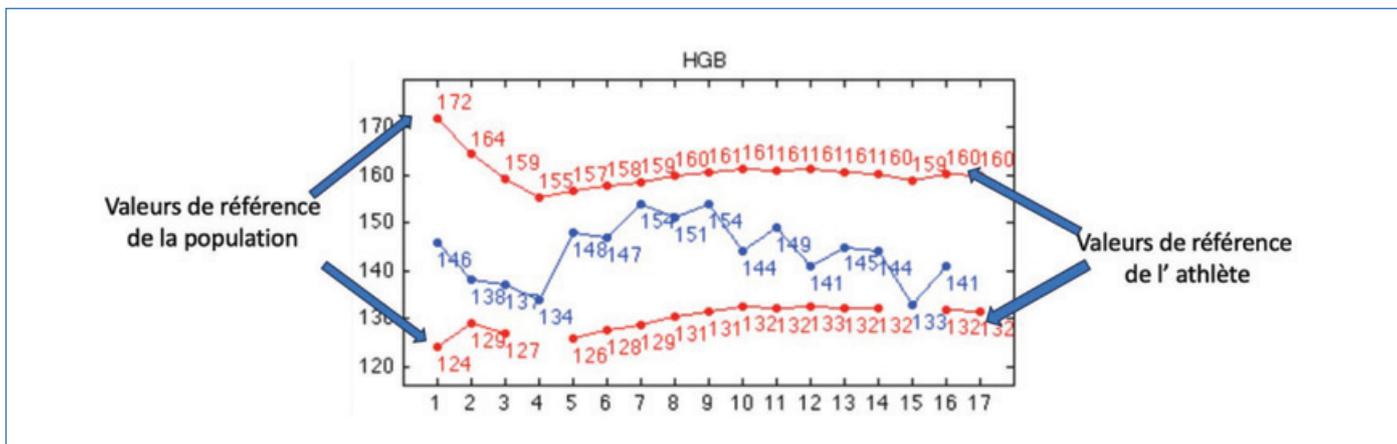


Figure 1 - Profil d'hémoglobine.

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. Le principe du PBA est basé sur le suivi au fil du temps de variables biologiques sélectionnées, ou biomarqueurs, qui peuvent être des composés, un groupe de composés, des paramètres biologiques indiquant l'utilisation d'une substance ou encore d'une méthode interdite, et qui révèlent indirectement les effets du dopage, par opposition à la détection directe traditionnelle du dopage. De la même manière que les biomarqueurs d'une maladie visent à détecter son empreinte biologique, les biomarqueurs du dopage sont utilisés pour détecter l'empreinte biologique du dopage.

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. En comparant les valeurs individuelles d'un athlète avec ses propres données antérieures, toute variabilité interindividuelle est supprimée, et seule la variabilité intra-individuelle reste à quantifier. À cette fin, des techniques mathématiques basées sur la statistique bayésienne ont été développées [5] car elles peuvent fournir des probabilités objectives de savoir si une mesure spécifique se situe, ou non, dans la variation biologique normale d'un athlète donné. 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 ultérieurement et progressivement en fonction des valeurs de chaque athlète, au fur et à mesure que des échantillons supplémentaires sont prélevés (figure 1). Le calcul de tels seuils personnalisés, qui correspondent à une plage critique définie par une spécificité donnée (exemple : 99 %) dans l'hypothèse d'un état physiologique normal, nécessite une compréhension de la répartition de la population et des sources de variation pour chaque biomarqueur. Grâce à cette approche, chaque athlète dispose de ses propres plages de référence pour les marqueurs biologiques. Le choix d'une spécificité initiale relativement faible (c'est-à-dire 99 %) permet de signaler de manière plus sensible les passeports atypiques en vue d'un examen plus approfondi.

Le PBA peut être utilisé pour signaler les athlètes et les échantillons nécessitant une attention particulière : il fournit des informations précieuses qui peuvent être utilisées pour piloter des stratégies antidopage telles que la collecte d'échantillons supplémentaires, l'analyse plus approfondie d'échantillons existants, la réalisation d'enquêtes ou le placement d'échantillons dans un stockage à long terme pour une analyse ultérieure. Il peut permettre, conformément à l'article 2.2 du Code mondial antidopage, de poursuivre un athlète pour violation des règles antidopage. Le PBA exige que les athlètes soient contrôlés non seulement sur les sites de compétition, mais également hors compétition. Afin de minimiser la variabilité pré-analytique et analytique, l'AMA a édité des règles strictes sur la procédure de prélèvement des échantillons ainsi que sur les procédures de laboratoire [6].

Les modules du PBA

Le module hématologique

Ce module vise à détecter le dopage sanguin, à savoir le recours aux agents stimulant l'érythropoïèse (ASE) et à la transfusion sanguine, qui sont utilisés pour améliorer la capacité de transport de l'oxygène. En 2008, l'Union cycliste internationale a été la première fédération internationale à mettre en œuvre ce module afin de détecter le dopage sanguin dans le cyclisme. Les biomarqueurs du module hématologique sont l'hémoglobine (Hb), le pourcentage de réticulocytes (retic%), une combinaison de ces deux paramètres appelée index de stimulation ou « Off-score » ($\text{Off-score} = [\text{Hb}] (\text{g/L}) - 60 \cdot \sqrt{\text{retic}\%}$), ainsi qu'une combinaison de dix marqueurs sanguins (hématocrite, hémoglobine, numération érythrocytaire, pourcentage de réticulocytes, numération des réticulocytes, volume corpusculaire moyen, hémoglobine corpusculaire moyenne, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, indice de distribution des globules rouges, fraction de réticulocytes immatures) regroupés sous le nom de « score de profil sanguin anormal » (figure 2) [6].

Les lignes directrices et les documents techniques de l'AMA définissent les modalités de prélèvement des échantillons :

- les échantillons ne peuvent être prélevés que deux heures après un effort physique ;
- l'athlète doit rester assis pendant au moins dix minutes avant de fournir un échantillon ;
- l'athlète doit être interrogé sur des sujets spécifiques, comme l'altitude (naturelle ou simulée), les pertes de sang, les dons et les transfusions.

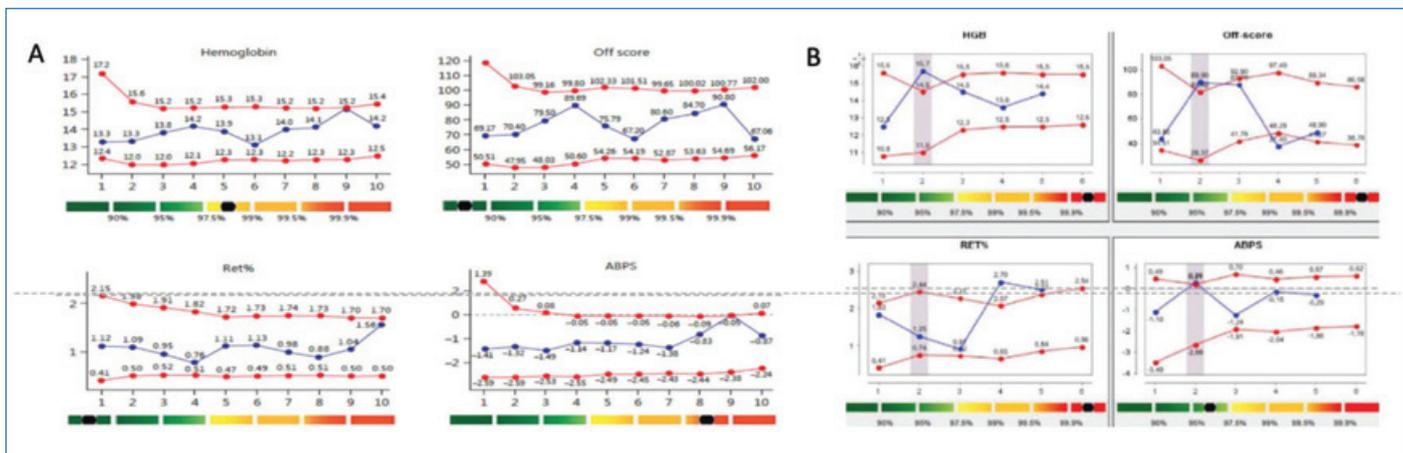


Figure 2 - A) Passeport normal ; B) Passeport atypique.

Pour mesurer les paramètres hématologiques du passeport biologique, un échantillon A (tube de 3 mL contenant de l'EDTA comme anticoagulant) suffit, car il n'est pas nécessaire de procéder à une analyse supplémentaire. Cependant le recueil d'un second échantillon B est recommandé pour une éventuelle recherche d'ASE ou d'usage de transfusion sanguine homologue. Une fois collectés, les échantillons doivent être conservés et transportés vers le laboratoire accrédité antidopage de l'AMA le plus proche dans des conditions réfrigérées (2 à 12 °C) afin d'être analysés.

Un paramètre important dans la phase pré-analytique est le « score de stabilité du sang » ou BSS calculé selon la formule $BSS = 3T + CA$ (avec T = température de conservation de l'échantillon depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse ; CA = le temps depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse). Il a été scientifiquement démontré que la stabilité des marqueurs utilisés dans le module hématologique est garantie tant que BSS reste inférieur à 85 ; le non-respect de cette règle invalide les résultats de l'analyse.

L'analyse est effectuée dans des laboratoires accrédités par l'AMA qui :

- utilisent la même technologie, afin de diminuer la variabilité notamment liée à la mesure des réticulocytes ;
- font partie d'une évaluation externe commune de la qualité ;
- appliquent les mêmes procédures lors de l'étalonnage des machines (contrôles de qualité, analyse d'échantillons de sang frais etc.) avant l'analyse des échantillons [7].

Le PBA comprend de nombreuses variables hématologiques qui sont influencées par plusieurs facteurs externes et internes comme l'origine ethnique, l'âge, le sexe, l'analyseur utilisé pour la mesure, le type de sport, l'effet des changements saisonniers et l'exposition à l'altitude. Le taux d'hémoglobine (Hb) est modifié non seulement par le dopage, mais également par les variations du volume plasmatique. Ces fluctuations du volume plasmatique peuvent être dues à des activités physiques ou à d'autres conditions environnementales comme la température ou l'altitude auxquelles les athlètes sont généralement exposés [8-12]. L'inclusion de nouveaux marqueurs dans ce module constitue un défi majeur car seules quelques variables peuvent être suivies longitudinalement et la majorité d'entre elles jouent un rôle dans le métabolisme du fer.

Le module stéroïdien

Ce module rassemble des données concernant les marqueurs de dopage aux stéroïdes. L'objectif principal est l'identification des stéroïdes anabolisants androgènes endogènes lorsqu'ils

sont administrés de façon exogène. De plus, plusieurs voies d'administration sont disponibles pour la testostérone (T), notamment l'application orale, intramusculaire et transdermique, et qui ont un impact différent sur son élimination urinaire : l'administration topique de T rend sa détection plus difficile. Le PBA, qui utilise le modèle adaptatif pour remplacer l'approche de référence basée sur la population (rapport T/E > 4, avec E pour épitestostérone) par une approche de référence basée sur l'individu, permet une évaluation plus précise. Il peut également aider à identifier la substitution de l'échantillon d'urine d'un athlète par l'urine d'un autre individu (échange d'urine).

Les biomarqueurs de ce module sont la testostérone (T) et ses métabolites : androstérone (A), étiocholanolone (Etio), 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol), 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol ainsi que l'épitestostérone (E) et les rapports urinaires suivants : T/E, A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol, 5 α Adiol/E.

Tous ces marqueurs sont systématiquement analysés par couplage GC-MS/MS ou GC-HRMS dans l'ensemble des échantillons d'urine prélevés pour les contrôles anti-dopage. Ces biomarqueurs peuvent être influencés par des facteurs externes : le type de sport pratiqué par l'athlète, le fait que l'urine ait été collectée pendant ou hors compétition. Il existe également des différences significatives en fonction du polymorphisme génétique, de l'heure de la journée, du cycle menstruel chez la femme, de la période de l'année à laquelle l'échantillon d'urine a été collecté et de la prise de certaines substances (contraceptifs, hormones thyroïdiennes, consommation d'éthanol) et de certaines pathologies [13-17].

Ce passeport stéroïdien a des difficultés à détecter le dopage chez des individus ayant un faible rapport urinaire T/E et chez les sujets féminins où les concentrations de ces biomarqueurs sont plus faibles et qui présentent une grande variabilité du rapport T/E. Il s'avère que la détection peut être améliorée par l'inclusion de biomarqueurs supplémentaires, soit ceux dont les concentrations ne sont pas affectées par le métabolisme de phase II, essentiellement la glycuconjugaison, soit ceux dont les concentrations se trouvent à des niveaux suffisamment supérieurs à la limite de quantification de la méthode analytique : il s'agit des stéroïdes libres totaux, notamment T, 5 α -dihydrotestostérone (DHT), ainsi que le rapport testostérone/androstènedione (T/A4) mesurés dans le sérum [18-19]. La testostérone et le rapport T/A4 mesurés dans le sérum ont été récemment ajoutés par l'AMA à la liste des biomarqueurs du module stéroïdien (cf lignes directrices opérationnelles du PBA, version 9, juillet 2023).

Le module endocrinien

L'objectif de ce module est la détection de l'hormone de croissance recombinante (rGH), ainsi que l'aide à la détection de l'usage de substances stimulant la sécrétion endogène de l'hormone de croissance (GH) (sécrétagogues) et de l'IGF-1. Il est basé sur la mesure de deux marqueurs de l'activité biologique de la GH, à savoir l'IGF-1 et le propeptide N-terminal du collagène de type III (P-III-NP) qui sont naturellement présents dans le sang et dont les concentrations sont augmentées suite à l'administration de rGH. Les résultats des mesures de l'IGF-1 effectués par top-down LC-MSn, du P-III-NP par immunodosage (ADVIA Centaur Siemens) et du résultat du score GH-2000 ($\text{GH-2000 score} = -6,586 + 2,100\log(\text{IGF-I}) + 2,905\log(\text{P-III-NP}) - 101,737/\text{âge} - 0,02 \times (\text{âge} - 25,09)$ pour les hommes, et $\text{GH-2000 score} = -8,459 + 2,195\log(\text{IGF-I}) + 2,454 \log(\text{P-III-NP}) - 73,666/\text{âge}$ pour les femmes) sont intégrés dans le module endocrinien en utilisant une approche bayésienne similaire à celle appliquée dans les modules stéroïdiens et hématologiques du PBA. Les analyses étant réalisées dans le sérum, ce module nécessite le prélèvement de deux tubes de sang (échantillons A et B) qui devront être transportés correctement réfrigérés jusqu'au laboratoire.

Gestion du PBA

Différents partenaires sont impliqués dans le processus du PBA qui inclut la planification des tests, la collecte des échantillons, l'analyse des échantillons, l'évaluation du profil et la gestion des résultats : il s'agit des Organisations antidopage (OAD), des Unités de gestion du Passeport de l'athlète (UGPA) et d'experts indépendants. L'UGPA joue un rôle important dans le processus du passeport. Ce département lié aux

laboratoires effectuant l'analyse est responsable de la partie administrative de ce programme et permet d'assurer un examen juste et impartial des résultats. Il examine les passeports sans connaître l'identité du sportif et transmet les passeports atypiques à des experts externes pour qu'ils les examinent et formulent des recommandations de mesures de suivi, y compris des contrôles ciblés, aux organisations antidopage. Le PBA est un système à plusieurs étapes, où la toute première étape d'évaluation (une étape « quantitative » pour déterminer le niveau d'anomalie d'un profil) est effectuée par un système logiciel. L'étape suivante, l'évaluation « qualitative », est réalisée par des experts qui évaluent le profil, s'il a été considéré comme atypique lors de la première étape. L'expert devra dire si le passeport est normal, suspect, s'il s'agit d'une probabilité de dopage ou d'une condition médicale. En cas de probabilité de dopage, le passeport est envoyé à deux autres experts. Si la décision « probabilité de dopage » fait l'unanimité, alors l'athlète est informé du résultat anormal de son passeport et a la possibilité de fournir une explication à ou aux anomalies observées, explication qui sera ensuite évaluée par les experts (figure 3). L'évaluation de ces données biologiques par des experts est un facteur clé. Le rôle et l'approche de l'expert scientifique évaluant les données pour le passeport biologique sont comparables à ceux d'un médecin légiste qui évalue différents éléments de preuve et donne son avis sur d'éventuels scénarios criminels dans toute affaire pénale. Lors de son évaluation, l'expert doit respecter quatre principes définis par l'Association of Forensic Service Providers (AFSP) :

- Équilibre : toutes les explications possibles des preuves doivent être soigneusement évaluées.
- Logique : il est important de mettre en évidence l'orientation de l'évaluation des preuves.

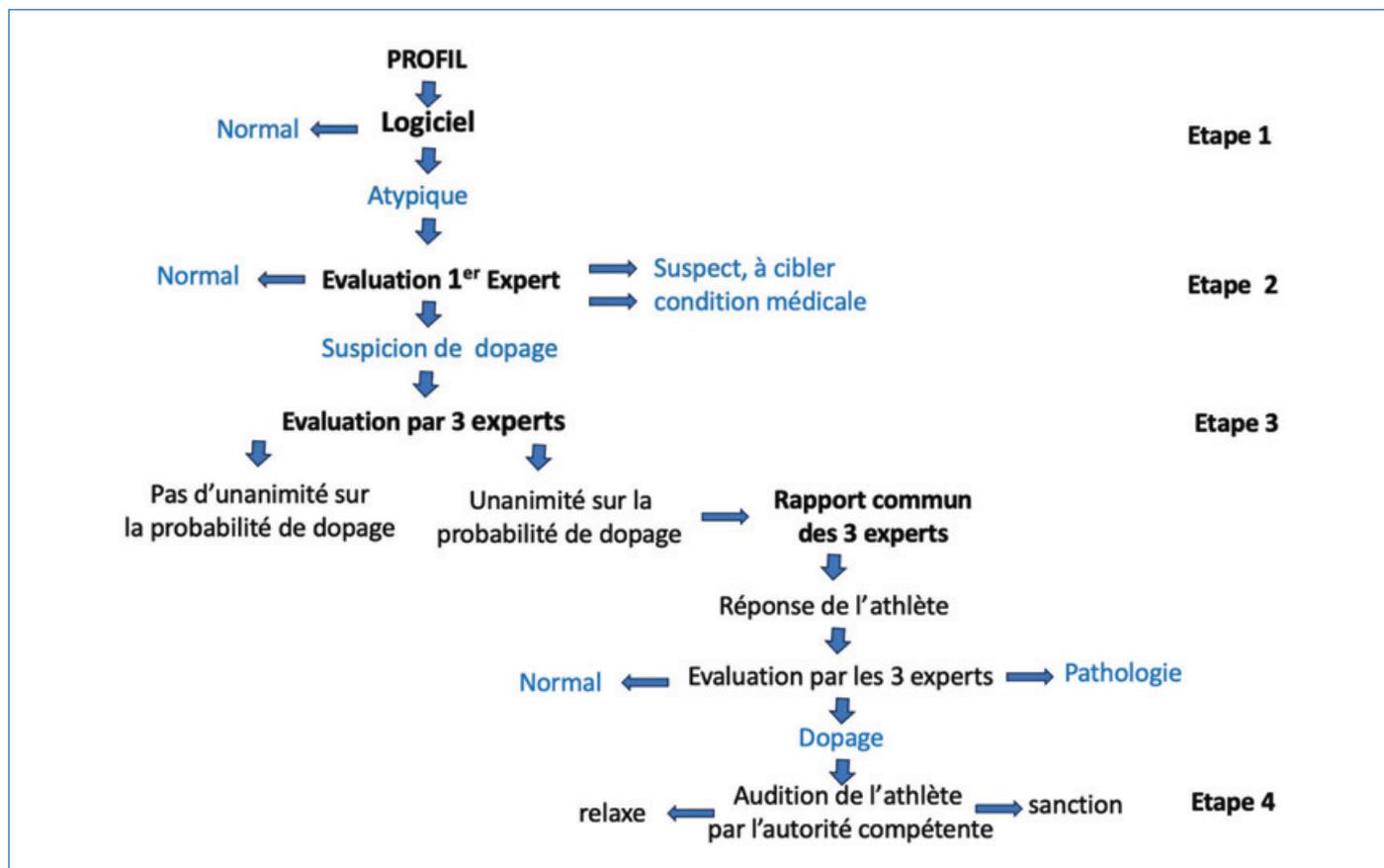


Figure 3 - Processus d'évaluation du PBA, exemple du module hématologique.

• Robustesse : l'opinion fournie par l'expert doit être basée sur des bases scientifiques et sur les conclusions de publications scientifiques évaluées par des pairs pour résister à l'examen minutieux d'autres experts ou d'avocats agressifs lors de contre-interrogatoires.

• Transparence : l'expert doit pouvoir reproduire à tout moment la manière dont il est parvenu à sa conclusion [20].

Ceci est particulièrement important pour le module hémato- logique pour lequel une anomalie peut, sans analyse supplé- mentaire, conduire à une accusation de violation des règles antidopage alors que, pour un profil stéroïdien atypique, une procédure de confirmation doit être effectuée soit à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-C-IRMS) qui permet grâce à la mesure du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des métabolites de la testosté- rone de différencier testosté- rone synthétique utilisée pour l'administration exogène, de la testosté- rone humaine, soit par un test ADN s'il s'agit d'une suspicion de substitution d'échantillon urinaire.

Méthodes omiques et intelligence artificielle

Ces dix dernières années, les stratégies omiques ont été envisagées pour rechercher de nouveaux biomarqueurs. Conçue pour étudier les biomarqueurs au niveau cellulaire, cette approche a été suggérée dans le cadre d'une approche antidopage. Si les investigations transcriptomiques et proté- omiques ont montré un certain intérêt, les approches métabo- lomiques ont récemment démontré des perspectives plus intéressantes [21]. Cependant, malgré leurs résultats promet- teurs, les approches métabolomiques dans les analyses antidopage souffrent encore de plusieurs limites. Les princi- paux inconvénients sont principalement dus aux difficultés à atteindre un niveau de signification suffisant pour différencier les effets produits par le recours à des substances/méthodes dopantes sur le métabolome de ceux dus à d'autres causes. Il s'agit de l'une des difficultés les plus récurrentes rencontrées lorsque l'on demande à des outils de diagnostic de corres- pondre à des spécifications médico-légales.

D'autre part, dans un proche avenir, l'intelligence artificielle pourrait venir aider les experts pour l'interprétation des données.

Un passeport en évolution

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 dans le sport. Il 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). Dans ce contexte, de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques sont en cours de développement pour améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité du PBA. De multiples stratégies sont actuelle- ment explorées pour améliorer ce suivi longitudinal, avec le développement des modules actuels ou encore le dépistage de nouveaux types de dopage. Néanmoins, en raison de la variabilité induite par les biomarqueurs indirects, la prise en

compte de facteurs confondants doit faire partie intégrante de cette recherche.

- [1] L. Malcovati, C. Pascutto, M. Cazzola, Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study, *Haematologica*, **2003**, 88(05), p. 570-581.
- [2] C.J. Gore et al., Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes, *Haematologica*, **2003**, 88(03), p. 333-344.
- [3] N. Robinson, P.E. Sottas, P. Mangin, M. Saugy, Bayesian detection of abnormal hematological values to introduce a no-start rule for heterogeneous populations of athletes, *Haematologica*, **2007**, 92, p. 1143-44.
- [4] A. Bornø et al., Screening for recombinant human erythropoietin using [Hb], reticulocytes, the OFFhr score, OFFz score and Hbz score: status of the Blood Passport, *Eur. J. Appl.*, **2010**, 109(3), p. 537-543.
- [5] P.E. Sottas et al., Statistical classification of abnormal blood profiles in athletes, *Int. J. Biostat.*, **2006**, 2(1), p. 1011.
- [6] <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/athlete-biological-passport-abp-operating-guidelines> (consulté le 11/01/24).
- [7] M. Zorzoli, Biological passport parameters, *J. hum. Sport. Exerc.*, **2011**, 6(2), p. 205-217.
- [8] M.N. Sawka et al., Blood, volume: Importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **2000**, 32(2), p. 332-348.
- [9] F. Sanchis-Gomar et al., Effect of intermittent hypoxia on hematological parameters after recombinant human erythropoietin administration, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **2009**, 107(4), p. 429-436.
- [10] Y.O. Schumacher et al., Diurnal and exercise-related variability of haemoglobin and reticulocytes in athletes, *Int. J. Sports Med.*, **2010**, 31(4), p. 225-230.
- [11] J.J. Saugy, T. Schmolztz, F. Botré, Altitude and erythropoietin: comparative evaluation of their impact on key parameters of the Athlete Biological Passport: a review, *Front. Sports Act. Living*, **2022**, 4.
- [12] B. Krumm, R. Faiss, Factors confounding the Athlete Biological Passport: a systematic narrative review, *Sports Med. Open*, **2021**, 7(1), p. 6.
- [13] J. Mullen et al., Inter-individual variation of the urinary steroid profiles in Swedish and Norwegian athletes, *Drug Test. Anal.*, **2020**, 12(6), p. 720-730.
- [14] B. Moreillon et al., Variability of the urinary and blood steroid profiles in healthy and physically active women with and without oral contraception, *Drug Test. Anal.*, **2023**, 15, p. 324-333.
- [15] D. Martínez-Brito, X. de la Torre, F. Botré, Effect of thyroid hormones administration on urinary endogenous steroid profile of the athlete biological passport, *Drug Test. Anal.*, **2023**, p. 1-10.
- [16] T. Piper et al., Current insights into the Steroidal Module of the Athlete Biological Passport, *Int. J. Sports Med.*, **2021**, 42, p. 863-878.
- [17] O. Salamin et al., Longitudinal evaluation of multiple biomarkers for the detection of testosterone gel administration in women with normal menstrual cycle, *Drug Test. Anal.*, **2022**, 14, p. 833-850.
- [18] T. Equey et al., Longitudinal profiling of endogenous steroids in blood using the Athlete Biological Passport approach, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2023**, 108, p. 1937-46.
- [19] T. Equey et al., Application of the Athlete Biological Passport approach to the detection of growth hormone doping, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2022**, 107(3), p. 649-659.
- [20] Y.O. Schumacher, G. d'Onofrio, Scientific expertise and the Athlete Biological Passport: 3 years of experience, *Clin. Chem.*, **2012**, 58(6), p. 979-985.
- [21] F. Botré, C. Georgakopoulos, M.A. Elrayess, Metabolomics and doping analysis - promises and pitfalls, *Bioanalysis*, **2020**, 12, p. 719-722.

Emmanuelle VARLET¹, docteure, et **Michel AUDRAN^{1*}**, professeur.

¹Institut des biomolécules Max Mousseron (U 5247) CNRS-ENSCM, Laboratoire du département de biophysique et physico-chimie en sciences pharmaceutiques, UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Montpellier.

*michel.audran@umontpellier.fr

Le pouvoir discriminant de l'analyse des cheveux

Résumé L'analyse de substances augmentant la performance à partir d'une mèche de cheveux, de poils du corps ou d'ongles permet de mettre en évidence une exposition (unique ou répétée) à un xénobiotique sur une longue période, de plusieurs mois (1 cm de cheveux = pousse pendant 1 mois). En cela, cette approche permet d'augmenter la durée de la fenêtre de détection des substances, communément de l'ordre de 2 à 4 jours dans le sang ou les urines, sauf pour les anabolisants et certaines substances avec une demi-vie longue (ostarine, ligandrol, dorzolamide). À partir des cheveux, les résultats peuvent donner, par segmentation, des renseignements sur le profil de consommation pendant plusieurs mois, voire des années, en particulier sur sa sévérité et son évolution. Depuis l'affaire Gasquet (arbitrage CAS 2009/A/1930) en 2009, le Tribunal arbitral du sport à Lausanne (Suisse) accepte ces preuves biologiques pour démontrer la bonne foi d'un athlète mis en cause dans une affaire de dopage. À l'aube des Jeux olympiques en France, l'auteur présente la place de l'analyse des cheveux dans la lutte antidopage et sa stratégie dans un contexte de contamination, dont la source peut être l'utilisation de complément alimentaire, de viande, une exposition environnementale ou encore un ou des rapports intimes avec une personne ayant consommé un produit interdit.

Mots-clés Cheveux, poils, ongles, dopage, contamination, sport, athlète, toxicologie.

Abstract **Testing for performance-enhancing drugs in human hair. Applications to contamination cases in doping control**

A low or a very low urine concentration can be interpreted in two different ways: it can be the tail end of a drug used to enhance performance or it is the direct consequence of a contamination. By contamination, one can include laced supplements, contaminated meat by growth promoters, poor quality pharmaceuticals and finally drug transfer during intimate moments. Testing for doping agents in hair allows discriminating cheating from contamination based on the measured concentration or even the absence of the target drug. Hair is receiving more and more attention by scientists and lawyers due to its long detection window, particularly when compared to blood and urine, its less embarrassing conditions of collection and its storage at ambient temperature. By providing information on exposure to drugs over time, hair analysis may be useful in verifying self-reported histories of drug use in any situation in which a history of past rather than recent drug use is desired. Hair analysis can also provide a retrospective calendar of an individual's drug use. For this, multi sectional analysis is required and involves taking a length of hair and cutting it into sections to measure drug use during shorter periods of time. Although hair is not yet a valid specimen for the International Olympic Committee or the World Anti-Doping Agency (WADA), it is accepted in most courts of justice in the world.

Keywords Hair, nail, doping, contamination, sport, athlete, toxicology.

Depuis 1968 et les Jeux olympiques d'hiver de Grenoble, le Comité international olympique (CIO) et la plupart des fédérations sportives internationales sont concernés par le problème du dopage. Dès le début des contrôles, l'urine a été choisie comme milieu d'investigation. Cette approche, utilisée comme règle de nos jours, permet d'obtenir des informations sur 48 ou 72 heures, exceptionnellement plus, comme pour le cannabis ou les anabolisants présentant des métabolites d'élimination longue ou sous forme estérifiée. C'est aussi le cas pour quelques molécules avec des demi-vies d'élimination longues, comme certains modulateurs sélectifs des récepteurs androgènes (SARMs) tels que l'ostarine ou le ligandrol, ou encore le dorzolamide, un diurétique. La recherche des hormones (érythropoïétine et dérivés, hormone de croissance et analogues, insuline) se pratique essentiellement dans le sang. À partir de 1979, date des premiers travaux américains [1] et allemands, la fenêtre de détection standard de quelques jours a été complètement modifiée par l'introduction du cheveu dans l'arsenal analytique de la toxicologie judiciaire et la lutte contre les addictions. Cette matrice possède la propriété unique d'être le marqueur historique d'une exposition unique ou répétée. C'est un milieu cumulatif par opposition à l'urine, milieu incrémental [2]. L'analyse des cheveux

permet également d'établir le profil de consommation sur le long terme (en fonction de la longueur des cheveux) et son évolution si l'on pratique des mesures par segmentation. En effet, le cheveu pousse chez 90 à 95 % de la population à une vitesse de 1 cm par mois et, donc, chaque segment de 1 cm correspond à ce qui a circulé dans le sang et qui a pu s'incorporer pendant un mois. Dans la pratique, l'analyse urinaire et l'analyse des cheveux s'avèrent plutôt complémentaires. Un tableau synthétique réunit les caractéristiques propres à chaque milieu dans le cadre du contrôle du dopage (voir *tableau*). Depuis 1998, plusieurs affaires judiciaires ont permis de documenter des observations dans le monde du sport, en France et dans d'autres pays. Les cheveux de sportifs ont ainsi été utilisés pour mettre en évidence des pratiques de dopage, des situations de trafic de substances classées comme vénéneuses, généralement des anabolisants, ou encore pour infirmer des analyses urinaires contestées. C'est l'affaire dite « Festina » dans le cyclisme qui a conduit à la création de l'Agence mondiale antidopage (AMA). Cette agence a désormais la responsabilité internationale de la politique antidopage, en particulier en maintenant à jour le Code mondial antidopage [3]. En France, c'est l'Agence française de lutte contre le dopage (AFLD) qui gère l'ensemble

Tableau - Comparaison urines et cheveux – spécificités de chaque matrice.

Paramètres	Urines	Cheveux
Reconnu AMA	Oui	Sous réserve*
Fenêtre de détection	2-5 jours, sauf quelques molécules	Plusieurs mois selon la longueur des cheveux
Adultération	Possible	Très difficile, voire impossible
Recueil	Invasif	Non invasif
Conservation	+ 4 °C ou - 20 °C	Température ambiante
Analyte majeur	Métabolites	Substance mère
Recueil à distance d'un 2 ^e échantillon identique	Non	Oui
Type de mesure	Incrémentale	Cumulative
Risque de faux positifs	Théoriquement nul	Théoriquement nul
Molécules retrouvées	Toute la liste des substances interdites	Toute la liste des substances interdites, sauf les hormones

* ne doit pas s'opposer à un résultat anormal (= positif) et accepté par le Tribunal arbitral du sport.

des actions. Dans sa version définitivement adoptée le 23 mars 1999, la loi (99-223) relative à la protection de la santé des sportifs et à la lutte contre le dopage complétée par le décret n° 2001-35 du 11 janvier 2001 autorise la mise en évidence d'une pratique dopante à partir d'un échantillon de phanères (cheveux, poils, ongles).

Prélèvement et analyse

Les cheveux sont généralement prélevés en vertex postérieur. Une mèche de 50 à 80 cheveux (diamètre d'un crayon à papier) est suffisante (prélever, à titre conservatoire, une seconde mèche). Celle-ci doit être prélevée le plus près de la peau, coupée au ciseau (ne pas arracher) et orientée racine-extrémité au moyen d'une cordelette, fixée 1 cm au-dessus du niveau de la racine (figure 1). La conservation est aisée ; elle s'effectue en tube sec ou dans une enveloppe, à température ambiante [4]. Ce procédé de stockage est nettement plus favorable que celui des urines ou du sang, qui nécessite le froid. Le recueil d'un deuxième échantillon identique de cheveux est toujours possible dans la semaine qui suit le prélèvement initial, alors que cela s'avère irréalisable avec les urines. Si les cheveux sont manquants (calvitie) ou qu'ils ne peuvent pas être prélevés pour cause religieuse ou traitement cosmétique particulièrement agressif, des poils (axillaires, pubiens, de la poitrine, des jambes ou des bras) ou des ongles peuvent être utilisés [5, 6]. Chaque prélèvement a ses propres caractéristiques en termes de vitesse de pousse et de fenêtre de détection, et il convient d'adapter l'interprétation en tenant compte de ces spécificités. À ce jour, parmi les classes de substances interdites et celles soumises à certaines restrictions, les analystes ont pu identifier dans les phanères la plupart des produits interdits selon le Code mondial antidopage, à l'exception majeure des hormones peptidiques du fait de leur encombrement stérique interdisant le transfert depuis les capillaires sanguins. Une revue récente a listé les agents dopants détectables dans les cheveux et, par extension, dans les poils et les ongles [7]. Toutes les méthodes font appel à la spectrométrie de masse, en général en tandem (MS/MS), mais de plus en plus en haute résolution (HRMS). Pour de nombreuses molécules, la chromatographie en phase gazeuse reste une option viable par rapport à la chromatographie en phase liquide, malgré le recours quasi-systématique à une étape supplémentaire de dérivation. Que ce soit en France, en Europe, aux États-Unis et, plus généralement, dans

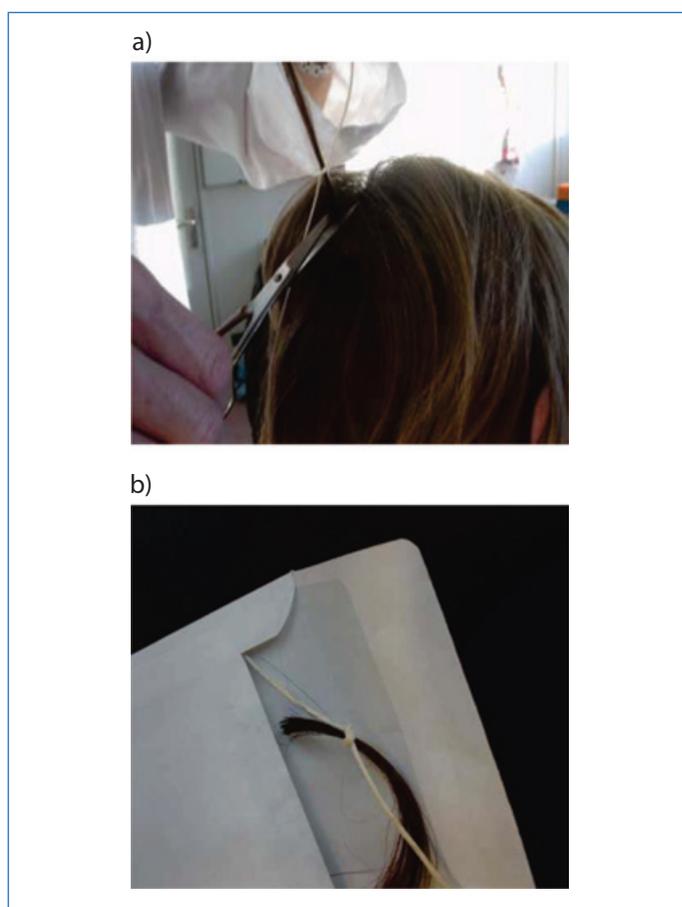


Figure 1 - Protocole de prélèvement des cheveux :
a) phase de coupe avec la cordelette posée à 1 cm du cuir chevelu ;
b) la conservation dans une enveloppe au sec et à température ambiante.

les pays où le contradictoire existe, l'expertise toxicologique à partir de cheveux, des poils ou des ongles est désormais reconnue par les tribunaux en charge des affaires criminelles. Dans ces conditions, mais sans polémique, il convient de s'interroger sur l'absence de considération par l'AMA des matrices kératinisées, alors que des milliers d'analyses sont faites chaque jour sur les cheveux dans des domaines aussi variés que la sécurité routière, la protection infantile, le suivi des addictions ou encore l'aptitude professionnelle au travail. L'analyse des agents dopants dans les cheveux, poils ou ongles reste controversée [8-11] et s'apparente parfois à des luttes très politiques alors même que rien ne s'oppose dans

ces choix. Il convient de garder à l'esprit les limites de l'analyse capillaire [12, 13] et de ne pas interpréter des résultats sans validation complète sur le plan analytique. De même, il convient d'être très rigoureux pour établir la signification pharmaco-toxicologique d'une concentration d'une molécule très peu étudiée dans la littérature [14].

