

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE : CHIMIE BIOLOGIE

**MISE AU POINT D'UN NOUVEL OUTIL DE DEPISTAGE DE
L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE EQUINE
RECOMBINANTE PAR APPROCHE METABOLOMIQUE**

THESE DE DOCTORAT

**DISCIPLINE : CHIMIE
SPÉCIALITÉ : ANALYTIQUE**

présentée
et soutenue publiquement par

Fanny KIEKEN

le 8 Juillet 2010, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs	Monsieur Martial Saugy <i>Directeur du Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage, Lausanne</i> Monsieur Jean-Charles Martin <i>Chargé de Recherches en Nutrition, INRA, Marseille</i>
Examineurs	Monsieur Yves BONNAIRE <i>Directeur du Laboratoire des Courses Hippiques, Verrières-le-buisson</i> Monsieur Michel Krempf <i>Médecin Nutritionniste, CHU Nantes</i> Madame Gaud PINEL <i>Ingénieur de recherche, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes</i>
Directeur de thèse	Monsieur Bruno LE BIZEC <i>Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes</i>

*À mes parents,
A Nicolas.*

Aux membres du jury de thèse,

Monsieur Martial Saugy, directeur du Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage à Lausanne,

Monsieur Jean-Charles Martin, chargé de recherches à l'INRA de Marseille,

Monsieur Yves Bonnaire, directeur du Laboratoire des Courses Hippiques à Verrières-le-Buisson,

Monsieur Michel Krempf, médecin nutritionniste au CHU de Nantes,

Madame Gaud PINEL, ingénieur de recherche au Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) à l'ENV de Nantes,

Monsieur Bruno LE BIZEC, directeur du Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) à ONIRIS Nantes,

qui m'ont fait l'honneur de lire et de juger ce travail, et que je remercie pour le temps qu'ils y ont consacré.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. Yves BONNAIRE et à M. Bruno LE BIZEC, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires respectifs, le Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) et le Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), pour la confiance qu'ils m'ont accordée lors de la réalisation de ce travail ainsi que pour leur disponibilité et leurs conseils scientifiques.

Je tiens également à remercier très sincèrement Mme Gaud PINEL, Melle Frédérique COURANT, M. Jean-Philippe ANTIGNAC, M. Patrice GARCIA, M. Ludovic BAILLY-CHOURIBERRY et Mme Marie-Agnès POPOT pour leur disponibilité, leur écoute, et leur soutien déterminants dans l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie l'ensemble du personnel du LCH et du LABERCA, composé de secrétaires, techniciens, cadres, ingénieurs, stagiaires, doctorants, post-doctorants et docteurs, dont les compétences ont constituées le socle solide indispensable au développement de ce projet mais surtout pour ces nombreux et agréables moments partagés ensemble. Un grand merci à ma correctrice assidue de fautes d'orthographe, Charlotte, avec qui j'ai passé d'excellents moments aux pauses de 16H.

Une thèse est une aventure humaine où les contacts et échanges sont nombreux. Parmi eux, certaines personnes occupent une place toute particulière puisque de véritables liens d'amitié se sont créés. Merci à Ludivine, Parina, Florence, Anne-Christelle et Pascal pour votre soutien mais aussi pour les incalculables fous rires, soirées et week-ends passés ensemble.

Dans un registre plus personnel, je tiens à remercier mes amis et ma famille pour avoir participé à leur façon à ce travail avec néanmoins une pensée toute particulière pour Mister Nico, Fabien et Irena, Franck et ma formidable Maman.

Nicolas, je ne trouve pas de mot assez fort pour exprimer tout ce que je ressens pour toi. Alors, je te dirai juste un modeste merci tout particulièrement chargé d'amour pour tout ce que tu m'apportes depuis 8 ans.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxiii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	xxvii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE - I TRAVAUX ANTERIEURS	17
PARTIE - 1 HORMONE DE CROISSANCE	19
1. <i>Définition d'une hormone</i>	19
2. <i>Caractéristiques générales de l'hormone de croissance</i>	19
2.1. Biosynthèse.....	19
2.2. Structure tertiaire	21
2.3. Sécrétion.....	21
3. <i>Contrôle de la sécrétion</i>	23
3.1. Contrôle par les hormones hypothalamo-hypophysaires	23
3.2. Contrôle par les sécrétagogues	25
4. <i>Actions de l'hormone de croissance sur le métabolisme</i>	27
4.1. Interactions hormone de croissance/récepteur	27
4.2. Actions directes	29
4.2.1. Sur le foie	29
4.2.2. Sur la mamelle.....	29
4.2.3. Sur l'os	29
4.2.4. Sur le muscle	29
4.2.5. Sur le tissu adipeux.....	29
4.3. Effets biologiques associés à la stimulation par l'hormone de croissance	31
4.3.1. Effets directs.....	31
4.3.1.1. Sur la lipolyse	31
4.3.1.2. Sur la glycémie	31
4.3.1.3. Sur la synthèse protéique	33
4.3.2. Effets indirects via les IGFs	33
4.3.2.1. Les Insulins Growth Factors (IGFs).....	33
4.3.2.2. Effets sur la croissance des os et tissus	35
4.3.2.3. Effets sur le muscle, la force et la vitesse de cicatrisation	35
5. <i>Les hormones recombinantes et leurs utilisations potentielles</i>	37
5.1. Historique	37
5.2. Principe général de synthèse des hormones de croissance recombinantes.....	37
5.3. Utilisation en tant que promoteur de croissance	39
5.3.1. Propriétés recherchées.....	39
5.3.1.1. Augmentation des performances physiques.....	39
5.3.1.2. Effets promoteurs de croissance	41
5.3.2. Réglementation.....	41
5.3.2.1. Chez le bovin et porcine	41
5.3.2.2. Chez l'homme.....	41
5.3.2.3. Chez le cheval.....	43
5.4. Conséquences sur la santé.....	43

6.	<i>Conclusion de la première partie</i>	43
PARTIE - 2	MISE EN EVIDENCE DE L'UTILISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE	45
1.	<i>Matrices biologiques d'intérêts</i>	45
1.1.	Le sang.....	45
1.2.	L'urine	47
1.3.	Concentrations physiologiques de l'hormone de croissance.....	49
2.	<i>Méthodes de dépistage les plus utilisées pour la détection de l'administration de l'hormone de croissance</i>	51
2.1.	Dosage de l'hormone de croissance.....	51
2.1.1.	Les bio-essais.....	51
2.1.2.	Les techniques immunologiques et radioimmunologiques	53
2.1.2.1.	Principe	53
2.1.2.2.	Application au dosage de la GH.....	53
2.2.	Dosage des marqueurs biologiques de l'administration de rGH	55
2.2.1	L'IGF-I.....	55
2.2.2	Les IGF Binding Protein (IGFBP).....	57
2.2.3	Les anticorps anti-hormones de croissance.....	57
3.	<i>Méthodes de confirmation</i>	59
3.1.	Identification de la rGH	59
3.1.1.	Distinction entre la forme native et recombinante	59
3.1.2.	Digestion enzymatique suivie d'une analyse par spectrométrie de masse	61
3.1.2.1	Hydrolyse enzymatique.....	61
2.2.1.1.	Spectrométrie de masse.....	61
4.	<i>Conclusions de la deuxième partie</i>	63
PARTIE - 3	LA METABOLOMIQUE EN TANT QUE NOUVEL OUTIL DE DEPISTAGE.....	65
1.	<i>Les Différentes approches omiques</i>	65
1.1.	Analyses génomiques	65
1.2.	Etudes transcriptomiques	67
1.3.	Etudes protéomiques.....	69
1.4.	La métabolomique	71
2.	<i>Analyse du métabolome</i>	71
2.1.	Différents niveaux d'étude.....	71
2.2.	Méthodes d'analyse	73
2.2.1.	La RMN.....	73
2.2.2	Les méthodes fondées sur la spectrométrie de masse	73
2.2.2.1	Les sources d'ionisation.....	75
2.2.2.2	Les analyseurs haute-résolution	77
2.2.2.3	Couplages en chromatographie	81
2.2.3	Traitement et analyse des données.....	83
2.2.3.1	Traitement des données.....	83
2.2.3.2	Analyses des données : analyses statistiques multivariées	85
2.2.3.3	Problématique de l'identification des variables.....	87
2.2.4	Domaines d'application	87
3.	<i>Conclusion de la troisième partie</i>	89
CHAPITRE - II	MATERIEL ET METHODES	91

PARTIE - 1	MATERIEL BIOLOGIQUE	93
1.	<i>Administration de l'hormone de croissance aux chevaux du centre d' experimentation de coye la forêt</i>	93
1.1.	Référence de l'hormone de croissance administrée	93
1.2.	Voie d'administration et identification des échantillons	95
1.3.	Prélèvement des échantillons	95
2.	<i>Administration de l'hormone de croissance aux chevaux dE l'ecole nationale veterinaire de Toulouse</i>	97
2.1.	Référence de l'hormone de croissance administrée et de l'excipient	97
2.2.	Voie d'administration et identification des échantillons	97
2.3.	Prélèvement des échantillons	97
3.	<i>Etude de population en vue de la mise en place d'un outil metabolomique prédictif</i>	99
PARTIE - 2	PRISES D'EMPREINTES METABOLOMIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION ...	99
2.1.	Réactifs	99
2.2.	Traitement de l'échantillon	101
2.2.1.	Filtration sur des filtres de seuil de coupure 10 kDa	101
2.2.2.	Filtration sur des filtres de seuil de coupure 10 kDa suivie d'une étape de lyophilisation	101
2.2.3.	Extraction sur phase solide	101
2.2.4.	Préparation des étalons externes	103
2.2.5.	Préparation des contrôles qualités	103
2.3.	Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	103
2.3.1.	Conditions HPLC	103
2.3.2.	Conditions Spectrométriques	105
2.2.4.1	Paramètres MS	105
2.2.4.2	Paramètres de fragmentation d'un métabolite d'intérêt : la vitamine b5	107
PARTIE - 3	RETRAITEMENT ET ANALYSES DES DONNEES METABOLOMIQUES	107
3.1.	Traitement des données	109
3.1.1.	Paramètres du logiciel XCMS	109
3.1.2.	Traitement secondaire des données	111
3.2.	Analyse des données	111
3.3.	Validation des modèles	113
3.4.1.	Indicateurs R ² et Q ²	113
3.4.2.	Validation croisée et test de permutation	113
3.4.3.	CV-ANOVA (Cross Validation-ANalysis Of Variance)	115
CHAPITRE - III	RESULTATS ET DISCUSSION.....	117
PARTIE-1	DEVELOPPEMENT D'UNE DEMARCHE METHODOLOGIQUE EN VUE DE L'ETUDE D'UN TRAITEMENT A LA REGH	121
1.	<i>Etude de faisabilite sur deux animaux</i>	121
1.1.	Introduction	121
1.2.	Stratégie analytique	123
1.2.1.	Echantillonnage et préparation des échantillons	123
1.2.2.	Choix et validation des conditions LC-HRMS	125
1.2.2.1.	Temps d'analyse	125
1.2.2.2.	Ordre d'injection des échantillons	125
1.2.2.3.	Etudes de répétabilité et de stabilité	125
1.2.2.3.1.	Répétabilité de la mesure	127
1.2.2.3.2.	Stabilité des échantillons	127

