

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

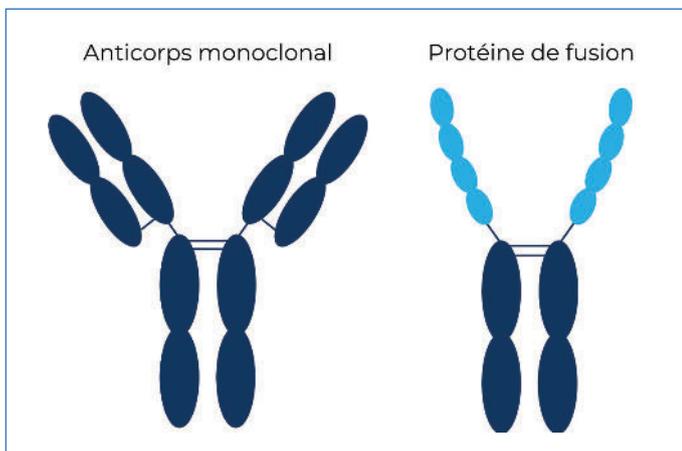


Figure 1 - Représentation schématique des anticorps monoclonaux et protéines de fusion Fc.

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.

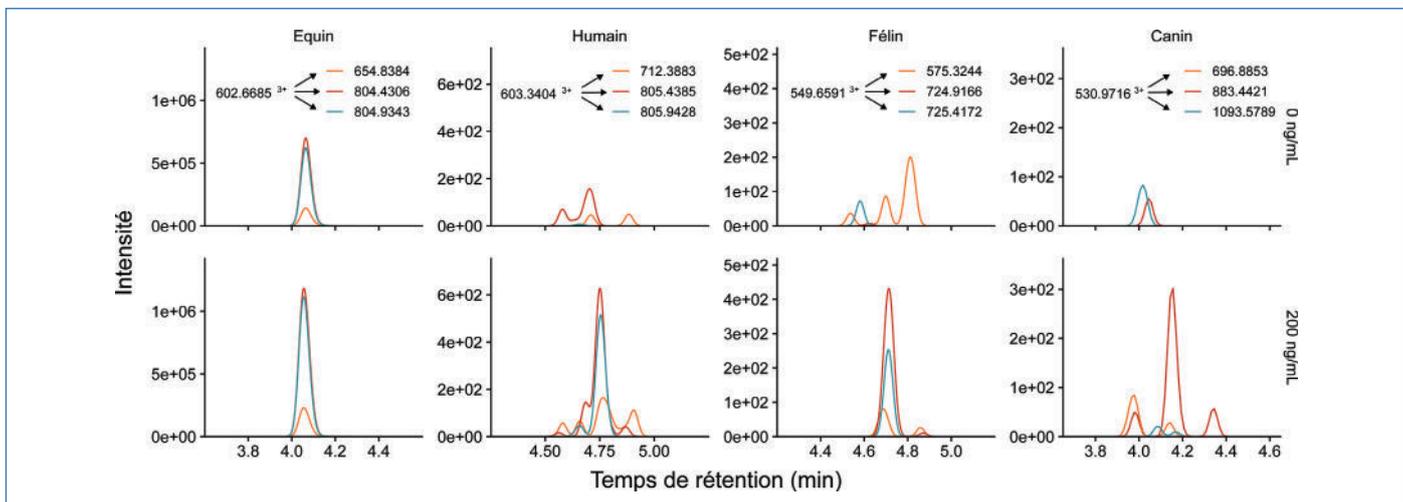


Figure 3 - Chromatogrammes d'ions extraits des fragments de chacun des peptides protéotypiques obtenus après analyse d'un extrait de plasma équin dans lequel aucun mAb n'a été ajouté (haut), et dans lequel les mAb *Tocilizumab* (mAb humain), *Bedinvetmab* (mAb canin) et *Frunevetmab* (mAb félin) ont 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.

* i.bailly@lchfrance.fr