À ce jour, l'acceptabilité des cheveux est contestée par l'absence d'études contrôlées, en particulier pour les anabolisants, les SARM et les diurétiques, qui sont des substances qui s'incorporent mal dans les cheveux. Dans ces conditions, il peut être difficile de documenter un cas avec des urines positives et des cheveux négatifs si l'expert n'est pas capable de faire la preuve d'une sensibilité analytique suffisante. Pour de nombreux agents dopants, il n'existe pas de référentiel (dose minimale détectable, influence de la couleur des cheveux, stabilité, biais d'incorporation, etc.), ce qui peut compliquer les interprétations et surtout donner des arguments aux instances qui s'opposent aux analyses capillaires.

Physiologie des cheveux et des ongles

Les cheveux en croissance (environ 85 % de la quantité totale) incorporent les substances présentes dans le sang et la sueur et peuvent ainsi représenter le calendrier rétrospectif de la consommation chronique d'un xénobiotique. En effet, les cheveux poussent d'environ 1 cm par mois et leur analyse centimètre par centimètre, de la racine (exposition la plus récente) vers la pointe des cheveux (exposition la plus ancienne dans le temps) permet de suivre l'évolution (diminution, augmentation ou pas de variation) de la consommation mois après mois. Aujourd'hui, l'analyse segmentaire est un outil indispensable pour la justice et le corps médical afin de suivre l'évolution d'une toxicomanie ou la substitution par d'autres produits. Néanmoins, les résultats quantitatifs, quels qu'ils soient, doivent être interprétés avec beaucoup de rigueur et de précautions, car si l'analyse segmentaire présente des avantages par rapport aux analyses traditionnelles dans le sang ou les urines (calendrier rétrospectif, fenêtre de détection, évolution de la consommation etc.), il faut garder en mémoire que la croissance des cheveux n'est pas continue et que des phénomènes de migration à l'intérieur du cheveu peuvent affecter les concentrations.

Sur le plan anatomique, l'ongle est une partie dure et insensible de l'orteil ou du doigt, faite essentiellement de kératine. À l'opposé des cheveux, l'ongle ne contient pas de pigment de type mélanine et, à ce titre, n'est pas sujet à des biais de couleur. La vitesse de pousse des ongles de la main est de l'ordre de 3 mm par mois, alors qu'elle est plus réduite pour les ongles des pieds, de l'ordre de 1 à 1,5 mm par mois. L'incorporation des xénobiotiques se fait à 80 % au niveau de la matrice proximale et à 20 % au niveau du lit de l'ongle. Il est communément admis qu'après avoir coupé les ongles, la partie coupée représente une fenêtre de détection de 3 à 6 mois pour les mains et 8 à 16 mois pour les pieds. À l'exclusion de l'éthylglucuronide, marqueur de l'éthanol, les concentrations dans les ongles sont généralement plus faibles que dans les cheveux [15].

Cheveux et contrôle antidopage, ça marche

L'analyse des cheveux autorise la différenciation entre un usage unique et une consommation régulière. De cette façon, l'usage récréatif de cannabis ou de cocaïne, en particulier

dans certains sports collectifs pourrait être documenté. La contamination « accidentelle » ou dans l'intention de nuire (par sabotage) d'une boisson, conduisant ainsi à un résultat urinaire positif, pourrait être élucidée par analyse des cheveux, l'athlète pouvant alors prouver une exposition unique. Dans le cadre de la protection de la santé des sportifs (suivi longitudinal), un usage prolongé d'anabolisants stéroïdiens, de corticoïdes ou de β 2-adrénergiques (salbutamol) ne peut être mis en évidence par analyse urinaire. Au contraire, les cheveux remplissent parfaitement leur rôle de mémoire historique. Les révélations des expertises judiciaires pratiquées après le Tour de France 1998 sont, dans ce sens, tout à fait éloquentes. Le nombre de contestations de résultat anormal (dans le dopage, on ne parle pas de résultat positif) semble en augmentation constante, comme en atteste l'activité croissante de certains cabinets d'avocats spécialisés dans le sport. Ainsi, les demandes d'assistance à la suite d'un échec à un contrôle sont essentiellement le fait d'athlètes de haut, voire très haut niveau international, avec des dossiers instruits par des juristes majoritairement issus de la culture anglo-saxonne, dont le système juridique est basé sur le contradictoire. La mise sur le marché d'outils analytiques particulièrement sensibles a singulièrement compliqué les investigations lorsque les concentrations urinaires sont de l'ordre du pg/mL. Ainsi, plus les concentrations sont faibles, plus le risque de contamination augmente. Dans ces conditions, il a semblé important à l'auteur d'établir les critères d'acceptabilité scientifique dans les situations où une contamination est suggérée [16, 17]. La source de la contamination peut être l'utilisation de compléments alimentaires, de viande, une exposition environnementale ou encore des contacts intimes avec une personne ayant consommé un produit interdit. Le concept est d'introduire le raisonnement médico-judiciaire dans l'antidopage [18-20]. La stratégie du cabinet, basée sur notre expérience de 25 années dans le domaine est la suivante :

- les concentrations urinaires des substances identifiées chez l'athlète doivent être très faibles (en général, inférieures à 2-3 ng/mL, voire du domaine du pg/mL) ;
- si possible, la dose entrée dans l'organisme doit être estimée, ce qui permettra de contester tout effet pharmacologique augmentant la performance ;
- une analyse de cheveux de l'athlète doit confirmer l'absence de consommation de la substance identifiée à dose efficace pour augmenter les performances (la période couverte par l'analyse capillaire doit englober celle du contrôle urinaire) ;
- l'athlète et ses conseils doivent présenter des éléments vérifiables justifiant une contamination et la source de contamination doit être identifiée. Cet élément d'identification de la source est primordial pour pouvoir établir ensuite la non-intentionnalité de consommation ;
- l'athlète doit démontrer qu'il (ou elle) ne savait pas qu'une substance prohibée était présente, et qu'il (ou elle) ne l'avait pas consommée de façon intentionnelle ;
- un pharmacologue ou un toxicologue expérimenté doit vérifier si les déclarations de l'athlète sont acceptables sur le plan scientifique ;
- enfin, une analyse de cheveux du partenaire (en cas de contamination par contact) doit confirmer un usage de la substance incriminée, afin de pouvoir être identifié comme étant la source de contamination.

Dans les cheveux comme les ongles, la substance la plus concentrée est la molécule-mère et les métabolites sont détectés surtout pour discriminer une contamination externe.

Dans le cas d'un abus de dérivés de la testostérone, les cheveux montrent ici un avantage absolu sur les urines. La qualification de dopage se fait sur un rapport Testostérone/Épitéstostérone supérieur à un seuil-cible (T/E < 4). Or, la testostérone est essentiellement administrée par voie injectable, sous forme estérifiée (propionate, énanthate, décanoate...) qui, en se métabolisant, va être hydrolysée pour donner de la testostérone, qu'on va retrouver dans les urines en mélange avec la forme endogène. Le dosage urinaire est facile, accessible à de nombreux laboratoires et certains sportifs n'hésitent pas à se faire contrôler régulièrement pour être « en dessous de la barre » ou pour prétexter une sécrétion naturelle importante. Dans ces conditions, s'agissant d'un composé physiologique, la différenciation est particulièrement délicate, même si l'utilisation des rapports isotopiques du carbone a été proposée. Au contraire, dans les cheveux, l'ester de testostérone, la substance-mère, sera présente et signera de façon indiscutable un apport exogène [21]. De même, un sportif peut être convaincu de dopage lorsque l'on retrouve de la norandrostérone (NA) dans ses urines avec un signal supérieur à celui que donne un contrôle à 2 ng/mL. Or, la NA est le métabolite commun à la nandrolone, la nandrolone décanoate, la 19-norandrostènediol et la 19-norandrostènedione. L'analyse des cheveux permet alors de distinguer la substance originelle, ce qui permet de démarrer des investigations de type médico-judiciaires [22]. Le contrôle du dopage par l'AMA par analyse des cheveux ne semble pas être à l'ordre du jour et, dans les faits, ne devrait pas faire l'objet de profondes modifications des règles du Code de l'AMA. En revanche, dans le cadre des expertises judiciaires, cette approche calquée sur les analyses de stupéfiants peut se révéler déterminante dans la lutte contre les trafics d'agents dopants, mais surtout dans la mise en évidence d'une altération du comportement (libido, agressivité) sous l'influence de substance de la performance [23], en particulier les anabolisants ou les décès inattendus d'origine cardiaque [21, 24-26]. Récemment, trois jugements [27-29] ont été favorables (*no fault*) à trois athlètes féminines ayant toutes présenté un résultat urinaire anormal. Ces affaires sont en tous points superposables : très faible(s) concentration(s) de la substance ou de ses métabolites dans les urines, analyse négative des cheveux de l'athlète, consommation de la (ou les) substance(s) incriminée(s) vérifiée chez le partenaire et analyse de cheveux positives du partenaire. Dans les trois cas, le tribunal a considéré que le résultat anormal des athlètes était plus que probablement la conséquence d'une contamination pendant des moments intimes par l'intermédiaire d'un partenaire consommant le (ou les) produit(s) retrouvé(s) dans les urines de l'athlète.

Une chaîne de qualité

Au total, la demande sans cesse croissante des magistrats d'expertises judiciaires à partir d'échantillons de cheveux a naturellement conduit à standardiser de façon très rigoureuse l'ensemble de la procédure, du prélèvement et de sa conservation à l'interprétation des résultats. Cela implique une chaîne de qualité identique à celle mise en place pour les urines. Chaque laboratoire pratiquant des analyses à partir d'échantillons de cheveux doit avoir une méthodologie complètement validée, incluant précision, justesse, sensibilité et spécificité, et doit avoir établi ses études de population. L'analyse des xénobiotiques dans les cheveux semble promise à un bel avenir. À partir d'une standardisation rigoureuse de la

méthode de prélèvement et de la technique d'analyse, l'implication des cheveux dans la lutte contre le dopage devrait être reconnue. En 2013, Sir Craig Reddie, le président de l'AMA, avait publiquement déclaré qu'il souhaitait que les contrôles puissent se faire avec des prélèvements alternatifs au sang et à l'urine et qu'à ce titre, les cheveux apparaissaient comme une excellente opportunité. Il n'est certes pas envisageable de rechercher directement l'ensemble des substances classées comme dopantes dans une seule mèche de cheveux ou des ongles. L'urine reste à cet effet le meilleur milieu de dépistage. Mais l'athlète devrait être autorisé à faire pratiquer une analyse de cheveux en cas de contestation.

- [1] A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner, C.T. Black, Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories, *J. Nucl. Med.*, **1979**, *20*, p. 748-752.
- [2] P. Kintz, Drug testing in addicts: a comparison between urine, sweat and hair, *Ther. Drug Monit.*, **1996**, *18*, p. 450-455.
- [3] <https://www.wada-ama.org/fr/ressources/code-mondial-antidopage-et-standards-internationaux/code-mondial-antidopage> (consulté le 8/01/24)
- [4] <http://www.x-pertise.com/x-pertise.com/Specialites.html> (consulté le 8/01/24)
- [5] P. Kintz, L. Gheddar, J.S. Raul, Simultaneous testing for anabolic steroids in human hair specimens collected from various anatomic locations has several advantages when compared with the standard head hair analysis, *Drug Test. Anal.*, **2021**, *13*, p. 1445-51.
- [6] P. Kintz, L. Gheddar, J.S. Raul, Testing for anabolic steroids in human nail clipping, *J. Forensic Sci.*, **2021**, *66*, p. 1577-82.
- [7] P. Kintz, L. Gheddar, A. Ameline, N. Arbouche, J.S. Raul, Hair testing for doping agents. What is known and what remains to do, *Drug Test. Anal.*, **2020**, *12*, p. 316-322.
- [8] L. Rivier, Is there a place for hair analysis in doping controls? *Forensic Sci. Int.*, **2000**, *107*, p. 309-323.
- [9] A. Petoczi *et al.*, Incongruence in doping related attitudes, beliefs and opinions in the context of discordant behavioural data: in which measure do we trust? *PLoS One*, **2011**, *6*, p. e18804.
- [10] D. Thieme, Potential and limitations of alternative specimens in doping control, *Bioanalysis*, **2012**, *4*, p. 1613-22.
- [11] M. Thevis, M. H. Geyer, L. Tretzel, W. Schänzer, Sports drug testing using complimentary matrices: Advantages and limitations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, *130*, p. 220-230.
- [12] P. Kintz, V. Cirimele, B. Ludes, Pharmacological criteria that can affect the detection of doping agents in hair, *Forensic Sci. Int.*, **2000**, *107*, p. 325-334.
- [13] P. Kintz, Hair analysis in forensic toxicology: an update review with a special focus on pitfalls, *Curr. Pharm. Des.*, **2017**, *23*, p. 5480-86.
- [14] J.J. Palamar, A. Salomone, On the challenges of hair testing to detect underreported substance use in research settings, *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, **2023**, *19*, p. 1-4.
- [15] D. Cappelle *et al.*, Keratinous matrices for the assessment of drugs of abuse consumption: a correlation study between hair and nails. *Drug Test Anal.*, **2018**, *10*, p. 1110-18.
- [16] P. Kintz, What are the prerequisites to account for "no fault" in doping control after an adverse analytical finding possibly due to drug contamination? Perspective from a hair testing analyst, *J. Anal. Toxicol.*, **2021**, *45*, e3-e5.
- [17] P. Kintz, Drug transfer during intimate moments: a key issue in doping control that can be documented by hair tests of the athlete and the partner, *Med. Sci. Law*, **2023**, *64*, p. 72-76.
- [18] P. Kintz, Dopage sportif : appliquer les principes de la toxicologie judiciaire. À propos de 3 cas dans le tennis, l'athlétisme et le football, *Rev. Med. Leg.*, **2016**, *7*, p. 81-83.
- [19] P. Kintz, Contrôles anti-dopage : trop, pas assez, autrement ? *Toxicol. Anal. Clin.*, **2020**, *32*, p. 141-143.
- [20] P. Kintz, The forensic response after an adverse analytical finding (doping) involving a selective androgen receptor modulator (SARM) in human athlete, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2022**, *207*, 114433.
- [21] L. Gheddar *et al.*, The power of keratinous matrices (head hair, body hair and nail clippings) analysis in a case of death involving anabolic agents, *J. Anal. Toxicol.*, **2023**, *46*, p. e307-e313.
- [22] P. Kintz, V. Cirimele, B. Ludes, Discrimination of the nature of doping with 19-norsteroids through hair analysis, *Clin. Chem.*, **2000**, *46*, p. 2020-22.
- [23] F. Aknouche *et al.*, Anabolic steroids and extreme violence: a case of murder after chronic intake and acute influence of metandienone and trenbolone, *Int. J. Leg. Med.*, **2021**, *135*, p. 1449-53.
- [24] P. Kintz *et al.*, In a case of death involving steroids, hair testing is more informative than blood or urine testing, *J. Anal. Toxicol.*, **2021**, *45*, p. 829-834.
- [25] L. Gheddar *et al.*, Testing for trenbolone, an anabolic steroid, in biological fluids and head hair in a post-mortem case, *J. Anal. Toxicol.*, **2021**, *46*, p. e88-e91.
- [26] P. Kintz *et al.*, Complete post-mortem investigations in a death involving denbuterol after long-term abuse, *J. Anal. Toxicol.*, **2019**, *43*, p. 660-665.
- [27] www.canoeicf.com/news/icf-decision-laurence-vincent-lapointe (consulté le 08/01/24).
- [28] www.usada.org/sanction/madilyn-nickles-found-at-no-fault/ (consulté le 11/07/23).
- [29] www.usada.org/sanction/virginia-fuchs-found-not-at-fault/ (consulté le 11/07/23).

Pascal KINTZ^{1,2}, professeur conventionné.

¹Institut de médecine légale, Strasbourg.

²X-Pertise Consulting, Mittelhausbergen.

* pascal.kintz@wanadoo.fr

Le cannabidiol (CBD) est-il un produit dopant ?

Résumé Le cannabidiol (CBD) est un cannabinoïde présent dans les plantes de *Cannabis sativa et indica*. Il présente des propriétés anxiolytiques, anti-inflammatoires et permet également de réduire le temps de récupération après un effort physique. Du fait des effets positifs qu'il peut offrir, le CBD est utilisé par les sportifs professionnels et amateurs. L'usage des cannabinoïdes est réglementé dans le sport et ces produits sont interdits en compétition excepté le CBD. En effet, ce dernier a été retiré de la liste des produits interdits en 2018, car il a été reconnu sans risque pour la santé des sportifs. Néanmoins, son utilisation dans le sport continue à soulever des questions légales, éthiques et sanitaires. Peu d'études cliniques existent, mais certaines montrent que l'utilisation du CBD peut engendrer des effets indésirables comme une toxicité hépatique. Enfin, l'utilisation de CBD peut entraîner des violations involontaires des règles antidopage, car le CBD vendu sur le marché peut contenir du THC (interdit en France) ainsi que d'autres cannabinoïdes pouvant conduire à une suspension de la pratique sportive.

Mots-clés Cannabidiol, CBD, sport, dopage.

Abstract Sport and doping: is cannabidiol (CBD) a doping substance?

Cannabidiol (CBD) is a cannabinoid naturally present in *Cannabis sativa* and *indica* plants. It has anxiolytic and anti-inflammatory properties. It allows reducing recovery time after physical activity. Thanks to these positive effects, CBD is used by professional and amateur athletes. The use of cannabinoids in sport is regulated and these substances are banned in competition, except for CBD. Indeed, the latter was removed from the list of prohibited substances in 2018, as it has been recognized safe for athlete's health. Nevertheless, its use in sport continues to raise legal, ethical and health issues. Few clinical studies exist, but some show that CBD use can give rise to adverse effects such as liver toxicity. The use of CBD can lead to unintentional anti-doping violations, as CBD sold on the market may contain THC as well as other cannabinoids, which can lead to suspension of the athlete.

Keywords Cannabidiol, CBD, sport, doping.

Le cannabidiol (CBD) est un composé naturellement présent dans les plantes de *Cannabis Sativa* et *Indica*. Il en a été isolé pour la première fois en 1940 par Adams et son équipe [1]. Les plantes de cannabis contiennent plus de 150 cannabinoïdes, dont le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) et le CBD. Ces derniers sont retrouvés dans les plantes en plus grande quantités par rapport aux autres cannabinoïdes. Contrairement au THC, le CBD est présenté comme n'ayant pas d'effet psychoactif : c'est pour cette raison que sa vente, son achat et sa consommation sont tolérés, même si son utilisation reste controversée. Le CBD est également utilisé dans des traitements contre les crises convulsives chez l'adulte et l'enfant de plus de deux ans sous forme de solution buvable (Epidyolex 100 mg/mL). Le CBD est par ailleurs très apprécié par la population générale, ce qui en fait un vrai phénomène de mode qui n'épargne pas la population sportive. Cet alternatif au cannabis attire dans des points de vente divers et variés des clients de plus en plus nombreux, car les produits commercialisés sont présentés comme étant inoffensifs pour la santé. Les dérivés du CBD présentent, selon leurs vendeurs, de nombreuses vertus comme le soulagement musculaire, une récupération physique plus rapide, un sommeil réparateur ou encore la diminution de l'anxiété. Dans cet article, les auteurs font le point sur la place du CBD dans le milieu du sport.

CBD et sport : la réglementation

Les cannabinoïdes, dont les cannabinoïdes naturels (par exemple le THC) et de synthèse (par exemple le dronabinol), sont interdits en compétition sportive par l'Agence mondiale antidopage (AMA) qui les a classés S8 dans la Liste standardisée des substances et méthodes interdites du Code mondial

antidopage [2]. On estime qu'en 2021 les cannabinoïdes naturels et de synthèse représentaient 4 % des résultats analytiques anormaux lors des contrôles antidopage.

Pour qu'une substance soit interdite par l'AMA et apparaisse dans la liste des produits interdits, la substance devra remplir au moins deux des critères suivants, comme décrits dans le Code [3] :

- la substance a le potentiel d'améliorer les performances physiques et/ou mentales du sportif ;
- la substance représente un risque pour la santé du sportif ;
- l'utilisation de la substance est contraire à l'esprit du sport.

Comme les autres cannabinoïdes, le CBD était interdit en compétition par l'AMA. Aujourd'hui, ce n'est plus le cas : en effet, il a été retiré en 2018 de la liste des substances interdites car il a été reconnu sans risque avéré pour la santé des sportifs. À ce jour, les produits de CBD purs sont donc autorisés dans le milieu sportif et leur utilisation n'est pas considérée comme une pratique dopante [4].

L'utilisation du CBD améliore-t-elle les performances physiques ?

Avec les effets positifs que le CBD présente, cette molécule s'est largement répandue dans le milieu du sport amateur et professionnel. Les médias en parlent largement et en vantent souvent ses vertus. De nombreuses propriétés du CBD peuvent séduire les sportifs, notamment les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques afin de diminuer les douleurs dues à l'effort, les propriétés anxiolytiques afin de réduire le stress, ce qui est recherché dans tous les sports pour augmenter la concentration, les propriétés neuroprotectrices ou encore l'influence sur le sommeil [5]. Ces différents effets

Produits analysés	Résultats
Huiles de CBD, teinture, liquide de vaporisation [12]	42,9 % : sous-dosé 26,2 % : surdosé 30,9 % : étiquetages corrects Autres cannabinoïdes (non annoncés) : THC, CBDA, CBG.
Produits (huile, thé, chewing-gum, fleurs de chanvre) [13]	Parmi 67 produits analysés : 25 % contenaient THC à haute dose (> 2,5 mg/jour) CBD sous-dosé
Produits de CBD (CBD seul, à large spectre) [14]	Parmi 80 produits analysés : 52 sur 80 : [THC] de 0,008 à 2,071 mg/mL 21 sur 80 « <i>THC free</i> », dont 5 sur 21 [THC] de 0,015 à 0,656 mg/mL

Figure 1 - Analyse de produits à base de CBD.

recherchés par les sportifs font penser à de la pratique dopante. Néanmoins, tous ces effets positifs n'ont pas été démontrés chez l'homme par la communauté scientifique. Très peu d'études existent et n'ont été réalisées que sur des modèles cellulaires ou sur des animaux. Une seule étude d'observation a été réalisée chez l'homme. En 2020, Kasper et son équipe se sont intéressés à l'utilisation du CBD par des rugbymen professionnels. 517 sportifs ont participé au sondage. 68 % des consommateurs réguliers ont rapporté avoir ressenti des effets positifs, dont la réduction des courbatures, la diminution du temps de récupération ou encore l'amélioration de la qualité du sommeil [6].

Impact sur la santé

Contrairement à ce que rapportent les médias, le CBD ne serait pas inoffensif. Plusieurs effets négatifs ont été décrits dans la littérature. Certains auteurs rapportent une modification du comportement, des troubles gastro-intestinaux, une hépatotoxicité, une altération de la fertilité ou encore des effets tératogènes à la suite de la consommation de CBD à haute dose [7-9]. Mais ces effets négatifs n'ont pas été démontrés chez l'homme ; la plupart des données disponibles sont, comme pour les effets positifs, des études précliniques réalisées sur l'animal ou sur des modèles cellulaires. Le manque de données scientifiques concernant les effets positifs (amélioration de la performance) et négatifs (risque pour la santé) du CBD chez l'homme ne permet pas d'interdire son utilisation dans le sport.

Risque de dopage non intentionnel

Composition réelle des produits

Les produits à base de CBD ne sont pas interdits dans le sport, mais certaines limites sont à prendre en compte. Sans analyse, il est difficile d'être certain de la composition exacte de ces produits. L'AMA met en garde les sportifs qui voudraient utiliser du CBD en indiquant dans le Code que certains produits de CBD extraits à partir de plants de chanvre pourraient contenir du THC et ainsi déclencher un résultat analytique anormal dans les urines d'un sportif. Cela a été observé en 2019 chez une skieuse de free-style, Devin Logan, et chez une pratiquante d'Ironman, Lauren Gross. À la suite de l'utilisation de produits à base de CBD, leurs urines ont montré des résultats anormaux pour le THC-COOH, un des principaux métabolites du THC. Le seuil de décision du THC-COOH ayant été fixé par l'AMA à 150 ng/mL dans les urines [10], les deux sportives ont respectivement été suspendues 3 et 6 mois.

Les questions suivantes peuvent se poser :

- Quels sont les produits de CBD qui circulent en boutique et sur Internet ?

- Retrouve-t-on d'autres cannabinoïdes dans les produits vendus comme CBD ?

Depuis 2015, l'intérêt pour le CBD s'est intensifié. On le retrouve donc en vente via des sites marchands sur Internet ou encore dans des magasins spécialisés, et cela sous plusieurs formes (fleurs de chanvre, complément nutritionnel, nourriture, produit cosmétique...). La vente en ligne est inquiétante car les produits peuvent présenter des taux importants de THC (au-dessus de la valeur légale européenne, c'est-à-dire 0,3 % [11]) ou contenir des cannabinoïdes naturels et de synthèse, ce qui peut engendrer des problèmes légaux et de santé. Trois équipes ont mené en laboratoire des études visant à déterminer ce qui pouvait être présent dans les produits à base de CBD (figure 1).

Les produits vendus comme CBD peuvent être adultérés (CBDA, CBG, THC) et les quantités présentées sur l'étiquetage peuvent ne pas être correctes. Même vendu avec la mention « *Free THC* », d'autres cannabinoïdes peuvent être présents. C'est d'ailleurs le cas avec les produits vendus comme « CBD à spectre large ». Il faut donc porter une grande importance à ces produits, et notamment ceux vendus en ligne. Ces produits présentés comme bénéfiques pour l'utilisateur pourraient se révéler nocifs pour sa santé.

La consommation de CBD peut-elle engendrer un dopage non intentionnel ?

Le test a été réalisé par l'équipe de Thevis, directeur du Laboratoire antidopage de Cologne. Deux études ont été menées, dont une sur la consommation de produits à base de CBD et la seconde sur des produits à base de chanvre. La première étude a été menée sur huit participants qui ont consommé par voie orale des produits à base de CBD. Les urines ont été collectées à 0, 6, 16 et 32 heures. Le THC-COOH a été détecté avec des valeurs sous le seuil de décision de l'AMA (150 ng/mL). Néanmoins, huit échantillons étaient encore positifs après 32 heures (avec la présence des cannabinoïdes suivants : CBG, CBN, CBDV, CBGA, CBDVA, CBDA) [15]. L'utilisation de ces produits aurait donc pu mener à une violation involontaire des règles antidopage avec la présence des cannabinoïdes CBGA, CBDVA ou encore CBDA dans les urines, qui sont strictement interdits en compétition (molécules sans seuil décisionnel selon l'AMA). Dans une seconde étude clinique, 22 participants ont ingéré des produits à base de chanvre (administration orale). Les urines ont été collectées à 0, 8, 16 et 32 heures. Les résultats ont montré que sept échantillons urinaires étaient positifs

à des cannabinoïdes interdits (CBG, CBDV, CBGA) à 32 h, ce qui aurait, comme dans la première étude, provoqué une violation involontaire des règles antidopage [16].

L'absence ou la présence de THC avec une faible concentration n'aurait pas pu provoquer une violation des règles antidopage dans les études précédentes. Néanmoins, certains athlètes ont été contrôlés positifs pour le THC-COOH dans les urines, après consommation ou utilisation de CBD qui aurait été contaminé avec du THC.

Selon une étude de 2004, la consommation orale d'une faible dose de THC (0,4 mg) peut entraîner une concentration de THC-COOH dans les urines de 20 ng/mL [17]. Ces résultats peuvent expliquer qu'une contamination de THC dans un produit de CBD pourrait provoquer des résultats anormaux dans les urines et donc une violation des règles antidopage.

Transformation par l'organisme du CBD en THC : mythe ou réalité ?

Une excuse que les utilisateurs peuvent fournir en cas de dépistage positif est la transformation du CBD en THC par l'organisme. À ce jour, il n'y a pas de preuve solide quant à la transformation du CBD en Δ^9 -THC chez l'homme [18]. Cela a été vérifié chez des consommateurs uniques et réguliers de CBD. Dans une première étude menée en France, un volontaire sain a consommé de manière unique une gélule de CBD dosé à 22 mg. La gélule contenait seulement du CBD. Les urines et les poils de barbe ont été prélevés : le THC n'a été détecté ni dans les urines, ni dans les poils [19]. Le constat est le même dans une seconde étude menée par Rodrigues et son équipe. L'objectif était de rechercher du THC, du CBN et du CBD dans les cheveux de consommateurs réguliers de CBD (4-320 mg/jour *per os*). L'analyse des cheveux n'a pas permis de mettre en évidence d'autres cannabinoïdes [20].

Les auteurs des deux études ont conclu que l'utilisation de CBD pur ne pouvait pas donner de réponse positive en THC dans les cheveux ou dans les urines.

CBD et compétition sportive

Le CBD n'est pas interdit en compétition par l'AMA. Ce cannabinoïde naturel est très apprécié par les sportifs professionnels et amateurs malgré les études préliminaires qui montrent que, chez l'animal, certains effets négatifs sur la santé ont été observés. À ce jour, les effets positifs – observés par les consommateurs – et les effets négatifs n'ont pas été démontrés chez l'homme. Les produits de CBD peuvent contenir du THC ainsi que d'autres cannabinoïdes qui, eux, sont interdits par l'AMA et qui peuvent provoquer des cas de dopage non intentionnels et non volontaires. Pour remédier à cette problématique, la communauté scientifique recommande au sportif d'être suivi par le corps médical en cas d'utilisation de CBD, de se renseigner sur la composition exacte du produit et d'éviter les produits vendus sur Internet qui sont moins surveillés. En effet, c'est au sportif d'être vigilant à ce qu'il consomme.

L'utilisation du CBD continue à soulever beaucoup de question, notamment sur la santé et sur l'amélioration des performances qui sont des critères d'inclusion dans la liste des produits interdits par l'AMA.

- [1] R. Adams, M. Hunt, J.H. Clark, Structure of cannabidiol, a product isolated from the marijuana extract of Minnesota wild hemp I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 62, p. 196-200.
- [2] www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-09/2024list_en_final_22_september_2023.pdf (consulté le 07/01/24).
- [3] www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada_anti-doping_code_2021_french_v9.pdf (consulté le 07/01/24).
- [4] www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_summary_of_modifications_en.pdf (consulté le 07/01/24).
- [5] F.-X. Gamelin *et al.*, L'usage du cannabidiol dans le sport : une bonne idée ?, *Science & Sports*, **2021**, 36, p. 251-258.
- [6] A. Kasper *et al.*, High prevalence of cannabidiol use within male professional rugby union and league players: a quest for pain relief and enhanced recovery, *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, **2020**, 30, p. 315-322.
- [7] M.A. Huestis *et al.*, Cannabidiol adverse effects and toxicity, *Curr. Neuropharmacol.*, **2019**, 17, p. 974-989.
- [8] R.K. Carvalho *et al.*, Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male swiss mice, *J. Appl. Toxicol.*, **2018**, 38, p. 1215-23.
- [9] D.R. Carty, C. Thornton, J.H. Gledhill, K.L. Willett, Developmental effects of cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol in zebrafish, *Toxicol. Sci.*, **2018**, 161, p. 137-145.
- [10] www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-09/2023list_explanatory_list_fr_final_26_september_2022.pdf (consulté le 07/01/24).
- [11] www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044793213 (consulté le 07/01/24).
- [12] M.O. Bonn-Miller *et al.*, Labeling accuracy of cannabidiol extracts sold online, *JAMA*, **2017**, 318, p. 1708-09.
- [13] D.W. Lachenmeier, P. Diel, A warning against the negligent use of cannabidiol in professional and amateur athletes, *Sports*, **2019**, 7, p. 251-256.
- [14] E. Johnson, M. Kilgore, S. Babalonis, Cannabidiol (CBD) product contamination: quantitative analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations found in commercially available CBD products, *Drug and Alcohol Depend.*, **2022**, 237, art. 109522.
- [15] U. Mareck *et al.*, Preliminary data on the potential for unintentional anti doping rule violations by permitted cannabidiol (CBD) use, *Drug. Test. Anal.*, **2021**, 13, p. 539-549.
- [16] U. Mareck *et al.*, Risk of unintentional antidoping rules violations by consumption of hemp products, *Drug Test. Anal.*, **2022**, 15, p. 27-41.
- [17] R.A. Gustafson *et al.*, Urinary pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-delta-tetrahydrocannabinol after controlled oral delta-9-tetrahydrocannabinol administration, *J. Anal. Toxicol.*, **2004**, 28, p. 160-167.
- [18] P. Kintz, Vaping pure cannabidiol e-cigarettes does not produce detectable amount of Δ^9 -THC in human blood, *J. Anal. Toxicol.*, **2020**, 44, p. e1-e2.
- [19] A. Ameline, J.-S. Raul, P. Kintz, Characterization of cannabidiol in alternative biological specimens and urine, after consumption of an oral capsule, *J. Anal. Toxicol.*, **2022**, 46, Issue 2, p.170-175.
- [20] A. Rodrigues, M. Yegles, N. Van Elsué, S. Schneider, Determination of cannabinoids in hair of CBD rich extracts consumers using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), *Forensic Sci. Int.*, **2018**, 292, p. 163-166.

Laurie GHEDDAR¹, ingénieure d'étude, et Pascal KINTZ^{1,2}, professeur conventionné.

¹Institut de médecine légale, Strasbourg.

²X-Pertise Consulting, Mittelhausbergen.