1.2.2.4.	Contrôles qualités de la mesure.....	129
1.2.3.	Retraitement des données	129
1.2.3.1.	Evolution globale du métabolome.....	129
1.2.3.2.	Analyses statistiques	131
1.2.3.2.1.	Analyse non supervisée de type ACP	133
1.2.3.2.2.	Analyse supervisée de type OPLS	135
1.2.3.2.3.	Validation du modèle OPLS	135
1.2.3.2.4.	Conclusions	137
2.	<i>Etude d'une population constituée de 13 animaux</i>	139
2.1.	Optimisations techniques	139
2.1.1.	Optimisation de la préparation des échantillons	139
2.1.1.1.	Echantillons et protocoles	141
2.1.1.2.	Richesse des empreintes LC-HRMS	141
2.1.1.3.	Répétabilité	143
2.1.1.4.	Comparaison des ions obtenus par les Méthodes A et B.....	143
2.1.1.5.	Conclusions.....	145
2.1.2.	Optimisation de la chromatographie.....	145
2.1.2.1.	Comparaison de la richesse des empreintes	147
2.1.2.2.	Calcul des performances chromatographiques.....	147
2.1.2.3.	Conclusions.....	149
2.1.3.	Comparaison des modes d'ionisation positif et négatif.....	149
2.1.4.	Comparaison des performances de trois analyseurs.....	151
2.1.4.1.	Echantillons, préparation et conditions chromatographiques	151
2.1.4.2.	Mesure de l'effet global de l'administration de reGH sur le métabolisme des chevaux.....	153
2.1.4.3.	Analyses statistiques en vue de la création de modèles statistiques et descriptifs	155
2.1.4.4.	Conclusions.....	157
2.1.5.	Conservation des échantillons	157
2.2.	Application de la stratégie aux 13 chevaux de l'expérimentation de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 159	
2.2.1.	Etude des extraits urinaires	161
2.2.1.1.	Empreintes LC-HRMS.....	161
2.2.1.2.	Retraitement et analyse des données	163
2.2.1.3.	Réduction du nombre d'ions pertinents.....	165
2.2.1.4.	Validation du modèle	169
2.2.1.5.	Conclusions.....	171
2.2.2.	Etude des extraits biologiques plasmatiques.....	173
2.2.2.1.	Empreintes LC-HRMS.....	173
2.2.2.2.	Retraitement et analyse des données	173
2.2.2.3.	Réduction du nombre d'ions	175
2.2.2.4.	Validation.....	177
2.2.2.5.	Comparaison et conclusions.....	179
2.3.	Conclusions de la première partie et perspectives.....	181
PARTIE-2 APPORT DE LA METABOLOMIQUE AU CONTROLE ANTI-DOPAGE DE L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE RECOMBINANTE EQUINE.....		183
1.	<i>Développement d'un nouvel outil de dépistage par approche métabolomique</i>	185
1.1	Mise en place d'un modèle métabolomique descriptif et prédictif	187

1.1.1.	Echantillons, préparation et conditions d'analyse.....	187
1.1.2.	Retraitement et analyse des données	187
1.1.2.1	Analyse des empreintes globales	187
1.1.2.2	Analyse fondée sur les intensités MS de 80 biomarqueurs	189
1.1.3.	Validité du modèle	189
1.1.3.1	Validation croisée (Figure III-34).....	189
1.1.3.2	Test de permutation	191
1.1.4.	Conclusions	191
1.2	Stratégie d'élucidation structurale d'un biomarqueur d'intérêt.....	193
1.2.1	Propriétés du biomarqueur d'intérêt	193
1.2.2	Mesure de la masse exacte par spectrométrie de masse haute résolution	195
1.2.3	Fragmentation et analyse du spectre CID	195
1.2.4	La vitamine B5 : un nouveau candidat biomarqueur de l'administration de l'hormone de croissance recombinate équine ?.....	197
2.	<i>Apport de la métabolomique au contrôle anti-dopage de l'utilisation de GH : mise en place de passeport biologique.....</i>	<i>197</i>
2.1	Introduction.....	197
2.2	Approche fondée sur des paramètres multiples.....	199
2.3	Résultats des analyses longitudinales réalisées sur plusieurs chevaux de course.....	201
2.3.1	Mesure de l'IGF-I.....	201
2.3.2	Mesure des anticorps anti-hormone de croissance.....	201
2.3.3	Mesure de l'expression des gènes.....	203
2.3.4	Mesure de la variation de 80 métabolites	205
2.3.5	Conclusions	205
3.	<i>Conclusions de la seconde partie.....</i>	<i>207</i>
	CONCLUSION GÉNÉRALE	209
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	219
	ANNEXES	235

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Séquence en acides aminés de la GH équine (190 AA).....	18
Figure I-2 : Représentation schématique de la structure 3D de la GH humaine (Chantalat et al, 1995).....	20
Figure I-3 : Mise en évidence de la sécrétion pulsatile chez de la GH chez le rat par mesure RIA (Idelman et Verdetti, 2000).....	20
Figure I-4 : Représentation schématique de la régulation de la synthèse de GH dans l'organisme.....	22
Figure I-5 : Structure de la MK-677 (Korbonits et Grossman, 1995).....	24
Figure I-6 : Représentation 3D de l'hGH et de ses deux récepteurs (GHR). La structure hélicoïdale de la GH est représentée en rouge et ses récepteurs en cyan (Palo et al, 2006).	26
Figure I-7 : Mécanisme d'interaction GH/Récepteur (Idelman et Verdetti, 2000).....	26
Figure I-8 : Processus d'obtention de l'hormone de croissance équine recombinante (Bailly-Chouriberry, 2007)..	36
Figure I-9 : Coupe sagittale du rein gauche.....	46
Figure I-10 : Principe du dosage ELISA direct.....	52
Figure I-11 : Principe du dosage ELISA indirect.....	52
Figure I-12 : Principe du dosage ELISA sandwich.....	52
Figure I-13 : Concentrations en IGF-I plasmatiques déterminées par ELISA de J-7 à J+30 pour un cheval traité à la reGH (Bailly-Chouriberry et al, 2007) . Les flèches de couleur désignent les posologies de reGH administrées, rouge ($18 \mu\text{g.kg}^{-1}$), vert ($25 \mu\text{g.kg}^{-1}$), et rose ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Le trait en pointillé représente le seuil en IGF-I proposé à 860 ng.mL^{-1} (Bailly-Chouriberry, 2007).	54
Figure I-14 : Cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir des échantillons sériques J-7 à J+210 (chevaux 1 et 2) mesurée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH et sur une plaque revêtue d'insuline porcine (mesure des interactions non spécifiques). La valeur seuil est présentée en pointillés (Bailly-Chouriberry, 2007).	58
Figure I-15 : Spectre de masse représentant le peptide N-terminal reGH (m/z 933.5) et ses ions d'intérêts (m/z 794 et 1288).....	62
Figure I-16 : Schéma représentant les fenêtres de détection de trois techniques d'analyse utilisées pour le contrôle anti-dopage équin.....	62
Figure I-17 : Différents niveaux d'organisation des techniques « omiques ».....	64
Figure I-18 : Principe de fonctionnement d'une puce à ADN.....	66
Figure I-19 : Schématisation de la stratégie analytique la plus fréquemment utilisée pour une approche non ciblée de type métabolomique.....	70
Figure I-20 : Schéma d'une source electrospray.....	76
Figure I-21 : Principe du fonctionnement d'un analyseur à temps de vol.....	76
Figure I-22 : Principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse hybride quadrupôle-time of flight (Q-TOF).....	78
Figure I-23 : Trajectoire des ions dans la trappe orbitale caractérisée par la fréquence de rotation ω_ϕ , la fréquence d'oscillation radiale ω_r , et la fréquence d'oscillation axiale ω_z	78
Figure I-24 : Principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap TM	80
Figure I-25 : Principe de fonctionnement du FT-ICR.....	80
Figure II-1 : Flacon d'EquiGen-5 [®] contenant l'hormone de croissance équine recombinante (solution à 5 mg/mL).....	92
Figure III-1 : Validation globale de la répétabilité n=5 échantillons.....	126

<i>Figure III-2 : Evolution des temps de rétention pour chaque analyte composant la solution de référence en début, milieu et fin de séquence.</i>	128
<i>Figure III-3 : Moyenne des intensités MS de chacun des 7 analytes composant la solution de référence en début (1), milieu (2), et fin (3) d'une séquence donnée.</i>	130
<i>Figure III-4 : Volcano-plot des 2375 ions extraits par le logiciel XCMS pour l'analyse des échantillons urinaires collectés à J₊₇.</i>	130
<i>Figure III-5 : ACP réalisée sur la base des 2375 ions formant les empreintes métaboliques urinaires de tous les jours de collecte. Les triangles verts représentent les observations correspondant aux animaux traités ; les triangles rouges représentent les observations correspondant aux animaux avant traitement.</i>	132
<i>Figure III-6 : OPLS réalisée sur la base de 2375 ions formant les empreintes métaboliques urinaires de tous les jours de collecte.</i>	134
<i>Figure III-7 : Test de permutation effectué sur l'analyse OPLS présentée en figure III-6.</i>	134
<i>Figure III-8 : OPLS réalisée sur la base de 2375 ions formant les empreintes métaboliques urinaires de tous les jours de collecte. Les triangles rouges et bleus représentent respectivement les échantillons collectés avant et après administration de reGH du jeu d'étalonnage. Les triangles verts et jaunes représentent respectivement les échantillons collectés chez les animaux non traités et traités à la reGH du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédits par le modèle.</i>	136
<i>Figure III-9 : Histogrammes représentant les coefficients de variation obtenus pour chaque technique de préparation des échantillons. (A) Filtration sur des membranes de coupure de seuil 10kDa, (B) Filtration suivie d'une étape de lyophilisation, (C) Extraction sur phase Oasis HLB.</i>	142
<i>Figure III-10 : Analyse OPLS des empreintes plasmatiques de 56 échantillons analysés en mode d'ionisation négatif. Les échantillons provenant des animaux contrôles et traités à la reGH sont respectivement notés sous le sigle c et t.</i>	148
<i>Figure III-11 : Chromatogramme d'un ion statistiquement pertinent extrait des empreintes plasmatiques en mode d'ionisation ESI-.</i>	150
<i>Figure III-12 : Représentation en volcano-plot (pour le jour de prélèvement J+7) de la p-value et du ratio des ions obtenus après le retraitement par le logiciel XCMS des empreintes urinaires acquises sur les appareil de spectrométrie de masse LTQ-OrbitrapTM (A), MicroTOF (B), MicroTOF-Q-II (C).</i>	152
<i>Figure III-13 : Evolution des temps de rétention de la Testostérone-D3 au cours de 100 injections.</i>	160
<i>Figure III-14 : Evolution des intensités MS de la Testostérone-D3 au cours de 40 injections.</i>	160
<i>Figure III-15 : Différence entre la masse exacte théorique et la masse mesurée pour la D3-testostérone utilisé comme étalon externe.</i>	162
<i>Figure III-16 : Analyse en composante principale de 150 échantillons biologiques collectés chez des animaux contrôles (c) et traités à la reGH (t) et de 12 échantillons de contrôles qualité (6 pools provenant de la population contrôle (PnT) et 6 pools provenant de la population traitée (PT)).</i>	162
<i>Figure III-17 : Analyse en composante principale effectuée sur les 4877 ions extraits lors du retraitement des empreintes métaboliques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.</i>	164
<i>Figure III-18 : Analyse OPLS effectuée sur les 4877 ions extraits lors du retraitement des empreintes métaboliques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.</i>	164

