

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 (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.

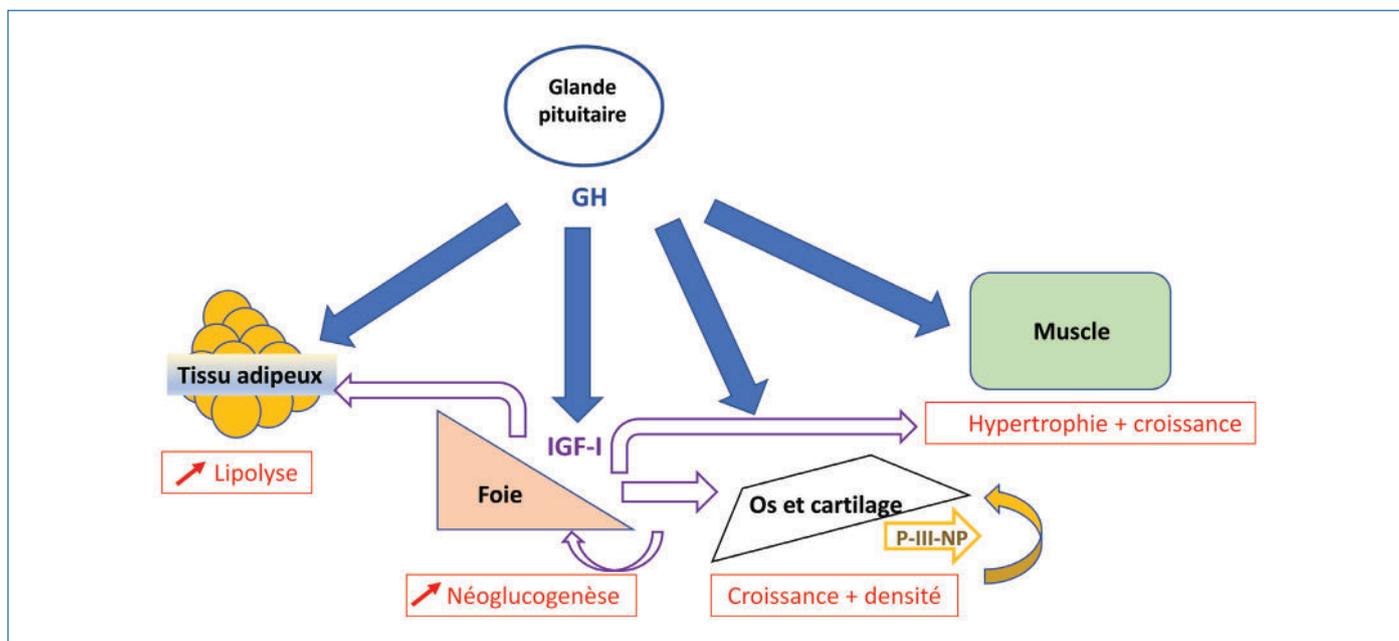


Figure 1 - Les différents effets de l'hormone de croissance.

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]. Une 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