* l.gheddar@gmail.com



Émergence des bio-thérapeutiques et implications pour le bien-être animal et le contrôle antidopage équin

Résumé Au cours des dernières décennies, les anticorps monoclonaux et protéines de fusion Fc ont connu un essor important en médecine humaine pour le traitement de diverses pathologies telles que les cancers, notamment grâce à leur grande spécificité d'action. Toutefois, comme tout médicament, ce type de substance peut être détourné de son utilisation dans une tentative de dissimulation d'une pathologie ou d'augmentation des performances dans le milieu du sport équestre. De plus, ces composés, s'ils sont administrés de façon répétée, peuvent occasionner des réactions immunitaires dangereuses pour les chevaux. Pour ces raisons, les instances internationales hippiques interdisent formellement leur utilisation. Ainsi, les laboratoires de contrôle antidopage mettent à profit des stratégies analytiques performantes basées sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse afin de contrôler de façon efficace l'abus de ces substances chez les athlètes équins.

Mots-clés Chevaux, peptides, anticorps monoclonaux, mAb, protéines de fusion, spectrométrie de masse.

Abstract **The rise of biotherapeutic and implications for animal welfare and equine doping controls**

In the past few decades, monoclonal antibodies and Fc fusion proteins have known an important rise in targeted therapies for various human diseases such as cancers through their high specificity. However, similarly to other classes of medicines, any substance can be misused in an attempt to hide a pathology or to enhance physical performances. Moreover, these substances can generate dangerous immune reactions in horses in case of repeated administrations. Thus, their use is considered as strictly forbidden by international horse racing authorities. Consequently, doping control laboratories develop sensitive analytical strategies based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry to control these compounds in an efficient fashion in equine athletes.

Keywords Horses, peptides, monoclonal antibodies, mAb, fusion proteins, mass spectrometry.

Le contrôle antidopage des chevaux

Les laboratoires de contrôle antidopage des chevaux de course font continuellement face à de nouvelles menaces émergentes en lien avec le développement de substances thérapeutiques novatrices produites par l'industrie pharmaceutique. En effet, des composés chimiques sont régulièrement approuvés par les autorités de santé telles que l'Agence européenne des médicaments (EMA) ou la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de diverses pathologies humaines, sans pour autant que leur utilisation soit autorisée en médecine vétérinaire équine. De plus, chez l'homme ou le cheval, il est fréquent que des substances n'ayant pas franchi les étapes successives des études cliniques, indispensables à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché, soient saisies par les services douaniers ou détectées par les laboratoires de contrôle. Les autorités hippiques nationales et internationales interdisent l'utilisation de ces substances afin de garantir le bien-être animal, l'équité des courses et la sélection des reproducteurs basée sur leurs seules qualités intrinsèques. De plus, les chevaux peuvent être les premières victimes de leur environnement anthropique, notamment lorsque celui-ci est dépourvu d'éthique, ce qui requiert une vigilance accrue et une pression de contrôle antidopage élevée. Dans ce contexte, les laboratoires de contrôle antidopage s'appliquent à développer des stratégies de détection toujours plus polyvalentes et performantes pour couvrir l'intégralité des familles chimiques susceptibles d'être administrées frauduleusement à des chevaux dans le but d'améliorer artificiellement leurs aptitudes physiques et/ou de masquer différentes pathologies.

Les bio-thérapeutiques en vogue

Au long de ces dernières années, un nombre croissant de spécialités pharmaceutiques protéiques appelées « bio-thérapeutiques » ont été mises sur le marché principalement pour le traitement de maladies inflammatoires et de cancers. D'autres sont en phase d'études cliniques pour des myopathies ou neuropathies, comme la maladie d'Alzheimer [1]. Cette classe de composés comprend diverses familles de macromolécules telles que les anticorps monoclonaux (mAb), les protéines de fusion Fc (PFc) et autres constructions protéiques (nanobodies, etc.) et, plus récemment, les dérivés d'acides nucléiques (vaccin ARNm, thérapie génique, etc.). Les mAb et PFc sont des médicaments protéiques de hautes masses moléculaires basés sur un socle commun : la présence de portions de séquences d'immunoglobulines gamma humaines (IgG), ce qui leur confère une stabilité élevée et une tolérance importante pour les patients traités (figure 1). Les mAb sont des anticorps thérapeutiques dont l'affinité pour une protéine spécifique, impliquée dans une maladie, permet un ciblage efficace et assure en général l'inactivation ou la neutralisation de la cible. À l'inverse, les PFc sont des molécules hybrides comprenant d'une part des séquences d'immunoglobulines du fragment cristallisable « Fc » et, d'autre part, une protéine dont le rôle sera d'activer ou d'inactiver un processus biologique en lien avec une pathologie. Ainsi, les mAb et PFc possèdent des caractéristiques communes : ce sont des protéines, produites par génie génétique, généralement composées de séquences humaines, de hautes masses moléculaires (majoritairement > 100 kDa) et qui contiennent des séquences protéiques d'IgG « Fc ». De plus, certains mAb

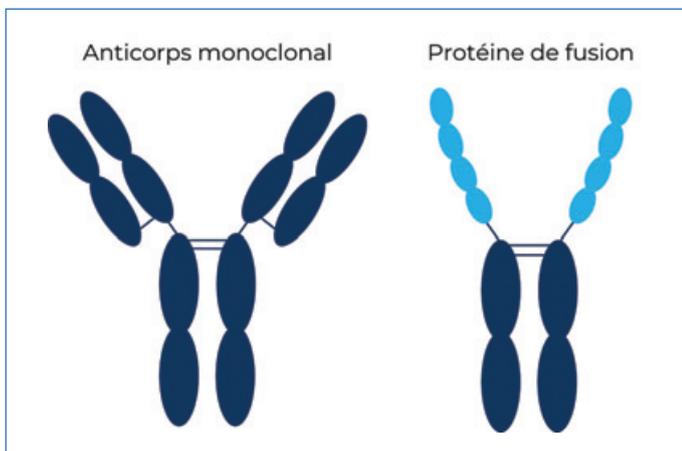


Figure 1 - Représentation schématique des anticorps monoclonaux et protéines de fusion Fc.

possédant des propriétés utiles en médecine humaine ont récemment été transposés au traitement de pathologies canines et félines.

La réponse des laboratoires de contrôle

Dans ce contexte, des méthodes de chimie analytique employant la spectrométrie de masse et qui assurent l'identification formelle des mAb et Pfc ont récemment été décrites par des laboratoires de contrôle antidopage humains et équins [2-4]. Ces stratégies analytiques permettent notamment de détecter des mAb et Pfc composés de séquences humaines et murines dans le plasma humain ou équin à des concentrations de l'ordre de quelques centaines de ng/mL. En ce qui concerne le contrôle antidopage des chevaux de course et sport équestre, l'intérêt d'étudier les mAb et Pfc est multiple. D'une part, ces substances peuvent masquer certaines pathologies (propriétés anti-inflammatoires) et sont susceptibles d'améliorer artificiellement les performances sportives des chevaux de compétition (pouvoir anabolisant, stimulation de l'érythropoïèse). D'autre part, elles peuvent aussi générer des réactions immunitaires importantes, voire dangereuses pour l'animal. Afin d'en assurer une détection efficace et spécifique dans les

matrices équines, il est nécessaire de réaliser les alignements de séquences en acides aminés des protéines recherchées par rapport aux séquences équines endogènes déduites des annotations génétiques [5-6] et des bases de données de médicaments [7-8]. Ainsi, il devient possible d'en déduire des éléments caractéristiques qui assurent leur détection spécifique par des approches de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Récemment, une méthode de dépistage à haut débit des mAb et Pfc pour le contrôle antidopage équin a été décrite [4]. Elle repose sur l'analyse ciblée de séquences peptidiques caractéristiques issues de la digestion de ces macromolécules par une enzyme protéolytique (trypsine). Les peptides ainsi obtenus sont purifiés par extraction en phase solide sur plaque 96 puits et analysés par chromatographie en phase liquide d'ultra haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem de haute résolution (HRMS/MS). Dans cet article, les auteurs exploitent les différences de composition en acides aminés entre les séquences des bio-thérapeutiques et les séquences d'IgG équines endogènes pour permettre la détection spécifique d'une large gamme de spécialités (figure 2). Enfin, un atout majeur de cette méthode tient dans son aptitude à être élargie à des cibles peptidiques additionnelles, modulables en fonction des besoins et de l'arrivée de nouveaux bio-thérapeutiques sur le marché. Par conséquent, pour faire face à l'émergence de spécialités pharmaceutiques vétérinaires destinées aux chiens et chats de compagnie, les séquences correspondantes aux portions d'IgG canines et félines ont été ajoutées à la méthode de dépistage.

Exemple de détection spécifique de mAb

La figure 3 présente un exemple d'analyse de mAb sous la forme de chromatogrammes d'ions extraits pour chacun des peptides protéotypiques spécifiques des espèces décrites dans le tableau précédent (figure 2), obtenus après analyse par UHPLC couplée à un spectromètre de masse de type *quadrupole time of flight* (QTOF) équipé d'une cellule de mobilité ionique de type *trapped ion mobility spectrometry* (TIMS). Les chromatogrammes d'ions fragments présentés

N° Uniprot / NCBI	Nom	Espèce	Positions	Séquence	m/z [M + 3H] ³⁺
CAC44761.1	Immunoglobulin gamma 2 heavy chain constant region, partial	<i>Equus caballus</i>	195-210	R.VVSVLPIQHQDWLSGK.E	602,66847
P0DOX5	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	<i>Homo sapiens</i>	304-319	R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E	603,34035
AAL35302.1	Immunoglobulin gamma heavy chain B	<i>Canis lupus</i>	319-332	R.VVSVLPIGHQDWLKGK.G	530,97160
AHH34165.1	Immunoglobulin G2 heavy chain constant region, partial	<i>Felis catus</i>	188-203	R.VVSVLPILHQDWLKGK.E	549,65913

Figure 2 - Exemple d'alignement de séquences d'une portion d'IgG équine et homologues humaines, canines et félines présentes dans les séquences de mAb et Pfc commercialisés ou en cours d'études. Les acides aminés marqués en rouge correspondent aux sites de clivage protéolytique de la trypsine, tandis que ceux marqués en bleu montrent la différence de séquence qui existe entre la séquence équine et les autres. La portion soulignée correspond au peptide de digestion enzymatique par la trypsine et le m/z indiqué correspond à la masse mono-isotopique de l'état de charge le plus abondant pour chacun des peptides soulignés.

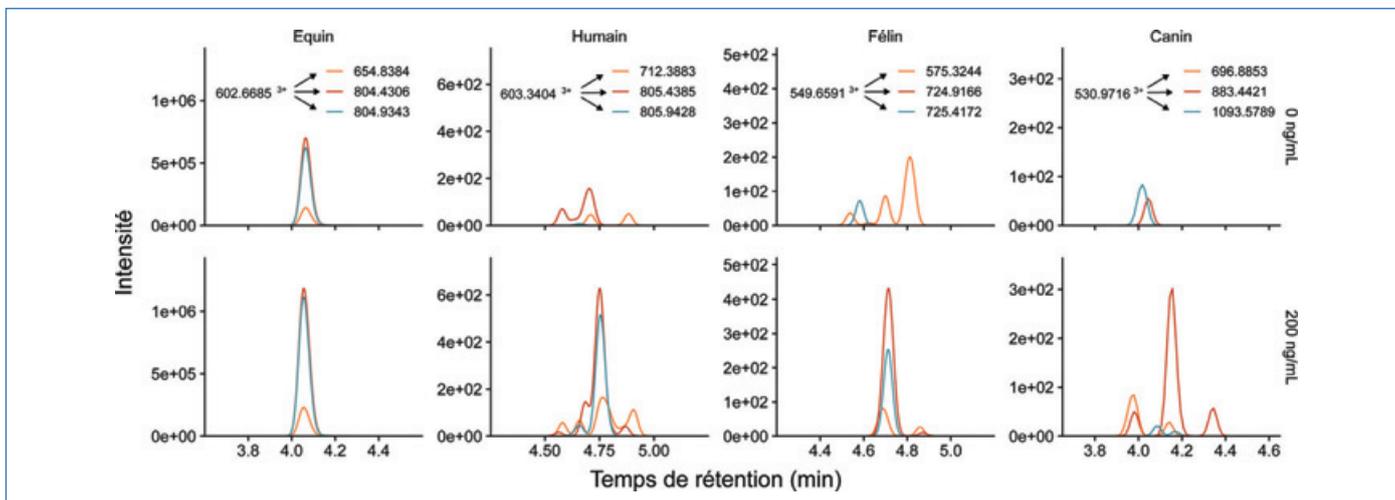


Figure 3 - Chromatogrammes d'ions extraits des fragments de chacun des peptides protéotypiques obtenus après analyse d'un extrait de plasma équin dans lequel aucun mAb n'a été ajouté (haut), et dans lequel les mAb *Tocilizumab* (mAb humain), *Bedinvetmab* (mAb canin) et *Frunevetmab* (mAb félin) ont été ajoutés à une concentration de 200 ng/mL (environ 1,33 pmol/mL) (bas). L'extraction sur la mobilité a été fixée à $1/KO \pm 0,015 \text{ V/s/cm}^2$ et la précision de mesure de masse à 10 mDa par rapport aux valeurs de références de chacun des peptides.

(figure 3, haut) illustrent la spécificité de détection dans un extrait de plasma équin dans lequel aucun mAb n'a été introduit. Par conséquent, seul le peptide protéotypique équin endogène de l'IgG produite naturellement est détecté. De plus, aux temps de rétention caractéristiques des peptides cibles correspondant aux espèces humaines, félines et canines, aucun signal spécifique n'est détecté. En revanche, après analyse des chromatogrammes d'ions extraits d'un plasma équin supplémenté avec 200 ng/mL (environ 1,33 pmol/mL pour une masse molaire d'environ 150 kDa) de mAb humain (*Tocilizumab*), canin (*Bedinvetmab*) et félin (*Frunevetmab*), il est possible de détecter plusieurs ions fragments spécifiques des peptides protéotypiques des mAb correspondant aux différentes espèces, en plus de ceux de l'IgG équine endogène (figure 3, bas). Lors des analyses de contrôle antidopage, lorsqu'un tel signal est détecté, une séquence analytique de confirmation est déclenchée afin d'attester la présence formelle de la molécule dans l'échantillon conformément aux exigences réglementaires (ILAC-G7 : 04/2021).

Vers une méthode de dépistage innovante

Les laboratoires pharmaceutiques développent continuellement de nouveaux composés afin d'améliorer le traitement des patients. De fait, de nouvelles substances sont régulièrement évaluées lors d'études cliniques et, éventuellement, autorisées afin d'être commercialisées pour utilisation chez l'homme. Les bio-thérapeutiques comme les mAb et Pfc sont des médicaments présentant un intérêt grandissant en médecine humaine, mais également médecine vétérinaire, notamment grâce à leur efficacité, leur aptitude à atteindre précisément et spécifiquement leur cible et leur tolérance. Toutefois, étant donné que ces molécules sont composées pour le moment de séquences humaines, canines, félines ou murines, elles peuvent occasionner des réactions immunitaires potentiellement dangereuses si elles sont administrées à des équidés de manière répétée. De plus, ces substances peuvent potentiellement masquer certaines pathologies et/ou améliorer artificiellement les performances des chevaux de courses et de sport. Pour ces raisons, les instances nationales et internationales interdisent leur usage chez le cheval. Pour faire face à cette situation, les laboratoires de contrôle

antidopage doivent développer régulièrement de nouvelles méthodes et des stratégies analytiques innovantes pour contrôler tous ces nouveaux produits. Ainsi, le laboratoire français de contrôle antidopage des courses hippiques et de sports équestres (GIE LCH) en collaboration avec l'équipe du Laboratoire innovations en spectrométrie de masse pour la santé (LI-MS) du CEA Saclay ont récemment développé une méthode de dépistage innovante des mAb et Pfc d'origine humaine, qui a ensuite été élargie pour le dépistage des mêmes entités protéiques, mais provenant d'autres espèces comme les animaux de compagnie.

Les auteurs remercient l'Association nationale de la recherche et de la technologie (ANRT) et l'Institut français du cheval et de l'équitation (IFCE) pour le support financier apporté (projet IGGDOP). Ils remercient également l'équipe de l'unité de recherche de la Fédération nationale des courses hippiques (FNCH), à Goustranville. Le GIE LCH est reconnaissant envers le laboratoire Roche pour la généreuse donation de Tocilizumab.

- [1] <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04437511> (consulté le 12/01/24).
- [2] K. Walpurgis *et al.*, Detection of the human anti-ActRII antibody bimagrumab in serum by means of affinity purification, tryptic digestion, and LC-HRMS, *Proteomics Clin Appl.*, **2018**, *12*(3), e1700120.
- [3] F. Guan, M.A. Robinson, L.R. Soma, Confirmatory analysis of etanercept in equine plasma by LC-MS for doping control, *Drug Test. Anal.*, **2017**, *9*(9), p. 1421-31.
- [4] J. Pinetre *et al.*, High-throughput untargeted screening of biotherapeutic macromolecules in equine plasma by UHPLC-HRMS/MS: Application to monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins for doping control, *Drug Test. Anal.*, **2023**, DOI: 10.1002/dta.3525.
- [5] N.A. O'Leary *et al.*, Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation, *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*(D1), D733-745.
- [6] UniProt Consortium, UniProt: a hub for protein information, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, D204-212.
- [7] D.S. Wishart *et al.*, DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration, *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *34*, D668-672.
- [8] M. Kanehisa *et al.*, KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs, *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, D353-361.

Justine PINÈTRE^{1,2}, doctorante, **Vivian DELCOURT**¹, chercheur, **François BECHER**², chercheur, **Benjamin CHABOT**¹, technicien, **Agnès BARNABÉ**¹, ingénieure en bioinformatique, **François FENAILLE**², chercheur, **Marie-Agnès POPOT**¹, directrice R&I, **Patrice GARCIA**¹, responsable R&I, **Ludovic BAILLY-CHOURIBERRY**^{1*}, directeur de laboratoire.

¹ Laboratoire des courses hippiques GIE LCH, Verrières-le-Buisson.
² CEA, INRAE, Département médicaments et technologies pour la santé (DMTS), Université Paris-Saclay, MetaboHUB, Gif-sur-Yvette.

* l.bailly@lchfrance.fr

La détection du dopage à l'hormone de croissance : vers le module endocrinien

Résumé L'hormone de croissance (GH) est utilisée à des fins de dopage depuis les années 1980. Le nombre de cas de dopage identifiés reste cependant faible malgré l'évolution des techniques de dépistage. Deux techniques principales ont été mises en place dans les laboratoires antidopage. La méthode directe développée au début des années 2000 repose sur l'analyse différentielle de la GH exogène, ou « recombinante » (rhGH), et des formes circulantes endogènes d'origine pituitaire. Cette technique présente une fenêtre de détection limitée du fait de la dégradation rapide de la GH dans le sang. Une seconde technique de détection indirecte a été mise en place au tournant des années 2010 et repose sur l'analyse de deux biomarqueurs circulants, l'hormone peptidique IGF-I (insulin-like growth factor-I) et le facteur P-III-NP (procollagène de type III, N-terminal propeptide) qui présentent toutefois de fortes variations inter-individuelles. Une évolution a donc été entreprise pour réaliser un suivi longitudinal de ces biomarqueurs au niveau individuel, afin d'identifier d'éventuelles variations non physiologiques. Pour harmoniser également la mesure des biomarqueurs dans les différents laboratoires antidopage, une analyse d'IGF-I intacte (approche top-down) par spectrométrie de masse LC-MS/MS ou LC-HRMS a été privilégiée, alors que P-III-NP reste analysé à l'aide d'un dosage immunologique automatisé. Le « module endocrinien » qui permet de révéler les variations anormales de ces marqueurs GH au niveau individuel est un nouveau module intégré au Passeport biologique de l'athlète mis en application fin 2023 pour lutter plus efficacement contre le dopage à la GH.

Mots-clés **Dopage, hormone de croissance, biomarqueurs, sérum, Passeport biologique de l'athlète.**

Abstract **Growth hormone doping detection: towards the endocrine passport**

Growth hormone (GH) has been used for doping purposes since the 1980s. However, the number of GH doping cases identified remains low despite the development of detection techniques. Two main techniques have been implemented in antidoping laboratories. The direct method developed in the early 2000s is based on the differential analysis of recombinant GH (rhGH) and endogenous circulating forms of pituitary origin. This technique has a limited detection window due to the rapid degradation of GH in the blood. A second indirect detection technique was put in place at the turn of the 2010s and is based on the analysis of two circulating biomarkers, IGF-I peptide hormone (insulin-like growth factor-I) and P-III-NP peptide (procollagen III, N-terminal propeptide), which nevertheless show strong inter-individual variations. An evolution has therefore been undertaken to perform a longitudinal follow-up of these biomarkers at the individual level and identify potential non-physiological variations. To harmonize the measurement of biomarkers in the various antidoping laboratories, an analysis of intact IGF-I (top-down approach) by LC-MS/MS or LC-HRMS mass spectrometry was preferred, while P-III-NP will continue to be analyzed using an automated immunoassay. This "endocrine module" that should be able to reveal abnormal variations of GH markers at the individual level has been integrated as a new module to the Athlete biological passport and started at the end of 2023 to fight more efficiently GH doping.

Keywords **Doping, growth hormone, biomarkers, serum, Athlete biological passport.**

L' hormone de croissance (GH) joue un rôle essentiel dans la croissance et le développement postnatal, notamment médié par le facteur de croissance analogue à l'insuline IGF-I (insulin-like growth factor-I). Cet axe GH/IGF-I est nécessaire au maintien physiologique de l'organisme et est impliqué en cas de dérégulation dans diverses pathologies. Actuellement, la GH recombinante (rhGH) produite par les biotechnologies reste la thérapie de choix pour traiter les retards de croissance et le nanisme liés à une déficience en GH. Les sportifs peuvent détourner l'action thérapeutique de la GH pour renforcer leur musculature et améliorer leur métabolisme énergétique. La GH recombinante est de plus assez facilement disponible (production pharmaceutique et au marché noir). La détection du dopage par la GH est une des priorités de l'Agence mondiale antidopage (AMA) et des solutions ont été mises en place depuis les années 2000, mais les méthodes d'analyse continuent à se perfectionner pour gagner en sensibilité et efficacité. Cet article présente l'historique et les dernières avancées techniques mises en œuvre pour améliorer l'efficacité de la détection du dopage par la GH.

Production et rôles physiologiques de l'hormone de croissance

La GH est une hormone peptidique hétérogène constituée de plusieurs isoformes. Chez l'adulte, le gène GH-1 est exprimé principalement dans les cellules de l'hypophyse (aussi appelée glande pituitaire). Les transcrits du gène GH-1 sont épissés en deux principaux ARNm matures qui codent respectivement pour les deux formes majoritaires de la GH hypophysaire libérée dans la circulation sanguine. La première, composée de 191 acides aminés correspondant à une masse moléculaire de 22 kDa représente près de 90 % de la GH totale en circulation. La deuxième forme, de 176 acides aminés et 20 kDa, représente 5 à 10 % de la GH circulante [1]. D'autres transcrits alternatifs du gène GH-1 codent également pour des formes encore plus courtes de 16 à 18 kDa. Toutefois, seule l'isoforme 22 kDa posséderait toutes les propriétés de l'hormone de croissance. C'est d'ailleurs cette forme de 22 kDa qui est produite par génie biologique pour être utilisée à des fins thérapeutiques et est détournée à des fins de dopage.

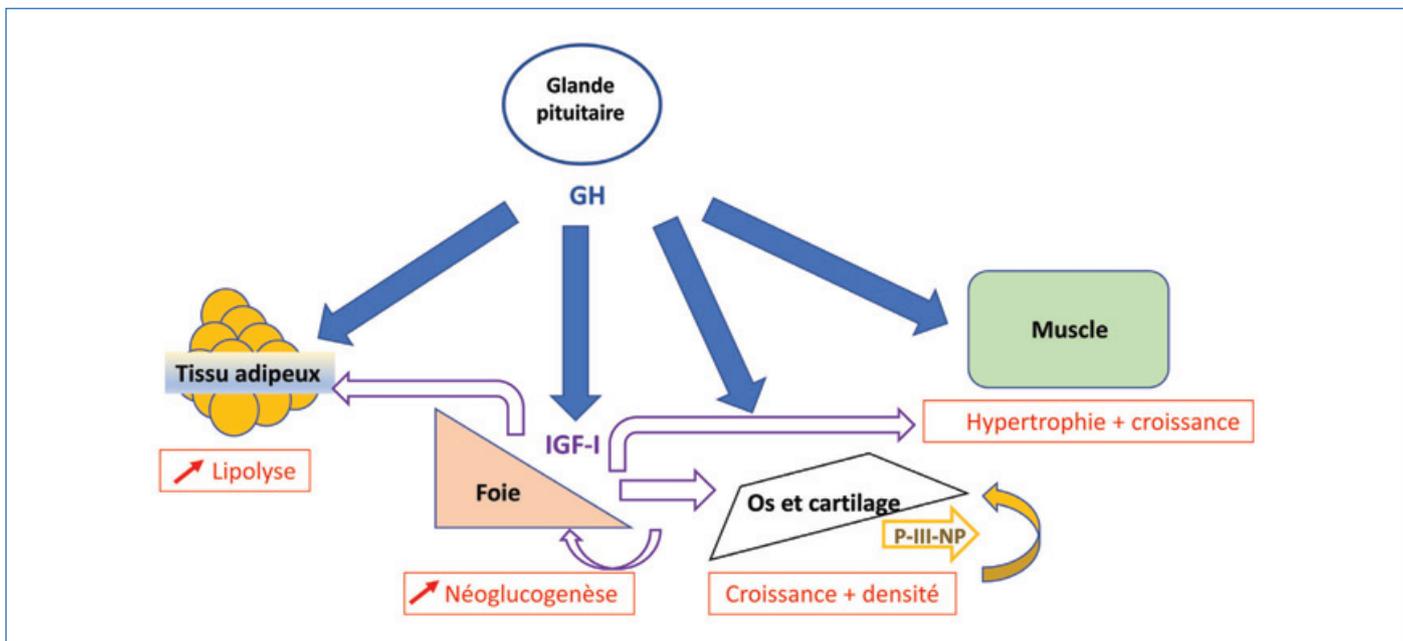


Figure 1 - Les différents effets de l'hormone de croissance.

Les formes de GH endogène circulant dans le sang sont dites pituitaires, car la glande pituitaire est leur site principal de stockage et de libération dans le sang. La GH est sécrétée de manière pulsatile selon un rythme circadien. La sécrétion et la régulation de la GH sont également influencées par différents facteurs tels que le sexe, l'âge, l'exercice physique, le sommeil, l'état nutritionnel, le stress et d'autres facteurs métaboliques [2]. Un fois dans la circulation sanguine, la GH circule sous sa forme libre, active ou sous forme de complexe limitant sa dégradation par les protéases sanguines. Elle exerce ses effets en se liant à des récepteurs appelés GHR présents dans la majorité des organes et initie plusieurs cascades de signalisation intracellulaire qui modifient l'expression de certains gènes responsables de la croissance et de l'activité cellulaire. Ceci explique les effets principaux de la GH sur la prolifération et le métabolisme énergétique glucidique [3]. Après liaison à ses récepteurs, le complexe GH-GHR est internalisé et dégradé. Seule une infime partie est éliminée dans les urines. Les effets métaboliques de la GH passent par une action directe ou indirecte par l'intermédiaire d'IGF-I, principal médiateur synthétisé par le foie en réponse à la GH (figure 1) [4]. Au niveau hépatique, la GH a un effet hyperglycémiant en stimulant la synthèse et la libération du glucose dans le sang. La GH agit également sur le tissu adipeux en stimulant l'utilisation des lipides pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. La GH possède aussi un effet anabolique au niveau du tissu osseux [5]. Elle stimule la prolifération des chondrocytes, permettant la croissance du cartilage, et des ostéoblastes, à l'origine de la synthèse osseuse et de l'augmentation du collagène. Un marqueur de cette action de la GH est le propeptide N-terminal du procollagène de type III (P-III-NP) dont l'expression sérique augmente sous l'action de la GH.

Vers une application thérapeutique

Les troubles de la croissance sont principalement causés par des anomalies d'expression ou d'action des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs. Le diagnostic des pathologies nécessite généralement une exploration fonctionnelle

de l'axe somatotrope. Cette investigation est principalement basée sur des dosages de la GH et d'IGF-I, permettant de vérifier si leur taux d'expression sont normaux et sur des tests de stimulation ou d'inhibition de la sécrétion de la GH.

La première utilisation thérapeutique de la GH à partir de 1958 a été de stimuler la croissance chez les enfants déficients en GH et atteints de nanisme. La GH administrée était alors purifiée à partir d'hypophyses de cadavres humains. Cette technique n'était cependant pas optimale en raison de la disponibilité limitée d'hormone et des risques infectieux pouvant en découler, pouvant notamment causer la maladie de Creutzfeldt-Jakob. À partir de 1985, l'introduction de la synthèse de GH recombinante (rhGH) produite à grande échelle par l'industrie pharmaceutique après l'introduction du gène humain dans la bactérie *Escherichia Coli*, ont permis de disposer de GH en grande quantité et de développer ses applications thérapeutiques chez l'enfant comme chez l'adulte. Des études cliniques réalisées chez l'adulte présentant un déficit en GH ont alors montré que l'administration de GH augmente non seulement la masse et la force musculaire, mais également les performances maximales en condition aérobie et le débit cardiaque après l'effort [6].

Détournement vers le dopage

Les progrès dans la connaissance des différentes actions de la GH sur le corps humain – et notamment la démonstration d'effets tels que la lipolyse et le renforcement musculaire, osseux et cartilagineux – ont contribué à susciter l'intérêt des sportifs pour la GH comme produit dopant. De plus, la diffusion du médicament a simplifié la possibilité de se procurer de la rhGH à un coût raisonnable, rendant ce produit attractif pour les sportifs comme produit dopant. Cependant, les effets de la GH sur la performance sportive en cas d'administration chez un adulte sain restent controversés dans la littérature scientifique [7-8] et les effets secondaires à plus ou moins long terme peuvent être importants, notamment des perturbations métaboliques (troubles de la glycorégulation), un syndrome dysmorphique (dysmorphie acro-faciale), ainsi qu'un risque de développement et d'accélération de cancers. Cela n'a

pour autant pas dissuadé certains sportifs de haut niveau d'y avoir recours une fois le médicament rhGH mis sur le marché. Un des premiers exemples de l'usage de GH pour dopage a été révélé au grand public suite à la disqualification de Ben Johnson des Jeux olympiques de Séoul en 1988, juste après sa victoire au 100 mètres après un contrôle positif au stanozolol qui est un stéroïde anabolisant. Il a déclaré par la suite avoir pris un cocktail de drogues, dont de la GH. L'interdiction de l'usage de GH a été introduite dans le cadre de la pratique du sport de compétition par les fédérations internationales et le CIO dès 1989. Cependant la GH recombinante produite chez *E. Coli* étant identique à la forme de 22 kDa naturellement produite dans l'organisme, et les concentrations de GH étant très variables dans le sang et très faibles dans l'urine, il restait difficile de prouver un apport exogène en GH. Il a fallu de gros scandales de dopage, comme l'affaire Balco en 2003 touchant les grandes stars américaines du sprint, pour avoir confirmation d'un usage important de la GH dans le sport. L'hormone de croissance administrée par voie sous-cutanée aurait été prise par certains sportifs dans les années 1990-2000 sous formes de cures de plusieurs semaines/mois, avec plusieurs administrations par semaine, à des doses d'ordre thérapeutique (3 à 4 UI/jour) ou supra thérapeutique (4 à 8 UI/jour d'après des témoignages de bodybuilders). De nos jours, le dopage de la GH reste d'actualité mais continuerait d'évoluer dans le but d'échapper plus facilement aux méthodes de détection, ainsi certains sportifs s'administreraient dans certains cas de faibles doses, dites « microdoses », de l'ordre de 1 à 2 UI/jour [9].

Première technique de détection

Plusieurs difficultés ont tout d'abord compliqué la mise en place d'une méthode de détection applicable à la lutte antidopage : les concentrations variables de GH, l'effet de l'exercice sur sa libération, sa dégradation rapide et une excrétion urinaire très faible, puisque seule une fraction de l'ordre de 0,001 à 0,01 % de la GH circulante est éliminée dans les urines. Il est vite apparu nécessaire de s'orienter vers un dosage sanguin semblable à celui réalisé lors des explorations fonctionnelles en endocrinologie (tests diagnostiques des maladies liées à la croissance). Cependant, la distinction de l'origine de la GH présente dans le sang restait problématique puisque la rhGH et la protéine humaine endogène de 22 kDa ne présentent pas de différences (séquence d'acides aminés identique et absence de glycosylation). Toutefois, l'existence

des autres isoformes de la GH circulante a conduit à mettre en place un test différentiel permettant de déterminer, d'une part, la concentration en recGH (forme de 22 kDa endogène et provenant d'administration de rhGH) et, d'autre part, la concentration en GH circulante (GH pituitaire pitGH de 22 kDa, 20 kDa et autres formes plus légères) (figure 2). L'administration de rhGH enrichit la concentration en GH de 22 kDa comparativement aux autres isoformes et va même, par une boucle de rétrocontrôle, limiter la production de GH endogène et donc la circulation des formes pituitaires. De ce fait, la valeur du ratio recGH/pitGH augmente. Le travail du Dr Bidlingmaier et son équipe [10-11] a permis de développer deux dosages immunologiques par luminescence en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés l'un contre la forme 22 kDa (recGH) et l'autre contre toutes les isoformes de la GH (pitGH). Les concentrations en recGH et pitGH sont ainsi déterminées dans le sérum et le ratio recGH/pitGH peut être calculé. Après des études de validation prouvant que l'administration de rhGH pouvait bien être détectée par ces dosages et une grande étude de population pour évaluer les variations inter-individuelles, des seuils ont pu être établis l'un pour les hommes, l'autre pour les femmes au-delà desquels le ratio recGH/pitGH ne peut être que non physiologique et révélateur d'un dopage à la GH. Pour apporter un niveau supérieur de spécificité, une analyse de confirmation sur un échantillon identifié comme suspect nécessite d'utiliser deux paires d'anticorps différents ayant les mêmes propriétés de reconnaissance pour chaque dosage (rec1 et pit1 ; rec2 et pit2). L'AMA a ensuite établi un document technique fournissant les directives sur les procédures analytiques et l'interprétation des résultats de ces analyses sur le sérum (WADA TDGH [12]). Le ratio rec/pit doit être supérieur ou égal à 1,84 pour les hommes et 1,63 pour les femmes avec le kit 1 et de 1,91 pour les hommes et 1,59 pour les femmes avec le kit 2 pour conduire à un résultat d'analyse anormal indiquant la présence de GH exogène dans l'échantillon. La sensibilité de la méthode reste impactée par la dégradation rapide de la GH en circulation : tous les échantillons avec une valeur recGH < 0,150 ng/mL sont considérés comme négatifs, indépendamment de la valeur pitGH et du ratio recGH/pitGH. Le premier test à grande échelle a été effectué lors des Jeux olympiques d'Athènes en 2004, mais il a fallu plusieurs années avant l'identification d'un premier cas avéré à l'aide de cette technique des isoformes différentielles de la GH, et ce malgré les témoignages d'ex-sportifs sur leur utilisation de GH et les saisies fréquentes par les douanes de rhGH produite au

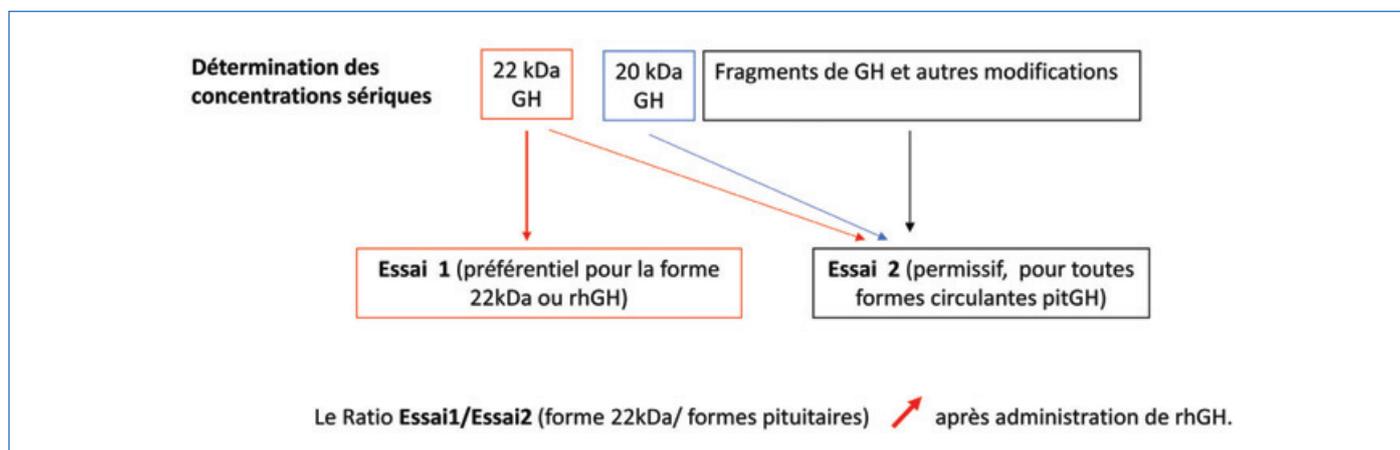


Figure 2 - Principe de la méthode différentielle des isoformes.

marché noir. Ceci s'explique par la fenêtre de détection courte de ce test (des études ont montré que la concentration de GH dans le sang retournait à ses valeurs basales au maximum 8 à 16 heures après une injection intra-musculaire et 11 à 20 heures après des injections sous-cutanées [10]) et sans doute aussi en raison d'une baisse progressive des doses utilisées par les sportifs conscients de la surveillance sur ce type de dopage. Elle nécessite donc que les contrôles antidopage soient réalisés au bon moment, idéalement dans les 24 heures après la dernière prise. De ce fait, seules quelques dizaines de cas ont été identifiés en 20 ans. Des investigations ont été menées en parallèle pour tenter de mettre en place une stratégie analytique permettant d'obtenir une plus longue fenêtre de détection.