Figure III-19 : Loading plot permettant la représentation des ions extraits dans les empreintes métabolomiques urinaires en fonction de leur contribution à la composante 1.	166
Figure III-20 : Chromatogrammes d'ions extraits des ions m/z 184 et m/z 220 identifiés comme ions d'intérêt présents dans la matrice urinaire.	166
Figure III-21 : Analyse OPLS effectuée sur les 80 ions extraits lors du retraitement des empreintes métabolomiques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.	168
Figure III-22 : Analyses OPLS effectuées sur les 80 ions extraits lors du retraitement des empreintes métabolomiques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et analysés sur deux séquences A et B.	168
Figure III-23 : OPLS réalisée sur la base de 80 ions sélectionnés et présents dans les empreintes urinaires. 75 échantillons ont été analysés au sein d'une même séquence et divisés en deux jeux de données. Les triangles noirs c et t représentent respectivement les chevaux contrôles et les chevaux traités du jeu d'étalonnage. Les carrés bleus cp et tp représentent respectivement les chevaux contrôles et traités du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédit par le modèle.....	170
Figure III-24 : Test de permutation consistant à réaffecter aléatoirement la variable Y du jeu de donnée provenant de l'analyse des extraits urinaires de l'expérimentation de Toulouse.	170
Figure III-25 : Stratégie analytique appliquée pour l'analyse des extraits urinaires et plasmatiques.....	172
Figure III-26 : ACP réalisée sur les 5086 ions formant les empreintes métabolomiques plasmatiques de tous les jours de collecte. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.	174
Figure III-27 : OPLS réalisée sur les 5086 ions formant les empreintes métabolomiques plasmatiques de tous les jours de collecte. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.	174
Figure III-28 : « S-plot » représentant les 5086 variables utilisés pour construire le modèle présenté à la Figure III-27. Les ions caractérisés par une contribution importante sont encadrés en rouge.	176
Figure III-29 : OPLS réalisées sur les 56 ions sélectionnés et présents dans les empreintes métabolomiques plasmatiques. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.	176
Figure III-30 : OPLS réalisée sur la base de 56 ions sélectionnés et présents dans les empreintes plasmatiques. Les triangles noirs c et t représentent respectivement les chevaux contrôles et les chevaux traités du jeu d'étalonnage. Les carrés bleus cp et tp représentent respectivement les chevaux contrôles et traités du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédit par le modèle.	178
Figure III-31 : Test de permutation consistant à réaffecter aléatoirement la variable Y du jeu de donnée provenant de l'analyse des extraits plasmatiques de l'expérimentation de Toulouse.....	178
Figure III-32: OPLS réalisée sur les 2035 ions extraits et présents dans les empreintes métabolomiques urinaires. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.....	186

<i>Figure III-33 : OPLS réalisée sur les 80 ions extraits comme potentiels biomarqueurs et présents dans les empreintes métabolomiques urinaires. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.....</i>	<i>188</i>
<i>Figure III-34 : OPLS réalisée sur la base de 80 ions extraits comme de potentiels biomarqueurs et présents dans les empreintes urinaires. Les triangles noirs c et t représentent respectivement les chevaux contrôles et les chevaux traités du jeu d'étalonnage. Les carrés bleus cp et tp représentent respectivement les chevaux contrôles et traités du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédit par le modèle.</i>	<i>188</i>
<i>Figure III-35 : Test de permutation consistant a réaffecter aléatoirement la variable Y du jeu de donnée provenant de l'analyse des extraits plasmatiques de l'expérimentation de Toulouse.</i>	<i>190</i>
<i>Figure III-36 : Chromatogramme d'ion extrait du métabolite d'intérêt choisi pour l'élucidation structurale en mode d'ionisation positif.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure III-37 : Différence d'intensité MS observée entre la population contrôle et traitée à l'hormone de croissance recombinante équine pour l'ion m/z=220 et tr=3.8 min détecté en mode d'ionisation positif.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure III-38 : Mesure de la masse exacte de l'ion d'intérêt en mode d'ionisation positif et négatif.....</i>	<i>194</i>
<i>Figure III-39 : Nombre de point par pic pour la mesure de l'ion d'intérêt en mode d'ionisation négatif.....</i>	<i>194</i>
<i>Figure III-40 : Spectre de fragmentation de l'ion d'intérêt obtenu en mode d'ionisation positif.</i>	<i>196</i>
<i>Figure III-41 : Structure développée de la vitamine B5.....</i>	<i>196</i>
<i>Figure III-42 : Evolution de la production d'anticorps en fonction des mois de prélèvements dans des échantillons plasmatiques collectés sur un cheval donné.</i>	<i>202</i>
<i>Figure III-43 : Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR à partir d'échantillons sanguins.</i>	<i>202</i>
<i>Figure III-44 : Prédiction des échantillons urinaires (A, B, C, D, E,) collectés chez 5 chevaux au profil « métabolomique normal » sur le modèle métabolomique développé en Figure III-33 composé d'échantillons urinaires collectés chez des chevaux non traités (c) et traités à la reGH (t) et fondé sur 80 biomarqueurs.</i>	<i>204</i>
<i>Figure III-45 : Prédiction des échantillons urinaires (X, Y) collectés chez deux chevaux au profil « métabolomique anormal » sur le modèle métabolomique développé en Figure III-33 composé d'échantillons urinaires collectés chez des chevaux non traités (c) et traités à la reGH (t) et fondé sur 80 biomarqueurs.....</i>	<i>204</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Liste des pays autorisant l'utilisation de rbST.....	40
Tableau I-2 : Composition minérale de l'urine équine.....	48
Tableau I-3 : Conditions LC-MS pour l'analyse des peptides de la GH bovine et équine.....	60
Tableau I-4 : Exemples de logiciels commerciaux utilisés pour le retraitement des données métabolomiques	82
Tableau I-5 : Exemples de logiciels « open-source » utilisés pour le retraitement des données métabolomiques	84
Tableau I-6 : Présentation de bases de données disponibles sur Internet	86
Tableau II-1 : Caractéristiques des chevaux choisis pour l'expérimentation de Coye la Forêt.....	94
Tableau II-2 : Caractéristiques des chevaux choisis pour l'expérimentation de Toulouse	96
Tableau II-3 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses effectuées sur le système Thermo Surveyor à l'aide de la colonne Uptisphere C18 HDO.....	104
Tableau II-4 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses effectuées sur l' Ultimate 3000 à l'aide de la colonne Luna HILIC.....	104
Tableau II-5 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses effectuées sur l'Ultimate 3000 à l'aide de la colonne Uptisphere Strategy NEC.....	104
Tableau II-6 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre de masse hybride, LTQ-Orbitrap TM en mode d'ionisation ESI+	104
Tableau II-7 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre MicroTOF en mode d'ionisation ESI+.....	106
Tableau II-8 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre hybride, Q-TOF en mode d'ionisation ESI+	106
Tableau II-9 : Conditions d'ionisation utilisées pour la MS-MS sur le spectromètre Exactive en mode d'ionisation ESI+	106
Tableau II-10 : Paramètres importants du logiciel XCMS optimisés pour le retraitement des données acquises sur les spectromètres de masse MicroTOF, MicroTOF-Q-II, et LTQ-Orbitrap TM	108
Tableau III-1: Validation de la stabilité sur 24 heures.....	126
Tableau III-2: Composés composant la solution de standards.....	128
Tableau III-3: Liste des prélèvements utilisés pour l'optimisation de différents paramètres analytiques.....	140
Tableau III-4 : Richesse des empreintes métabolomiques obtenus pour les trois techniques de préparation des échantillons.....	142
Tableau III-5: Caractéristiques des colonnes Uptisphere C18 HDO, Uptisphere Strategy et Luna HILIC.....	144
Tableau III-6 : Nombre d'ions détectés après retraitement des données LC-MS obtenues avec trois phases chromatographiques différentes.....	146
Tableau III-7 : Calcul des performances chromatographiques obtenus pour l'analyse de 4 composés ciblés	146

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACN	: Acétonitrile
ACP	: Analyse en Composante Principale
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	: Acide RiboNucléique messenger
AAc	: Acide Acétique
CID	: Dissociation induite par collision (Collision Induced Dissociation)
CV	: Coefficient de Variation
E1D, E2D	: Electrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	: Electrospray
GH	: Growth Hormone (b : bovine, c : canine, e : équine, h : humaine, p : porcine)
GH-BP	: Growth Hormone Binding Protein
GHRH	: Growth Hormone Releasing Hormone = somatolibérine
GHRP	: Growth Hormone Releasing Peptide
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HRMS	: Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
IAC	: Chromatographie d'immunoaffinité (ImmunoAffinity Column)
IGF-1	: Insulin-like Growth Factor 1
IGF-BP	: Insulin-like Growth Factor – Binding Protein
IgG	: Immunoglobuline G
IRMS	: Isotopic Ratio Mass Spectrometry
LC-MS/MS	: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LMR	: Limite Maximale de Résidus
MALDI	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	: Méthanol
MRM	: Suivi de réactions multiples (Multiple Reaction Monitoring)
MS	: Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MS/MS, MS ⁿ	: Spectrométrie de masse en tandem
OPLS	: Orthogonal Partial Least Square
pI	: Point Isoélectrique
PLS	: Partial Least Square
PM	: Poids Moléculaire
rGH	: recombinant Growth Hormone
RIA	: RadioImmunoAssay

SIM	:	Single Ion Monitoring
SPE	:	Extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction)
TOF (Time of Flight)	:	Analyseur à temps de vol
ST	:	Somatotropine
SST	:	SomatoStatine
TFA	:	Acide trifluoroacétique

INTRODUCTION GENERALE

Depuis la Rome antique, l'utilisation de substances permettant l'amélioration des capacités physiques de chevaux a été rapportée. Ainsi l'hydromel fut l'une des premières substances utilisées dans le but de stimuler les capacités d'animaux de course grâce aux propriétés tonifiantes des feuilles de sauge qui entrent dans sa composition. D'autres substances telles que l'anis, le miel ou encore le sandaraque furent également largement utilisées comme drogue. Au début du XIX^{ème} siècle, une nouvelle famille de composés, les alcaloïdes est découverte, elle devient alors très utilisée par des entraîneurs américains. Cette pratique se répand rapidement en Europe, néanmoins les nombreux abus entraînent l'adoption de mesures répressives dès 1903. Le mot dopage issu de l'anglais « to dope » (≡ prendre un excitant) apparaît alors dans la langue française (petit Larousse Illustré, 1903). Il se définit comme « l'emploi d'excitants susceptibles au moment d'une course de donner au cheval une ardeur factice et momentanée ». Il est précisé que le procédé est interdit par le code des courses et en toute occasion pour les chevaux militaires. Des réglementations se mettent en place et aboutissent à l'élaboration d'un code des courses hippiques en 1989 dont l'article L-233 stipule qu'« Aucun cheval déclaré partant ne doit receler dans ses tissus, fluides corporels, ou excréments, aucune substance ou métabolite de cette substance qui soit une substance prohibée ou aucune substance dont l'origine et la concentration ne peuvent être rattachée à la nourriture normale ou habituelle, ou aucun indicateur scientifique prouvant qu'il y a eu administration d'une substance prohibée ou exposition à une substance prohibée, dont la mise en évidence est équivalente à la mise en évidence de ladite substance prohibée ». Pour les sports équestres, le règlement général de la Fédération Française d'Équitation (FFE) émet la définition suivante : « le dopage consiste dans l'utilisation de produits pouvant modifier le comportement physique et/ou psychique et/ou dans l'utilisation de produits faisant obstacle à leur détection et susceptibles de nuire à la santé du cheval ». Les familles de composés prohibées sont diverses, et possèdent par conséquent des effets variés et spécifiques sur l'organisme de l'animal. Le Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) est le laboratoire agréé par la Fédération Nationale des Courses Françaises pour l'analyse des échantillons biologiques équins et la recherche des substances interdites par le Code des Courses Hippiques ; les grandes familles de composés recherchées sont : les antalgiques, les antipyrétiques, les anti-inflammatoires, les tranquillisants, les stimulants, les diurétiques, et les hormones anabolisantes. Ces dernières ont pour but de favoriser la constitution de tissus organiques à partir d'éléments simples puisés dans l'alimentation.

L'hormone de croissance (GH : growth hormone) est une protéine décrite pour la première fois par Evans et Long en 1921, comme molécule capable de promouvoir la croissance. Leurs premières études ont montré qu'après administration d'extraits bruts d'hypophyse de bovins à des rats en croissance, leur vitesse de croissance en était accélérée.

Peu après, Raben entreprit de traiter le nanisme hypophysaire en injectant de l'hormone somatotrope humaine extraite d'hypophyses à des patients. Ces extraits hypophysaires ont alors été appelés « somatotropines » (ST) en lien avec le grec signifiant « croissance de tissu ». Le besoin en hormone de croissance pour soigner le retard de croissance des enfants s'est ensuite rapidement accru et des prélèvements sur des hypophyses humaines de cadavres ont alors été effectués pour combler ce déficit. Certains de ces extraits hypophysaires, contaminés par un prion, ont induit la maladie de Creutzfeld-Jacob. La nécessité de produire des hormones par biotechnologie en toute innocuité s'est alors très vite imposée. Dans le même temps, les avancées scientifiques rapides ont permis à l'industrie pharmaceutique de développer et de mettre sur le marché des spécialités d'hormones de croissance recombinantes (rGH) humaines, bovines, équines et porcines.