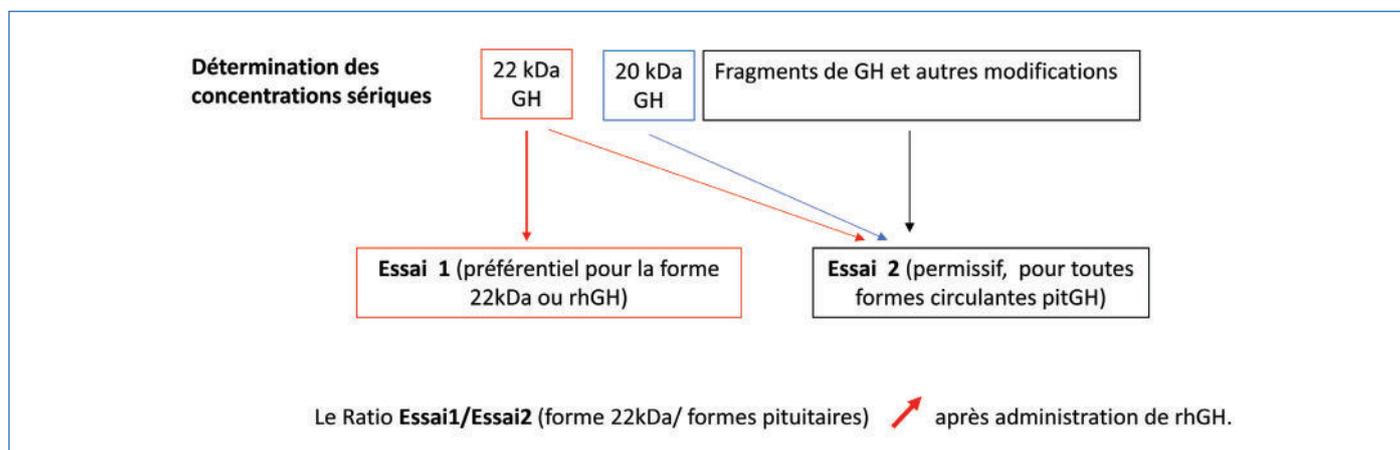


Figure 2 - Principe de la méthode différentielle des isoformes.

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-I 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 nouvelles aliquotes. Enfin, les passeports seront examinés tout d'abord par les unités

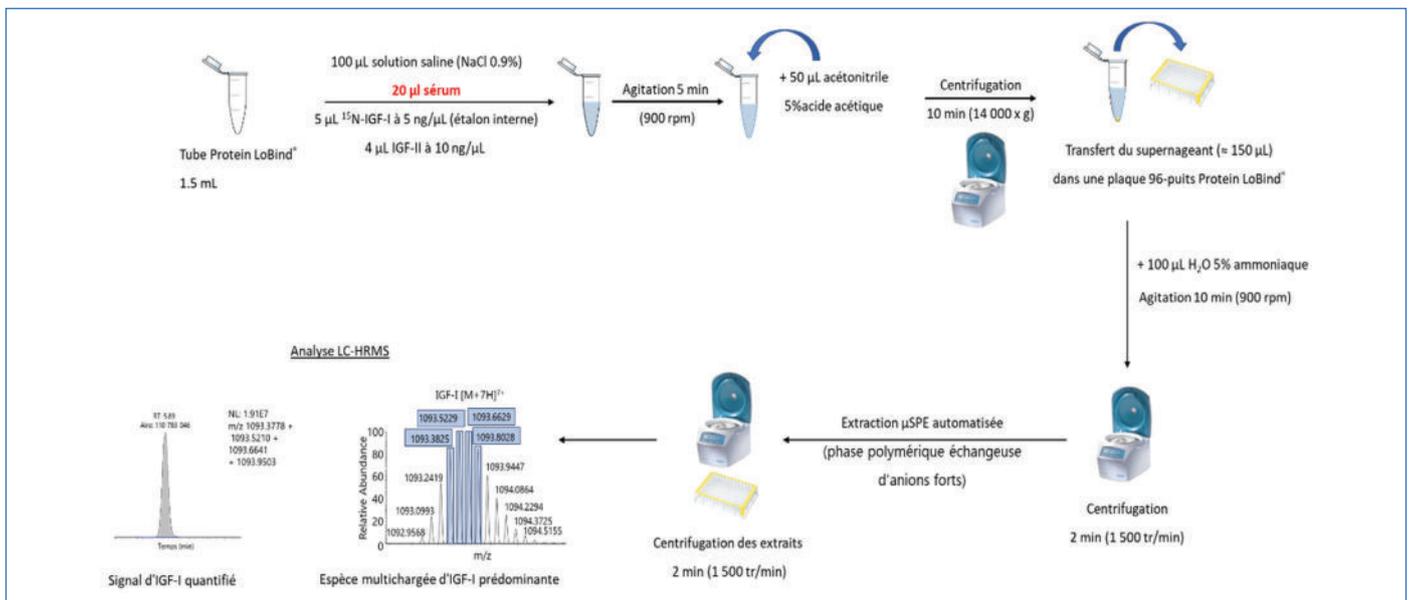


Figure 6 - Méthode de préparation et mesure d'IGF-I dans le sérum par approche top-down mise en œuvre au Laboratoire antidopage français (LADF) pour l'analyse du module endocrinien du PBA du sportif.

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.

[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.

[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