Recherche de biomarqueurs et deuxième technique de détection

Pour améliorer la fenêtre de détection de la GH, il est vite apparu nécessaire de rechercher non pas directement la GH, trop labile, mais les traces des modifications qu'elle produit sur l'organisme. Des recherches en protéomique ont permis d'identifier des modifications de facteurs circulant dans le sang suite à la prise de GH et de sélectionner des cibles spécifiques mesurables à partir de la matrice antidopage sérum. Les marqueurs envisagés ont d'abord inclus plusieurs membres du système IGF ainsi que certains marqueurs du métabolisme du collagène des os et tissus mous [13]. Après plusieurs études confirmant la spécificité et sensibilité en réponse à l'administration de GH, deux biomarqueurs de la GH ont finalement été retenus : le facteur de croissance IGF-I produit par le foie médiant les effets métaboliques de la GH et le peptide P-III-NP produit lors de la synthèse du collagène et impliqué dans le renforcement du cartilage. En effet, une prise de rhGH augmente le taux d'IGF-I dans les 24 à 48 heures avant de revenir à un niveau normal, alors que l'augmentation du taux de P-III-NP est d'amplitude moins marquée mais persiste près d'une semaine. Une stratégie visant à combiner ces deux biomarqueurs impliqués dans deux processus différents et présentant des temps de réponse différents à un traitement à la GH permet de s'assurer d'une part de la spécificité de réponse à la prise de GH et, d'autre part, d'augmenter la fenêtre de détection par rapport au test de détection directe par l'analyse des isoformes, en particulier en cas de prises répétées [14].

Deuxième technique de détection : approche indirecte par analyse de biomarqueurs

Les valeurs des concentrations d'IGF-I et de P-III-NP dans le sérum ont alors été évaluées sur une grande population ainsi que chez des athlètes afin d'identifier les possibles facteurs confondants hors pathologies tels que l'âge, le sexe, l'appartenance ethnique, l'exercice physique, la discipline sportive,

les variations journalières et inter-individuelles. Bien que ces deux biomarqueurs présentent des concentrations relativement stables, plusieurs sources de variabilité ont dû être prises en compte : outre un effet du sexe sur les taux mesurés, l'âge doit aussi être considéré car les taux d'IGF-I diminuent progressivement chez l'adulte.

Pour tenir compte de ces facteurs confondants, une formule complexe a été mise en place afin d'élaborer un score nommé GH-2000 spécifique pour chaque sexe (figure 3). Une valeur seuil de GH-2000 a été établie à l'aide des techniques statistiques en tenant compte des variabilités inter-individuelles au-delà de laquelle le résultat GH-2000 ne peut résulter que d'une prise de GH recombinante [15]. L'AMA a mis en place à partir de 2015 un document de lignes directrices pour la détection du dopage de la GH par l'analyse des biomarqueurs de la GH indiquant le calcul du score GH-2000 (cf. Ligne directrice de l'AMA pour le test des biomarqueurs de la GH [16]). Les méthodes d'analyse approuvées par l'AMA regroupent des approches de type radioimmunoessai pour l'analyse du P-III-NP (*Orion*) et d'IGF-I (*Immunotech*) ou d'un dosage immunologique chimiluminescent pour P-III-NP (*Advia Centaur*) et IGF-I (*IDS-Sys*), mais aussi une méthode par spectrométrie de masse pour IGF-I (LC-MS/MS ou LC-HRMS) suivant une approche bottom-up qui consiste à identifier et doser la molécule intacte par l'analyse de deux fragments peptidiques spécifiques obtenus après une digestion enzymatique d'IGF-I.

Pour tenir compte des variations dans les mesures liées à chaque technique d'analyse, les valeurs seuils (limites de décision ou DL) ont été adaptées à la combinaison des méthodes d'analyse utilisées (figure 4).

Suivant les exigences de l'AMA, il est nécessaire après identification d'une suspicion (valeur de GH-2000 supérieure au seuil) de réaliser une analyse de confirmation avec deux paires d'essais différentes : celle utilisée lors de l'analyse initiale de dépistage et une seconde utilisant une méthode de dosage différente, sauf dans le cas d'IGF-I si la mesure a été réalisée par spectrométrie de masse. L'analyse d'IGF-I par spectrométrie de masse a en effet été développée pour disposer d'une méthode non dépendante de la production (parfois compliquée) d'anticorps et résoudre de possibles problèmes de spécificité liée à la détection ou non de variants d'IGF-I afin de garantir une meilleure standardisation entre les laboratoires. Il s'agit de plus de la technologie de référence utilisée dans tous les laboratoires antidopage. L'approche bottom-up telle que décrite par Cox et son équipe est recommandée [17] : les échantillons de sérum sont incubés avec une solution acide pour dissocier IGF-I de ses protéines partenaires (IGFBP) en présence d'un excès d'IGF-II pour éviter une réassociation d'IGF-I avec les IGFBP et d'un étalon interne, ¹⁵N-IGF-I, qui est de l'IGF-I marqué au ¹⁵N. Les protéines de haut poids moléculaire sont ensuite précipitées avec de l'acétonitrile. Le surnageant contenant l'IGF-I libre est ensuite séché et hydrolysé avec de la trypsine après réduction et alkylation.

$$\text{GH-2000 (homme)} = - 6,586 + 2,905 \times \ln[\text{P-III-NP}] + 2,100 \times \ln[\text{IGF-I}] - 101,737/\text{âge} - 0,02 \times (\text{âge} - 25,09)$$

$$\text{GH-2000 (femme)} = - 8,459 + 2,454 \times \ln[\text{P-III-NP}] + 2,195 \times \ln[\text{IGF-I}] - 73,666/\text{âge}$$

Figure 3 - Calcul du score GH-2000.

Sexe	Paire d'essais pour mesurer IGF-I et P-III-NP	Limite de décision (DL) du score GH-20000
Hommes	LC-MS/MS or LC-HRMS + Orion	9.70
	LC-MS/MS or LC-HRMS + Siemens Advia Centaur	11.34
	IDS-Sys + Orion	9.00
	IDS-Sys + Siemens Advia Centaur	10.61
	ImmunoTech + Orion	9.98
	ImmunoTech + Siemens Advia Centaur	11.53
Femmes	LC-MS/MS or LC-HRMS + Orion	8.56
	LC-MS/MS or LC-HRMS + Siemens Advia Centaur	10.13
	IDS-Sys + Orion	7.79
	IDS-Sys + Siemens Advia Centaur	9.35
	ImmunoTech + Orion	8.62
	ImmunoTech + Siemens Advia Centaur	10.10

Figure 4 - Combinaisons d'essais autorisés par l'AMA pour mesurer les concentrations sériques d'IGF-1 et P-III-NP et limites de décision (DL) associées pour identifier un résultat anormal révélateur de dopage à la GH chez le sportif [16].

Deux peptides correspondant aux acides aminés 1–21(T1) et 22–36(T2) d'IGF-I sont séparés par chromatographie liquide et analysés par MS/MS ou HRMS. Cette stratégie analytique d'IGF-I par mesure des concentrations peptidiques présente cependant quelques inconvénients :

- la préparation d'échantillon est fastidieuse et longue à mettre en œuvre ;

- la méthode requiert une digestion trypsique complète, les deux peptides spécifiques d'IGF-I devant donner des concentrations similaires différant de moins de 20 % l'une de l'autre pour rendre un résultat conforme. Contrairement à IGF-I, il n'a pas été possible pour l'instant de développer un dosage de P-III-NP par spectrométrie de masse du fait des valeurs faibles de P-III-NP dans le sérum, de la complexité de la molécule et de l'absence de P-III-NP marqué utilisable comme étalon interne. Le test des biomarqueurs de la GH a été testé pour la première fois lors des Jeux olympiques de Londres en 2012 et a permis de révéler le dopage de deux haltérophiles russes lors des épreuves paralympiques [18]. Néanmoins, depuis cette affaire et malgré l'implémentation de cette analyse dans les laboratoires antidopage du monde entier, aucun nouveau cas de dopage n'a pu être révélé par cette méthode. En effet, les variations inter-individuelles constatées au moment de la mise en place des seuils ont conduit à établir des DL élevées difficilement dépassées en dehors de prises rapprochées et prolongées de fortes doses de GH, alors même que le dopage a tendance à évoluer vers des doses plus faibles. Le test des biomarqueurs de la GH n'a donc pour l'instant pas été efficace pour détecter le dopage à la GH des sportifs. Pour sortir de cette impasse, et surveiller plus efficacement les athlètes,

une autre façon d'envisager l'analyse des biomarqueurs de la GH a donc été envisagée.

Intérêt d'une approche individuelle par suivi longitudinal

Le Passeport biologique de l'athlète (PBA) a été implémenté à partir de 2009 comme une approche indirecte de détection du dopage. Il permet de suivre au fil du temps les variations intra-individuelles (pour un même sportif) de certains paramètres endogènes (paramètres hématologiques dans le sang comme l'hémoglobine dans le cadre d'un module hématologique, paramètres stéroïdiens dans l'urine comme le rapport testostérone/épitestostérone dans le cadre du module stéroïdien) et utilise un algorithme permettant de prédire sur la base des données individuelles relevées les limites des variations estimées possibles physiologiquement pour le sportif concerné. Lorsqu'un paramètre va se retrouver au-delà des limites, l'échantillon est classé atypique et le passeport consulté par un expert, chargé également d'examiner de possibles facteurs confondants. Devenu un outil précieux dans la lutte contre le dopage, le PBA a permis de révéler des cas de dopage sur la base des variations anormales observées, mais conduit aussi à des analyses complémentaires pour détecter directement un produit interdit et à un meilleur ciblage des sportifs. Plusieurs études ont montré l'intérêt de passer à un suivi longitudinal individuel d'IGF-I, P-III-NP et du score GH-2000 afin de mieux détecter des variations suite à la prise de GH, en particulier dans le cadre de microdoses [9-19]. Cela permet de resserrer les limites pour identifier une

Méthode et instrumentation	Analyse top-down par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse triple quadripôle ou haute résolution (LC-MS ⁿ ; $n \geq 1$).
Gamme dynamique de la méthode	Doit couvrir les plages de concentrations physiologiques d'IGF-I chez les hommes et les femmes et démontrer au moins une linéarité comprise entre 50 et 1 000 ng/mL .
Limite de quantification (LOQ)	La LOQ doit être inférieure ou égale à 50 ng/mL .
Incertitude de mesure combinée u_c	L' incertitude u_c (en %) estimée doit être inférieure ou égale à 20 % .
Échantillonnage	La quantification d'IGF-I doit être réalisée sur deux aliquotes différents de l'échantillon « A », en utilisant un volume de sérum inférieur à (\leq) 50 μL de sérum par aliquote .
Étalon interne	IGF-I marqué par un isotope stable (¹⁵ N-IGF-I).
Étalonnage	Un étalon en un point (SPC) fraîchement préparé doit être inclus dans chaque lot analytique. L'étalon IGF-I humain recombinant (SRM 2926 du NIST, National Institute of Standards and Technology) doit être utilisé pour préparer le SPC. Tout autre étalon utilisé doit être validé/raccordé au standard de référence NIST SRM 2926.

Figure 5 - Performances exigées par l'AMA pour valider une méthode de dosage d'IGF-I par approche top-down pour la mesure d'IGF-I dans le sérum applicable au module endocrinien du PBA du sportif [20].

variation anormale et donc identifier plus facilement un cas de dopage. IGF-I en particulier s'avère un marqueur sensible de la prise de microdoses de GH.

Vers la création d'un module endocrinien du PBA

Afin de faire évoluer le PBA par la mise en place d'un module endocrinien pour mieux détecter l'hormone de croissance, il a été nécessaire de choisir les méthodes à appliquer dans chaque laboratoire antidopage susceptible de recevoir un échantillon à analyser qui viendra ajouter un point dans le passeport. La méthode de détection du P-III-NP s'est orienté vers le dosage chimiluminescent (*Advia Centaur*, Siemens), plus facile à implémenter dans tous les laboratoires que le dosage radioimmunologique nécessitant par ailleurs la production d'éléments radiomarqués. En ce qui concerne IGF-I, l'analyse par spectrométrie de masse a été privilégiée au dosage par immunoessai dépendant des anticorps. Cependant, la technique par approche bottom-up ayant présenté des difficultés liées à une variabilité de mesure des concentrations des peptides T1 et T2, l'AMA a choisi d'évoluer vers une nouvelle méthode de mesure d'IGF-I par LC-HRMS ou LC-MS/MS par une approche top-down pour doser directement la molécule intacte et s'affranchir de la digestion enzymatique (cf. Lignes directrices de l'AMA pour le module endocrinien du Passeport biologique de l'athlète [20]). Grâce aux améliorations techniques en termes de sensibilité et de précision des instruments de spectrométrie de masse ces deux dernières décennies, l'approche top-down pour IGF-I ne nécessite plus le recours aux anticorps lors de la préparation d'échantillon. Dès 2011, une analyse de quantification d'IGF-I intacte basée sur une précipitation des protéines suivie d'une extraction SPE (solid phase extraction) en ligne a été développée. L'analyse sur un instrument de type TOF-MS a permis de quantifier IGF-I sur la base d'un cluster isotopique d'IGF-I avec une limite de quantification de 15,6 ng/mL démontrant l'utilisation possible de ce dosage dans le domaine clinique [21]. Plusieurs autres méthodologies de dosage de l'IGF-I intacte ont été rapportées dans la littérature, dont une appliquée à la matrice sérum et destinée aux laboratoires antidopage publiée en

2020 [22] et une autre évaluant la possibilité d'utiliser des gouttes de sang séchées (DBS en alternative au sérum [23]). En 2023, l'AMA a publié dans ses lignes directrices pour l'analyse des marqueurs du module endocrinien les performances à valider pour la méthode de détection d'IGF-I et les recommandations pour la technique d'analyse (figure 4) [20]. Le laboratoire antidopage français a développé une méthode de quantification d'IGF-I intacte par LC-HRMS utilisant 20 μ L de matrice sérum et présentant une limite de quantification de 25 ng/mL compatible avec les valeurs physiologiques dans le sérum. Cette méthode précise et reproductible a été validée selon les exigences des normes internationales et des documents techniques de l'AMA (figure 5). Elle consiste en une précipitation des protéines en milieu organique acide suivie d'une purification d'IGF-I et de son étalon interne sur phase solide miniaturisée (μ SPE échangeuse d'anions forts) et de l'analyse LC-HRMS (figure 6). L'extraction μ SPE en amont de l'analyse en spectrométrie de masse permet de s'affranchir d'une étape d'évaporation et de maximiser le nombre d'échantillons traités en même temps. Cette stratégie simple à exécuter dans un contexte d'analyse de routine est propice à un haut débit d'analyse. Le dosage d'IGF-I est basé sur la détection de quatre isotopes du massif isotopique de l'espèce multichargée prédominante dans nos conditions d'analyse, à savoir l'espèce IGF-I $[M + 7H]^{7+}$. Cette méthode est actuellement celle mise en œuvre dans le laboratoire antidopage français dans le cadre des analyses du module endocrinien du PBA.

L'analyse des deux marqueurs IGF-I et P-III-NP doit se faire à partir de deux aliquotes et le résultat n'est validé que si le coefficient de variation des deux mesures est inférieur à 20 % pour IGF-I et 15 % pour P-III-NP. La concentration moyenne de ces deux paramètres est alors directement intégrée dans le module du passeport qui permet de suivre l'évolution de chaque marqueur, ainsi que celle du score GH-2000 associé et de le confronter aux limites des variations estimées physiologiquement possibles. Une confirmation des valeurs mesurées peut être nécessaire notamment en cas de point atypique. L'analyse est alors répétée sur deux nouveaux aliquotes. Enfin, les passeports seront examinés tout d'abord par les unités

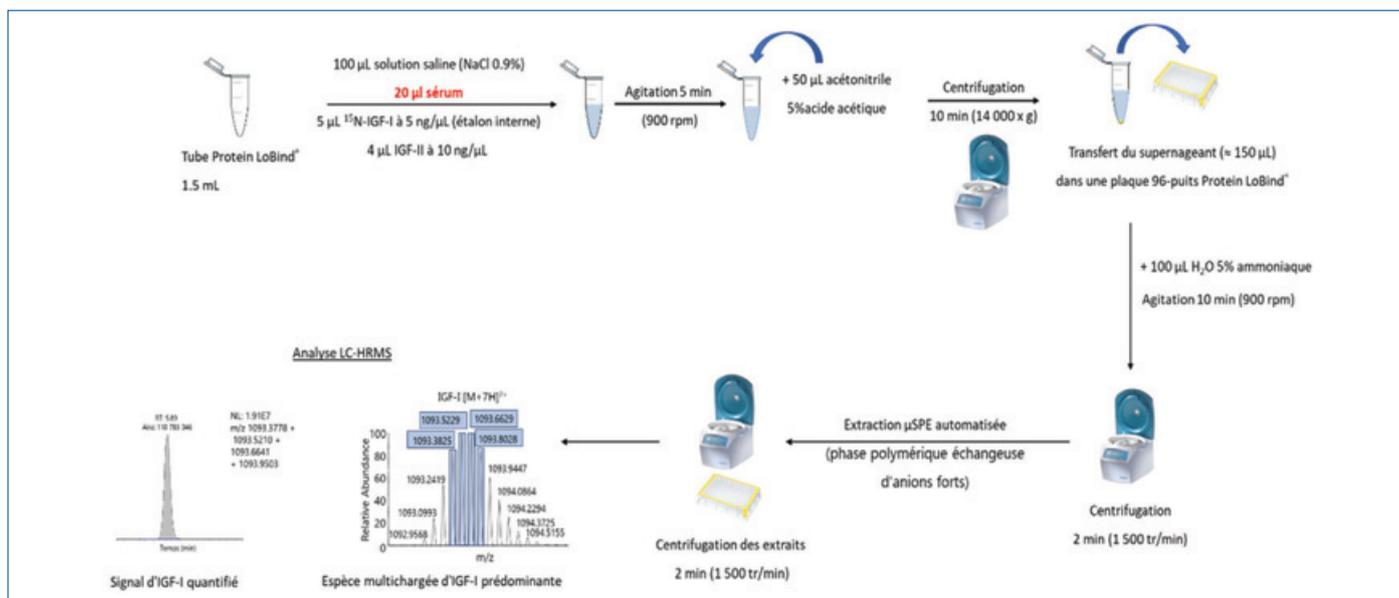


Figure 6 - Méthode de préparation et mesure d'IGF-I dans le sérum par approche top-down mise en œuvre au Laboratoire antidopage français (LADF) pour l'analyse du module endocrinien du PBA du sportif.

de gestion du passeport biologique et envoyés si nécessaire à des experts du module endocrinien (médecins endocrinologues et spécialistes du dopage GH) afin d'évaluer l'anormalité du point et les raisons possibles, en excluant toute cause pathologique. Une analyse complémentaire des prélèvements du sportif par la méthode des isoformes de la GH pourra aussi être déclenchée en cas d'élévation suspecte des marqueurs.

Veiller aux variations anormales des marqueurs

Ce module endocrinien de l'athlète a démarré courant automne 2023 et il faudra attendre quelques années pour constater si des cas de dopage sont identifiés plus efficacement. L'approche individuelle est en tout cas une avancée majeure pour une identification plus sensible de variations liées à une administration de rhGH. Le succès du module endocrinien dans le PBA restera cependant dépendant de l'obtention régulière de nouvelles données pour suivre l'évolution des marqueurs et d'un bon ciblage des périodes les plus à risque de dopage (notamment les phases de préparation pour les compétitions majeures). La contribution des organismes de contrôle antidopage est donc un élément clé au succès de cette approche. L'identification des athlètes présentant des variations atypiques permet aussi de renforcer les contrôles sur ceux-ci et donc de mieux cibler les athlètes suspects. Le test de détection directe du dopage à la GH par la mesure différentielle des isoformes qui s'avère efficace sur une période courte, pourra continuer à être appliqué de manière plus ciblée grâce aux informations du passeport. L'intérêt pour le module endocrinien est aussi renforcé par le développement d'autres approches thérapeutiques visant l'axe somatotrope, telles que l'utilisation des libérateurs d'hormone de croissance qui sont aussi déjà disponibles au marché noir, et l'autorisation récente des analogues de la GH à action longue. L'usage de ces molécules pourrait aussi conduire à des variations anormales des marqueurs du module endocrinien.

- [4] N. Mauras, M.W. Haymond, Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable?, *Gr. Horm. & IGF Res.*, **2005**, *15*(1), p. 19-27.
- [5] S. Wu, W. Yang, F. de Luca, Insulin-like growth factor-independent effects of growth hormone on growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth, *Endocr.*, **2015**, *156*(7), p. 2541-51.
- [6] R.C. Cuneo *et al.*, Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. Effects on exercise performance. *J. App. Physiol.*, **1991**, *70*(2), p. 695-700.
- [7] P.J. Jenkins, Growth hormone and exercise: physiology, use and abuse, *Growth Horm. & IGF Res.*, **2001**, *11*, p. S71-S77.
- [8] M.R. Graham *et al.*, Potential benefits of recombinant human growth hormone (rhGH) to athletes, *Growth Horm. & IGF Res.*, **2009**, *19*(4), p. 300-307.
- [9] A. Marchand *et al.*, Combined administration of microdoses of growth hormone and erythropoietin: Effects on performance and evaluation of GH detection capability using anti-doping methods, *Drug Test Anal.*, **2019**, *11*(11-12), p. 1698-1713.
- [10] M. Bidlingmaier, Z. Wu, C.J. Strasburger, Test method: GH, *B. Best Pract. Res. Clin. Endocr. Metab.*, **2000**, *14*(1), p. 99-109.
- [11] J.D. Wallace *et al.*, 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. Endocr. Metab.*, **2001**, *86*(4), p. 1731-37.
- [12] www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2021gh_final_eng_0.pdf
- [13] A. Kniess, E. Ziegler, J. Kratzsch, D. Thieme, R.K. Müller, Potential parameters for the detection of hGH doping, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, *376*(5), p. 696-700.
- [14] R.I. Holt, Detecting growth hormone abuse in athletes, *Drug Test Anal.*, **2009**, *1*(9-10), p. 426-433.
- [15] I. Erotokritou-Mulligan *et al.*, The development of decision limits for the implementation of the GH-2000 detection methodology using current commercial insulin-like growth factor-I and amino-terminal pro-peptide of type III collagen assays, *Growth Horm. & IGF Res.*, **2012**, *22*(2), p. 53-58.
- [16] www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada_guidelines_hgh_biomarkers_test_v3_jan_2021_eng.pdf
- [17] H.D. Cox *et al.*, Interlaboratory agreement of insulin-like growth factor 1 concentrations measured by mass spectrometry, *Clin. Chem.*, **2014**, *60*(3), p. 541-548.
- [18] R.I. Holt, Detecting growth hormone misuse in athletes, *Indian J. Endocrinol Metab.*, **2013**, *17*(Suppl 1), S18-22.
- [19] M. Lehtihet *et al.*, Longitudinally monitoring of P-III-NP, IGF-I, and GH-2000 score increases the probability of detecting two weeks' administration of low-dose recombinant growth hormone compared to GH-2000 decision limit and GH isoform test and micro RNA markers, *Drug Test Anal.*, **2019**, *11*(3), p. 411-421.
- [20] www.wada-ama.org/fr/ressources/lignes-directrices-pour-les-laboratoires-exigences-analytiques-pour-le-module
- [21] C. Bystrom *et al.*, Clinical utility of insulin-like growth factor 1 and 2; determination by high resolution mass spectrometry. *PLoS One*, **2012**, *7*(9), e43457.
- [22] D. Moncrieffe *et al.*, Inter-Laboratory Agreement of Insulin-like Growth Factor 1 Concentrations Measured Intact by Mass Spectrometry, *Clin. Chem.*, **2020**, *66*(4), p. 579-586.
- [23] C. Mongongu *et al.*, Use of capillary dried blood for quantification of intact IGF-I by LC-HRMS for antidoping analysis, *Bioanalysis*, **2020**, *12*(11), p. 737-752.

Alexandre MARCHAND*, responsable d'unité biologie R&D,
Cynthia MONGONGU, responsable secteur R&D chimie analytique,
Corinne BUISSON, responsable d'unité chimie R&D,
 et **Magnus ERICSSON**, directeur.

Laboratoire antidopage français (LADF), Université Paris-Saclay, Orsay.

* a.marchand-ladf@universite-paris-saclay.fr

[1] G.P. Baumann, Growth hormone isoforms, *Growth Horm. & IGF Res.*, **2009**, *19*(4), p. 333-340.

[2] V.S. Bonert, S. Melmed, Growth hormone, *The Pituitary*, **2017**, p. 85-127.

[3] C. Carter-Su, J. Schwartz, L.S. Argentsinger, Growth hormone signaling pathways, *Growth Horm. & IGF Res.*, **2016**, *28*, p. 11-15.

The use of dried blood spots in antidoping: advantages and limitations

Abstract The adoption of dried blood spots (DBS) in antidoping has marked a transformative shift in the landscape of sample collection and analysis. This review explores the compelling advantages and inherent limitations associated with the use of DBS in antidoping efforts. One of the most notable advantages of DBS lies in its streamlined sample collection, transportation, and storage processes. The simplicity of DBS sample collection minimizes invasiveness, rendering it athlete-friendly and promoting more frequent testing. Furthermore, DBS samples are exceptionally stable, preserving the integrity of analytes within the dried matrix. This stability allows for prolonged sample storage without significant degradation, offering flexibility and cost-efficiency in sample management. In addition to these advantages, DBS simplifies the analytical process, facilitating large-scale screenings for prohibited substances. The method's practicality and efficiency make it a valuable tool for antidoping organizations seeking to conduct widespread analyses. Moreover, the information obtained from DBS can complement the interpretation of urine samples, enhancing result management. In cases of suspicious or non-conclusive findings, DBS data can serve as valuable supplementary evidence, aiding antidoping authorities in making informed decisions. However, DBS is not without its challenges. The hematocrit effect, a critical consideration, can lead to variations in analyte quantification due to fluctuations in individual hematocrit levels. This poses a significant hurdle in maintaining consistent sensitivity and accuracy. The limited volume of blood collected in DBS samples can also restrict sensitivity, particularly when detecting substances present in minute concentrations. Furthermore, the current regulatory framework confines the use of DBS to the detection of substances without predefined thresholds or minimum reporting levels, limiting its applicability to specific doping agents. It is important to recognize that the implementation of DBS in antidoping is still in its nascent stage. While initial experiences with DBS have shown promise, the true impact of this innovative approach on antidoping efforts will become increasingly apparent over the next two to three years. Importantly, DBS is not intended to replace conventional urine or blood collection methods but rather to complement them. This integration promises to enhance the comprehensiveness of antidoping practices and improve the fairness and integrity of sports antidoping measures.

Keywords **Dried blood spots (DBS), microsampling, capillary blood, direct detection.**

Résumé **L'utilisation des « dried blood spots » dans l'antidopage : avantages et limitations**

L'adoption des gouttelettes de sang séché (« dried blood spots », DBS) dans la lutte antidopage a marqué un changement fondamental dans la collecte et l'analyse des échantillons. Cet article explore les avantages considérables et les limitations inhérentes à l'utilisation des DBS dans la lutte antidopage. L'un des avantages les plus notables des DBS réside dans leur facilité de collecte, de transport et de stockage des échantillons. La simplicité de la collecte des échantillons de DBS réduit l'invasivité, en faisant une option respectueuse des athlètes et en favorisant des tests plus fréquents. De plus, les échantillons de DBS sont exceptionnellement stables, préservant l'intégrité des composants dans la matrice sèche. Cette stabilité permet de stocker les échantillons sur une période prolongée sans dégradation significative, offrant ainsi de la flexibilité et une gestion économique des échantillons. Outre ces avantages, les DBS simplifient le processus analytique, facilitant le dépistage à grande échelle de substances interdites. La praticité et l'efficacité de cette méthode en font un outil précieux pour les organisations antidopage cherchant à mener des analyses à grande échelle. De plus, les informations obtenues à partir des DBS peuvent compléter l'interprétation des échantillons d'urine, améliorant ainsi la gestion des résultats. En cas de résultats suspects ou non concluants, les données des DBS peuvent servir de précieuses preuves supplémentaires, aidant les autorités antidopage à prendre des décisions éclairées. Cependant, les DBS ne sont pas exempts de défis. L'effet hématocrite, en raison des fluctuations des taux d'hématocrite individuels, peut ainsi entraîner des variations cruciales dans l'analyse quantitative des substances détectées. Cela représente un obstacle important à la préservation de la sensibilité et de la précision. De plus, le faible volume de sang collecté dans les échantillons de DBS peut limiter la sensibilité, en particulier lors de la détection de substances présentes à de faibles concentrations. En outre, le cadre réglementaire actuel restreint l'utilisation des DBS à la détection de substances sans seuils prédéfinis ni niveaux minimaux de notification, limitant son applicabilité à des agents dopants spécifiques. Il est important de reconnaître que la mise en œuvre des DBS dans la lutte antidopage en est encore à ses débuts. Bien que les premières expériences avec les DBS soient très prometteuses, l'impact réel de cette approche novatrice sur les efforts antidopage deviendra de plus en plus évident au cours des deux à trois années à venir. Il est essentiel de souligner que les DBS ne visent pas à remplacer les méthodes conventionnelles de collecte d'urine ou de sang, mais plutôt à les compléter. Cette intégration promet de renforcer la globalité des pratiques antidopage et d'améliorer l'équité et l'intégrité des mesures antidopage dans le sport.

Mots-clés **Gouttelette de sang séché (DBS), microéchantillonnage, sang capillaire, détection directe.**

From finger to filter: unraveling the magic of dried blood spots

Dried blood spots (DBS) have become a pivotal form of biosampling over the years, offering a less invasive and more practical method than traditional venous blood draws. The concept of DBS dates back several decades, originally finding applications in neonatal screening. This innovative technique has since evolved, finding utility in various fields, including clinical diagnostics, toxicological analyses, and epidemiological research.

The process of collecting DBS involves a small, controlled finger prick (heel in the context of neonatal screening) to obtain a few drops of capillary blood (figure 1). Rather than the conventional liquid form, the collected blood is either applied directly or transferred via pipetting onto specialized filter paper in small, defined spots. Subsequently, these spots are left to air-dry, preserving the blood components in a stable state. The resulting dried blood spots are compact, lightweight, and easily handled, offering a simple solution for both sample storage and transportation.

This method's simplicity and versatility have made it increasingly popular, with recent applications extending to antidoping efforts in sports. In this review, we will explore the advantages and limitations of using DBS in antidoping analyses. We will delve into the technical aspects of DBS collection, storage, and analysis, highlighting the potential benefits for both antidoping authorities and athletes. Additionally, we will discuss the challenges and considerations associated with DBS in the context of antidoping, ensuring a comprehensive understanding of this innovative approach to sample collection and analysis.

Implementing dried blood spots in antidoping: current approaches

In 2021, the World Anti-Doping Agency (WADA) created guidelines for using DBS in antidoping tests. These guidelines cover everything from collecting and transporting samples to the actual testing and storage of the samples. These rules were updated in 2023, giving official recognition to any suspicious

findings in dried blood, creating a clear legal framework for dealing with such results in antidoping efforts. Here is an overview of these guidelines for each particular aspect.

Sample collection and transport

Due to the absence of venipuncture for the collection of DBS, the samples can be collected by a regular doping control officer (DCO) without the need for a specialized blood control officer (BCO). Alternatively, the collection of DBS may be performed by the athletes themselves under close supervision. While the volume of capillary blood deposited onto filter is approximately 10-50 μL , the WADA guidelines require a minimum total of approximately 40 μL of capillary blood in the "A" spot(s) and with a minimum total of approximately 20 μL of capillary blood in the "B" spot(s) to satisfy relevant analytical requirements. Nevertheless, it is recommended to collect at least 60 μL and 40 μL , respectively [1]. To facilitate rapid drying of the spots once they are sealed and to shield the sample from potential early degradation or contamination, it is essential for the DBS sample container to include a desiccant. The samples shall be collected using disposable lancets in conjunction with cellulose cards. When collecting the sample from the fingertip, it is required to discard the initial drop after puncturing to prevent any potential dilution from interstitial fluids. Although numerous chemically treated filter cards can be found on the market, in the context of antidoping, it is essential that the absorbent sample support is made of untreated cellulose paper or alternative absorbent material (e.g. synthetic polymer). Following DBS collection, the sample is sealed in a tamper evident kit and DBS samples can either be transported at ambient temperature using regular mail or courier services or shipped refrigerated if other blood samples were also collected.