Simultanément à la mise sur le marché de ces molécules pour les espèces animales bovine, porcine et équine, des textes réglementant leur usage sont apparus en Europe. Dans ce contexte international, la circulation des hormones de croissance sur le marché noir Européen est suspectée pour accroître la rentabilité de production des animaux d'élevage et améliorer les performances physiques des animaux en dépit des directives Européennes (article premier de la Décision 1999/879/CE ; Décret 2003-514, article 6 de l'accord international sur l'élevage et les courses). Le développement d'une méthode fiable d'identification des différentes hormones de croissance recombinantes (rGH) afin de mettre en évidence de potentielles pratiques illégales a constitué un vrai challenge analytique au cours de ces quinze dernières années. En 2004, des recherches initiées en collaboration par le Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) et par le Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) ont permis pour la première fois la détection de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance (GH) chez le cheval (Bailly-Chouriberry, 2007). Ces travaux ont tout d'abord abouti à la mise au point d'une méthode de dépistage fondée sur la détection d'anticorps anti-hormone de croissance. Cette technique permet de suspecter une administration d'hormone de croissance quelle que soit la forme recombinante administrée. Cependant, elle nécessite un délai d'environ une semaine avant d'induire une réponse immunitaire. Une méthode basée sur la spectrométrie de masse permettant la confirmation de l'administration de l'hormone de croissance équine recombinante (reGH) à l'état de trace (quelque ng.mL^{-1}) dans le plasma a également été développée.

Elle permet pour la première fois la détection d'une forme recombinante de l'hormone de croissance équine (BresaGen, Australie) jusqu'à 48h après administration. Cependant, la rapide élimination de l'hormone de croissance de l'organisme et le fait que cette méthode ait été développée pour une forme recombinante donnée rendent en pratique délicat le contrôle efficace de l'administration de cette molécule. De plus, l'apparition de nouvelles pratiques comme l'administration de cocktails à faible dose, accentue la difficulté à détecter des hormones naturelles anabolisantes (hormone de croissance, oestradiol, testostérone) par les méthodes analytiques classiques et actuelles. De nouvelles alternatives, non plus basées sur la détection de composés connus et ciblés, mais sur la détection globale des effets physiologiques s'est alors imposée et a été développée récemment.

Les effets connus de l'hormone de croissance sur le métabolisme des sucres, des lipides et des protéines laissent suggérer que son administration entraîne des modifications et perturbations physiologiques à différentes échelles de l'organisme. Une étude des profils de matrices biologiques dans le but de révéler les effets physiologiques de l'hormone croissance pourrait alors permettre la mise en évidence de variations comme conséquence directe ou indirecte de son action. Les techniques « omiques » qui incluent la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique sont des approches permettant de satisfaire à de telles études. La métabolomique en particulier, qui fait référence à l'étude des métabolites présents dans un milieu biologique donné, semble appropriée pour dresser le profil de matrices biologiques et détecter des variations induites par exemple par une administration d'anabolisant. Les métabolites correspondent à des molécules de faibles poids moléculaires dont leurs concentrations résultent de l'expression des gènes et constituent la réponse ultime d'un organisme à une altération génétique, une maladie, une exposition toxique ou encore un traitement. L'administration d'un produit dopant tel que l'hormone de croissance aura alors de fortes chances d'entraîner des modifications qualitatives ou quantitatives de métabolites décelables par une exploration large et systématique du métabolome.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et est fondé sur une approche de type profilages métaboliques ; il s'intéresse particulièrement aux perturbations engendrées par un traitement à l'hormone de croissance recombinante équine (reGH). Des travaux utilisant la spectrométrie de masse haute résolution ont été engagés afin de différencier des chevaux non traités d'animaux traités à la reGH sur la base d'empreintes spectrométriques globales. L'objectif de cette approche a été de démontrer la faisabilité analytique, d'en optimiser les différents paramètres afin de révéler des différences significatives de profils métaboliques chez les animaux traités.

En premier lieu, ce manuscrit fait le point sur les données de la littérature et est consacré à l'état des connaissances actuelles sur la structure, les effets biologiques, les méthodes de détection de l'administration de reGH, mais également sur le principe, les méthodes d'analyse et les domaines d'applications de la métabolomique. Le deuxième chapitre est consacré à la description des matériels et méthodes employés au cours de ce travail. Enfin, le dernier chapitre expose les résultats des recherches effectuées dans le cadre de ce travail de thèse : des empreintes métabolomiques urinaires et plasmatiques ont été réalisées dans le but de construire des modèles statistiques révélateurs d'une exposition à l'hormone de croissance équine recombinante et mettre en évidence de nouveaux candidats biomarqueurs. Il développe également les méthodes actuelles de dépistage de la reGH utilisées au Laboratoire des Courses Hippiques dans le but de donner des éléments de comparaison et d'envisager la place de la métabolomique dans un contexte de contrôle anti-dopage.

L'ensemble de ces travaux a donné lieu aux publications ou communications suivantes :

PUBLICATIONS

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Monteau F, Paris AC, Popot MA, Bonnaire Y, Le Bizec B. Development of a metabonomic approach based on LC-ESI-HRMS measurements for profiling of metabolic changes induced by recombinant equine growth hormone in horse urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 394(8): 2119-2128.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Garcia P, Popot MA, Grall M, Mercadier V, Toutain PL, Bonnaire Y, Le Bizec B. Development and application of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to reveal an illegal administration of recombinant equine growth hormone in horse from urinary and plasmatic biological signatures. *Metabolomics* 2010 (submitted).

COMMUNICATIONS ORALES

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Popot MA, Bonnaire Y et Le Bizec B. Mise en évidence de l'administration d'hormone de croissance équine par approche métabolomique LC-ESI-HRMS. Application au contrôle anti-dopage. 3^{èmes} Journées du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Bordeaux, France, 7-8 Février 2008.

Pinel G, Le Breton M-H, Rochereau-Roulet S, Bailly-Chouriberry L, **Kieken F**, Rychen G and Le Bizec B. Somatotropin, overview of research studies. Euroresidue VIth Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands, 19th-21th May 2008.

Antignac JP, Pinel G, Bichon E, Monteau F, Courant F, **Kieken F**, Destrez B and Le Bizec B. The mass spectrometric-based untargeted metabolomics: principle and applications in the field of food safety. Euroresidue VIth Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands, 19th-21th May 2008.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Popot MA, Bonnaire Y et Le Bizec B. Développement d'une approche métabolomique basée sur le couplage LC-ESI-HRMS (LTQ-OrbitrapTM) pour la mise en évidence de l'utilisation de l'hormone de croissance chez le cheval. 25^{èmes} Journées Françaises de la Spectrométrie de Masse, Grenoble, France, 8-11 Septembre 2008.

Kieken F, Garcia P. Analyses ciblées et non ciblées en couplage LC-MicroTOF dans le cadre du contrôle antidopage équin. Journée utilisateurs Bruker Daltonics, Paris, France, 25 Novembre 2008.

Pinel G, Antignac JP, Bichon E, Monteau F, Courant F, **Kieken F**, Destrez B, Le Bizec B. Mass spectrometry based metabolomics in the field of chemical food safety. Trends in Food Analysis VI Conference, Ghent, Belgium, 19th May 2009.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Popot MA, Garcia P, Bonnaire Y, Le Bizec B. Application of LC-HRMS metabolomic fingerprinting from urine and plasma samples to screen for illegal administration of equine growth hormone in horse. Metabomeeting 2009, Norwich, Angleterre, 5-8 Juillet 2009.

Antignac JP, Pinel G, Courant F, Anizan S, **Kieken F**, Destrez B, Monteau F and Le Bizec B. Metabolomic / metabolite profiling: real perspective or dream? Annual CRL Hormones Workshop – BIO COP Mini-Symposium, Utrecht, The Netherlands, 28th-30th October 2009.

POSTERS

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Popot MA, Bonnaire Y, Le Bizec B. Development of a method based on metabolomic approach in order to detect recombinant equine growth hormone administration. Application to doping control. 2^{èmes} Journées du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Bordeaux, France, 7-8 Février 2008.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Popot MA, Bonnaire Y, Le Bizec B. Discrimination between GH treated and non-treated animals: untargeted fingerprints of urine samples by LC-ESI-HRMS measurements. Eurorésidu VIth Conference, Egmond aan ZEE, The Netherlands, 19th-21th may 2008.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Popot MA, Bonnaire Y, Le Bizec B. Urine metabolomic fingerprints, by LC-HRMS measurements, in order to detect illegal administration of equine growth hormone in horse racing. 18th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, ICRAV, Turkey, October 2008.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Paris AC, Popot MA, Le Bizec B, Bonnaire Y. Nouvelle méthode de contrôle de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine (reGH) par approche métabolomique. ASEP, Marseille, France, 2-3 Décembre 2009.

Kieken F, Pinel G, Antignac JP, Paris AC, Popot MA, Le Bizec B, Bonnaire Y. Development and application of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for growth hormone abuse in horses. 19th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, ICRAV, New-Zealand, March 2010.

CHAPITRE - I

TRAVAUX ANTERIEURS

¹	FPAMPLSSLF	ANAVLRAQHL	HQLAADTYKE	FERAYIPEGQ	40
⁴¹	RYSIQNAQAA	FCFSETIPAP	TGKDEAQQRS	DMELLRFSL	80
⁸¹	LIQSWLGPVQ	LLSRVFTNSL	VFGTSDRVYE	KLRDLEEGIQ	120
¹²¹	ALMRELEDGS	PRAGQILKQT	YDKFDTNLR	DDALLKNYGL	160
¹⁶¹	LSCFKKDLHK	AETYLKVMKC	RRFVESSCAF ¹⁹⁰		

Figure I-1 : Séquence en acides aminés de la GH équine (190 AA)

PARTIE - 1 HORMONE DE CROISSANCE

1. DEFINITION D'UNE HORMONE

Une hormone est un messager chimique, libéré dans le sang par une cellule sécrétrice et transporté jusqu'à des cellules cibles afin d'y exercer des fonctions physiologiques et des régulations biochimiques (Beaulieu et Kelly, 1990). Les hormones sont produites, par des glandes endocrines telles que l'hypophyse ou la thyroïde, en réponse à une stimulation, et interviennent dans de nombreux processus, touchant notamment la reproduction, la différenciation cellulaire, l'homéostasie, ou encore la régulation des rythmes biologiques. Plusieurs types d'hormone peuvent être distingués :

- Les hormones dérivées d'amines qui sont constituées d'un seul acide aminé (la tyrosine ou le tryptophane) mais sous une forme dérivée. C'est le cas des catécholamines et de la thyroxine.

- Les hormones peptidiques, comme l'hormone de croissance ou l'insuline, qui sont constituées de chaînes d'acides aminés.

- Les hormones stéroïdiennes qui dérivent du cholestérol et qui sont fabriquées dans la zone cortico-surrénale et les gonades. Les oestrogènes, la testostérone et le cortisol appartiennent à cette famille.

- Les hormones qui dérivent des lipides et dont la classe principale est représentée par les eicosanoïdes, parmi lesquelles, les plus étudiées sont les prostaglandines.

2. CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'HORMONE DE CROISSANCE

2.1. Biosynthèse

L'hormone de croissance (GH) est une protéine caractéristique des vertébrés. Elle est produite dans l'hypophyse et plus précisément dans son lobe antérieur appelé adénohypophyse (Friesen *et al*, 1970). Sa forme prédominante est celle qui possède un poids moléculaire de l'ordre de 22 kiloDalton (kDa) et qui correspond à la séquence entière des acides aminés (AA). Dans le cas du cheval, la séquence totale de la GH est constituée de 190 AA, représentant un poids moléculaire de 21757 kDa (Figure I-1).

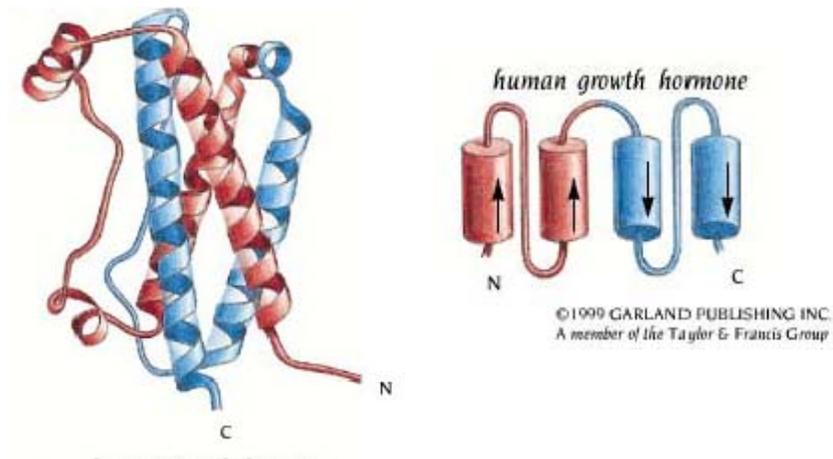


Figure I-2 : Représentation schématique de la structure 3D de la GH humaine (Chantalat *et al*, 1995)

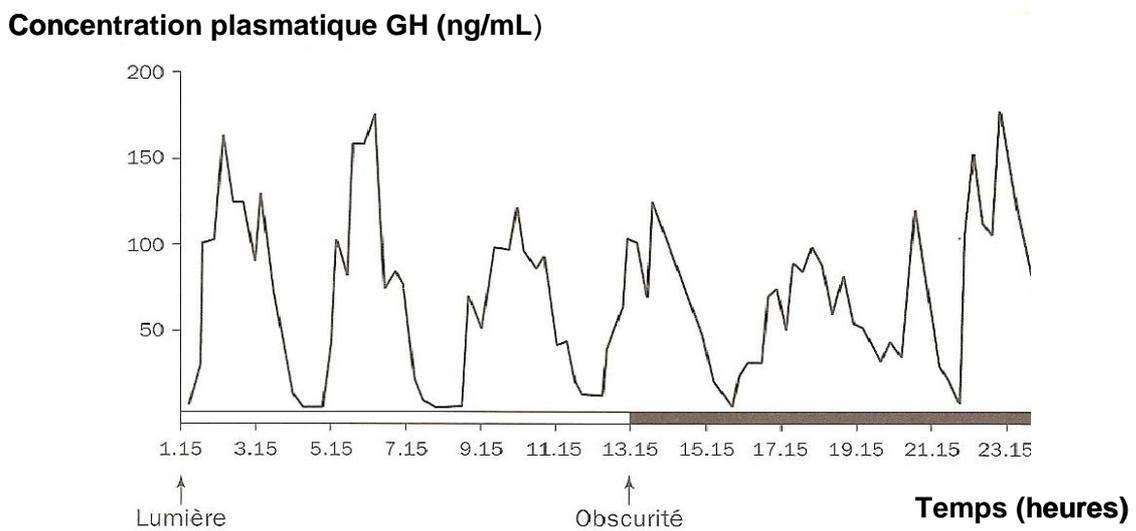


Figure I-3 : Mise en évidence de la sécrétion pulsatile chez de la GH chez le rat par mesure RIA (Idelman et Verdeti, 2000)

D'autres formes circulantes ont été également décrites. Chez l'homme une forme de 20 kDa codée et transcrite par le même gène que la variante 22 kDa est également présente (Tinsley *et al*, 1986). La seule différence provient de l'épissage du gène ce qui se traduit par la perte d'acides aminés. D'autres formes circulantes de poids moléculaire 27 kDa, 17 kDa, ou encore 5 kD sont également trouvées.

2.2. Structure tertiaire

Dans l'organisme, la séquence des acides aminés de la GH s'organise en une conformation tridimensionnelle qui intervient dans la reconnaissance de certains récepteurs des organes cibles. Dans le cas de la hGH (Branden et Tooze, 1996), sa modélisation 3D met en évidence une structure comprenant quatre hélices α anti-parallèles deux à deux (Figure I-2).

2.3. Sécrétion

Comme l'indique la Figure I-3, la sécrétion de la GH est pulsatile le jour comme la nuit (Tannenbaum et Martin, 1976). L'amplitude des pics s'élève 3 à 4 heures après le repas ainsi qu'une heure après le début du sommeil. Pendant les pics de sécrétion, la concentration plasmatique en hormone de croissance est très élevée, de l'ordre de la centaine de ng.mL^{-1} et extrêmement faible (quelque ng.mL^{-1}) en dehors.

La fréquence des pulses de GH est chez l'homme comprise entre plus d'un par heure à un pulse toutes les quatre heures (Casanueva, 1992). En général, les conditions physiologiques résultant d'une augmentation de la concentration de GH sérique en 24 heures sont associées à l'augmentation de l'amplitude des pulses plutôt qu'à une augmentation de la fréquence des pulses. De la même manière, la réduction des taux circulants de GH chez les personnes âgées et chez les personnes de petite taille est associée à une diminution de l'amplitude des pulses sans changement de la fréquence. Les mécanismes de contrôle de l'amplitude des pulses de GH varient selon les différents états physiologiques de l'individu, à savoir le sommeil, l'exercice ou le stress (Strobl et Thomas, 1994).

Les données rapportées dans la littérature concernant la sécrétion pulsatile de GH pour le cheval (Thompson Jr *et al*, 1992 ; Stewart *et al*, 1993) indiquent un même mode de fonctionnement que celui observé chez l'homme.

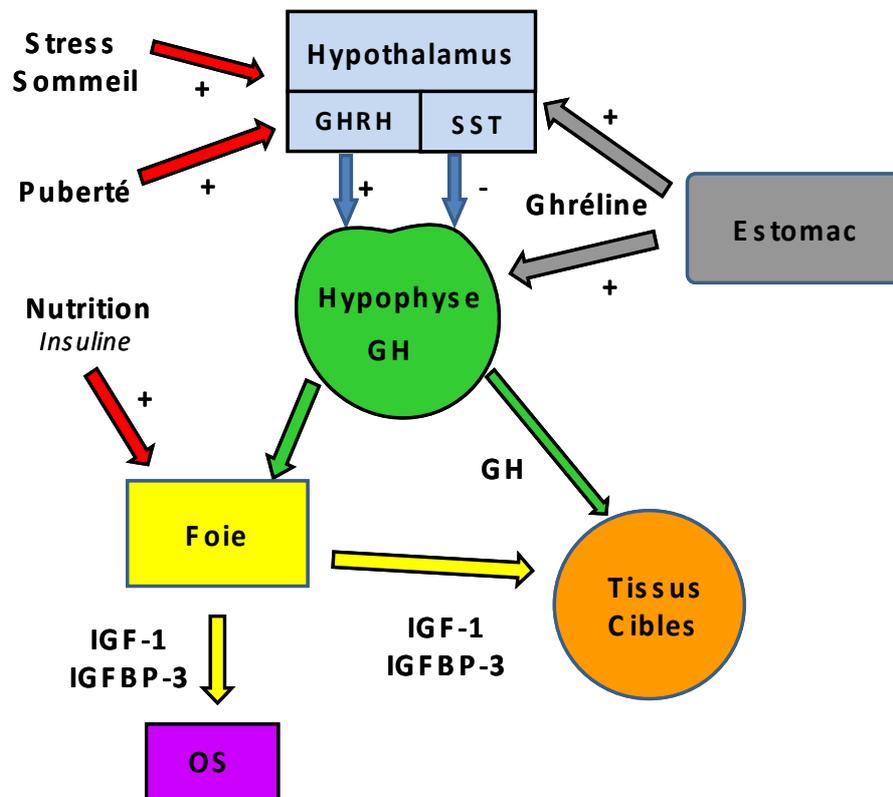


Figure I-4 : Représentation schématique de la régulation de la synthèse de GH dans l'organisme.

Il en est de même, pour la production d'un pulse de GH en réponse à des conditions physiologiques particulières d'exercice, de stimulation sexuelle, de stress alimentaire (Nadal *et al*, 1997) et d'injection de GHRH chez le cheval (Thompson Jr *et al*, 1992 ; Thompson Jr *et al*, 1994).

3. CONTROLE DE LA SECRETION

3.1. Contrôle par les hormones hypothalamo-hypophysaires

L'hypothalamus exerce une influence régulatrice sur l'antéhypophyse (Green et Harris, 1947). Cette neurosécrétion qui atteint les différentes cellules cibles de l'hypophyse constitue pour chacune des catégories cellulaires un facteur provoquant leur excrétion dans la circulation sanguine, d'où le nom de « releasing factor » (RF) ou « releasing hormone » (RH), ou encore libérine. Dans quelques cas, ce facteur sera un inhibiteur, « inhibiting factor » (IF) ou « inhibiting hormone » (IH) (Idelman et Verdeti, 2000). Les produits de sécrétion de l'hypothalamus contrôlent donc toutes les sécrétions hormonales adénohypophysaires. Tous les RF ou IF sont des polypeptides (Figure I-4).

Plus particulièrement, La GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) est un polypeptide qui intervient dans la régulation de l'hormone de croissance en exerçant un rétrocontrôle positif ce qui permet d'augmenter sa concentration plasmatique. Dans le cas de buffles femelles (*bubalus bubalis*), des injections de GHRH à une dose de 10µg/100 kg de masse corporelle ont ainsi permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration plasmatique de GH dans les 20 minutes suivant l'injection (Mondal et Prakash, 2004). Ces résultats sont en accord avec des études menées sur des troupeaux de vaches laitières (Kazmer *et al*, 2000 ; Mondal *et al*, 2006) où une augmentation de la concentration de GH est observée quelques minutes après administration de GHRH.

Les somatostatines exercent un rétrocontrôle négatif sur l'hormone de croissance en abaissant sa concentration plasmatique (Brazeau *et al*, 1973). En plus d'être sécrétées dans l'hypothalamus, elles sont également produites dans les glandes thyroïdes et surrénales, les reins, la prostate ou encore le placenta.

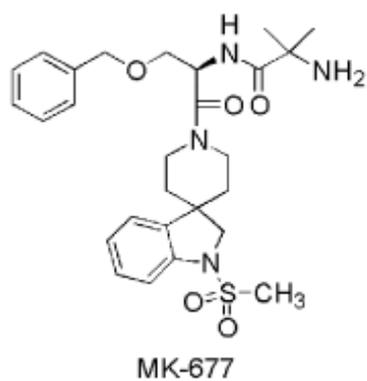


Figure I-5 : Structure de la MK-677 (Korbonits et Grossman, 1995)

3.2. Contrôle par les sécrétagogues

Après une administration intraveineuse, sous-cutanée, intranasale ou même orale, les GHRP, Growth Hormone Releasing Peptide ou sécrétagogues (Ankerson *et al*, 1999) sont capables d'induire la libération de GH chez l'homme ou l'animal. Les sécrétagogues présentent des actions centrales et agissent tant au niveau de l'hypothalamus que de l'hypophyse.

Dès 1981, le laboratoire Momany&Bowers synthétise des sécrétagogues peptidiques (< 10 AA) de l'hormone de croissance (GHRPs) capable de stimuler la sécrétion de la GH (Momamy *et al*, 1981). Afin d'étendre les propriétés de ces molécules sécrétagogues, de nouvelles synthèses peptidiques sont réalisées (Bowers *et al*, 1984). Parmi les GHRPs les plus connus, les peptides GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6 ou encore l'hexareline peuvent être cités (Korbonits and Grossman, 1995).

Puis, la recherche s'est étendue à des molécules non peptidiques et c'est ainsi que les sécrétagogues non peptidiques (GHSs) apparaissent, dont une molécule très prometteuse est la MK-677 (Figure I-5).