Analytical testing and storage

In the present context, as outlined in the technical document governing the analysis of DBS samples, the analytical testing procedures are specifically designed for detecting substances that do not have threshold values without minimum reporting levels (MRL). In simpler terms, DBS samples are presently suitable only for identifying substances where the mere

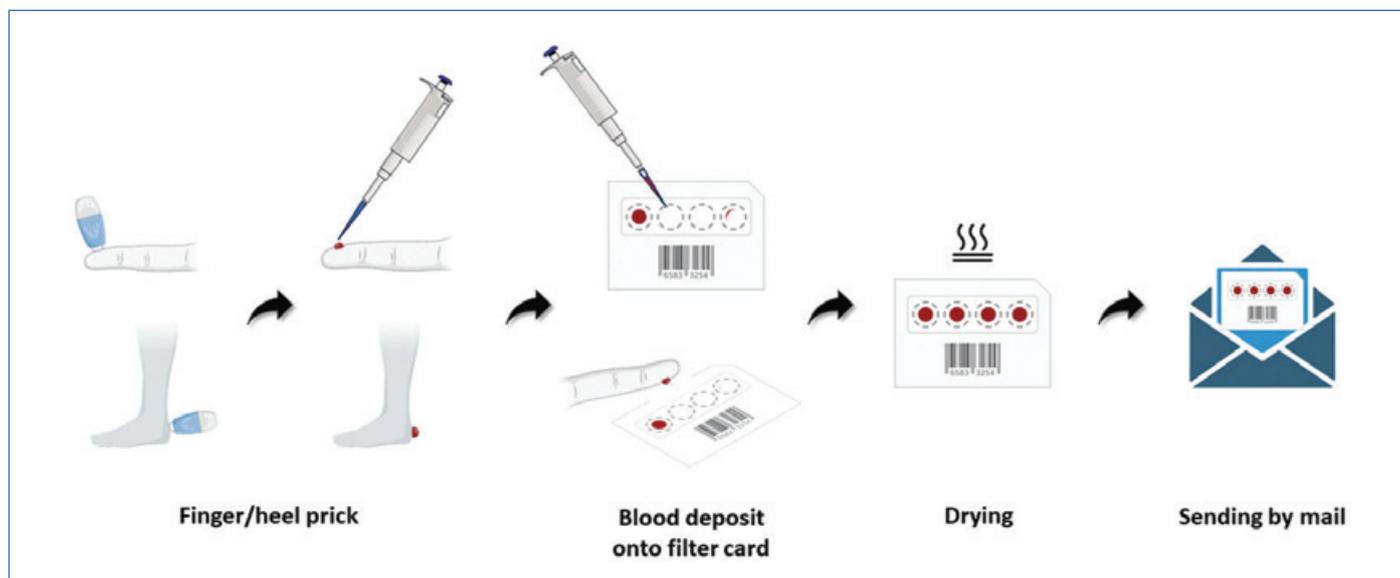


Figure 1 - Dried blood spot collection. First, a prick is performed with a specific lancet on the finger or heel (for neonates), the capillary blood is then transferred onto a filter card in pre-defined spots. After a proper air-drying process, the DBS card can be sent by regular mail. (created in BioRender.com)

presence is considered conclusive evidence of an antidoping rule violation. For instance, this includes a wide range of substances falling under the S1 category (anabolic steroids, excluding endogenous steroids), S2 (peptide hormones, growth factors, related compounds, and mimetics) and S4 (hormones and metabolic modulators) of the prohibited list. Upon receiving DBS samples, the laboratory assesses for any potential irregularities, such as the absence of desiccant, attachment to the container, or inadequate drying. The DBS "A" sample should be refrigerated and protected from light until analysis while the "B" sample should be stored frozen (-20°C) after reception until analysis. Upon analysis, the samples are first brought to room temperature in an airtight and dry container (e.g. desiccator, plastic box containing desiccant) to avoid condensation. If spots are still present in the "A" sample, it should be placed back into refrigerated storage until both the initial testing procedure and, if applicable, the confirmation procedure are finished. Afterward, it should be stored in a frozen state at approximately -20°C.

Possible devices compliant with WADA technical documents

Most studies conducted thus far in the realm of DBS collection have predominantly utilized standard cellulose DBS cards like the DMPK-C cards or Whatman 903™ protein saver cards. However, recent advancements have ushered in a new era of DBS collection devices, many of which are volumetric in nature. This transition offers distinct advantages, allowing for precise and consistent sample volumes to be collected, reducing variability in sample collection, and simplifying analytical workflows.

Several innovative DBS collection devices have emerged on the market, each with their unique advantages. The *HemaXis DB10* (DBS System SA, Gland, Switzerland) incorporates a microfluidic chip to deliver an accurate amount of blood (10 µL) from the fingertip to a standard filter card (*Whatman 903*). A single cartridge allows for the collection of four spots. In accordance with WADA regulations, this necessitates the use of two kits to guarantee an adequate volume for both the "A" and "B" spots. The precision in volume control eliminates the necessity for a sub-punch since the entire spot can be utilized for extraction. The *Mitra* clamshell or cartridge (Neoteryx, LLC, Torrance, CA, USA) is a volumetric absorptive microsampling device using the VAMS technology allowing accurate collection of 10, 20 or 30 µL of capillary blood at the fingertip. The *Mitra 96-Autorack* compatible with 96-well plates allows for manual or high-throughput processing of DBS samples. The *Capitainer B* (Capitainer, Solna, Sweden) is another dried blood spot micro-sampling card device. The microfluidic qDBS technology of the *Capitainer B* card provides an exact sample volume (2 × 10 µL) to a pre-cut DBS disc. Capitainer's paper based drying pouch allows the sample to dry during transportation. The pre-cut disc allows for direct processing of the sample without the need to punch out. Like *Hemaxis DB10*, multiple devices should be used to ensure sufficient volume and spots in accordance with WADA requirements. Recently, the *Capitainer B50* was marketed for the collection of 2 × 50 µL spots. The *HemaSpot HF* capillary blood collection (Spot on Sciences, Austin, TX, USA) has a fan-shape design that allows even distribution across each of the eight blades with an approximate volume of 9 µL each. Each pre-cut fan with tracking notch filter (TNF) paper can be directly used for individual sample extraction and analysis with no punching required. In an alternative approach to

fingertip collection, the *Tasso-M20* device (Tasso Inc., Seattle, USA) collects capillary blood volumetrically from the upper arm. This particular device stands out as the most user-friendly option, demanding minimal user manipulation. In essence, the procedure involves initially positioning the device on the skin. Once the user presses the button to activate the lancet, a precisely controlled vacuum is generated. This controlled negative pressure delicately draws four separate capillary blood samples, each measuring 20 µL, into the connected sample pod. In contrast to other kits, the absorptive VAMS tip (*Mitra*) and the *Tasso-M20* support are synthetic polymers. In addition to these advancements, it is crucial to combine these DBS collection devices with tamper-evident kits to ensure the integrity and authenticity of collected samples, particularly in antidoping settings. For instance, Versapak (Erith, UK) has developed a temper evident kit for the collection of *Hemaxis DB10* samples consisting of two ("A" and "B") sealed cases. Innovero has developed the *SAFESystem DBS kit* compatible with *Tasso-M20* devices. Innovero's *SAFESystem DBS kit* separates the sample from the sample pod into secure A/B samples, ensuring efficiency and consistency.

Before the implementation of DBS collection in antidoping, a study conducted by Solheim *et al.* compared the perception of different DBS collection kits (*HemaSpot HF* and *Tasso-M20*) and found a notable preference by both DCOs and athletes for the *Tasso-M20* device, likely due to its self-sampling capabilities and ease of use, which make it particularly appealing for a wide range of users [2]. These advancements in DBS collection technology underscore the importance of continuous innovation in simplifying sample collection processes and improving the overall experience for both professionals and individuals.

Unveiling the strengths of DBS in antidoping

Dried blood spot testing has emerged as a transformative approach in the realm of antidoping, bringing with it a plethora of advantages that enhance the efficiency, accessibility, and comprehensiveness of testing procedures.

Sample collection

One of the primary advantages of DBS lies in its minimally invasive nature during sample collection. Traditional venous blood sampling can be uncomfortable for athletes and requires trained personnel for extraction. In contrast, DBS allows for the collection of capillary blood through a simple finger prick, reducing discomfort and making it more athlete-friendly. This simplicity in sample collection contributes to increased compliance and a more positive testing experience for athletes. In addition, the collection of DBS would reduce the sampling time at the end of a competition (e.g. football game) and would allow for a larger number of athletes to be tested.

Sample transport and storage

The ease of sample transportation and storage is another notable advantage of DBS. Liquid blood samples necessitate stringent temperature controls and timely analysis, posing logistical challenges. DBS samples, on the other hand, are dried and can be shipped at room temperature, eliminating the need for rigorous temperature control during transport. This feature reduces logistical complexities, making sample handling more convenient and cost-effective for antidoping organizations. Furthermore, in contrast to urine containers, DBS samples

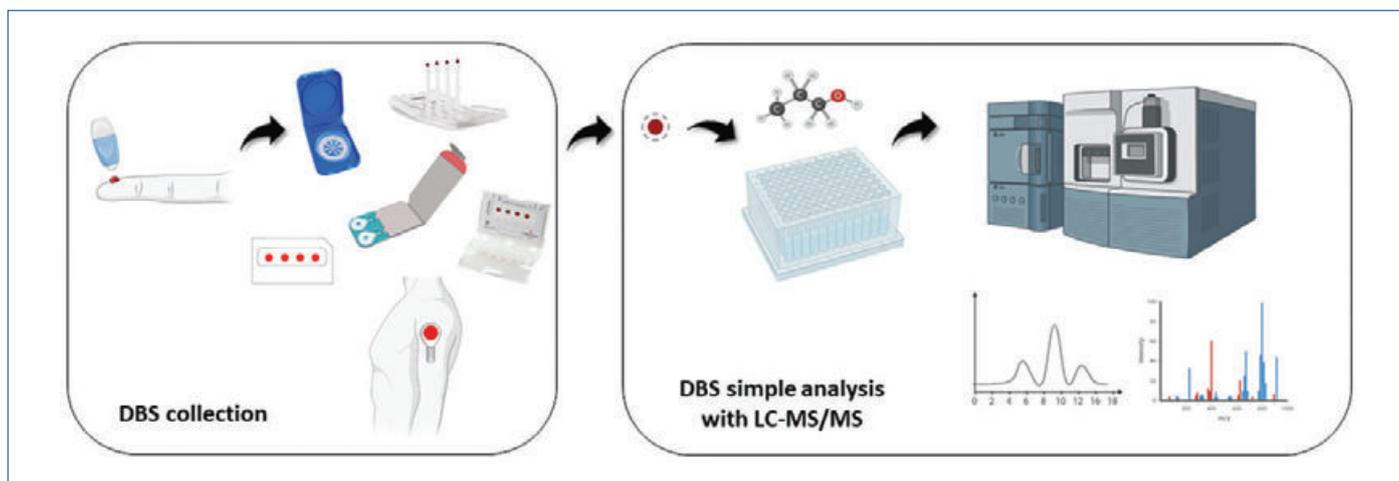


Figure 2 - From DBS collection (with the different devices presented above) to analysis using methanolic single-step extraction and injection with liquid-chromatography tandem mass spectrometry (created in BioRender.com).

occupy significantly less space due to their compact size. Consequently, a significantly greater number of DBS samples can be accommodated within the same storage area, thus expanding the available storage capacity considerably. This efficient use of space is advantageous for laboratories dealing with a high volume of samples, as it enables them to store and manage a larger quantity of specimens without requiring extensive storage facilities.

DBS samples are exceptionally stable, preserving the integrity of analytes within the dried matrix. This advantage stems from the inactivation of enzymatic activity due to the absence of water in the dried blood spots. This stability allows for prolonged sample storage without significant degradation, offering flexibility and cost-efficiency in sample management. The long-term stability of DBS samples ensures that they can be stored for extended periods without compromising the quality of the sample. This is particularly advantageous in situations where delayed analysis is required or when additional testing may be needed in the future. This feature proves especially advantageous when dealing with steroid esters that undergo swift hydrolysis due to the presence of esterase in the blood [3]. Similar considerations regarding the instability of hypoxia-inducible factor (HIF) activating agents in urine/blood highlight the use of DBS for the detection of such substances.

Sample analysis

Furthermore, DBS simplifies the analytical process, facilitating large-scale screenings for prohibited substances. The method's practicality and efficiency make it a valuable tool for antidoping organizations seeking to conduct widespread analyses. The incorporation of DBS analysis into the laboratory is facilitated by their minimal sample preparation demands (often a single-step extraction using organic solvent is sufficient) and their compatibility with mass spectrometry-based methods, offering a straightforward and effective approach for detecting prohibited substances (figure 2). This practicality offers the opportunity for full automation of sample extraction and analysis [4–6].

The information obtained from DBS is not limited to the immediate testing scenario; it can also complement the interpretation of urine samples, enhancing result management. In cases of suspicious or inconclusive findings, DBS data can serve as valuable supplementary evidence, aiding antidoping

authorities in making informed decisions. This is especially relevant for substances prohibited in-competition for which it is fundamental to determine the time of administration or exposure to the prohibited substance (e.g. cocaine, glucocorticosteroids, cannabinoids...). The estimated concentration of clenbuterol (a β -2-agonist with anabolic and lipolytic side effects) in DBS could also help to discern whether the doping incident was intentional or unintentional (ingestion of contaminated meat) [7].

Furthermore, DBS serve as valuable matrices for substances that incorporate into erythrocytes. An example of such a substance is meldonium, an anti-ischemic drug with cardioprotective properties, which has been prohibited in sports since 2016 under the category of a "hormone and metabolic modulator". Meldonium's significant incorporation into red blood cells (RBCs) and its subsequent gradual release from these cells lead to an unusual urinary excretion pattern characterized by an initial rapid phase followed by a slower phase, resulting in detection times spanning several weeks [8].

Navigating hurdles: exploring the limitations of DBS for antidoping

While DBS have emerged as a promising tool in antidoping analyses, it is crucial to acknowledge their inherent limitations. Understanding these constraints is vital for ensuring a nuanced and realistic assessment of the technology's applicability in the realm of antidoping efforts.

Hematocrit effect

One of the primary challenges associated with DBS is the hematocrit effect [9]. Hematocrit, the proportion of blood volume occupied by red blood cells, can vary among individuals. This variability introduces complexities in the quantification of substances present in the dried matrix. Fluctuations in hematocrit levels may impact the concentration of analytes, posing a challenge to consistent sensitivity and accuracy. In individuals with high hematocrit levels, DBS samples may yield higher analyte concentrations, while those with lower hematocrit levels may produce lower concentrations. This variability can complicate the interpretation of DBS results and necessitates careful consideration when analyzing samples. To overcome this effect, techniques for the nondestructive hematocrit determination in DBS have been developed [10–13].

Table - Summary of the advantages and limitations of the use of DBS in antidoping.

Dimension	Advantages	Limitations
Sample collection	Simple No need for phlebotomist Reduced sampling time Low invasiveness Large number of tested athletes Optional remote testing	Low number of available temper-evident kits Limited control on sample quality
Sample transport & storage	Low cost Logistic Reduced storage space High stability	
Sample analysis	Minimal sample preparation High complementarity with mass spectrometry Pharmacological information Possible automation of sample extraction and analysis Complementary information for result management Substances that incorporate into erythrocytes	Regulatory constraints Low sample volume Limited number of spots (replicates) Hematocrit effect Short detection windows Time-consuming manual sample preparation

Limited sample volume

The volume of blood collected in DBS samples is inherently limited. This constraint becomes particularly significant when detecting substances present in low concentrations in the bloodstream. The reduced sample volume may compromise the sensitivity of the analysis, potentially leading to the underdetection of certain doping agents. Moreover, the number of spots may also limit the coverage of analytes that can be screened. For example, achieving sensitive detection of recombinant human erythropoietin often necessitates the use of multiple spots or a larger spot with a greater volume [14]. This requirement poses certain challenges and limitations in this particular context.

Regulatory constraints

The current regulatory framework for DBS testing in antidoping is another limiting factor. Presently, DBS analysis is primarily applicable to substances without predefined thresholds or minimum reporting levels (MRLs) for blood. Therefore, they are currently only effective in detecting substances for which their mere presence is deemed sufficient evidence of an antidoping rule violation. This restriction narrows the scope of substances that can be effectively monitored using DBS, limiting its broader applicability.

Sensitivity challenges

Achieving high sensitivity in detecting prohibited substances is a paramount goal in antidoping analyses. While DBS offers practical advantages, such as ease of collection and transport, its sensitivity may be compromised compared to traditional sampling methods. The sensitivity is also impaired by the short detection windows of many prohibited substances in the blood. This compromise stems from the nature of the dried matrix and the need for highly sensitive detection methods. In addition to issues related to sensitivity, the potential for high throughput capacity may be restricted when manual sample preparation is the sole option for the laboratory.

Complementarity, not replacement

It's crucial to recognize that DBS is not intended to replace traditional urine or blood sampling methods. Instead, it serves as a complementary approach, offering unique advantages while coexisting with established practices. Urine sampling

remains crucial for detecting long-term metabolites of certain substances, which can provide valuable evidence of doping practices even when the parent compound is no longer detectable in blood or urine. Therefore, a combination of both urine and blood-based testing methods is essential to ensure comprehensive and effective antidoping efforts.

Reflections on the future of antidoping with DBS

The use of DBS in antidoping is relatively new and holds considerable promise for the future of athlete monitoring. The prospects of utilizing DBS for quantitative analysis in antidoping are promising but come with the need to establish new minimum reporting levels (MRLs) specifically tailored for blood matrices. As DBS gains traction as a viable alternative for sample collection, the establishment of MRLs becomes imperative to ensure accurate and reliable quantitative results. This involves determining the minimum concentration of a substance in the blood that can be reported with confidence. Once these new benchmarks are established, DBS can play a pivotal role in enhancing the sensitivity and precision of quantitative analyses, providing a valuable tool for antidoping efforts. In line with this perspective, the use of DBS could be applied for indirect detection with the quantification of biomarkers indicative of doping. Some studies have already explored this option for the detection of blood doping, testosterone or growth hormone administration [15–18]. One perspective involves exploring dried plasma spots (DPS), which could offer improved accuracy and sensitivity for detecting prohibited substances without the issues related to hematocrit. Increasing the volume of blood collected in each DBS spot is another avenue to enhance sensitivity, particularly for substances administered in microdoses. Furthermore, the integration of remote sampling methods using DBS would streamline the antidoping process, enabling for simplified logistics related to sample collection [19]. This approach could facilitate more frequent and surprise testing, bolstering the effectiveness of antidoping efforts. Finally, more than 25000 venous whole blood samples are collected per year since 2016 for the analysis of hematological parameters included into the ABP. The collection and transportation of such samples impose a significant financial burden on antidoping organizations. Typically, these samples

undergo immediate analysis upon arrival, after which they are refrigerated for a brief period before disposal, often without fully exploiting their potential. Utilizing these blood samples to generate DBS offers an intriguing alternative. This approach eliminates the constraints associated with limited sample volume, enabling the creation of multiple DBS. Consequently, these DBS could be stored for an extended duration, offering improved stability and space-efficient storage solutions. Over time, DBS derived from whole blood samples could serve as valuable complementary evidence in antidoping efforts, providing additional insights into the potential use of prohibited substances by athletes. This innovative approach not only maximizes the utility of collected blood samples but also demonstrates the adaptability of DBS in optimizing resources and enhancing the capabilities of antidoping organizations. Alternatively, microsampling could also be used for the collection of capillary whole blood intended for the measurement of hematological parameters [20]. Devices like the "Tasso + EDTA" (Tasso) or the "onflow" (Loop Medical SA) allows for the near-painless collection of capillary whole blood in a volume (250-500 μ L and 1.5 mL, respectively) that is sufficient for the automated full blood count.

DBS and the future landscape of antidoping

The utilization of dried blood spots (DBS) in antidoping represents a promising advancement in the fight against doping in sports. As evidenced by testing figures in 2021, DBS implementation has commenced gradually, with some adverse analytical findings (AAFs) underscoring its efficacy. However, the true potential of DBS in enhancing antidoping efforts is yet to be fully realized. The next 2-3 years are poised to be pivotal in highlighting the transformative impact of DBS in athlete monitoring. With ongoing research, method refinements, and the establishment of minimum reporting levels for blood, DBS has the potential to offer more frequent and athlete-friendly sampling strategies, ultimately strengthening the integrity and fairness of sports. It is important to emphasize that while DBS brings significant advantages, it should not be seen as a replacement for urine or blood sampling. Instead, its integration complements the existing methods, enhancing test targeting and results management. As antidoping authorities continue to explore and refine the application of DBS, the stage is set for this innovative approach to play a substantial role in safeguarding clean and fair competition in the world of sports.

[1] M. Thevis, K. Walpurgis, A. Thomas, DropWise: current role and future perspectives of dried blood spots (DBS), blood microsampling, and their analysis in sports drug testing, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **2023**, *60*, p. 41-62.

- [2] S.A. Solheim *et al.*, No pain, just gain: Painless, easy, and fast dried blood spot collection from fingertip and upper arm in doping control, *Drug Test. Anal.*, **2021**, *13*, p. 1783-90.
- [3] G. Forsdahl *et al.*, Detection of testosterone esters in blood, *Drug Test. Anal.*, **2015**, *7*, p. 983-989.
- [4] J. Jing *et al.*, Automated online dried blood spot sample preparation and detection of anabolic steroid esters for sports drug testing, *Drug Test. Anal.*, **2022**, *14*, p. 1040-52.
- [5] T. Lange, A. Thomas, K. Walpurgis, M. Thevis, Fully automated dried blood spot sample preparation enables the detection of lower molecular mass peptide and non-peptide doping agents by means of LC-HRMS, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, *412*, p. 3765-77.
- [6] A.-M. Garzinsky *et al.*, Dried blood spots for doping controls – Development of a comprehensive initial testing procedure with fully automated sample preparation, *Biomed. Chromatogr. BMC*, **2023**, e5633.
- [7] S.A. Solheim *et al.*, Single-dose administration of clenbuterol is detectable in dried blood spots, *Drug Test. Anal.*, **2020**, *12*, p. 1366-72.
- [8] L. Tretzel *et al.*, Analyses of meldonium (Mildronate) from blood, dried blood spots (DBS), and urine suggest drug incorporation into erythrocytes, *Int. J. Sports Med.*, **2016**, *37*, p. 500-502.
- [9] M. Luginbühl, S. Gaugler, Dried blood spots for anti-doping: Why just going volumetric may not be sufficient, *Drug Test. Anal.*, **2021**, *13*, p. 69-73.
- [10] M.M. Alsou, A.F. Hawwa, J.C. Mc Elnay, Hematocrit, blood volume, and surface area of dried blood spots – a quantitative model, *Drug Test. Anal.*, **2020**, *12*, p. 555-560.
- [11] F. Del Ben, J. Biasizzo, F. Curcio, A fast, nondestructive, low-cost method for the determination of hematocrit of dried blood spots using image analysis, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2019**, *57*, e81-e82.
- [12] M. Oostendorp *et al.*, Measurement of hematocrit in dried blood spots using near-infrared spectroscopy: robust, fast and nondestructive, *Clin. Chem.*, **2016**, *62*, p. 1534-36.
- [13] S. Capiou, L.S. Wilk, M.C.G. Aalders, C.P. Stove, A novel, nondestructive, dried blood spot-based hematocrit prediction method using noncontact diffuse reflectance spectroscopy, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, p. 6538-46.
- [14] C.E. Heiland *et al.*, Optimizing detection of erythropoietin receptor agonists from dried blood spots for anti-doping application, *Drug Test. Anal.*, **2022**, *14*, 1377-86.
- [15] O. Salamin *et al.*, Steroid profiling by UHPLC-MS/MS in dried blood spots collected from healthy women with and without testosterone gel administration. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, *204*, 114280.
- [16] O. Salamin *et al.*, Detection of stimulated erythropoiesis by the RNA-based 5'-aminolevulinate synthase 2 biomarker in dried blood spot samples, *Clin. Chem.*, **2019**, *65*, p. 1563-71.
- [17] H.D. Cox *et al.*, Detection of autologous blood transfusions using a novel dried blood spot method, *Drug Test. Anal.*, **2017**, *9*, p. 1713-20.
- [18] C. Mongongu *et al.*, Use of capillary dried blood for quantification of intact IGF-I by LC-HRMS for antidoping analysis, *Bioanalysis*, **2020**, *12*, p. 737-752.
- [19] M.N. Fedoruk, Virtual drug testing: redefining sample collection in a global pandemic. *Bioanalysis*, **2020**, *12*, p. 715-718.
- [20] J.M. Goodrum *et al.*, Feasibility of microvolumetric capillary whole blood collections for usage in ABP analysis, *Drug Test. Anal.*, **2022**, *14*, p. 1291-99.

Olivier SALAMIN¹, PhD, and Martial SAUGY², director emeritus.

¹ Unit of integrative metabolomics, Institute of environmental medicine, Karolinska Institutet, Stockholm (Suède).

² Center of research and expertise in anti-doping sciences, Institute of sport sciences, University of Lausanne (Suisse).

*olivier.salamin.1@gmail.com



Toute l'actualité de la
Société Chimique de France

et bien plus...

societechimiquedefrance.fr

Recent advances in peptide analysis by LC-MS for doping controls

Abstract Doping with peptide-based drugs has gained more and more relevancy since the last decades. Thus, analytical methods are required to enable efficient sports drug testing for this class of prohibited substances. One of the most important tools for peptide analysis is the combination of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Within this manuscript recent advances and developments in the analysis of peptide hormones by means of LC-MS are described with a special focus on the analysis of peptides and proteins according to the list prohibited substances in professional sport (e.g. insulins, growth hormone releasing peptides, IGF-I (and analogs), somatotropin etc.).

Keywords Mass spectrometry, peptide hormones.

Résumé Les avancées récentes de l'analyse peptidique par LC-MS

Le dopage au moyen de médicaments à base de peptides est devenu de plus en plus pertinent au cours des dernières décennies. Par conséquent, des tests de dépistage efficaces de telles substances interdites dans le sport sont devenus nécessaires. L'un des outils les plus importants pour l'analyse des peptides est la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). On décrit ici quelles sont les avancées récentes dans l'analyse LC-MS des hormones peptidiques, en insistant particulièrement sur l'analyse des peptides et des protéines incluses dans la liste des substances interdites dans le sport professionnel (par exemple, les insulines, les peptides libérant l'hormone de croissance, l'IGF-I (et les analogues), la somatotropine, etc.).

Mots-clés Spectrométrie de masse, hormones peptidiques.

A large number of different substances is banned in sport that are considered as doping agents. Amongst these, peptide hormones play an important role and they are found on the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited List in different categories, most prominently though under S2 (Peptide hormones, growth factors, related substances, and mimetics) [1]. The detection of these substances represents a major challenge in doping analysis, as they differ greatly in their structural properties from classic doping substances (such as steroids, stimulants, narcotics, etc.).

Mass spectrometry of prohibited peptide hormones

In addition to established analytical methods based on ligand-binding assays (LBA), which are used to analyze peptide hormones such as human growth hormone, erythropoietin, etc., more and more LC-MS-based methods have been developed in recent years [2]. In particular, the availability of high-resolution mass spectrometers coupled to liquid chromatographs, which are available in most doping control laboratories, enables effective analysis. Examples of such methods are implemented for insulins, growth hormone releasing peptides, gonadorelin (and analogs), IGF-I (and

analogues), corticorelin, mechano growth factors and others [3-6]. These methods are all based on the measurement of intact peptides (top-down), but analysis after enzymatic hydrolysis (bottom-up) has also been realized in many instances (e.g. myostatin inhibitors, activin receptor activators, chorionic gonadotrophin etc.) [7]. The main factor for analyzing the hormone intact or after hydrolysis is the size or molecular mass of the peptide/protein. The *figure 1* shows the distribution of existing analytical approaches (with examples) using top-down respectively bottom-up analysis according to the molecular mass (ranging from 1-150 kDa).

Lower molecular mass peptides (up to 2 kDa) are commonly analyzed after simple solid-phase extraction procedures or even by direct urine injection, and modern mass spectrometers enable low detection limits in the sub-ng/mL level [8]. With increasing molecular masses (2-12 kDa), the sample preparation procedures become more and more complex with assays using immune-purification or mixed-mode solid-phase extraction. A recent development here is that the sample preparation procedures change from laborious and time/cost-intensive immunoaffinity purification to much more simplified solid-phase extraction procedures [5]. This is mainly enabled by the utilization of modern high resolution mass spectrometer

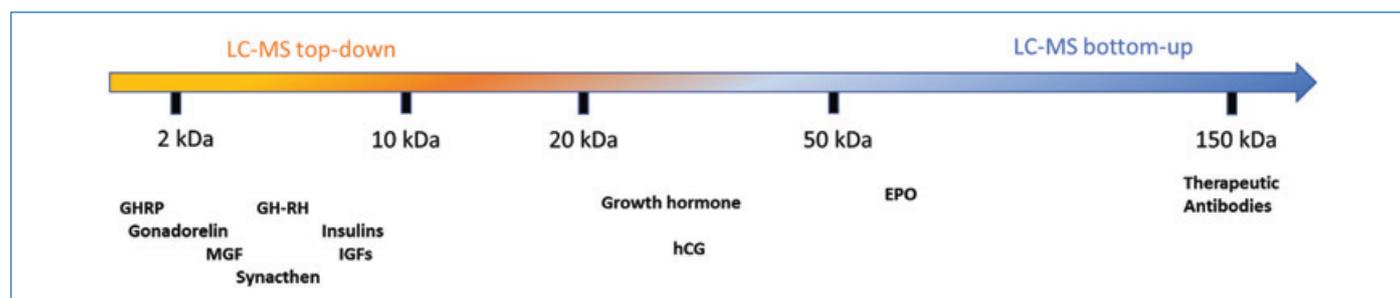


Figure 1 - Distribution top-down - resp. bottom-up LC-MS-based assays for peptide hormones according to their molecular masses. (GHRP: growth hormone releasing peptide; MGF: mechano growth factor; GH-RH: Growth hormone releasing hormone; IGF: insulin like growth factor, hCG: human chorionic gonadotrophin; EPO: erythropoietin).

with a resolution power of > 100 000 full width at half maximum (FWHM) in combination with adapted liquid chromatographic conditions allowing the analysis of less purified sample extracts. These generic sample preparation procedures further allow for the simultaneous analysis of different classes of peptide hormones with a molecular mass between 2 and 10 kDa.

While the analysis of synthetic peptides, which were not produced in the human organism, is covered by simple qualitative analysis, the monitoring of endogenous peptide hormone levels requires reliable quantitative analysis. Therefore, the quantitative determination of several peptide hormones by means of LC-MS has received growing interest in sports drug testing. Target endogenous peptides are IGF-I, P-III-NP and hCG [3, 9, 10]. The reliable quantification is facilitated by the utilization of stable isotope-labelled (SIL) internal standards, which are available for many peptide hormones nowadays. These SIL standards are added to the sample aliquot at the beginning of the sample preparation procedure and ideally compensate for analyte losses or confounding effects at any sample preparation and analysis step. While for the ideal SIL peptide analogues all amino acids are labelled (e.g. ^{15}N), also peptides featuring single amino acid labelling only are available and enable the desired control of the processes.

Challenges and regulations in doping control peptide analysis

Due to its unrivaled specificity, mass spectrometric analysis of peptide hormones represents the state-of-the-art methodology in doping controls. Several potentially performance-enhancing peptide hormones are included in the list of prohibited substances issued by WADA. Under consideration of the molecular mass of the peptide/protein, the analysis is realized by top-down- respectively bottom-up analysis. Major challenges result from the fast (and partly) unknown metabolism of peptides after parenteral administration and the, consequently, prevailing low concentrations in blood and urine. Generally, the analysis of blood (plasma or serum) samples

offers the better conditions due to the commonly higher concentrations and the circulation of the intact hormone. Renal clearance is not entirely investigated for some peptide hormones yet.

- [1] www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-09/2023list_en_final_9_september_2022.pdf, consulté le 16/01/23.
- [2] M. Thevis, K. Walpurgis, A. Thomas, Analytical approaches in human sports drug testing: recent advances, challenges, and solutions, *Anal. Chem.*, **2020**, *92*, p. 506.
- [3] F. Lopes *et al.*, Quantification of intact human insulin-like growth factor-I in serum by nano-ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, *28*, p. 1426.
- [4] A. Knoop *et al.*, Qualitative identification of growth hormone-releasing hormones in human plasma by means of immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408*, p. 3145.
- [5] H.D. Cox *et al.*, Detection of insulin analogues and large peptides >2 kDa in urine, *Drug Test. Anal.*, **2022**.
- [6] G. Coppieters *et al.*, A high-throughput assay for the quantification of intact insulin-like growth factor I in human serum using online SPE-LC-HRMS, *Clin. Chim. Acta.*, **2020**, *510*, p. 391.
- [7] K. Walpurgis *et al.*, Detection of the human anti-actRII antibody bimagrumab in serum by means of affinity purification, tryptic digestion, and LC-HRMS, *Proteomics Clin. Appl.*, **2018**, *12*, e1700120.
- [8] C. Gorgens *et al.*, "Dilute-and-inject" multi-target screening assay for highly polar doping agents using hydrophilic interaction liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry for sports drug testing, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, *407*, p. 5365.
- [9] H.D. Cox *et al.*, Interlaboratory agreement of insulin-like growth factor 1 concentrations measured by mass spectrometry, *Clin. Chem.*, **2014**, *60*, p. 541.
- [10] D. Moncrieffe *et al.*, Inter-laboratory agreement of insulin-like growth factor 1 concentrations measured intact by mass spectrometry, *Clin Chem.*, **2020**, *66*, p. 579.

Andreas THOMAS^{1*}, senior scientist, Florine LEIPP¹, scientific assistant, and Mario THEVIS^{1,2}, scientific director.

¹Institute of Biochemistry - Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, (Germany).

²European Monitoring Center for Emerging Doping Agents (EuMoCEDA), Cologne/Bonn, (Germany).

*a.thomas@biochem.dshs-koeln.de

45
Sc
21

Culture
iencesChimie



ENS



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE

Mis à disposition
**CAPES et
AGRÉGATION**
aux épreuves orales

Site de **ressources en Chimie** pour les enseignants

Thèmes en lien avec les
**PROGRAMMES
D'ENSEIGNEMENT**

Contenu validé par des
CHERCHEURS

Articles, Vidéos, Diaporamas

AGENDA, ACTUALITÉS
événements, conférences, parutions
scientifiques...

http://culturesciences.chimie.ens.fr



Drugs on the edge of performance enhancement

Abstract The official laboratories responsible for detecting cases of sports doping must know very precisely the list of prohibited products (PEDs, performance-enhancing drugs, performance enhancing products) as defined and updated each year by the World Anti-Doping Agency (WADA) in order to be able to develop specific and targeted methods. These efficient modern methods are used to detect minute quantities of drugs on the list, at picogram levels and sometimes even lower. Nowadays it is very likely that any banned substance on the list will be detected. This becomes more complicated when we consider the "WADA Prohibited List" to include related substances in many chemical categories, making the list undefined and nearly infinite in scope. The plurality of wording and "catch-all" notes in many categories such as "including, but not limited to", or "and other substances having a similar chemical structure or similar biological effect(s)", can expand the scope to include any substances related to those on the list. If an unlisted substance has a similar chemical structure to a banned substance on the list, it may be identified during targeted testing and declared to be a doping agent. This has happened twice so far: for example, for 1,3-dimethylamylamine (DMAA), detected and banned due to its similarity to tuaminoheptane, similarly for N, α -diethylphenylethylamine (N, α -DEPEA), due to similarity to methamphetamine. DMAA and N, α -DEPEA are popular illegal pre-workout supplement ingredients. However, if a substance has a similar biological effect that may provide similar performance enhancement to related substances on the WADA Prohibited List, it may escape detection by targeted testing. This therefore requires that such substances be identified first so targeted methods can be created, or detected using non-targeted methods. Several categories of substances on the WADA Prohibited List include only a few medications. Related substances that fit in these categories are likely to be abused as alternative doping agents that are not yet targeted in testing. Among these categories, nootropics and anti-ischemic and antihypoxant drugs that act as metabolic modulators are likely to improve performance and evade current targeted testing. These drugs are on the edge of performance enhancement today.