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés appartenant à la famille des GHRPs et qui possède un groupement acide n-octanoïque sur la sérine en position 3. Elle fut isolée, pour la première fois, en 1999 dans l'estomac de rat et d'être humain (Kojima *et al*, 1999), ce qui lui confère un statut d'hormone endogène. Des études menées chez le rat ont montré qu'une simple injection intracérébroventriculaire (ICV) de 20 pmol suffisait à augmenter, de façon significative, la concentration plasmatique d'hormone de croissance (Date *et al*, 2000). Le fait que différentes espèces de la même classe sécrètent des ghrélines très proches sur le plan structural confère à ce peptide une activité beaucoup plus large. C'est ainsi que la ghréline humaine ou bovine s'avère parfaitement efficace et active dans l'organisme du porc (Hashizume *et al*, 2003). D'autres études menées sur des chèvres et des bovins ont permis d'effectuer une comparaison des réponses de l'hormone de croissance suite à une administration de GHRH et de ghréline (Hashizume *et al*, 2005). Elles révèlent que les concentrations nécessaires en GHRH doivent être nettement inférieures à celle de la ghréline pour obtenir le même rétrocontrôle positif sur l'hormone de croissance. L'action de la GHRH est donc très spécifique de la GH alors que celle de la ghréline est beaucoup plus large.

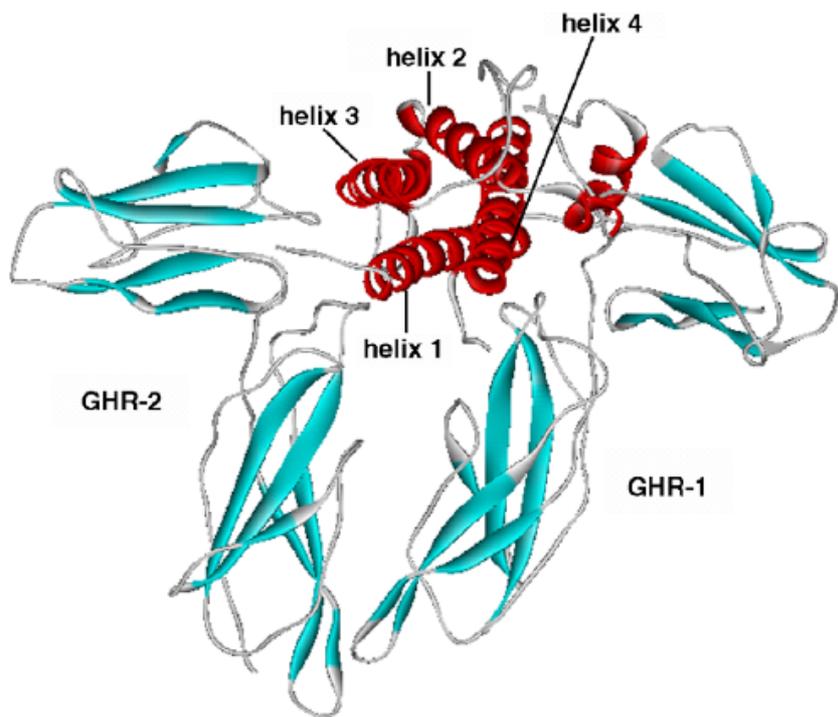


Figure I-6 : Représentation 3D de l'hGH et de ses deux récepteurs (GHR). La structure hélicoïdale de la GH est représentée en rouge et ses récepteurs en cyan (Palo *et al*, 2006).

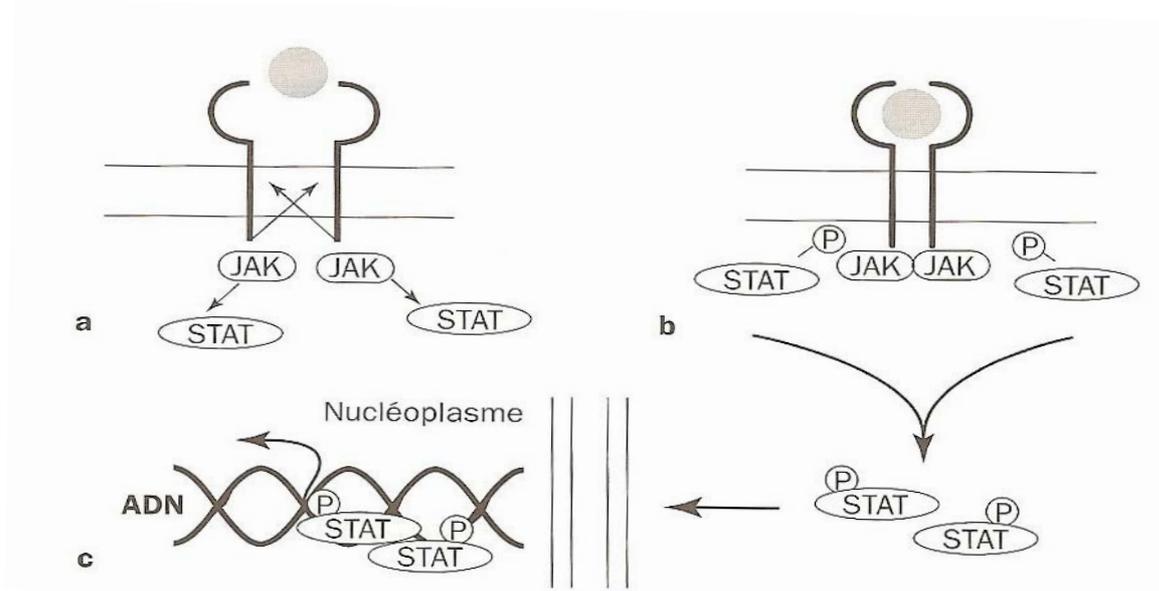


Figure I-7 : Mécanisme d'interaction GH/Récepteur (Idelman et Verdeti, 2000)

Chez le cheval, il a été rapporté que l'usage de sécrétagogues augmentait les concentrations de GH circulantes. La première étude concerne l'administration par voie orale d'un sécrétagogue non peptidique (L-163255, Merck) qui a l'avantage de ne pas être dégradé par les enzymes digestives (Christensen *et al*, 1997). Les autres concernent le sécrétagogue EP51389, un tripeptide (Kennedy *et al*, 2002) et GHRP-6 (Borromeo *et al*, 2005).

4. ACTIONS DE L'HORMONE DE CROISSANCE SUR LE METABOLISME

4.1. Interactions hormone de croissance/récepteur

L'action de la GH sur le métabolisme d'un organisme passe par une interaction avec son récepteur. Le récepteur de l'hormone de croissance est une protéine membranaire qui appartient à la superfamille des cytokines. Deux formes de récepteurs existent : une liée à la membrane de la cellule cible qui est une protéine de 620 acides aminés et une autre liée à une protéine de transport appelée GHBP. Ces deux formes ont la capacité de reconnaître le message spécifique de la GH et de le transmettre à la cellule cible. Les récepteurs ont donc un rôle de transducteur et de traducteur d'information. Le mécanisme d'interaction entre l'hormone de croissance et son récepteur commence par un processus de dimérisation. En effet, le récepteur de la GH est une protéine dimérique qui lie une molécule de ST dans deux régions distinctes : le site I (GHR-1) qui implique les résidus de la partie C-terminale et le site II (GHR-2) qui implique ceux de la région N-terminale (Figure I-6).

Cette première étape entraîne l'activation de protéines appelées JAK (Janus Kinase) associées au récepteur (Figure I-7, étape a). Puis, ces protéines se transphosphorylent et phosphorylent le récepteur qui devient un site de liaison pour des protéines cytoplasmiques, les protéines STAT (étape b). Enfin, la liaison des protéines STAT au récepteur entraîne leur activation par phosphorylation ce qui leur permet de former des homo- ou hétéro-dimères. Elles sont transloquées dans le noyau où elles lient les séquences spécifiques d'ADN (étape c) et activent une série de gènes cibles (Postel-Vinay et Kelly, 1996).

Grâce à ses interactions avec ses récepteurs, l'hormone de croissance peut agir de manière directe ou indirecte sur ses cellules cibles, situées sur différents organes et tissus.

4.2. Actions directes

4.2.1. Sur le foie

L'action directe de la GH sur les cellules du foie permet la synthèse d'un ensemble de facteurs d'origine hépatique, les somatomédines. Il s'agit de substances proches de l'insuline car apparentées structurellement à la proinsuline, dits « Insulin-like Growth Factors » (IGF). Les principales sont l'IGF-1 (SM-A ou somatomédine A) qui est un peptide de 70 acides aminés et l'IGF-2 (SM-C ou somatomédine C) qui est composé de 67 acides aminés. Elles sont véhiculées dans le sang par des protéines de transport (IGFBP ou IGF-Binding Protein) au nombre de 6 (IGFBP 1 à 6). Ces IGFBP modulent l'action des IGFs sur les tissus cibles (Jones et Clemmons, 1995).

4.2.2. Sur la mamelle

Le tissu mammaire contient d'abondants récepteurs pour les somatomédines et une très petite population de récepteurs à l'hormone de croissance. Les somatomédines ont des effets directs sur les cellules mammaires épithéliales et sont les médiateurs préférentiels de l'action de la somatotropine dans la glande mammaire (Etherton et Bauman, 1998).

4.2.3. Sur l'os

La GH peut réaliser, dans une moindre mesure que l'IGF-1, la maturation des cellules germinales de l'os par une action directe sur le cartilage (Strobl et Thomas, 1994).

4.2.4. Sur le muscle

Les effets de l'hormone de croissance sur le muscle squelettique sont directs et indirects via l'IGF-1. L'IGF-1 stimule la prolifération de myoblastes (Houseknecht *et al*, 1996).

4.2.5. Sur le tissu adipeux

L'action de l'hormone de croissance sur le tissu adipeux est considérée comme étant directe puisque les adipocytes contiennent des récepteurs à l'hormone de croissance (Etherton et Bauman, 1998).

4.3. Effets biologiques associés à la stimulation par l'hormone de croissance

L'hormone de croissance est une hormone à activités multiples qui agit à la fois comme facteur de croissance (os et muscles), facteur de différenciation, mais également régulateur métabolique (foie, tissu adipeux et muscles). Elle est donc un agent anabolisant physiologique indispensable à la croissance staturale et au maintien de la masse protéique chez l'adulte. Le déficit de GH, lorsqu'il survient avant la maturité sexuelle entraîne un nanisme. Son excès provoque avant la maturité sexuelle un gigantisme et après la maturité sexuelle de l'acromégalie (croissance en épaisseur des os au niveau des extrémités et de la face). Son action sur la croissance s'exerce de manière dose-dépendante, ce qui n'est pas le cas d'autres hormones (insuline, hormones thyroïdiennes) qui participent aussi à la régulation de la croissance corporelle.

4.3.1. Effets directs

4.3.1.1. Sur la lipolyse

L'hormone de croissance exerce une action directe sur les cellules adipeuses (graisseuses) d'un organisme en augmentant la lipolyse c'est-à-dire la coupure des liaisons esters des graisses. Une élévation du taux d'acides gras libres non estérifiés est ainsi observée, ceux-ci étant ensuite convertis en énergie grâce aux voies de la bêta-oxydation ou de la cétogénèse (Moller *et al*, 2003). Cette action de la GH se traduit par une diminution de la masse grasseuse du corps. En effet, des personnes déficientes en hormone de croissance, traitées pendant 1 mois avec 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'hormone de croissance recombinante humaine (rhGH) puis 2 mois avec 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de rhGH, voient leur masse grasseuse diminuée de 3 kg (Woodhouse *et al*, 1999). Cependant, la masse corporelle demeure identique car à la perte de masse grasseuse est associée un gain en masse maigre.

4.3.1.2. Sur la glycémie

La GH modifie le métabolisme du glucose de plusieurs manières. Tout d'abord, elle entraîne une diminution de l'utilisation du glucose à des fins énergétiques en favorisant la voie de la lipolyse. Ainsi, elle favorise l'accumulation de glucose sous forme de glycogène dans les cellules (Szeszycki *et al*, 1996). Les dégradations du glucose et du glycogène sont diminuées, ce qui entraîne une élévation du taux sanguin de glucose (Bak *et al*, 1991 ; Mac Gorman *et al*, 1981).

C'est pour cela, que les personnes atteintes d'une déficience en hormone de croissance présentent, au contraire, une hypoglycémie (Wolfsdorf *et al*, 1983). De plus, l'hormone de croissance module également la sécrétion d'insuline. A court terme, l'administration d'hormone de croissance s'accompagne d'une inhibition marquée de l'effet inducteur de l'insuline sur la captation du glucose dans le muscle squelettique. Le taux de glucose plasmatique est ainsi augmenté.