Keywords **Nootropics, anti-ischemic, antihypoxants, performance enhancement, cognitive health.**

Résumé **Des produits, voire des drogues, pour augmenter les performances**

Les laboratoires officiels chargés de détecter les cas de dopage sportif doivent connaître très précisément la liste des substances interdites (médicaments améliorant la performance, produits améliorant la performance) telle que définie et mise à jour chaque année par l'Agence mondiale antidopage (AMA) afin de pouvoir développer des méthodes spécifiques et ciblées. Ces méthodes modernes et efficaces sont utilisées pour détecter des quantités infimes de drogues figurant sur cette liste, à l'échelle du picogramme et parfois même à des niveaux inférieurs. De nos jours, il est très probable que toute substance interdite figurant sur la liste soit détectée. Cela devient plus compliqué lorsque l'on considère que la liste des interdictions de l'AMA inclut des substances apparentées dans de nombreuses catégories chimiques, ce qui rend la liste infinie. La pluralité de formulations et de notes « fourre-tout » dans de nombreuses catégories telles que « y compris, mais sans s'y limiter », ou « et d'autres substances ayant une structure chimique similaire ou un (ou des) effet(s) biologique(s) similaire(s) », peut élargir le champ d'application pour inclure toutes les substances liées à celles figurant sur la liste. Si une substance non répertoriée a une structure chimique similaire à une substance interdite figurant sur la liste, elle peut être identifiée lors de tests ciblés et déclarée comme agent dopant. Cela s'est produit deux fois jusqu'à présent : par exemple, pour la 1,3-diméthylamylamine (DMAA), détectée et interdite en raison de sa similitude avec le tuaminoheptane, de même pour la N, α -diéthylphényléthylamine (N, α -DEPEA), en raison de sa similitude avec la méthamphétamine. La DMAA et la N, α -DEPEA sont des ingrédients de suppléments pré-entraînement illégaux et populaires. Toutefois, si une substance a un effet biologique similaire susceptible d'améliorer les performances de manière similaire à celle des substances apparentées figurant sur la Liste des interdictions de l'AMA, elle peut échapper à la détection par des tests ciblés. Cela nécessite donc que ces substances soient d'abord identifiées afin que des méthodes ciblées puissent être créées ou détectées à l'aide de méthodes non ciblées. Plusieurs catégories de substances figurant sur la Liste des interdictions de l'AMA ne comprennent que quelques médicaments. Les substances apparentées entrant dans ces catégories sont susceptibles d'être utilisées de manière abusive comme agents dopants alternatifs qui ne sont pas encore ciblés par les tests. Parmi ces catégories, les nootropes et les médicaments anti-ischémiques et antihypoxants, qui agissent comme modulateurs métaboliques, sont susceptibles d'améliorer les performances et d'échapper aux tests ciblés actuels. Ces médicaments sont aujourd'hui à la pointe de l'amélioration des performances.

Mots-clés **Nootropes, anti-ischémiques, antihypoxants, amélioration des performances, santé cognitive.**

Nootropics

In 1998 fonturacetam, also known as carphedon or phenylpiracetam, became the first nootropic banned in Olympic sport by the International Olympic Committee (IOC).

Developed in 1983 in Russia to improve the performance of cosmonauts in harsh environments, phenylpiracetam is a prescription drug registered in Russia under trade name Phenotropil. In the last 25 years no other nootropics have been added to the WADA Prohibited List. Nootropics are loosely

categorized as brain health or cognitive enhancement agents but they can have a variety of impacts including antihypoxant or actoprotective effects. Brain health supplements have grown into an \$8 billion industry as of 2022. Unauthorized ingredients or unapproved pharmaceuticals in the US or EU, including phenylpiracetam, have been sold around the world as nootropic dietary supplements or in an apparently unregulated category of products sold under the guise they are "Not for human consumption" or are "For research use only". These are products often packaged like dietary supplements or food supplements but not labelled as such theoretically putting them out of reach of regulators. They also come without use guidelines or instructions so any potential consumers become guinea pigs and must do their own research to determine appropriate use. Combining nootropics with antihypoxants could significantly enhance the final pharmacological effects especially in terms of reduction of fatigue, improvement of brain and muscle oxygenation, better concentration or focus or other parameters important to sport performance. It is important to realize that while some of the substances discussed here may have acceptable safety profiles on their own at doses designed for use as single ingredient medicines, safety profiles have not necessarily been explored at higher doses or in combination with other ingredients and this should be considered from a public health perspective. Furthermore, while nootropics may provide clinical benefits to individuals in a disease state they may provide enhancement instead to healthy individuals [1].

Many nootropics such as phenibut, racetams and picamilon are derivatives of γ -aminobutyric acid (GABA). Other compounds such as pyritinol or pirisudanol are derivatives of vitamin B6. Explored here is a brief review of some of the available literature on how nootropics impact exercise capacity, physical condition, muscle strength or other skills important in specific sports (such as visual function, precision, decision making, motivation for competition). Of note, fonturacetam and omberacetam, more commonly known as noopept, were developed to enhance performance and workload capacity of cosmonauts in conditions of stress, anxiety, extreme temperatures, or reduced oxygen. These protective effects sometimes result in these compounds being described as synthetic adaptogens or actoprotectors, which are synthetic agents that do not increase oxygen consumption but do increase physical work capacity. Whereas, nootropics are designed to primarily enhance mental capacity but may also have impacts on physical capacity [1]. In the majority of sports mental acuity, attention, focus, and movement precision combined with relevant strength plays a key role. Supporting cognitive performance may correlate with enhanced cerebral processes that can benefit focus, memory, motivation, attention, recognition or even physical resiliency. These factors can significantly impact overall performance. As an example, one competition that requires intense concentration, attention and focus is chess. The International Olympic Committee (IOC) recognized chess as sport discipline in 1999. Chess players competing in a major tournament, such as the World Cup of Chess, can burn up to 6000 calories per day as a result of extreme mental effort, decision making, strategy planning, forecasting, and the stress and emotions associated with the game [2]. Mental performance is not just vital in chess, but in all sports, and a small advantage in the mind just might be the advantage the body needs to perform at its best. Here is a look at some of the most prominent nootropics and potential impacts on sport performance.

Piracetam, phenylpiracetam and other racetams

Piracetam (2-oxo-1-pyrrolidinoacetamide) is a pyrrolidone derivative of GABA and part of a larger class of drugs called racetams that share a pyrrolidone nucleus. Piracetam improves blood supply and oxygenation of the brain. Fonturacetam, also known as carphedon or 4-phenylpiracetam, is a derivative of piracetam used as stimulant and actoprotector agent. Previously 100 mg dose was shown to support exercise performance [1,3]. The phenyl substituent in R3 position increases lipophilicity of the molecule and enhances penetration of the blood-brain barrier (BBB) and final nootropic effect [4]. A large amount of an unknown substance later identified as fonturacetam was found in the urine of a skater in 1997 [1]. Carphedon was also detected in 16 samples during doping control of athletes at the Athletics World Championships in Athens in 1997 [5]. In 1998 fonturacetam (under the name carphedon) became the first nootropic prohibited in elite sport in the IOC Medical code prohibited classes of substances and prohibited methods and it remains on the WADA Prohibited List as a stimulant, a category where the catchall language is relevant. There are a number of other racetams considered to be nootropics that demonstrate similar biological effects as piracetam or phenylpiracetam including aniracetam, oxiracetam, pramiracetam and omberacetam (noopept) [1]. In the Netherlands the "Risky Ingredient List" from 2017 prepared by the Doping Authority included carphedon and other related racetams such as piracetam, aniracetam and noopept.

In addition to piracetam, other racetams are registered drugs in selected countries. Aniracetam in 750 mg or 1500 mg dose is registered in Italy (*Ampamet*), Greece (*Memodrin*, *Referan*) and by Pfizer in Argentina (*Pergamid*). Pramiracetam in 600 mg dose (*Amacetam*, *Ectapram*, *Pramistar*, *Neupramir* and *Remen*) is registered in Italy. Oxiracetam is registered in Italy and Portugal under trade names such as *Neuractiv*, *Neuromet*, *Senex*. Nefiracetam (*Translon*) is only registered in Japan. Fasoracetam and coluracetam are still not registered and remain investigational drugs. These racetams are available around the world on various internet sites. The figure demonstrates some structure-activity relationships among racetams (*figure 1*) [4].

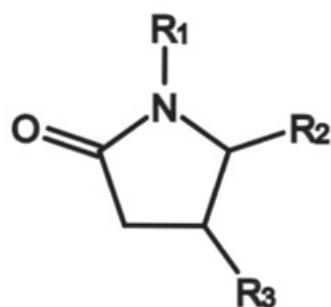
Omberacetam (Noopept)

Omberacetam also known as noopept (N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester) is an example of a racetam with a more complex chemical structure. It has become one of the most popular nootropics today, registering as #29 on Amazon best sellers in analytical reagents October 13, 2023 and on the label of 28 supplement products on the US National Institute of Health (NIH) Dietary Supplement Label Database. A study conducted on young healthy subjects demonstrated that noopept contributes to fast adaptation to difficult environmental conditions and in hot climate it also improved physical capacity [6]. Another study suggested noopept is 200-50000 times more potent than piracetam as a nootropic agent based on comparison of effective dose for both compounds [7].

Phenibut

Phenibut (4-amino-3-phenylbutyric acid, phenyl-GABA) is a synthetic derivative of γ -aminobutyric acid (GABA). GABA is metabolized to succinic semialdehyde by the enzyme GABA transaminase (GABAT) then succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) transforms succinic semialdehyde to

A)



B)

Compound	R1	R2	R3	Half-life (hours)	Single or daily dose (registered or used in clinical trials)	Pharmacological profile	
Piracetam		-H	-H	4-5	400-1200	Unclear receptors and neurotransmitters affinity	Strong nootropic Lower anticonvulsant component
Phenylpiracetam		-H		3-5	100-200	Cholinergic; affinity to nicotinic acetylcholine (nACh) receptors	Strong nootropic Lower anticonvulsant component
Oxiracetam		-H	-OH	3-6	25-40 mg/kg/d	Positive allosteric modulator of AMPA receptors (ampakine effect)	Strong nootropic
Nefiracetam		-H	-H	3-5	600-900	Cholinergic receptors NMDA receptors	Strong nootropic and anticonvulsant
Aniracetam		-H	-H	0.5-1	750-1500	Cholinergic Positive allosteric modulator of AMPA receptors (ampakine effect)	Nootropic
Fasoracetam	-H		-H	4-6.5	100 mg	Metabotropic glutamate receptor (mGluR) GABA-B receptors	Nootropic
Coluracetam		-H	-H	1-2	1-10 mg/kg/d	Cholinergic NMDA receptors	Nootropic

Figure 1 - A) General structure of racetams and substituents ; B) Structure-activity relationships for selected racetams.

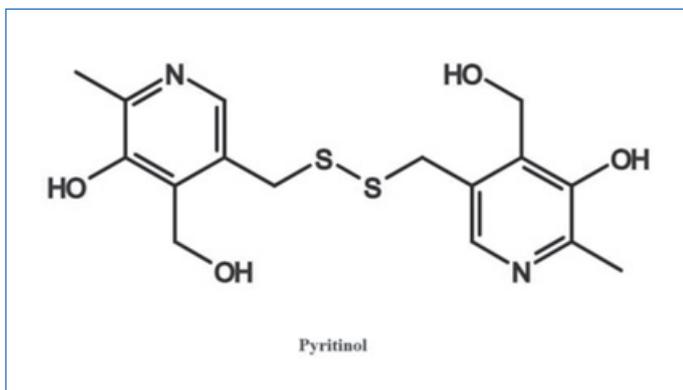


Figure 2 - Chemical structure of pyritinol.

succinic acid. Succinic acid is a key component in the Krebs energy cycle and thus human metabolism. Phenibut is registered as a psychotropic drug under various trade names including *Anvifen*, *Bifren*, *Citrocard*, and *Noofen* in several countries including Russia, Latvia and Ukraine. It has not been approved as a drug by the US FDA or in the European Union (EU). Most of the research on phenibut has been conducted in Russia [1]. Experiments with rats showed that phenibut combined with succinic acid improved exercise performance. Human performance studies on phenibut have mostly been done with other nootropic or actoprotective substances. One study demonstrated that acute intake of phenibut with bemtil, a primary member of the actoprotector category, enhanced thermal resistance in humans during physical load [8]. Another study also showed thermal resistance with a combination of phenibut, piracetam, and obsidian [9].

Picamilon

Picamilon (pikatropin) is a N-nicotinoyl-GABA derivative that is a prescription Russian drug indicated for various neurological conditions typically available in 50 mg tablets. Picamilon has also been sold as a dietary supplement in western countries including the US and EU. It is often found as a powder in multi-ingredient pre-workout or nootropic supplements or capsules with up to six times the prescription dose up to 300 mg. The US FDA has clarified picamilon is an illegal dietary supplement ingredient but it is still found in 133 supplements on the market in the NIH Dietary Supplement Label Database. After oral administration, picamilon rapidly crosses the blood-brain barrier then is hydrolysed into nicotinic acid and GABA. The final result is improving blood flow and circulation and increasing the supply of oxygen and nutrients to the brain [1].

Pyritinol

Pyritinol is a synthetic derivative of vitamin B6 created in the early 1960s. The chemical structure of pyritinol include two molecules of vitamin B6 conjugated by a disulfide bridge (figure 2). This drug improves glucose metabolism and blood circulation in ischemic areas of the brain and increases oxygen supply. Pyritinol under trade name such as *Encephabol* (Merck) or *Enerbol* (Polfa) is indicated for treatment of cerebral atherosclerosis, impaired memory in the course of dementia, psychosomatic exhaustion. Pyritinol is available in the form of tablets (100 mg and 200 mg) and as a liquid/suspension in dose 80 mg/5 mL. Pyritinol demonstrates high bioavailability approximate 85% and is rapidly absorbed after oral administration with half-life estimated on the range 2.5 hours. A study with a small number of healthy volunteers ($n = 12$)

investigated the effect of three days administration of pyritinol at 600 mg daily or 1200 mg daily on psychomotor functions. Performance improved significantly in selected psychomotor parameters such as in Critical Flicker Fusion Test (CFFT) and Choice Reaction Time (CRT) [10].

Pirisudanol

Pirisudanol also known as pyrisuccideanol (trade names *Mentium*, *Mentis*, *Nadex*, *Stivane*), presents an interesting chemical structure as a succinate double ester of pyridoxine (vitamin B6) and dimethylaminoethanol (DMAE), another nootropic. In a group of 10 adult volunteers the effects of amphetamine, a stimulant on the WADA Prohibited List, and pirisudanol were compared on motor reactions (H-reflex test) and psychometric attention tests. Results showed pirisudanol increased motor reactions and attention in performed tests to optimal level while amphetamine decreased performance in both aforementioned tests [11].

Xanthinol nicotinate

Xanthinol nicotinate is a derivative of theophylline and nicotinic acid (vitamin B3). Xanthinol nicotinate is a vasodilator that improves cerebral and peripheral blood circulation and supports tissue oxygenation and nutrition of brain and limbs. Mechanism of pharmacological activity is by blocking the adenosine receptors (AR) and enzyme phosphodiesterase (PDE) which increases the concentration of adenosine monophosphate (AMP) in the cells and increases oxidative phosphorylation and adenosine triphosphate (ATP) synthesis. There is also an antiplatelet effect through activation of fibrinolysis. Xanthinol nicotinate is available in the form of tablets (150-500 mg) or injections (150 mg/mL) under trade names *Complamin* (in Germany) or *Sadamin* (in Poland). Xanthinol nicotinate as *Complamin* was discussed during the "IOC World Conference on Doping in Sport" in Lausanne 1999, as one of the examples of borderline substances but no further action was taken.

Naftidrofuryl

Naftidrofuryl (figure 3) is a complex derivative of diethylaminoethanol (DEAE) available under many alternative trade names such as *Artocoron*, *Dusodril*, *Praxilene*, *Gevatran*, *Iridus*, *Sodipryl* or *Vascuprax*. It had been used in pharmacotherapy for treatment of cerebral disorders caused by vascular insufficiency. Naftidrofuryl enhances tissue oxidative metabolism by activation of succinic dehydrogenase (SDH), a Krebs cycle enzyme involved in energy production and metabolism.

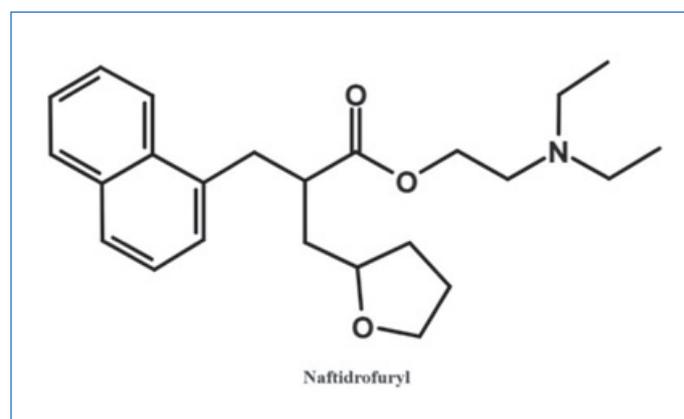


Figure 3 - Chemical structure of naftidrofuryl.

One study investigated the influence of acute oral administration of 300 mg/day naftidrofuryl on five healthy male volunteers 20-40 min before exercise on a bicycle ergometer. Naftidrofuryl contributed to a reduction in the lactate/pyruvate ratio in the volunteers during exercise. This finding suggests naftidrofuryl increases the efficiency of aerobic metabolism in oxygen-deprived tissues during physical load [12]. It should be noted that naftidrofuryl is banned in equine sport by the Fédération équestre internationale (FEI) but it is not banned by WADA in human sport. In the investigation of a doping case involving Dutch cyclists it was reported that a retired cyclist turned race director for a prominent cycling team had naftidrofuryl in his urine sample. It is unclear if it enhances performance but naftidrofuryl appears to have been used to at least aid performance.

Anti-ischemic and antihypoxant drugs

While steroids and stimulants are some of the best known PEDs, more obscure categories like metabolic modulators have been in the spotlight more recently. The anti-ischemic antihypoxant heart medications meldonium (*Mildronate*) and trimetazidine (*Vastarel*) have both become high profile infamous doping agents. The 2022 Winter Olympic Games were jolted when it was reported Russian skater Kamila Valieva returned a positive drug test the previous December for trimetazidine an anti-ischemic antihypoxant antianginal heart medication. She also admitted to using hypoxen (polyhydroxyphenylene thiosulfonate sodium), another antihypoxant drug not yet banned in sport that is advertised to support physical activity. Previously meldonium, another anti-ischemic drug, was added to the Prohibited List in 2016 and became the number one reported substance by WADA that year with 515 adverse analytical findings. It is clear anti-ischemic antihypoxant substances are being sought after and used yet meldonium and trimetazidine are the only two on the WADA Prohibited List in category S4.4 "metabolic modulators". It stands to reason athletes looking to dope would look for related substances. When meldonium was added to the WADA Prohibited List Russian sport officials said they already had alternatives that worked better than meldonium. Succinic acid derivatives such as *Mexidol* and *Cytoflavin* demonstrate antihypoxic, anti-ischemic, reoxygenation effects similar to meldonium and trimetazidine and are used in similar clinical circumstances including for treatment of ischemic stroke or mitochondrial dysfunction. These antihypoxant, anti-ischemic drugs developed in Eastern Europe are not yet prohibited and may be used as ergogenic aids today [13,14].

Mexidol

Mexidol (emoxypine succinate or 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate) is a synthetic 3-hydroxypyridine derivative of vitamin B6 that is registered as a medicine in Russia and Ukraine. It was developed at the Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, in the early 1980s and has been in clinical use since 2003 as a treatment for ischemia. It can be found online on sites that cater to Russian medicines as a suggested alternative to meldonium. Eموxypine succinate is available under various trade names including *Mexidol*, *Mexiprim*, *Mexibel*, *Mexidant*, *Mexifin*, *Neurox* in Russia, and *Armadin Long*, *Limontar*, *Nicomex* and *Elfunat* in Ukraine. A review of the available administration studies

done on healthy subjects suggests there is a potential for performance enhancement. One example with *Mexidol* used at a high dose (200 mg/kg/day) demonstrated an increase in strength among young male athletes aged 19-22 with improvement in deadlift and bench press performance [15]. A study done with a lower dose of 1800 mg/day of *Armadin Long* showed improved performance in strength tests like military press or the jerk used in Olympic style Weightlifting as well as a decrease in time to perform workouts and in lactate acid concentration [16].

Other anti-ischemic antihypoxant 3-hydroxypyridine derivatives are being developed and explored. The effects of emoxypine L-aspartate were found to be equal to or greater than those of bemtil and bromantane, which are considered to be the primary representatives of the actoprotector category [17]. Bemtil is not on the WADA Prohibited List but it has been included in the WADA monitoring program. Bromantane is on the WADA Prohibited List as a stimulant.

Actoprotectors are not often considered in western pharmacology. Actoprotectors are described as synthetic adaptogens that increase work capacity without increasing oxygen consumption or heat production. Adaptogens are generally considered to be natural or synthetic substances that help the body manage biological stress. Actoprotectors and psychostimulants, like amphetamine that are prohibited by WADA as stimulants, improve physical resiliency but actoprotectors do so in non-exhaustive fashion without producing heat and with distinct pharmacological action. Actoprotectors can have antihypoxic activity but they differ in that they also directly stimulate protein synthesis and working capacity. The performance enhancing potential and biological effects of antihypoxant anti-ischemic substances like *Mexidol* may be compared not only to metabolic modulators like trimetazidine or meldonium but also potentially to psychostimulants that are banned in sport [13].

Cytoflavin

Cytoflavin is a registered drug in Russia available in formulation as tablets or injections. *Cytoflavin* is a multi-component drug including meglumine sodium succinate, nicotinamide (vitamin B3), inosine (riboxin) and riboflavin (vitamin B2). A study among 60 volleyball players aged 18-35 demonstrated that intake of 4 tablets of *Cytoflavin* per day (providing 1200 mg meglumine sodium succinate, 200 mg inosine, 100 mg nicotinamide, 20 mg riboflavin) contributed to improvements in memory and attention on the Visual Analog Scale (VAS) test. Additionally there was an increased level of subjective satisfaction with physical and mental performance [18]. In another publication administration of *Cytoflavin* to 60 ice hockey players registered a slight improvement in time to exhaustion (TTE) and also an increase in maximal oxygen consumption (VO₂ Max) on a treadmill ergometer [19].

The edge of performance enhancement

The nootropic and anti-ischemic antihypoxant substances reviewed here appear to have similar biological effects as substances on the WADA Prohibited List and are likely to be sought after as alternative doping agents. While research studies may be limited in scope and scale, they do seem to support the use of these substances as potential ergogenic aids albeit in non-traditional ways like cognitive enhancement or improved oxygenation. Message boards show that these

substances are being used to enhance sports performance. Many have been developed as drugs and are available as such in Eastern Europe while in Western countries they are often made available as illegal dietary supplement ingredients or chemicals clearly meant for human consumption but sold for research purposes only. Substances like the pharmaceutical nootropics or anti-ischemic antihypoxant agents explored here deserve further attention and debate in the effort to maintain clean sport. They are also worthy of discussion from the larger public safety and health perspective as these substances are sold for the purposes of brain health, enhancing cognition, stress reduction, managing anxiety, and more. As such they are attractive not only as potential doping agents for athletes looking for a chemical advantage but also to general consumers looking to boost their daily lives and performance. While some of these substances may demonstrate reasonable safety profiles at lower doses studied and intended for medical use they may not have been tested and may not be safe at higher doses or when used in combinations with potentially synergistic ingredients as seen in some dietary supplements. As we watch the glory of the 2024 Paris Olympics unfold some may wonder what substances athletes might be using to achieve peak performance. The ones highlighted here remain legal to use as ergogenic aids but appear to be teetering on the edge of performance enhancement.

- [1] K. Jędrejko *et al.*, Unauthorized ingredients in "nootropic" dietary supplements: a review of the history, pharmacology, prevalence, international regulations, and potential as doping agents, *Drug Test. Anal.*, **2023**, 15(8), p. 803-839.
- [2] S. Golf, Doping for chess performance, *J. Sports Med. Doping Stud.*, **2015**, 5, p. 160.
- [3] V.A. Semenov, S.L. Bolotov, V.F. Sizoi, New stimulant of russia-carphedon. recent advances in doping analysis, *Sport und Buch Strauß*, **1999**, p. 337-348.
- [4] A.G. Malykh, M.R. Sadaie, Piracetam and piracetam-like drugs, *Drugs*, **2010**, 70, p. 287-312.
- [5] C.G. Georgakopoulos *et al.*, Doping control analysis: the 6th World Championships of Athletics, Athens, Greece, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1999**, 18, p. 1-13.
- [6] P.D. Shabanov, V.P. Ganapol'skiĭ, P.V. Aleksandrov, Meteoadaptogenic properties of peptide drugs in healthy volunteers, *Eksp. Klin. Farm.*, **2007**, 70, p. 41-47.

- [7] R.U. Ostrovskaja *et al.*, The original novel nootropic and neuroprotective agent noopept, *Eksp. Klin. Farm.*, **2002**, 65, p. 66-72.
- [8] V.I. Makarov *et al.*, The enhancement of human thermal resistance by the single use of bemitil and fenibut, *Eksp. Klin. Farm.*, **1997**, 60, p. 68-71.
- [9] V.S. Baculin, V.I. Makarov, Thermoprotective efficiency of piracetam, phenibut and obsidan during submaximal physical loads in conditions of reduced heat loss, *J. Volg. St.e Medic. Un.*, **2011**, 8, p.23-26.
- [10] I. Hindmarch, D.M. Coleston, J.S. Kerr, Psychopharmacological effects of pyritinol in normal volunteers, *Neuropsychobiology*, **1990**, 24, p. 159-164.
- [11] N.Bathien, J.C.Willer, A. Hugelin, Effect of psychotropic drugs on physiological variations and psychometric scores during attention, *Encephale*, **1976**, 2, p. 55-60.
- [12] S.W.J. Shaw, R.H. Johnson, The effect of naftidofuryl on the metabolic response to exercise in man, *Acta. Neuro.l Scand.*, **1975**, 52, p. 231-237.
- [13] S. Oliynyk, S. Oh, The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance, *Biomol. Ther.*, **2012**, 20, p. 446.
- [14] V.E. Novikov, O.S. Levchenkova, E.N. Ivantsova, V.V. Vorobieva, Mitochondrial dysfunctions and antihypoxants, *Обзоры*, **2019**, 17, p. 30-41.
- [15] Н.А. Фудин, А.А. Хадарцев, А.А. Несмеянов, Возможности Активации Митохондриальной Активности у Спортсменов Мексидолом, *Вестник новых медицинских*, **2015**, 9, p. 12.
- [16] V.L. Voitenko, L.M. Gunina, V.G. Oleshko, E.V. Nosach, Assessing action mechanisms of pharmacological agent based on succinic acid derivative under physical loads of submaximal intensity, *World Med. Biol.*, **2018**, 14, p. 28-32.
- [17] V.V. Yasnetsov *et al.*, Studying some pharmacological effects of new 3-hydroxypyridine derivative, *Eksp. Klin. Farm.*, **2016**, 79, p. 3-8.
- [18] P.N. Chainikov *et al.*, Clinical effectiveness of cytoflavin in the correction of cognitive functions for mental and physical working capacity in male floor volleyball players, *Eksp. Klin. Farm.*, **2018**, 81, 25-29.
- [19] V. Zaborova *et al.*, Metabolic and body composition changes in ice hockey players using an ergogenic drug (cytoflavin), *Biology*, **2023**, 12, p. 214.

Oliver CATLIN^{1*}, president, and Karol JĘDREJKO², researcher.

¹Anti-Doping Sciences Institute & Banned Substances Control Group (BSCG), Los Angeles, États-Unis.

²Jagiellonian University Medical College, Faculty of Pharmacy, Department of pharmaceutical botany, Krakovie, Pologne.

* ocatlin@bscg.org

Nouveaux principes actifs pharmaceutiques

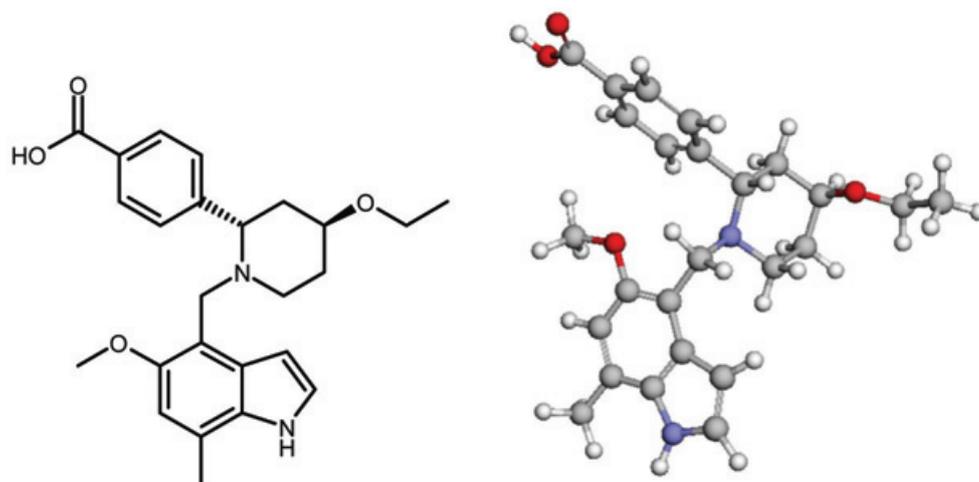
Bilan des approbations FDA en décembre 2023

Au cours de cette période, trois nouvelles molécules de synthèse ont été approuvées, aucune nouvelle molécule d'origine biologique n'a été approuvée.

Molécules de synthèse

Principe actif	Compagnie	Indication
Iptacopan hydrochloride	Novartis	Hémoglobinurie paroxystique nocturne
Birch triterpenes	Amryt	Plaies et ulcères
Eplontersen sodium	Ionis Pharma Inc.	Amylose à transthyréine

L'**iptacopan** est utilisé pour le traitement de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. Il s'agit d'un inhibiteur du facteur B du complément administré par voie orale. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne est une maladie du sang rare, potentiellement mortelle, caractérisée par la destruction des globules rouges par le système du complément, une partie du système immunitaire inné de l'organisme. Ce processus destructeur est dû à un déficit de la protéine de surface des globules rouges, DAF, qui inhibe normalement ces réactions immunitaires.



Structure de l'iptacopan

Nomenclature : 4-[(2S,4S)-4-ethoxy-1-[(5-methoxy-7-methyl-1H-indol-4-yl)methyl]piperidin-2-yl]benzoic acid ; n° CAS : 1644670-37-0.
La représentation 3D provient du site Drugbank⁽¹⁾ : https://go.drugbank.com/structures/small_molecule_drugs/DB16200

Le **birch triterpenes** est un cicatrisant utilisé sous forme de gel dans le traitement des plaies peu profondes et des ulcères. La préparation est à base d'extrait sec raffiné de cortex de bouleau. Cet extrait contient majoritairement des triterpènes de type bétuline. Le mécanisme d'action précis dans le processus de cicatrisation n'est pas connu.

L'**eplontersen sodium** est un oligonucléotide antisens conjugué à la N-acétylgalactosamine ciblant l'ARN messager de la transthyréine (TTR), inhibant ainsi sa biosynthèse. L'amylose à transthyréine se caractérise par une atteinte du système nerveux, des reins, des yeux et du cœur due à une accumulation de transthyréine en dépôts amyloïdes dans les organes atteints.

⁽¹⁾ Drugbank est une banque de données sur les principes actifs accessible sur Internet : D.S. Wishart *et al.*, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46, p. D1074-D1082, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>

Actualités des substances actives phytopharmaceutiques

Janvier 2024

Retraits d'autorisation

Les produits à base de *trisulfuron-méthyle* sont retirés du marché à partir du 20 février 2024, ceux à base de *métirame* le seront le 28 mai et ceux à base de *benthiavalicarbe* seront retirés le 13 juin.

Le bulletin de l'ANSES de ce mois annonce le retrait d'un fongicide à base de *boscalide* associé à la *dimoxystrobine* par décision du 20 octobre dernier.

Nouvelles autorisations

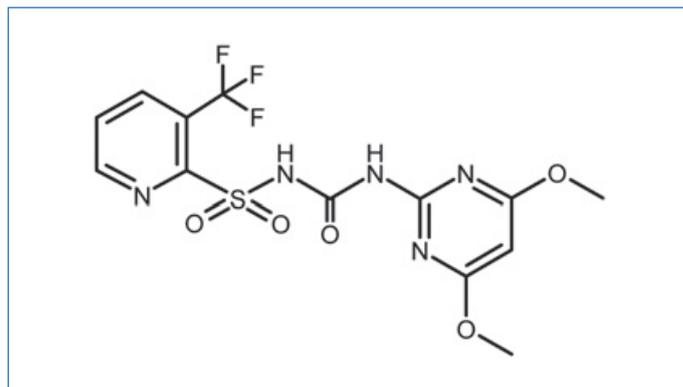
Elles sont accordées à deux fongicides et à un attractif phéromone. L'un des fongicides, aussi régulateur de croissance, est à base de *metconazole* présenté sous forme de concentré émulsionnable, utilisable en grandes cultures et cultures légumières. L'autre est à base de *prothioconazole*, pour grandes cultures et en concentré émulsionnable. L'attractif phéromone est à base d'acétate de (E,Z)-7,9-dodécadien-1-yle, sous forme de produit diffuseur de vapeur.

Modifications d'AMM (renouvellements, modifications d'usages)

L'AMM d'un herbicide à base de *flazasulfuron* est renouvelée après réapprobation de la substance active et réexamen. Il en est de même de l'AMM d'un insecticide-fongicide-acaricide, à base d'huile essentielle d'orange, avec modifications des conditions d'emploi.

Le **flazasulfuron** est une sulfonylurée herbicide systémique de prélevée utilisé pour désherber les zones industrielles, voies de communication et voies ferrées, et en désherbage

de cultures installées (vigne, olivier, agrumes), efficace en traitements de pré et post-émergence. Il est absorbé par les feuilles et les racines. Il a été introduit au Japon en 1989 par la société japonaise Ishihara Sangyo Kaisha Ltd. Il inhibe la biosynthèse des aminoacides branchés essentiels (valine et isoleucine). Il est réputé peu toxique pour les mammifères avec une DL50 par ingestion pour le rat supérieure à 5 g/kg.



Le flazasulfuron (CAS N° 104040-78-0).

Nom IUPAC : 1-(4,6-diméthoxyrimidin-2-yl)-3-(3-trifluorométhyl-2-pyridylsulfonyl)urée.

Cette rubrique est coordonnée et alimentée par **Josette FOURNIER**, qui a présidé de 2007 à 2010 le comité d'orientation et de prospective scientifique de l'Observatoire des résidus de pesticides (ORP) (josette.fournier4@orange.fr), et **Jean-Marc PARIS**, ancien directeur de recherche pharmaceutique dans le groupe Rhône-Poulenc et ancien directeur scientifique de la chimie organique et biotechnologies de Rhodia (jeanmarc.paris@free.fr).

9th EuChemS CHEMISTRY CONGRESS
Dublin, Ireland 7-11 July 2024

CHEMISTRY: ADDRESSING CURRENT AND FUTURE GLOBAL CHALLENGES

ECC-9 Congress Programme Themes

Advances in Synthetic Organic Chemistry	Education, History, Cultural Heritage, and Ethics in Chemistry
Catalysis	Nanochemistry/ Materials
Physical, Analytical and Computational Chemistry	Energy, Environment and Sustainability
Chemistry Meets Biology for Health	Supramolecular Chemistry

ECC-9 World-Leading Plenary Speakers

 Professor Dame Clare P. Grey	 Professor Odile Eisenstein	 Professor Véronique Gouverneur	 Professor Frances H. Arnold
 Professor Sir David W. C. MacMillan	 Professor Sir J. Fraser Stoddart	 Professor Omar M. Yaghi	 Professor Brigitte Van Tiggelen

www.euchems2024.org

Prix et distinctions

Médaille de cristal du CNRS 2023

La médaille de cristal distingue des femmes et des hommes, personnels d'appui à la recherche, qui par leur créativité, leur maîtrise technique et leur sens de l'innovation, contribuent aux côtés des chercheurs et des chercheuses à l'avancée des savoirs et à l'excellence de la recherche française. Chimie, génie des procédés et matériaux sont ainsi mis en lumière :



© Ruben Checa

• Chantal Lorentz

Entrée au CNRS en 1994 comme technicienne, Chantal Lorentz exerce désormais comme ingénieure de recherche à l'Ircelyon (CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1).

Après l'obtention de son diplôme d'ingénieure du CNAM en 2011, elle a gravi de nombreuses marches, tant administratives que techniques et scientifiques jusqu'à devenir responsable de la plateforme de caractérisation des matériaux catalytiques Ircatech. Co-auteurice d'une soixantaine d'articles scientifiques, elle a également contribué à des développements technologiques d'envergure. Elle a adapté différentes techniques analytiques pour la caractérisation de catalyseurs par résonance magnétique nucléaire permettant de comprendre et d'optimiser des procédés chimiques. Elle a également contribué au développement d'une technique séparative innovante permettant d'étudier des milieux chimiques complexes constitués de plusieurs centaines de molécules. En tant que membre du comité de direction de son laboratoire, Chantal Lorentz assure le suivi de l'ensemble des personnels de support à la recherche.