A long terme, la GH entraîne une hyperinsulinémie en parallèle de ses effets sur la dégradation du glycogène et l'inhibition de l'activité de la glycogène synthétase musculaire. L'ensemble des effets de la GH sur le métabolisme glucidique est complexe et dépend d'une part, de la dose et de la durée du traitement et, d'autre part, des caractéristiques génétiques et métaboliques des patients.

4.3.1.3. Sur la synthèse protéique

Depuis une vingtaine d'années, l'effet direct de la GH sur le métabolisme protéique a fait l'objet de nombreuses études (Cameron *et al*, 1988). Au niveau des cellules membranaires, la GH active le transport transmembranaire des acides aminés et ainsi accroît leur disponibilité pour la synthèse protéique (Kyosto, 1968). De plus, la GH exerce également un effet direct sur le système ribosomal, activant la synthèse protéique indépendamment de l'augmentation des concentrations intracellulaires en acides aminés (Ullman et Oldfors, 1989).

4.3.2. Effets indirects via les IGFs

4.3.2.1. Les Insulins Growth Factors (IGFs)

Les IGFs, également appelés somatomédines, sont des polypeptides d'environ 60 AA, sécrétés principalement par le foie mais également par d'autres tissus (pancréas, muscle,...) (D'Ercole *et al*, 1984). Ils jouent un rôle de médiateur indirect de l'hormone de croissance et sont ainsi responsables de certaines des propriétés promoteurs de croissance de la GH (Guler *et al*, 1988). Deux formes d'Insulin like Growth Factor sont présentes dans le plasma et les tissus. La première (IGF-1), régulée par la GH elle-même, est responsable de la plupart de ses effets indirects de croissance. La seconde (IGF-2) est non régulée par la GH et s'avère nettement moins active que l'IGF-1 (Botfields *et al*, 1997). Les IGFs circulent sous formes libres mais également liées à des protéines de transport (BP) formant ainsi des complexes appelés IGFBP (IGFBP-1 à IGFBP-6) qui augmentent le temps de vie des IGFs. Les récepteurs des IGFs sont de deux types, le type 1 qui présente une forte homologie avec le récepteur de l'insuline, et le type 2 qui est structuralement identique au récepteur mannose-6-phosphate.

L'interaction entre le ligand (IGF, IGFBP) et son récepteur permet ainsi d'activer les processus de traduction et transcription dans les cellules cibles.

4.3.2.2. Effets sur la croissance des os et tissus

Grâce à son action indirecte sur la croissance des os et du muscle, l'hormone de croissance est préconisée, en médecine humaine, dans le traitement de certains retards de croissance observés chez des individus atteints de GHD (Déficiency en hormone de croissance). Son action sur la croissance peut être également indirecte via l'intervention de l'IGF-I. Par exemple, dans le cas de personnes souffrant du syndrome de Turner, seul l'utilisation d'IGF-I et non de GH permet de corriger les retards de croissance des patients. De plus, de nombreux travaux de culture cellulaire ont révélés le rôle, sans équivoque, de l'IGF-1 dans la croissance osseuse, la différenciation et prolifération cellulaire (MacRae *et al*, 2007).

4.3.2.3. Effets sur le muscle, la force et la vitesse de cicatrisation

Chez l'homme adulte, déficient en GH et traité à l'hormone de croissance, il est observé une augmentation significative de sa masse corporelle (5 à 11 %) associée à une augmentation de sa masse musculaire et de sa capacité à pratiquer des exercices physiques (Cuneo *et al*, 1991b ; Cuneo *et al*, 1991a). En effet, il a été suggéré que des modifications cardiaques sont responsables de l'augmentation de la capacité à réaliser des exercices physiques. La capacité de contraction du cœur et de la masse du ventricule gauche sont augmentées après un traitement à la GH chez les personnes déficientes en GH (Cuneo *et al*, 1991c). Néanmoins et ce malgré les améliorations observées, les patients déficients en GH et traités à la GH n'ont pas atteint le niveau de performances physiques observé pour les personnes saines de même âge (Jorgensen *et al*, 1991). D'autre part, il a été montré que l'administration de rhGH à des enfants augmentait la vitesse de cicatrisation de brûlures cutanées (Gilpin *et al*, 1994).

Chez le cheval âgé (>20 ans), il a été montré que l'administration de reGH améliorait la musculature des animaux sans pour autant déterminer si cet effet était accompagné d'une augmentation de leur force ou de leur performance physique (Malinowski *et al*, 1997). Des études sur la vitesse de cicatrisation de blessures aux membres des chevaux ont indiqué que l'administration de reGH n'avait pas un impact significatif sur la guérison immédiate de la blessure (Smith *et al*, 1999) mais que la vitesse de guérison était augmentée lorsque les blessures survenaient après l'arrêt du traitement sans pouvoir en apporter une preuve concrète (Dart *et al*, 2002).

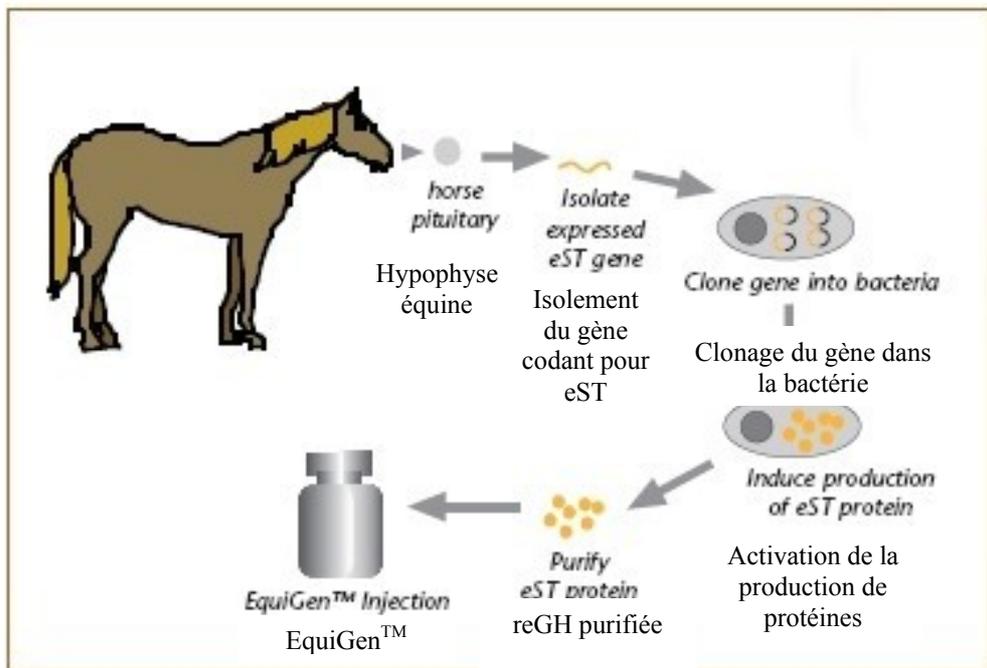


Figure I-8 : Processus d'obtention de l'hormone de croissance équine recombinante (Bailly-Chouriberry, 2007).

5. LES HORMONES RECOMBINANTES ET LEURS UTILISATIONS POTENTIELLES

5.1. Historique

Dès le début des années 50, la synthèse chimique des peptides a été initiée par Bruce Merrifield (Merrifield, 1951). En 1953, Du Vigneaud synthétise pour la première fois un octapeptide possédant l'activité hormonale de l'ocytocine (Du Vigneaud *et al*, 1953). A cette époque, seuls les peptides contenant moins de 20 résidus d'AA peuvent être synthétisés. Devant l'incapacité technique des chimistes à synthétiser des hormones protéiques d'une taille pouvant atteindre 200 AA, l'extraction des protéines d'intérêt à partir d'organes humains ou d'animaux s'est généralisée. Cependant, les problèmes sanitaires liés à la maladie de Creutzfeldt Jacob, en juin 1985, ont encouragés les Etats-Unis et la Grande Bretagne à développer à grande échelle la synthèse d'hormone de croissance humaine recombinante et d'arrêter de distribuer les produits provenant d'hypophyses humaines. De plus, l'intérêt de produire des hormones par des procédés biotechnologiques est de permettre une production massive (100 000 molécules par bactérie).

5.2. Principe général de synthèse des hormones de croissance recombinantes

Quelle que soit l'espèce animale considérée, le principe de synthèse d'une protéine recombinante est le même (Figure I-8). Pour produire massivement une protéine d'intérêt, son ARNm correspondant doit d'abord être isolé, extrait de tissus hypophysaires dans le cas particulier de la GH, puis à l'aide de la transcriptase inverse son ADN complémentaire (ADNc) doit être obtenu. L'ADN double brin obtenu est introduit dans une cellule procaryote comme *Escherichia coli* (George *et al*, 1985) ou eucaryote. Lors de la construction moléculaire du vecteur plasmidique, afin de permettre l'expression dans la bactérie *Escherichia coli* du cadre ouvert de lecture correspondant à l'hormone de croissance mature que l'on souhaite produire, il faut introduire en amont les signaux nécessaires à sa traduction dans une cellule procaryote.

La séquence de l'hormone de croissance débutant par une phénylalanine spécifiée par un codon TTC, il est nécessaire d'ajouter immédiatement en amont un codon de démarrage (initiation) ATG. Il faut également prévoir, une séquence dite de « Shine-Dalgarno », pour permettre la fixation du ribosome et réaliser la traduction de l'ARNm en protéine. L'ajout du codon de démarrage conduit alors à l'insertion d'une méthionine en position N-terminale.

C'est pourquoi, la majorité des hormones de croissance recombinantes possèdent une méthionine en position N-terminale. Il est possible d'éliminer en théorie cette méthionine par la méthionine-aminopeptidase (MAP), naturellement présente dans la bactérie, mais la production en grande quantité de l'hormone recombinante ne permet pas cette hydrolyse. La composition en acides aminés adjacents à la méthionine joue aussi un rôle dans la déméthionylation de la protéine (Hirel *et al*, 1989). De plus, le maintien de cet acide aminé surnuméraire ne nuit aucunement à l'activité biologique de l'hormone puisque la partie N-terminale de la somatotropine n'intervient pas dans la fixation aux récepteurs.

5.3. Utilisation en tant que promoteur de croissance

5.3.1. Propriétés recherchées

5.3.1.1. Augmentation des performances physiques

Dans le milieu sportif, la GH serait utilisée pour plusieurs de ses propriétés. Tout d'abord, l'effet lipolytique de la GH semble être la raison principale de son utilisation comme produit dopant. En effet, le fait de réduire la masse grasseuse sans modifier le poids corporel, peut intéresser certains sportifs comme les bodybuilders chez qui le tissu adipeux sous-cutané est à réduire le plus possible (Desvigne, 2005). La GH est également reconnue pour augmenter la masse musculaire squelettique, accélérer le processus de cicatrisation, améliorer le rendement cardiaque, ce qui exacerberait son utilisation illicite (Szeszycki *et al*, 1996). Cependant, il semblerait que les athlètes tendent à utiliser des mélanges de substances car les stéroïdes anabolisants pourraient avoir un effet synergique avec l'hormone de croissance sur la force musculaire. Par ailleurs, un lien pourrait exister entre le dopage à l'hormone de croissance et la progression du dopage à l'insuline. En effet, l'hormone de croissance stimule la synthèse protéique directement alors que l'insuline est anabolisante en inhibant la dégradation protéique. Une action synergique pourrait ainsi exister entre l'hormone de croissance et l'insuline dans la régulation de la synthèse protéique. Dans le cadre du dopage hippique, l'administration d'hormone équine serait réalisée pour différentes raisons. A l'instar des sportifs humains, le but recherché serait d'augmenter les performances physiques du cheval en augmentant notamment sa masse musculaire. De plus, afin de conserver les performances physiques du cheval le plus longtemps possible, les effets anti-vieillessement et cicatrisant de l'hormone de croissance seraient également très recherchés (Dart *et al*, 1998).