© Institut Jean Lamour

• Jonathan Martens

Technicien en instrumentation, expérimentation et mesure, membre de l'équipe Procédé, d'élaboration, Jonathan Martens a rejoint en 2019 la chaire industrielle Métal liquide de l'Institut Jean Lamour (CNRS/Université de

Lorraine). Son activité porte sur le développement d'un four de fusion original dédié à l'étude des alliages métalliques à très hautes températures, comme par exemple les aciers ou les superalliages. L'objectif : maintenir une faible quantité de métal en lévitation grâce à l'émission d'ondes acoustiques, tout en assurant la chauffe et la fusion de l'échantillon par un laser. Dans ce cadre, Jonathan Martens a pris en charge le développement du système de lévitation, une activité sur laquelle aucun résultat n'avait été identifié dans la littérature auparavant. Ses nombreux développements ont permis au four de faire léviter des échantillons de tous types de métal et d'atteindre des températures supérieures à 1 500 °C. Cette première mondiale, concernant ce type de dispositif, a donné lieu à deux dépôts de brevet depuis fin 2022.



© Laurent Pieuchot

• Gautier Schrodj

Entré en CNRS en 2001 en tant qu'assistant ingénieur, Gautier Schrodj est devenu en 2008 responsable de la plateforme Analyses mécaniques thermomécaniques et rhéologiques

de l'Institut de science des matériaux de Mulhouse (IS2M, CNRS/Université de Haute-Alsace). Il soutient alors de nombreux projets académiques et industriels. En vingt ans de carrière, il a acquis une expertise technique et scientifique unique de haut niveau en caractérisation des matériaux. Son savoir-faire en analyses mécanique, dynamique et thermique, en particulier, est largement reconnu à l'échelle nationale. En 2009, il met en place une démarche qualité pour les onze plateformes techniques de son laboratoire, une initiative alors rare pour un établissement de recherche qui s'est depuis généralisée et pour laquelle l'IS2M est souvent cité comme exemple. Jusqu'à ce jour, Gautier Schrodj mène d'une main de maître le fonctionnement et l'organisation des plateformes de son laboratoire et maintient leur haut niveau de technicité tout en s'appuyant sur l'expertise de ses collaborateurs.

Recherche et développement

Douze lauréats EMERGENCE@CNRSChimie2024

Pour la septième année consécutive, CNRS Chimie a renouvelé son soutien en faveur des jeunes chimistes en relançant l'appel à projet Emergence@CNRSChimie2024. L'objectif de cet appel consiste à mieux accompagner les chargé(e)s de recherche ou maîtres et maîtresses de conférences en finançant une bourse postdoctorale pour un projet novateur par rapport à l'état de l'art et en encourageant la prise de risque.

Les douze lauréats 2024 sont :

- **Édouard Badarau**, enseignant chercheur au laboratoire Chimie et biologie des membranes et des nanoobjets (CNRS/Université de Bordeaux/Bordeaux INP) pour le projet « Grob fragmentation as a tool for the design of new photo-immolative nano-materials (PhotoCHOP) » ;
- **Læticia Chausset-Boissarie**, chercheuse au laboratoire Chimie organique et bioorganique : réactivité et analyse (CNRS/Université Rouen Normandie/INSA Rouen Normandie) pour « Electrophotocatalytic trifluoromethylation with trifluoroacetic acid (TFA@EPC) » ;
- **Benoît Couturaud**, enseignant chercheur à l'Institut de chimie et des matériaux Paris-Est (CNRS/Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne) pour « Auto-assemblage induit par polycondensation utilisant des réactions multicomposants (McPISA) » ;
- **Émilie Delahaye**, chercheuse au Laboratoire de chimie de coordination (CNRS/Université Toulouse 3), pour le projet « Étude d'aimants moléculaires multiferroïques (AIMMOI) » ;
- **Marc Devillard**, chercheur à l'Institut des sciences chimiques de Rennes (ENSC de Rennes/Université de Rennes) pour « The missing link for olefin synthesis: 2-silyl-vinylaluminum (SILVA) » ;
- **Adrien Normand**, chercheur à l'Institut de chimie moléculaire de l'Université de Bourgogne (CNRS/COMUE UBFC) pour « Earth-abundant catalytic systems for the dehalogenation of polymers (DEHALOPOLY) » ;
- **Gauthier Rydzek**, enseignant chercheur à l'Institut Charles Gerhardt Montpellier (CNRS/ENSC Montpellier/Université de Montpellier) pour « Electrodeposited hybrid mesoporous films (E-HYPOF) » ;

- **Johannes Schachenmayer**, chercheur à l'Institut de science et d'ingénierie supramoléculaires (CNRS/Université de Strasbourg) pour « Disorder-induced non-classical states in polaritonic chemistry (DINOPARC) » ;

- **Lydia Sosa Vargas**, chercheuse à l'Institut parisien de chimie moléculaire (CNRS/Sorbonne Université), pour le projet « Supramolecular thermally-activated delayed fluorescence polymers for greener LED materials (SupraLED) » ;

- **Antoine Tissot**, chercheur à l'Institut des matériaux poreux de Paris (CNRS/ENS – PSL/ESPCI Paris – PSL) pour le projet « Solides poreux flexibles et commutables pour la détection de chocs (SPOCC) » ;

- **Laura Trapiella Alfonso**, enseignante chercheuse à l'Institute of chemistry for life and health sciences (CNRS/Chimie ParisTech – PSL) pour l'« Étude approfondie des propriétés structurales et physicochimiques des carbon dots dopés avec du fer en milieux physiologiques pour le diagnostic (App-CDFe) » ;

- **Domenico Truzzolillo**, chercheur au Laboratoire Charles Coulomb (CNRS/Université de Montpellier) pour le projet intitulé « Gelation and elastocapillarity in spinning beads (ELAS-TOSPIN) ».

• Source : CNRS Chimie, 22/12/2023.

La recherche académique française en chimie par temps de crise

Qu'il s'agisse de concevoir, synthétiser et caractériser des molécules ou matériaux nouveaux ou bien de nouveaux procédés, pour des applications d'aujourd'hui et de demain, la chimie se trouve au carrefour de plusieurs des dix-sept objectifs de développement durable (ODD) définis par l'ONU. Ces ODD visent à ce que les sociétés de l'ensemble des pays du monde atteignent un stade de développement durable à la fois sur les plans environnemental et sociétal. La chimie développe des interfaces avec la physique, la biologie, la santé, le génie des procédés et, aujourd'hui, aussi avec la « science des données » en plein essor. Les objets d'étude de la chimie couvrent toutes les échelles entre les molécules et les matériaux, les plus avancés étant souvent inspirés de la nature et pouvant présenter une structuration hiérarchique multi-échelles. Les rapports dits « de prospective » de chaque Conseil scientifique d'institut (CSI) du CNRS sont demandés en fin de mandature et se présentent sous forme d'une publication d'une vingtaine de pages, constituant un rapport pour une période de trois ans⁽¹⁾. Pour 2019-2023, Olivier Sandre, président du CSI de l'Institut de chimie (INC, dorénavant CNRS Chimie), a proposé à *L'Actualité Chimique* un article résumant son rapport de mandature et intitulé « La recherche académique française en chimie par temps de crise ». Le rapport de prospective de la mandature 2019-2023 du CSI-INC est consultable en ligne⁽²⁾ et sa version résumée accessible sur le site de *L'Actualité Chimique*⁽³⁾. Ce rapport de prospective résulte des discussions menées lors des séances du CSI de l'Institut de chimie du CNRS qui se sont déroulées de janvier 2019 à septembre 2023. Les premières parties du rapport visent à dépeindre le paysage de la recherche française en chimie et ses sous-disciplines, depuis la chimie moléculaire à la science des matériaux et la physico-chimie analytique. Cependant, comme toute représentation, elle sera forcément partielle et résultant du point de vue de ses auteurs, qui ne revendiquent pas d'embrasser l'entièreté des sujets de recherche actuels, mais simplement de donner une vision de la discipline à travers le prisme des connaissances,

de l'expertise et des orientations de recherches des membres du CSI. Les propos exposés dans la suite du rapport résultent des débats et des réflexions des membres du CSI au sujet de grandes questions sociétales auxquelles les chimistes peuvent apporter des réponses par leurs travaux en lien avec l'énergie, les ressources durables, la santé, etc., et grâce à la chimie en flux et aux nouveaux outils de l'intelligence artificielle. Ils ont été suscités, d'une part, par la présentation régulière devant le CSI des actualités de l'INC par sa direction, d'autre part, par des exposés de personnalités invitées pour leur expertise (et sur suggestion du Bureau) sur des questions précises sur lesquelles la direction de l'Institut a demandé au CSI de réfléchir, soit desquelles le CSI s'est auto-saisi, en fonction de l'actualité, pouvant concerner les membres des laboratoires rattachés à l'INC. Le rapport aborde ensuite les questions de l'emploi des docteurs en chimie, de la science ouverte, des questions d'intégrité et des financements de la recherche – notamment ceux des programmes et équipements prioritaires de recherche (PEPR) – et se conclut par une série de recommandations élaborées de manière collégiale et votées en séance.

⁽¹⁾<https://rapports-du-comite-national.cnrs.fr/rapports-de-prospective>

⁽²⁾<https://hal.science/hal-04307872v1>

⁽³⁾www.lactualitechimique.org (page liée au sommaire de ce numéro).

RMN et IRM : un duo magnétique pour comprendre les cancers du cerveau

Les gliomes représentent 50 % des cancers du cerveau et constituent les tumeurs cérébrales les plus fréquentes. Les altérations moléculaires impliquées dans ces cancers affectent principalement les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, qui agissent comme des « interrupteurs » d'activation ou d'inhibition de nombreuses fonctions comme la division ou la migration cellulaire. En particulier, on observe une amplification et/ou des mutations du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et des voies de signalisation qui lui sont associées. Ceci induit une division cellulaire incontrôlée et, à terme, l'apparition de tumeurs. Plusieurs thérapies ciblées ont été développées, mais les traitements actuels restent inefficaces contre les glioblastomes, les formes les plus graves de ces cancers du cerveau. Il est donc primordial d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter ces cancers.

Des scientifiques du CNRS, au Centre de biophysique moléculaire et au laboratoire Conditions extrêmes et matériaux haute température et irradiation, ont étudié un modèle de ces cancers du cerveau chez la drosophile pour mieux comprendre les perturbations métaboliques qui lui sont associées. La surexpression des récepteurs de l'EGF et d'une enzyme (la phosphoinositide 3-kinase, PI3K) dans les cellules gliales, ces cellules du système nerveux central qui soutiennent et protègent les neurones, induit une hypertrophie du cerveau nettement visible par IRM et l'apparition d'une cachexie (fonte du tissu adipeux et des muscles). Ils ont ensuite exploré l'altération du métabolisme cellulaire en utilisant la RMN à angle magique haute résolution (HR-MAS) et la RMN liquide 2D. Ils ont ainsi pu mettre en évidence des modifications des voies métaboliques dans le gliome, en particulier des modifications caractéristiques de la cachexie.

Si l'intérêt de cibler le récepteur 5-HT7 de la sérotonine pour le traitement de maladies neurologiques et psychiatriques est bien décrit, son rôle dans le contrôle de la prolifération tumorale reste peu exploré. Pour tenter de répondre à cette question, les scientifiques ont génétiquement modifié les

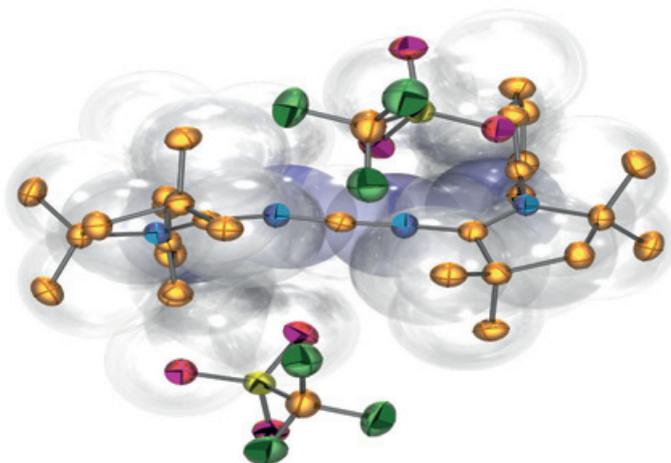
drosophiles porteuses du gliome pour qu'elles expriment à la surface des cellules gliales le récepteur R5-HT7 humain. Ils ont ainsi pu montrer que l'expression de ce récepteur de la sérotonine atténue plusieurs effets qui sont associés au développement du gliome, comme l'hypertrophie du cerveau, observable par IRM, et la cachexie.

La combinaison des techniques d'analyses RMN utilisées ici se révèle être un outil efficace pour mieux comprendre les mécanismes biochimiques de certains cancers du cerveau, étape cruciale pour développer de nouvelles thérapies ciblées.

• Source : CNRS Chimie, 09/01/2024.

Réf. : M. Bertrand, F. Szeremeta, N. Hervouet-Coste, V. Sarou-Kanian, C. Landon, S. Morisset-Lopez, M. Decoville, An adult *Drosophila* glioma model to highlight metabolic dysfunctions and evaluate the role of the serotonin 5-HT7 receptor as a potential therapeutic target, *The FASEB Journal*, 2023, DOI: 10.1096/fj.202300783RR.

Un atome de carbone avec seulement quatre électrons de valence...



© Mohand Melaimi.

Les carbènes sont des espèces chimiques organiques dont un atome de carbone possède seulement six électrons de valence au lieu des huit dans sa forme stable prédite par la célèbre règle de l'octet*. Ce défaut d'électrons rend les carbènes très instables et donc ultra réactifs. Pour cette raison, ils ont longtemps été considérés comme des intermédiaires réactionnels fugaces, curiosités de laboratoires faisant uniquement l'objet d'études très fondamentales. Depuis que les équipes de Guy Bertrand et Anthony Arduengo ont isolé les premiers carbènes stables, ces espèces ont connu des développements considérables. Elles sont en particulier devenues incontournables en chimie de synthèse, précisément en raison de leur réactivité singulière. Les carbènes se comportent aussi comme des catalyseurs organiques à part entière, aussi bien en synthèse moléculaire qu'en chimie des polymères.

Les chimistes de l'équipe de Guy Bertrand au laboratoire international du CNRS « Joint Research Laboratory » (Department of Chemistry and Biochemistry, University of California - San Diego) viennent de franchir un nouveau pas en isolant le tout premier composé stable dans lequel on ne compte plus que quatre électrons de valence sur le carbone. Pour réussir cette première, les chimistes ont introduit des substituants volumineux en périphérie du carbène afin de stabiliser électriquement cette espèce autrement instable. Cette stratégie a également rendu possible sa caractérisation par cristallographie des rayons X, apportant la preuve de cet état de valence atypique.

En étudiant sa réactivité, ils ont également pu mettre à jour sa forte acidité de Lewis attribuable à la double oxydation du carbone carbénique. Cette espèce est suffisamment réactive pour former des anions tels que le méthoxyde (CH_3O^-), le chlorure (C^-) et même le cyanure (CN^-). Une découverte publiée dans la revue *Nature*, qui, si elle met à mal un des fondements de la chimie organique, devrait ouvrir des nouvelles perspectives en termes de catalyse.

• Source : CNRS Chimie, 04/12/2023.

Réf. : Y. Kai Loh, M. Melaimi, M. Gembicky, D. Munz, G. Bertrand, A crystalline doubly oxidized carbene, *Nature*, 2023, www.nature.com/articles/s41586-023-06539-x.

* Formulée par Gilbert Lewis en 1916, la règle de l'octet est une règle chimique simple qui énonce que les atomes avec un numéro atomique $Z \geq 4$ comme le carbone tendent à se combiner de façon à avoir huit électrons dans leur couche de valence, ce qui leur donne la même structure électronique qu'un gaz noble.

Du nouveau dans la réaction de Diels-Alder grâce aux organocatalyseurs

Depuis le prix Nobel décerné à Benjamin List et David MacMillan en 2021 pour leurs travaux en organocatalyse, la réputation de ce domaine de recherche n'est plus à faire. Petites molécules carbonées, les organocatalyseurs ont séduit de nombreux chimistes organiciens en mal d'alternatives efficaces aux métaux largement utilisés, mais souvent connus pour leur toxicité et leur coût élevé. Ils permettent non seulement d'accélérer certaines réactions mais aussi et surtout de contrôler la géométrie des molécules synthétisées. Parmi le large champ d'applications de l'organocatalyse, la réaction de Diels-Alder est un cas d'école. Transformation iconique en chimie organique, elle permet la synthèse de molécules cycliques en transformant, en une seule étape, deux doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ en simples liaisons $\text{C}-\text{C}$. Au cours de cette réaction dite de cycloaddition, plusieurs isomères peuvent souvent se former, molécules de même formule chimique mais dont l'arrangement des atomes dans l'espace diffère. On appelle stéréosélectivité l'art de contrôler cette géométrie et l'utilisation d'un organocatalyseur chiral est un puissant levier pour atteindre ce contrôle.

Une équipe de chimistes de l'Institut des substances naturelles (CNRS/Université Paris Saclay) a étudié une famille de tels organocatalyseurs chiraux à base d'acide phosphorique. Avec ces catalyseurs, ils ont pu réaliser des réactions de Diels-Alder asymétriques qui permettent d'introduire dans le cycle une liaison $\text{N}-\text{O}$. Les molécules ainsi obtenues, appelées oxazines, sont des hétérocycles à six atomes dont quatre de carbone, un atome d'azote et un atome d'oxygène. Ces molécules, que l'on retrouve dans de nombreux produits naturels comme le preisomide aux propriétés antimicrobiennes, présentent un grand intérêt, notamment en chimie thérapeutique. Comme il est aisé de jouer sur la liaison $\text{N}-\text{O}$, elles sont des briques de choix pour la préparation rapide de produits plus complexes.

D'habitude, les cycloadditions de Diels-Alder utilisent comme réactifs de départ des molécules qui possèdent deux doubles liaisons consécutives, appelés diènes. Des chimistes de l'ICSN se sont penchés sur une question simple mais pourtant jamais étudiée jusqu'ici : qu'advient-il si ces réactifs possèdent non pas deux mais trois doubles liaisons (triènes) ? Sur quel couple de liaisons se fait la cycloaddition ? L'organocatalyseur parvient-il à différencier ces trois doubles liaisons tout en conservant la stéréosélectivité de la réaction ? Leur étude montre que le catalyseur fonctionne toujours et conserve le contrôle sur la géométrie de la molécule produite. Plus

puissant encore, cette sélectivité est modulable en jouant sur les paramètres de la synthèse pour choisir quelle géométrie de cycle se forme. Ainsi, parmi les huit isomères possibles en partant d'un triène, six oxazines différentes ont pu être synthétisées de façon très sélective. Les scientifiques ont illustré l'utilité de ces oxazines en proposant un éventail varié de produits issus de ces intermédiaires. Amino-alcools, tricycles originaux, oxazines fonctionnalisées sont venus soutenir ce travail publié dans le *Journal of American Chemical Society*.

• Source : CNRS Chimie, 09/01/2024.

Réf. : E. Naulin, M. Lombard, V. Gandon, P. Retailleau, E. Van Elslande, L. Neuville, G. Masson, Enantioselective and regioselective synthesis of dihydro-1,2-oxazines from triene-carbamates via chiral phosphoric acid-catalysis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2023, <https://doi.org/10.1021/jacs.3c12015>.

Alzheimer : élucider la formation des agrégats dans le cerveau

L'agrégation de la protéine Tau dans le cerveau est un marqueur de plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer. Des études récentes montrent que la formation de ces agrégats de Tau, aussi appelés fibres amyloïdes, coïncide avec la présence d'autres biomolécules, dont la nature et l'organisation ne sont pas encore élucidées. Identifier *in vivo* quelles molécules induisent l'agrégation de la protéine Tau et forment les enchevêtrements neurofibrillaires délétères serait une avancée majeure pour la compréhension de la maladie d'Alzheimer et d'autres pathologies associées à la protéine Tau (tauopathies).

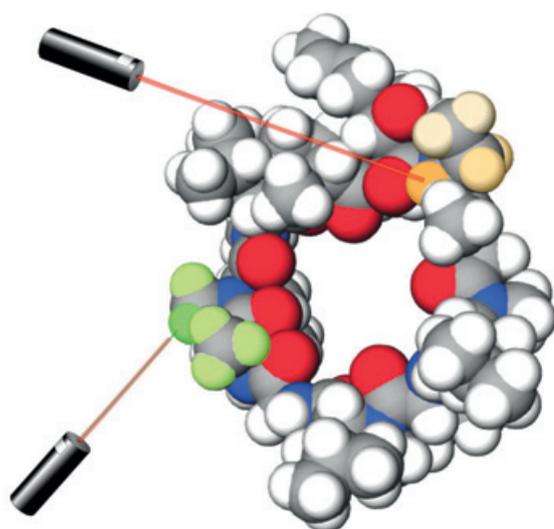
In vitro, de nombreuses études ont établi que des molécules chargées négativement, comme des sucres, des lipides ou encore des acides nucléiques (ARN), pouvaient induire l'agrégation de Tau. Mais observer directement pour comprendre quels cofacteurs s'assemblent avec Tau pour former des agrégats pathologiques est une tâche difficile à cause de la taille nanométrique des fibres amyloïdes. Ce défi technologique impose le développement de nouveaux outils de caractérisation.

Des équipes bordelaises du laboratoire Chimie et biologie des membranes et des nanoobjets (CBMN, CNRS/Bordeaux INP/Université de Bordeaux) et de l'Institut des sciences moléculaires (ISM, CNRS/Bordeaux INP/Université de Bordeaux) ont démontré que l'agrégation de la protéine Tau peut être induite par l'ARN modèle PolyA, chaîne de nucléotides adénine. Pour ce faire, ils ont eu recours à un montage de spectroscopie Raman TERS (« tip-enhanced Raman spectroscopy ») développé à l'ISM et qui permet simultanément de visualiser et caractériser chimiquement des agrégats de quelques nanomètres de diamètre. Cette technique leur a permis d'analyser des fibres amyloïdes individuelles et de révéler l'insertion du PolyA dans la fibre. L'intégration des signatures vibrationnelles spécifiques de la protéine Tau et de l'adénine permet de caractériser simultanément la partie protéique et la partie ARN de la fibre. Cette étude a mis en évidence que l'ARN polyA interagit avec plusieurs régions de la protéine Tau, à la fois celles organisées en feuillet et ses régions plus désordonnées. De plus, une forte colocalisation est observée entre l'ARN et les résidus chargés positivement de la protéine. Ces résultats, publiés avec le label « hot topic », permettent de mieux comprendre la formation de ces agrégats pour espérer agir plus en amont sur la pathologie.

• Source : CNRS Chimie, 19/12/2023.

Réf. : G. S. Cooney, D. Talaga, V. Ury-Thiery, Y. Fichou, Y. Huang, S. Lecomte, S. Bonhommeau, Chemical imaging of RNA-Tau amyloid fibrils at the nanoscale using tip-enhanced Raman spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, <https://doi.org/10.1002/anie.202314369>.

Une RMN plus performante pour analyser les mélanges complexes



© Margherita Bazzoni.

La spectroscopie RMN est une méthode de référence pour identifier et quantifier des molécules dans un mélange. Utilisée en routine, la méthode souffre cependant d'une sensibilité limitée, surtout pour des mélanges complexes où certaines espèces sont présentes en petite quantité. À ceci s'ajoute la complexité des spectres, somme des signaux provenant de chaque espèce constituant le mélange. Ces signaux peuvent se recouvrir et se masquer mutuellement. Les nouvelles méthodes d'acquisition des spectres RMN proposées par les scientifiques du laboratoire CEISAM (CNRS/Université de Nantes) permettent de contourner cet obstacle.

Issue des travaux de l'entreprise allemande NVision et de l'Institut Paul Scherrer (PSI) en Suisse, la méthode dite « d'hyperpolarisation », appelée HYPNOESYS, permet d'améliorer la sensibilité de la spectroscopie RMN d'un facteur 10, voire plus. En l'adaptant aux expériences RMN bidimensionnelles (2D) menées couramment pour identifier les molécules, les scientifiques sont parvenus à mettre en évidence des liens, appelés corrélations, qui existent entre les signaux recueillis dans les spectres RMN 2D. Simplifiant ainsi l'analyse, ces corrélations permettent d'attribuer sans ambiguïté les signaux aux différentes espèces présentes dans le mélange, concentrées ou non. Cette méthode d'enregistrement des données présente également l'avantage que les mesures peuvent être réalisées en un temps très court.

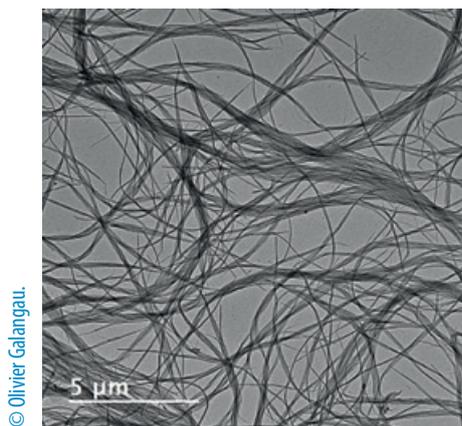
En parallèle, les chimistes de CEISAM ont également développé une méthode permettant d'isoler et d'extraire du spectre RMN les signatures de composés présents dans le mélange, mêmes lorsqu'ils sont masqués par les signatures d'autres signaux, avec une augmentation d'un facteur 10 de la sensibilité de la mesure.

Prochaine étape : réaliser ces mesures avec un appareil dit « de paillasse » qui présente l'avantage d'être compact, et donc facilement transportable vers les milieux réactionnels que l'on veut caractériser.

• Source : CNRS Chimie, 20/12/2023.

Réf. : A.J. Parker, A. Dey, M.U. Qureshi, J.M. Steiner, J.W. Blanchard, J. Scheuer, N. Tomek, S. Knecht, F. Josten, C. Müller, P. Hautle, I. Schwartz, P. Giraudeau, T.R. Eichhorn, J.-N. Dumez, Solution-state 2D NMR spectroscopy of mixtures hyperpolarized using optically polarized crystals, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202312302> ; M. Bazzoni, R. Mishra, J.-N. Dumez, Single-scan ultrasensitive NMR experiments with preserved sensitivity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.202314598>.

Polymères supramoléculaires : qui a dit que les forces dispersives ne faisaient pas le poids ?



Les polymères supramoléculaires, analogues non covalents des « plastiques » que nous utilisons quotidiennement, font l'objet de recherches accrues en vue de leur utilisation dans des domaines variés comme le biomédical ou l'électronique. À l'instar des biopolymères comme l'ADN, ces objets macromoléculaires sont formés de petites molécules liées entre elles par des interactions non covalentes, comme les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Waals. Les premières, de forte intensité, impliquent un partage d'électrons entre un atome d'hydrogène d'une molécule et un atome d'oxygène d'une molécule voisine. Les secondes, aussi appelées forces dispersives, correspondent à une faible interaction électrique à courte distance entre atomes et/ou molécules voisines. L'avantage de ces polymères est que les liaisons qui constituent la chaîne ne sont pas permanentes et permettent, en fonction de la température, de passer d'un liquide constitué de petites molécules à un solide élastique ou rigide. Ces polymères sont également autoréparables puisqu'une élévation locale de la température permet de « colmater » par fusion locale des fissures dans le matériau.

Longtemps, la communauté scientifique a considéré que la croissance des polymères supramoléculaires était fixée par la thermodynamique. Dans certains cas, des assemblages plutôt contrôlés par la cinétique peuvent aussi être obtenus, ouvrant la porte à des tailles et formes d'objets supramoléculaires plus variées. Ces processus cinétiques reposent exclusivement sur le fait de retarder pour un temps la polymérisation spontanée (thermodynamique) en bloquant la formation des liaisons hydrogène intermoléculaires, responsables de la construction des assemblages.

Des chimistes du CNRS à l'Institut des sciences chimiques de Rennes (ISCR, CNRS/Université de Rennes/ENSCR/INSA Rennes) ont récemment mis au point une nouvelle approche qui permet également de retarder les polymérisations spontanées, non plus en bloquant la formation de liaisons hydrogène mais en boostant le rôle des forces dispersives. Le principe est le suivant : en fonctionnalisant judicieusement une molécule organique avec, d'une part, des fonctions amides responsables des liaisons hydrogène et, d'autre part, des motifs cycliques (aromatiques) à six atomes de carbone ainsi que des chaînes carbonées linéaires favorisant les forces dispersives, ces dernières deviennent force motrice de l'assemblage. En outre, cet assemblage ne permet pas la croissance des architectures thermodynamiques via les liaisons hydrogène. Cette approche, qui repose sur la coopérativité de très nombreuses interactions faibles, ouvre de nouvelles opportunités pour la fabrication de polymères supramoléculaires.

• Source : CNRS Chimie, 19/12/2023.

Réf. : W.T. Gallonde, C. Poidevin, F. Houard, E. Caytan, V. Dorcet, A. Fihey, K. Bernot, S. Rigaut, O. Galangau, Kinetic delay in cooperative supramolecular polymerization by redefining the trade-off relationship between H-bonds and Van der Waals/ π - π stacking interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, <https://doi.org/10.1002/anie.202313696>.

Comment se structure un liquide ionique au contact d'une paroi ?

Les liquides ioniques sont des sels liquides à température ambiante composés uniquement d'ions. Ils sont souvent utilisés comme solvants non volatils, électrolytes pour les batteries ou lubrifiants dans diverses applications. Leur faible volatilité et leur stabilité thermique en font des alternatives intéressantes aux solvants organiques traditionnels.

La structuration à l'échelle moléculaire de ces liquides ioniques sur une paroi solide est un sujet de recherche très dynamique. En effet, des interactions intermoléculaires complexes entre la surface solide et le liquide conduisent à une ré-organisation moléculaire spécifique en surface. Cette structuration peut avoir un impact significatif sur les propriétés physiques et chimiques du liquide ionique à l'interface. Elle agit par exemple sur l'efficacité et la sélectivité de réactions catalytiques, gouverne l'efficacité anti-usure de lubrifiants, influence la durée de vie et la densité énergétique des dispositifs de stockages d'énergie... Hélas, cette structure interfaciale reste encore très mal comprise.

Prenons le cas des liquides ioniques amphiphiles⁽¹⁾ à longue chaîne carbonée⁽²⁾ que l'on trouve par exemple dans les supercondensateurs, les capteurs électrochimiques ou les lubrifiants. Leur caractère amphiphile conduit à une nanostructuration du liquide en domaines polaires et apolaires. Des équipes du Laboratoire de physique et du Laboratoire de chimie à l'ENS de Lyon, du CEA Leti et du CEA Liten à Grenoble, se sont demandé ce que devenait cette nanostructuration au voisinage de différentes parois solides : deux substrats hydrophiles, le mica et la silice, et deux substrats hydrophobes, le silicium et le disulfure de molybdène (MoS_2). Les trois premiers sont des substrats de référence, tandis que le dernier a été choisi pour l'importance de ses applications en électronique en combinaison avec des liquides ioniques⁽³⁾.

Pour cela, ils ont combiné des expériences de microscopie à force atomique (AFM) à des simulations de dynamique moléculaire. Les expériences d'AFM ont révélé qu'il pouvait exister trois types de structures interfaciales pour le même liquide ionique, qui dépendent de la nature du substrat et de la teneur en eau du système. Les simulations de dynamique moléculaire ont également permis de distinguer l'effet de l'eau de celui de la nature du substrat, et de mieux comprendre ainsi les comportements des liquides ioniques observés en surface de paroi. Ce travail devrait permettre, à terme, de proposer un cadre général capable de décrire, mais aussi de prédire, l'organisation interfaciale d'un liquide ionique amphiphile en fonction de la nature du substrat, et donc ses propriétés.

• Source : CNRS Chimie, 19/12/2023.

Réf. : L.B. Tannous, M. Simoes Santos, Z. Gong, P.-H. Haumesser, A. Benayad, A. A.H. Padua, A. Steinberger, Effect of surface chemistry on the electrical double layer in a long-chain ionic liquid, *Langmuir*, 2023, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.3c02123>.

⁽¹⁾ Une espèce chimique est amphiphile lorsqu'elle possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe.

⁽²⁾ À base d'imidazolium à longue chaîne (1-octyl-3-méthylimidazolium dicyanamide).

⁽³⁾ Le MoS_2 est un semiconducteur à 2D. Lorsqu'il est en contact avec un liquide ionique, sa conductivité varie très fortement en fonction de la structure interfaciale du liquide ionique, qui peut être modifiée à l'aide d'un potentiel externe. Cet effet est exploité dans une nouvelle classe de transistors à effet de champ à grille électrolytique, qui peuvent permettre de lever des verrous technologiques à la miniaturisation des transistors.

son nouveau site : <http://www.udppc.asso.fr>



L'association	Publications	Annales
L'UdPPC ?	Le Bup	Baccalauréat général
Nos positions	Nous avons lu	Baccalauréats technologiques
Tarifs	L'arpenteur du web	Concours général
Charte graphique	Appel aux auteurs	Diplôme national du brevet
Olympiades	Parus au BO	
Partenaires	Autres publications	Ressources
Nous soutenons	Publicitaires	De la maternelle au supérieur
Enquêtes		Au collège
Divers	Actualités	Au lycée
Agenda	De la maternelle au supérieur	Au labo
BupDoc	Au collège	
Congrès	Au lycée	
Concours	Au labo	
Sites académiques		

Des sections académiques dans toute la France et les DOM-TOM
Venez nous rejoindre !



mais l'UdPPC, c'est aussi...

...la publication numérique mensuelle avec impression papier trimestrielle



...la consultation du Bup en ligne par articles et par numéro avec BupDoc

Du 1^{er} janvier au 31 décembre 2024 :
 ♦ pour tous : 1907 → 2019
 ♦ pour les abonnés : 2020 → 2024



...un congrès organisé chaque année par une académie différente



À signaler



Lumières sur le nucléaire

X. Ursat (coord.)

288 p., 18,50 €

Le Cherche Midi, 2024

Comment produire de l'électricité sans altérer le climat ? Le nucléaire est-il une source d'électricité incontournable pour un avenir sûr et bas-carbone ? Qu'en est-il de la sécurité des centrales et du traitement des déchets ?

De tout temps, le débat autour de l'énergie nucléaire a suscité les passions, oscillant entre faits, idéologies et idées reçues. Les opinions se contredisent souvent, les conflits font brutalement resurgir la nécessité d'une indépendance énergétique des nations. Autant de considérations qui nous éloignent de la vraie question : qu'implique réellement le choix du nucléaire ?

Méconnaissance, défense ou opposition, le nucléaire laisse rarement indifférent. Et de ce paysage tourmenté, une certitude émerge : il est désormais urgent de connaître et de comprendre les enjeux, les choix et les solutions possibles afin de réussir au mieux la transition énergétique.

Rédigé par des scientifiques, des universitaires, des élus et des experts du secteur de l'énergie, cet ouvrage nous éclaire sur les principales questions d'actualité relatives au nucléaire, sans omettre les doutes et incertitudes qu'il suscite.

Xavier Ursat, directeur exécutif depuis 2015 du groupe EDF en charge de la Direction Ingénierie et projets nouveau nucléaire, est président du Comité stratégique de la filière nucléaire et président du Groupement des industriels français de l'énergie nucléaire (GIFEN).



Le grand guide des huiles essentielles, hydrolats, huiles végétales

Propriétés et utilisations

X. Fernandez, C. André,

A. Casale, F. Chemat, T. Do, M. Vian

384 p., 24,90 €

De Boeck Supérieur, 2023

À l'heure où le retour au naturel est plébiscité tant par les professionnels que par les amateurs, il est nécessaire de bien connaître les propriétés, les bienfaits, mais aussi les précautions d'usage des huiles essentielles, des hydrolats/eaux florales et des huiles végétales, pour les utiliser en toute confiance.

Tel est le défi relevé par un collectif de spécialistes, tous amoureux de ces beaux ingrédients. Ils ont sélectionné 152 produits incontournables, présentés dans ce livre sous forme de fiches synthétiques et magnifiquement illustrées. L'ouvrage se distingue par l'expertise de tous ses contributeurs, par la dimension humaine des témoignages et par une volonté affirmée d'expliquer avec clarté et de rendre plus accessible le monde

de la phytothérapie, de la cosmétique et des extraits naturels.

Ce guide complet, tout en couleur, s'adresse aux débutants comme aux utilisateurs aguerris.



Maîtriser son processus de mesure en 8 étapes clés

140 p., 90,05 € (ebook : 75,82 €)

CFM, 2023

Ce guide technique du Collège Français de Métrologie, rédigé en collaboration avec des experts (industriels, indépendants, académiques...) décrit de façon pédagogique et pratique les huit étapes clés de la maîtrise d'un processus de mesure avec ses spécifications.

Il est complété de témoignages de métrologues aguerris évoluant en industrie et en laboratoire. Pour des métrologues qui débutent ou qui veulent approfondir certaines notions, et aussi pour des responsables qualité et tous les personnels d'entreprises et laboratoires d'étalonnage, d'essai, d'analyse, de biologie, impliqués dans le processus de mesure.

• À commander en ligne :

www.cfmetrologie.com/fr/bibliotheque/product/690-maitriser-son-processus-de-mesure-en-8-etapes-des

Bulletin de l'Union des professeurs de physique et de chimie (« Le Bup »)

La rédaction de *L'Actualité Chimique* a sélectionné pour vous les articles suivants :



N° 1060 (janvier 2024)

- Les sciences à l'école maternelle : c'est possible !, par F. Bernardini-Malvoti, B. Balaire, J. Lemoigne et S. Bretheau.
- Élaboration d'un spectrofluorimètre avec du matériel de lycée et applications : titrage avec suivi simultané du pH et de l'émission de fluorescence, par S. Clède.
- Python au service de la physique-chimie : une immersion passionnante dans le mouvement des projectiles, par B. Ouari.

• Sommaires complets, résumés des articles et modalités d'achat sur www.udppc.asso.fr

1-2 mars 2024

Village de la chimie

Paris Montreuil
www.villagedelachimie.org

2-17 mars 2024

JNI 2024

Journées nationales de l'ingénieur
https://jni.iesf.fr

5-7 mars 2024

JEC world 2024

International composite show
Paris-Nord Villepinte
www.jec-world.events

15 mars 2024

Journée d'électrochimie en hommage à Étienne Laviron

Dijon
Voir p. 53.
rita.meunier-prest@u-bourgogne.fr
marcel.bouvet@u-Bourgogne.fr

19-21 mars 2024

International conference CBRNE Research & innovation

Strasbourg
https://cbrneconference.fr

27-28 mars 2024

M2M 2024

Les matinales de la métrologie
Lyon
www.cfmetrologie.com/fr/evenements/les-matinales-de-la-metrologie

2-5 avril 2024

GFECI 2024

Réunion annuelle du Groupe français d'étude des composés d'insertion
Dourdan
Voir p. 53.
https://gfeci2024.sciencesconf.org

21-24 avril 2024

18th EFMC short course on medicinal chemistry

Oegstgeest (Pays-Bas)
www.efmcshortcourses.org

26 avril 2024

FICS 2024

French industrial chemistry symposium
Paris
Voir p. 53.
https://fics2024.sciencesconf.org



8-9 mai 2024

JPFSA 2024

Journées pratiques francophones des sciences analytiques
Casablanca (Maroc)
Voir p. 53.
https://jpfsa.com

14-17 mai 2024

GeCat 2024

Hendaye
Voir p. 54.
https://gecat2024.sciencesconf.org

15-16 mai 2024

CoFRO

Coordination between France and Romania
Rennes
Voir p. 54.
https://cofro.sciencesconf.org

15-17 mai 2024

Supr@Paris 2024

3rd French supramolecular chemistry congress
Paris
Voir p. 54.
https://supraparis2024.sciencesconf.org

19-22 mai 2024

MSB 2024

40th International symposium on microscale separation and bioanalysis
Brno (Rép. Tchèque)
www.msb2024.org

19-23 mai 2024

23rd International symposium on bioelectrochemistry and bioenergetics

Madrid (Espagne)
https://eventoscalca.fgua.es/bes2024

19-24 mai 2024

GECOM-CONCOORD

Ax-les-Thermes
Voir p. 54.
https://gecom2024.sciencesconf.org

21-23 mai 2024

Journées annuelles SP2P'24

Grenoble
https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/photochimie-photophysique-et-photosciences/conferences



22-23 mai 2024

Congrès Plasturgie et environnement

Douai
www.sfp-plastic.org/evenements/3180

26-29 mai 2024

ISPROCHEM

International school of process chemistry
Gargnano (Italie)
www.isprochem.unimi.it

26-29 mai 2024

37th Topical meeting of the International Society of Electrochemistry

Šibenik (Croatie)
https://topical36.ise-online.org

26-31 mai 2024

MH 2024

18th International symposium on metal-hydrogene systems
Saint-Malo
https://mh2024.org

2-7 juin 2024

ICCBIC

International conference of coordination and bioinorganic chemistry
Smolenice (Slovaquie)
http://frenchbic.cnrs.fr/event/international-conference-of-coordination-and-bioinorganic-chemistry-iccbic

3-7 juin 2024

NLigands'2024

8th EuChemS conference on nitrogen ligands
Cassis
www.cinam.univ-mrs.fr/site/NLigands2024/index.php?page=Accueil

4-5 juin 2024

Journées du GdR Synt Flux

Nancy
https://gdrsynth-flux.cnrs.fr/prochaines-journees-du-gdr-synth-flux-en-2024-a-nancy

10-12 juin 2024

Journées scientifiques SCF-Bretagne & Pays de la Loire

Logonna-Daoulas
https://scf-bpl2024.sciencesconf.org

Manifestations

15 mars 2024

Journée d'électrochimie en hommage à Etienne Laviron

Dijon

Suite au décès d'Etienne Laviron survenu en mars 2023, Marcel Bouvet, Rita Meunier-Prest, Charles Devillers et Dominique Lucas (ICMUB, Dijon) organisent à l'Université de Bourgogne une journée d'hommage.

Conférenciers invités : Olivier Alévêque (Université d'Angers), Christophe Bucher (École Normale Supérieure de Lyon), Cyrille Costentin (Université Grenoble Alpes), Frédéric Lemaître (École Normale Supérieure de Paris), Benoît Limoges (Université Paris Cité).

• rita.meunier-prest@u-bourgogne.fr ; marcel.bouvet@u-bourgogne.fr

2-5 avril 2024

GFECI 2024

Réunion annuelle du Groupe français d'étude des composés d'insertion

Dourdan

La réunion est organisée par trois laboratoires franciliens (ICMPE-Université Paris-Est Créteil, PHENIX-Sorbonne Université et ICMMO-Université Paris Saclay) avec pour objectif de permettre la rencontre et de faciliter les discussions entre les différents acteurs de la recherche sur les composés d'insertion, qu'ils soient académiques ou industriels. Ce colloque annuel offre une vision actualisée, dynamique et complète des différentes thématiques abordées, tout en permettant d'échanger sur certains axes en lien direct avec l'industrie. Il permet aussi aux jeunes chercheurs (notamment doctorants et postdoctorants) de présenter leurs travaux les plus récents devant des chercheurs confirmés et des industriels afin de renforcer leur réseau.

Prix Chimie industrielle 2024

Appel à candidatures

La division Chimie industrielle (DCI) remettra cette année deux prix :

- Le prix de la division, qui récompense une personne ayant accompli un travail remarquable dans le domaine de la chimie industrielle, notamment dans la création ou le développement d'une nouvelle entreprise en chimie.
- Le prix Jeune chercheur, qui récompense un jeune chimiste (doctorant, postdoctorant, jeune chercheur) ayant publié en 2023 un travail remarquable en chimie industrielle.

Date limite de réception des dossiers : 31 mars 2024.

• <https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/chimie-industrielle/prix-chimie-industrielle-2024>

Conférenciers invités :

- Sami Oukassi (CEA-LETID RT/DCOS/SITEC, Grenoble) : « Microbatteries : du matériau au composant ».

- Arnaud Perez (Laboratoire de chimie de la matière condensée de Paris, Sorbonne Université, CNRS, Collège de France) : « Quels matériaux pour les batteries tout-solide ? ».

- Aline Rougier (Institut de chimie de la matière condensée de Bordeaux) : « Matériaux et dispositifs électrochromes : au-delà du changement de couleur ».

- Christine Taviot-Gheho (Institut de chimie de Clermont-Ferrand) : « Relations structures-propriétés au sein de phases hydroxydes lamellaires, simples LSH et doubles HDL, incorporant des espèces électroactives et des principes actifs ».

• <https://gfeci2024.sciencesconf.org>

26 avril 2024

FICS 2024

French industrial chemistry symposium

Paris

Après le succès de ses deux précédentes éditions nationales en 2020 et 2022 et de sa première édition régionale à Strasbourg en 2023, la division Chimie industrielle organise ce colloque d'une journée pour rassembler les scientifiques impliqués dans la chimie durable auprès d'entreprises industrielles couvrant un large spectre d'applications (pharmacie, agrochimie, parfumerie, etc.).

Ce type d'événement vise à renforcer les liens entre les mondes industriel et académique et offre aux participants, et notamment aux étudiants, l'opportunité d'échanger. La chimie est une science clé dans ces métiers et est favorisée par le développement des nouvelles technologies. L'objectif de ce colloque est de dévoiler certains aspects de ces métiers multidisciplinaires. Les étudiants diplômés et les postdoctorants, encouragés à participer par le biais de séances d'affiches, auront l'occasion de bâtir un réseau solide et d'en apprendre davantage sur les carrières proposées par les industries.

• <https://fics2024.sciencesconf.org>

8-9 mai 2024

JPFSA 2024

Journées pratiques francophones des sciences analytiques Casablanca (Maroc)

Les sixièmes Journées pratiques francophones des sciences analytiques sont organisées par des chercheurs de l'Université Hassan II de Casablanca avec la participation de plusieurs associations, laboratoires publics et privés, universités, établissements du ministère...

Les thèmes abordés à travers des tables rondes, des conférences plénières, des communications orales et par affiches, concernent les aspects tant fondamentaux qu'appliqués des diverses techniques d'analyses chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, environnementales et biologiques. Divers constructeurs et fournisseurs présenteront durant les journées leur matériel à travers des ateliers de travail.

• <https://jpfsa.com>

14-17 mai 2024

GeCat 2024

Hendaye

Le Groupe d'étude en catalyse (GECat), groupe thématique de la division Catalyse (DivCat) organise des réunions thématiques annuelles dans le but de fédérer la communauté de catalyse francophone, promouvoir les échanges entre chercheurs et favoriser l'intégration des jeunes chercheurs.

Le programme scientifique s'organise cette année autour de trois thèmes :

- Thème 1 : Catalyse et génie chimique (cinétique réactionnelle, réacteurs, modélisation, procédés catalytiques, extrapolation, changement d'échelle, mise en forme...).

Conférencier : David Edouard (CP2M, Lyon).

- Thème 2 : Activation de petites molécules (H_2 , N_2 , CO_x , NO_x , CH_4 , syngas... - production d'ammoniac, valorisation du CO_2 , méthanation, Fischer-Tropsch, water-gas shift, dépollution automobile...).

Conférencier : Philippe Serp (LCC, Toulouse).

- Thème 3 : Bioraffinerie et économie circulaire (biomasse, biocarburants, chimie biosourcée, valorisation des déchets, recyclage chimique de plastiques...).

Conférencière : Marion Carrier (IMT Mines, Albi).

• <https://gecat2024.sciencesconf.org>

15-16 mai 2024

CoFRO

Coordination between France and Romania

Rennes

Ce workshop est dédié aux chimistes français et roumains des domaines de la chimie organométallique, inorganique et de coordination, qui sont invités à présenter leurs travaux de recherche lors d'un événement binational et, à terme, encouragés à proposer des collaborations et des thématiques pour des projets communs. L'objectif est d'offrir une plateforme où tous les sujets de ces disciplines seront abordés, afin d'encourager des collaborations entre les deux pays.

Conférenciers invités :

- Narcis Avarvari (Moltech, Université d'Angers) : « Chiral photo- and electroactive materials ».

- Gábor Balázs (Université de Regensburg, Allemagne) : « The manifold reactivity of polyphosphorous complexes ».

- Dragoș Roșă (Université d'Heidelberg, Allemagne) : « Adventures in cycloaddition chemistry with iron complexes: the enabling rôle of redox-active ligands ».

• <https://cofro.sciencesconf.org>

15-17 mai 2024

Supr@Paris 2024

3rd French supramolecular chemistry congress

Paris

Le terme « chimie supramoléculaire » a été inventé en France par Jean-Marie Lehn. Depuis, ce domaine a connu un essor extraordinaire, et la communauté des chimistes supramoléculaires français s'est organisée, à travers un groupe thématique de la SCF et une série de conférences. La troisième édition de cette série débutée à Lyon en 2018, puis à Strasbourg en 2021, se tiendra cette année à Paris, à Sorbonne Université. Le programme comprendra quatre conférences plénières, dix conférences principales, vingt-trois communications orales et vingt communications courtes et de nombreux posters

Journées Scientifiques
SCF-BPL
10-12 juin 2024
Centre de Moulin-Mer (Logonna-Daoulas, Finistère)

Organique
Catalyse
Organométallique
Synthèse
Analytique
Electrochimie
Supramoléculaire
Chimie Théorique
Matériaux

26 comm. orales
2 sessions posters

Inscriptions : scf-bpl2024.sciencesconf.org // Infos : @scfbpl

Conférences plénières :

- Marc FOURMIGUÉ (ISCR Rennes)
Grand Prix SCF Achille Le Bel 2022
- Elsabeth LOJOU (BIP Marseille)
- Alexandre MARTINEZ (ISM2 Marseille)
- Franck MEYER (Univ. Göttingen, ALL.)
- Jennifer MOLLOY (DCM Grenoble)
- Franck ZAL (Hemarina, Morlaix)

UBO
Université de Bretagne Occidentale

UNIVERSITÉ d'ANGERS
Le Mans Université
Nantes Université
Université de Rennes

pour donner l'opportunité à un maximum de personnes à différentes étapes de leur carrière de montrer leur science. Différents domaines de la chimie supramoléculaire seront représentés : catalyse, machines, assemblages, surfaces, nanotechnologies, molécules entrelacées, polymères...

• <https://supraparis2024.sciencesconf.org>

19-24 mai 2024

GECOM-CONCOORD

Ax-les-Thermes

La conférence rassemble la communauté scientifique inorganique intéressée par la coordination et la chimie organométallique, autour de quatre domaines principaux : chimie et réactivité des complexes de coordination ; catalyse ; coordination et chimie des matériaux ; chimie bio-inorganique. Ce vaste domaine de la chimie moderne à la frontière entre les sciences physiques et les sciences de la vie joue un rôle central pour relever les grands défis sociétaux liés à la production et au stockage de l'énergie, au stockage de l'information, à la chimie verte et durable, à la chimie supramoléculaire et bio-inorganique.

Conférenciers au programme :

- Gustav Berggren (Uppsala University, Suède).

- Jesús Campos Manzano (University of Sevilla, Espagne).

- Aude Demessence (Ircelyon).

- Rafael Gramage-Doria (Institut des sciences chimiques de Rennes).

- Raluca Malacea (ICMUB, Dijon).

- Marie Sircoglou (Institut de chimie moléculaire et des matériaux d'Orsay).

- Florence Volatron (Sorbonne Université, Paris).

• <https://gecom2024.sciencesconf.org>

Applications industrielles des biopiles enzymatiques : utopie ou réalité ?

Ces dernières décennies ont été marquées par des progrès de plus en plus rapides dans le domaine des piles à combustible enzymatiques en tant que nouvelle source d'énergie biosourcée et écologique. Ces biopiles, basées sur des enzymes comme catalyseurs, constituent une sous-classe de piles à combustible conventionnelles. Contrairement aux piles à combustible, les biopiles ne nécessitent pas de matériaux nobles (platine, nickel...) mais utilisent, à la place, des enzymes comme électrocatalyseur. De plus, en raison de la spécificité des réactions enzymatiques, le fonctionnement des biopiles ne requiert pas de carburant de haute pureté, ni de membrane pour séparer les réactions se produisant à l'anode et à la cathode (voir *L'Act. Chim.* n° 427-428, mars 2018). Il faut souligner que les piles enzymatiques présentent généralement une activité maximale à des températures modérées (20 à 50 °C) et à un pH presque neutre. Par rapport aux piles à combustible qui fonctionnent majoritairement avec de l'oxygène et du H₂ ou du CH₃OH, la gamme de combustibles des piles enzymatiques est considérablement plus large, englobant plusieurs sucres (comme le glucose, fructose, saccharose, maltose, xylose, cellobiose et des polysaccharides), des alcools (méthanol, éthanol), le lactate et, plus récemment, l'hydrogène. Toutefois, il convient de noter que les biopiles ne sont pas destinées à résoudre le problème de l'épuisement des combustibles fossiles et à entrer dans la catégorie des ressources énergétiques renouvelables telles que l'énergie hydroélectrique, solaire et éolienne. Le champ d'application des piles à combustible enzymatiques est limité, du moins pour l'instant, à la production d'électricité pour alimenter des systèmes microélectroniques tels que des actionneurs et des capteurs.

Une grande majorité des piles enzymatiques génèrent de l'énergie électrique à partir de l'oxydation du glucose à l'anode et la réduction de l'oxygène à la cathode, deux substrats présents dans les fluides physiologiques. Ainsi, parallèlement à l'alimentation d'appareils électroniques portables (téléphone portable, lecteur de musique numérique, GPS, capteurs etc.), une perspective fascinante d'application des biopiles concerne leur implantation dans le corps humain. Contrairement aux piles conventionnelles qui contiennent une quantité finie d'électricité, les biopiles ne sont pas un réservoir d'énergie, mais pourraient agir comme une source d'énergie théoriquement illimitée en consommant ces composés puisque ces derniers sont apportés en quasi-continu à la biopile *via* les fluides corporels (liquides extracellulaires, sang, sueur) (figure 1). De telles biopiles pourraient ainsi constituer une alternative prometteuse à l'alimentation des dispositifs médicaux implantés, une application phare postulée par les chercheurs étant l'alimentation de pacemaker. Cette motivation emblématique des piles enzymatiques s'est concrétisée par une première mondiale en 2010 avec l'implantation totale d'une biopile dans un rat. Cette biopile, placée dans l'espace rétro-péritonéal, était capable de délivrer de l'énergie (24,4 µW/mL), l'animal étant éveillé et libre de ses mouvements [1]. Par la suite, de nombreux essais dans le règne animal s'avèrent fructueux avec l'introduction partielle des électrodes des biopiles *via* la perforation de la carapace d'insectes (blatte) ou des homards, de la coquille des escargots, des coquillages, voire en ouvrant superficiellement la peau de souris ou de rats ou en piquant dans une veine chez des lapins et des rats (il s'agissait plus de planter que d'implanter) [2-7]. Ces travaux ont permis de démontrer que les biopiles pouvaient fonctionner dans le sang ou les liquides extracellulaires avec le glucose voire avec d'autres substrats ainsi que, malheureusement, l'impossibilité d'associer plusieurs biopiles dans un organisme vivant unique [6]. L'amplification des performances des biopiles *via* l'utilisation de nanomatériaux conducteurs, comme la compression de mélange d'enzymes et de nanotubes de carbone, a conduit au premier

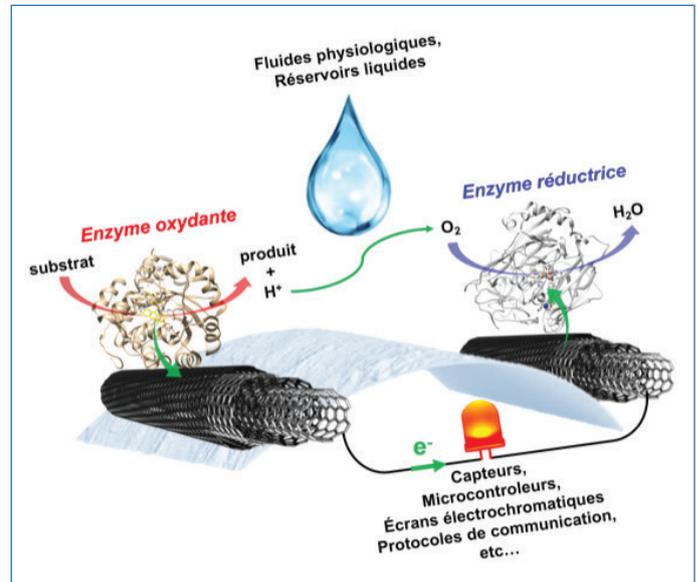


Figure 1 - Schéma de principe d'une biopile enzymatique substrat/oxygène dont les bioélectrodes nanostructurées sont déposées sur support flexible.

exemple d'une biopile entièrement implantée dans un mammifère produisant la puissance nécessaire (161 µW/mL) au fonctionnement de deux types d'appareils électroniques : une LED et un thermomètre numérique [8]. Plus récemment, la combinaison de feutre de carbone modifié par des nanotubes de carbone et des enzymes a débouché sur le premier exemple de pile enzymatique implantée dans un oiseau. Cette biopile, comprenant une bioanode basée sur la glucose oxydase et une biocathode basée sur la bilirubine oxydase, fournit 0,12 mW *in vitro* et 0,08 mW *in vivo*, et permet l'alimentation d'un stimulateur cérébral. La combinaison de ces deux systèmes totalement implantés dans un pigeon constitue une avancée significative vers la neuromodulation auto-alimentée [9]. Plus récemment, des microbiopiles à base de fils torsadés de multicouches de nanotubes de carbone sous forme de feuillets contenant des enzymes et des médiateurs rédox et recouverts de poly(3,4-éthylène dioxythiophène) (PEDOT) et de *Nafion* ont été implantées chirurgicalement dans la cavité abdominale d'une souris. Ce type de microbiopile génère environ 5 µW, ce qui représente théoriquement une avancée en termes de puissance surfacique en atteignant 298 µW/cm² [10]. Cependant, malgré toutes ces avancées, il reste de nombreux obstacles à surmonter pour le développement industriel des biopiles implantées, comme leur faible puissance, leur biocompatibilité et leur stabilité opérationnelle qui varie de quelques heures à maximum un an contre, par exemple, cinq à huit ans pour des piles au lithium utilisées pour les pacemakers. Il apparaît donc illusoire d'envisager, avec ces systèmes, l'alimentation d'un stimulateur cardiaque. Concernant la faible puissance des biopiles, cette dernière étant directement reliée à la quantité d'enzyme fixée et électriquement connectée à l'électrode, les efforts ont récemment porté sur la création d'électrodes à grande surface conductrice spécifique. Ce concept inclut, mais n'est pas limité aux électrodes textiles en fil de carbone et de nanotubes de carbone, à la structuration 3D des surfaces par des nanomatériaux conducteurs comme des structures hiérarchiquement poreuse à structure MgO, des fibres de nanotube de carbone modifiées par des nanoparticules d'or, des structures à squelette organique (COF) ou organométallique poreux (MOF), etc. [11,12]. Outre l'augmentation de puissance, le piégeage ou l'adsorption

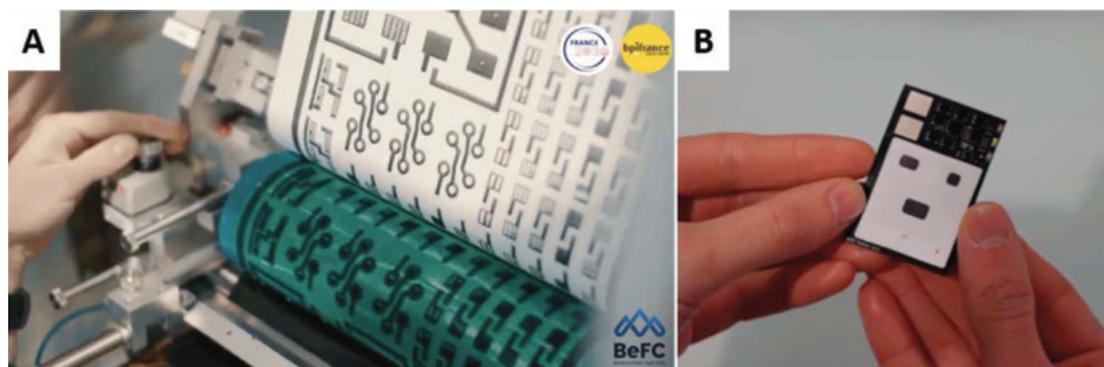


Figure 2 - A) Impression de différentes couches d'une biopile enzymatique BeFC glucose/oxygène par flexographie selon une vitesse d'impression de $25 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$; B) Biopile enzymatique BeFC glucose/oxygène ($30 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$) délivrant une tension de $0,7 \text{ V}$ et produisant 25 mWh pour alimenter une plateforme électronique BeFC avec un circuit amplificateur (3 V) et 3 LED.

d'enzymes dans ces structures poreuses améliorent nettement la stabilité des enzymes. Parallèlement, la possibilité d'extraire davantage d'énergie (en fait d'électrons) du substrat en associant plusieurs réactions enzymatiques séquentielles a été également envisagée via l'immobilisation de systèmes métaboliques pour les réactions en cascade d'enzymes [13].

Outre les problèmes de puissance et de durée de vie, un verrou technologique qui n'a quasiment jamais été abordé concerne la notion de stérilisation des biopiles. En effet, à l'exception d'un exemple de biopile stérilisée par rayonnement gamma, toutes les réalisations d'implantation ont été effectuées sans traitement particulier [14]. L'explication réside dans l'incompatibilité entre la fragilité des enzymes et les technologies de stérilisation les plus largement utilisées pour les dispositifs médicaux comme les traitements thermiques (autoclave), l'oxyde d'éthylène gazeux et les rayonnements. Très récemment, une nouvelle approche de stérilisation des biopiles a été décrite qui permet une élimination totale des micro-organismes avant implantation sans dégrader l'activité enzymatique [15]. Il s'agit d'un traitement chimique simple, pratique et peu coûteux, basé sur l'immersion des biopiles dans une solution de chlorhexidine qui est un agent antimicrobien efficace à large spectre contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que les champignons et les virus. En conclusion, la résolution de ces d'obstacles technologiques devrait aboutir à de réelles applications potentielles des piles enzymatiques implantées ou cutanées [16] pour l'alimentation de (bio)capteurs pour la surveillance périodique de maladies ou de leur de traitements sur de courtes périodes (1 à 3 mois). Parallèlement aux applications biomédicales potentielles des biopiles implantées, le développement industriel des biopiles comme source d'énergie transitoire et jetable connaît un essor exponentiel avec, en particulier, la création d'une startup nommée BeFC, acronyme pour Bioenzymatic Fuel Cells. BeFC a débuté la pré-industrialisation de ses biopiles à base de papier, aussi appelées biocellules enzymatiques, en juin 2023. Cette industrialisation sera entreprise par impression d'une encre de carbone encapsulant des composés biologiques avec pour objectif la production de millions d'unités de biocellules par jour d'ici la fin de l'année 2024.

Le défi de l'industrialisation est d'équilibrer la faisabilité technico-économique ($\text{mW}/\text{cm}^2/\text{€}$ et $\text{mWh}/\text{cm}^2/\text{€}$), la processabilité (et la capacité à faire évoluer les dits processus) ainsi que le débit de production. L'utilisation des technologies analogues imprimées (sérigraphie à plat à alimentation rotative, flexographie, offset et sérigraphie rotative) permet d'atteindre des débits d'impression des biopiles d'une dizaine de mètres par minute (figure 2A). L'épaisseur du film obtenu est importante pour la performance et la processabilité,

et est gouvernée par la formulation de l'encre (teneur en masse, rhéologie, viscosité etc.) et la technologie d'impression sélectionnée. Le séchage/durcissement des collecteurs de courant imprimés et des électrodes constitue souvent un verrou limitatif du débit du processus de fabrication.

Délivrant plus de $10 \text{ mW}/\text{cm}^2$, pour des impulsions de densité de puissance inférieures à 1 seconde, ce type de biopile est capable d'alimenter une gamme de capteurs, microcontrôleurs, écran électrochromatique et protocole de communication sans fil (NFC, BLE, Sigfox) sur la même plateforme électronique (figure 2B). En bref, il est possible de collecter et de transmettre des données avec une source d'énergie imprimée sur papier, ouvrant ainsi la voie au développement de produits écoresponsables pour la logistique intelligente, le secteur médical et la santé digitale, ou encore le traitement de déchets et de la contrefaçon pour les produits de luxe.

- [1] P. Cinquin *et al.*, A glucose biofuel cell implanted in rats, *PLOS ONE*, **2010**, *5*(5), e10476.
- [2] T. Miyake *et al.*, Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms, *Energy Environ. Sci.*, **2011**, *4*, 5008.
- [3] L. Halámková *et al.*, Implanted biofuel cell operating in a living snail, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, p. 5040-43.
- [4] M. Rasmussen *et al.*, An implantable biofuel cell for a live insect, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 1458-60.
- [5] A. Szczupak *et al.*, Living battery-biofuel cells operating in vivo in clams, *Energy Environ. Sci.*, **2012**, *5*, 8891.
- [6] K. MacVittie *et al.*, From "cyborg" lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells, *Energy Environ. Sci.*, **2013**, *6*, p. 81-86.
- [7] F.C.P.F. Sales *et al.*, An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes, *Lab. Chip*, **2013**, *13*, p. 468-474
- [8] A. Zebda *et al.*, *Sci. Rep.*, Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices, **2013**, *3*, 1516.
- [9] D. Lee *et al.*, Totally implantable enzymatic biofuel cell and brain stimulator operating in bird through wireless communication, *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, *171*, 112746.
- [10] D.Y. Lee *et al.*, Two-ply carbon nanotube fiber-typed enzymatic biofuel cell implanted in mice, *IEEE Trans. NanoBioscience*, **2020**, *19*, 333.
- [11] C.H. Kwon *et al.*, Highly conductive electrocatalytic gold nanoparticle-assembled carbon fiber electrode for high-performance glucose-based biofuel cells, *J. Mater. Chem. A*, **2019**, *7*, 13495.
- [12] Y. Wang *et al.*, Novel g-C₃N₄ assisted metal organic frameworks derived high efficiency oxygen reduction catalyst in microbial fuel cells, *J. Power Sources*, **2020**, *450*, 227681.
- [13] M. Bilal *et al.*, Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet biotechnological challenges, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, *186*, p. 735-789.
- [14] S. El Ichi-Ribault *et al.*, Remote wireless control of an enzymatic biofuel cell implanted in a rabbit for 2 months, *Electrochimica Acta*, **2018**, *269*, p. 360-366.
- [15] A. Berezovska *et al.*, Chlorhexidine digluconate exerts bactericidal activity vs Gram positive Staphylococci with bioelectrocatalytic compatibility: high level disinfection for implantable biofuel cells, *Bioelectrochemistry*, **2023**, *152*, 108435.
- [16] X. Chen *et al.*, Stretchable and flexible buckypaper-based lactate biofuel cell for wearable electronics, *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, *29*(46), 1905785.

Cette fiche a été réalisée par **Fabien GIROUD**, enseignant-chercheur, **Serge COSNIER**, directeur de recherche au département de chimie moléculaire (CNRS/Université Grenoble Alpes), ainsi que **Jules HAMMOND**, président, et **Marie BERTHUEL**, cheffe de produit, de BeFC SAS située à Grenoble.

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par Jean-Pierre FOULON (jpfoulon@wanadoo.fr).

Elles sont regroupées en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org.

Complétez votre collection

Les sommaires de tous les numéros peuvent être consultés sur notre site (www.lactualitechimique.org)

Tous les articles et numéros de plus de cinq ans sont téléchargeables gratuitement

Numéros spéciaux également disponibles en **version électronique** sur le site à un tarif préférentiel

Dernières parutions :

- Sport et dopage (février 2024) : 20 €
- Biomarqueurs pour la médecine du futur (décembre 2023) : 20 €
- Chimie et bois (mai-juin 2023) : 32 €
- De la vigne aux vins (décembre 2022) : 20 €
- La diffusion de neutrons (octobre 2022) : 20 €
- Le fer en catalyse : un élément d'avenir (mai-juin 2022) : 32 €
- Répondre aux menaces : explosifs, déminage et management de crises (avril 2022) : 20 €
- La chémobiologie explore le vivant (décembre 2021) : 20 €
- Hydrogène décarboné (octobre 2021) : 20 €
- De la chimie du solide aux batteries de demain (juillet-août 2021) : 20 €
- Substances naturelles et chimie durable (mai 2021) : 20 €
- Radiochimie et chimie sous rayonnement (mars-avril 2021) : 32 €
- Le jubilé du Groupe Français d'Études & d'Applications des Polymères (nov.-déc.-janv. 2020-2021) : 32 €
- Pigments et colorants (oct.-nov. 2019) : 32 €
- La montée en puissance de la RPE (sept. 2019) : 20 €
- Les applications actuelles de la calorimétrie (juin 2019) : 20 €
- Quelles réponses aux menaces chimiques, biologiques et radiobiologiques ? (mai 2019) : 20 €
- Les startups de la chimie (mars-avril 2019) : 32 €
- La chimie supramoléculaire (juin-juil.-août 2018) : 32 €
- Chimie et développement durable (mars-avril 2018) : 32 €



Collection « Chimie et... », co-éditée et diffusée par EDP Sciences

Dernières parutions :

- Chimie et Notre-Dame de Paris (août 2023) : 25 €
- Chimie et agriculture durable (nov. 2022) : 25 €
- Chimie et énergies nouvelles (mars 2022) : 25 €
- Chimie et lumière (janv. 2021) : 25 €
- Chimie et nouvelles thérapies (sept. 2020) : 25 €
- Chimie et Alexandrie dans l'Antiquité (janv. 2020) : 25 €
- Chimie, nanomatériaux, nanotechnologies (sept. 2019) : 25 €
- Chimie et biologie de synthèse - Les applications (janv. 2019) : 25 €
- Chimie, aéronautique et espace (sept. 2018) : 25 €
- La chimie et les sens (janv. 2018) : 25 €
- La chimie et les grandes villes (sept. 2017) : 25 €
- Chimie, dermo-cosmétique et beauté (janv. 2017) : 25 €
- Chimie et changement climatique (sept. 2016) : 25 €



À commander
chez votre libraire
ou directement sur
laboutique.edpsciences.fr



Bon de commande

Nom Prénom

Adresse (pour les particuliers, préciser l'adresse personnelle)

Code postal Ville Pays

Tél Courriel

Adresse IP (pour l'abonnement multiple).....

Montant total de la commande (frais de port inclus) :

Mode de règlement

- sur facturation (joindre obligatoirement le bon de commande)
- par chèque bancaire ou postal libellé à l'ordre de la SCF souhaite recevoir une facture acquittée
- par virement bancaire ou postal
France Société Générale Paris Seine Amont, 03081/00037265820/87 CCP Paris 30041 Compte 070786U020/90
Étranger IBAN FR7630003030810003726582087 Swift.Sogefrpp
- par carte bancaire (Visa, Eurocard Mastercard) Validité /
Cryptogramme visuel (les trois derniers chiffres du numéro imprimé au dos)

L'Actualité Chimique

SCF, Service Abonnement, 250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris - Tél. : 01 40 46 71 66/60.

abonnement@lactualitechimique.org - www.lactualitechimique.org



**LE VILLAGE
ACCUEILLE LES FUTURS
CHAMPIONS
DE LA CHIMIE**

60 ENTREPRISES 40 ÉCOLES & PARTENAIRES

**2 JOURS
POUR TROUVER
TA FORMATION
ET TON FUTUR
MÉTIER !**

**O1+O2
M² A⁰ R² S⁴**
villagedelachimie.org

PARIS MONTREUIL EXPO

ENTRÉE LIBRE

128, RUE DE PARIS - 93100 MONTREUIL (M) ROBESPIERRE

ANIMATIONS + CONFÉRENCES + RÉALITÉ VIRTUELLE