Tableau I-1 : Liste des pays autorisant l'utilisation de rbST

Afrique du Sud	Emirats arabe unis	Malaisie	Turquie
Algérie	Etats-Unis	Mexique	Ukraine
Brésil	Honduras	Namibie	Zimbabwe
Colombie	Inde	Pakistan	
Costa Rica	Jamaïque	Pérou	
Corée	Kenya	Russie	

5.3.1.2. Effets promoteurs de croissance

- Augmentation de la production de lait chez les troupeaux laitiers

Même si une législation interdit l'utilisation de l'hormone de croissance bovine recombinante (rbGH) dans l'Union Européenne, celle-ci est employée dans de nombreux pays afin d'augmenter la production laitière (Chilliard *et al*, 1998).

En effet, le tissu mammaire contient d'abondants récepteurs pour les somatomédines (IGF-1 et IGF-2) ainsi qu'une petite proportion de récepteurs à la somatotropine. On note aujourd'hui qu'environ 1/3 du cheptel laitier américain est traité à la rbST et que ce traitement pourrait augmenter de 3 à 11 kg la quantité de lait par jour et par animal (Nürnberg *et al*, 1998).

- Augmentation de la production de viande (chez le bovin et porc)

La rGH est utilisée, chez les bovins et les porcins, pour améliorer les performances et l'efficacité de production tout en diminuant le taux de gras des viandes produites (McPhee *et al*, 1991). Elle permet également d'augmenter la masse des tissus musculaires de 5 à 20 % ce qui conduit à une augmentation du poids de l'animal conjointement à une diminution de la prise alimentaire de 10 à 20 % (Van der Hel *et al*, 1991; Schally *et al*, 2001).

5.3.2. Réglementation

5.3.2.1. Chez le bovin et porc

L'utilisation de la rGH comme promoteur de la production de lait ou de viande, chez le bovin et le porc, n'est pas autorisée dans les pays de l'Union Européenne conformément aux directives 94/936/CE et 99/879/CE. Cette dernière directive est fondée sur le rapport réalisé par le Comité Scientifique de la Santé et du Bien être des Animaux (CSSBA), adopté le 10 Mars 1999, reconnaissant que la rbST accroît le risque de mammite clinique, augmente les risques d'infection du pied et des membres et les effets néfastes sur la reproduction, et provoque des réactions au niveau du site d'injection. En revanche, l'hormone de croissance bovine est autorisée dans plus d'une vingtaine de pays dont les Etats-Unis (Tableau I-1).

5.3.2.2. Chez l'homme

Suite au décret n° 2003-514 du 12 Juin 2003 (JO n°139 du 18/06/2003, p.10159), l'Agence Mondiale Antidopage (AMA) ou World Anti Doping Agency (www.wada-ama.org) interdit l'utilisation de la hGH dans le but d'améliorer les performances physiques.

5.3.2.3. Chez le cheval

La Fédération Internationale des Autorités Hippiques de Courses (www.horseracingintfed.com) interdit les substances susceptibles d'agir sur un ou plusieurs des systèmes corporels des mammifères suivants : système nerveux, cardio-vasculaire, respiratoire, digestif, urinaire, reproducteur, musculo-squelettique, hémolympatique, immunitaire, endocrinien. Par conséquent et logiquement eu égard à ses propriétés, l'utilisation de l'hormone de croissance équine est strictement interdite.

5.4. Conséquences sur la santé

Les effets secondaires associés à la prise d'hormone sont très fréquents et sont comparables avec ceux retrouvés chez des individus souffrant de GHD (oedème,...). Des doses supraphysiologiques de GH pourraient entraîner l'apparition d'hypertension, de problèmes cardiaques auxquels s'ajoutent des risques de cancer de la prostate ou du sein. De plus, l'ingestion de viande ou de lait provenant d'animaux traités à l'hormone de croissance suscite de nombreuses questions en terme de santé publique. En effet, les pathologies animales associées à la prise de GH, comme les inflammations des membres et mamelles, nécessitent souvent un traitement antibiotique qui pourrait suggérer la présence de résidus antibiotiques dans la viande ou le lait des animaux traités.

6. CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

L'hormone de croissance a été exhaustivement étudiée notamment en ce qui concerne ses mécanismes d'action et ses effets physiologiques potentiellement intéressants en élevage ou dans le domaine sportif. Avec l'émergence des protéines recombinantes à la fin des années 1980, il a été possible de produire de grandes quantités de ces hormones.

La réglementation européenne en ce qui concerne l'utilisation de l'hormone de croissance recombinante pour améliorer la croissance des bovins et des porcs, pour augmenter la production de lait ou pour modifier la masse musculaire des animaux de compétition est très stricte. Il est donc indispensable de mettre en place des outils de détection et de contrôle de la potentielle utilisation de la reGH c'est à dire être en mesure d'assurer la discrimination entre animaux traités et non traités à la rGH.

PARTIE - 2 MISE EN EVIDENCE DE L'UTILISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

L'hormone de croissance est une protéine dont les concentrations physiologiques attendues sont de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le sang et de quelque ng.L^{-1} dans l'urine. L'administration d'hormone de croissance peut être mise en évidence au moyen de techniques de dépistage basées sur le dosage de la protéine d'intérêt ou celui de l'un de ses biomarqueurs secondaires. Ces dosages s'effectuent principalement par immunologie tels que les tests immunoenzymatique (ELISA) ou radioimmunologiques (RIA). Cependant, seules les méthodes de confirmation, basées sur la spectrométrie de masse, permettent d'identifier et de prouver l'utilisation d'hormone de croissance recombinante. La mise en œuvre de tels protocoles nécessite des étapes de purification suffisamment performantes pour permettre une identification avec une bonne spécificité et une grande sensibilité. Une synthèse de la littérature au regard de l'intérêt, l'utilisation et la mise en œuvre de ces méthodes est présentée dans cette partie.

1. MATRICES BIOLOGIQUES D'INTERETS

Les matrices biologiques d'intérêt pour la recherche d'une administration de rGH sont le sang et l'urine en raison de leur facilité de prélèvement ; la connaissance de ces matrices est nécessaire pour la mise au point d'un protocole de purification.

1.1. Le sang

Le sang est un liquide hétérogène composé principalement par des globules rouges, des globules blancs, et des plaquettes. Lorsque le sang est prélevé dans un tube contenant un anticoagulant tel l'héparine, une centrifugation permet d'obtenir deux phases : le plasma et un culot globulaire.

Le plasma est constitué principalement d'eau (90 %) mais également de protéines (albumines et globulines), ions et divers constituants organiques non protéiques.

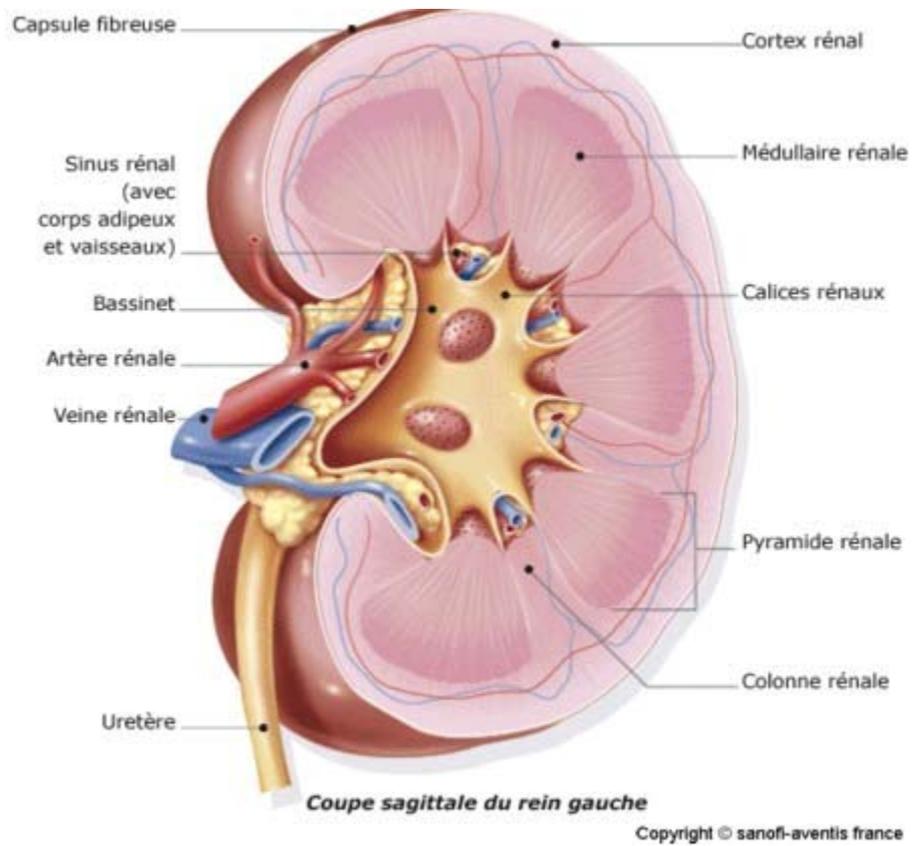


Figure I-9 : Coupe sagittale du rein gauche

1.2. L'urine

L'intérêt principal de cette matrice est lié à son mode de formation. En effet, l'urine provient des reins (Figure I-9) où l'unité fonctionnelle est le néphron dont il en existe environ un million dans le rein humain. La formation de l'urine s'y déroule en trois étapes :

-L'ultrafiltration : dans le glomérule, l'urine primitive est formée par ultrafiltration du plasma. Les pores à travers lesquels passe le plasma ont un diamètre effectif moyen d'environ 2,9 nm. Ceci permet à tous les composants plasmatiques jusqu'à une masse molaire de 5 kDa de passer librement. Pour des valeurs croissantes de masse molaire, les molécules sont retenues, mais seules les molécules de $MM > 68$ kDa ne peuvent plus du tout passer dans l'urine primitive. Les protéines plasmatiques dont la masse est en générale supérieure à 54 kDa ne se retrouvent donc qu'en très faible quantité dans l'urine.

-La réabsorption : l'urine primitive est fortement concentrée grâce à la réabsorption d'eau. Simultanément, d'autres composés de petit poids moléculaire sont réabsorbés par des transports actifs : glucose, acides aminés, ions.

-La sécrétion : les nombreuses molécules, devant être excrétées, sont déversées dans l'urine par des transports actifs : protons, acide urique, créatinine. L'urée synthétisée dans le foie est la forme d'excrétion des protéines et des acides aminés. Sa concentration reflète directement le métabolisme des protéines. L'acide urique est le produit terminal du métabolisme des purines et la créatinine provient du métabolisme musculaire. Des dérivés d'acides aminés libres (hippurate) et des acides aminés modifiés (hydroxyproline) apparaissent également dans les urines. Parmi les autres composants de l'urine, on note des conjugués de l'acide glucuronique, de l'acide sulfurique, la glycine et d'autres composés polaires formés dans le foie par biotransformation. On retrouve les métabolites de plusieurs hormones (catécholamines, stéroïdes, sérotonine).

Ces connaissances montrent ainsi que l'urine est une matrice de choix pour l'excrétion des petites molécules. Elle est par conséquent la matrice d'intérêt de nombreuses études métabolomiques (Fukui *et al*, 2009 ; Feng *et al*, 2009 ; Rijk *et al*, 2009).

L'urine est une matrice très utilisée pour la recherche de différentes familles de résidus chimiques car la plupart de ces substances sont essentiellement métabolisées par le foie puis transformées, par des réactions chimiques, en composés polaires qui sont ainsi éliminés via l'urine (Jiang *et al*, 2004). L'urine présente donc de nombreux avantages dans le domaine du contrôle anti-dopage car :

Tableau I-2 : Composition minérale de l'urine équine.

Minéraux abondants dans l'urine	Formules
Carbonate de calcium	CaCO_3
Oxalate de calcium dihydrate	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Hydrogénophosphate de calcium dihydraté	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Hydroxy-apatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

- elle constitue la voie principale d'élimination de la majorité des substances médicamenteuses,
- elle est liquide et facile à prélever,
- elle offre une fenêtre de détection large pouvant aller jusqu'à plusieurs jours ou semaines pour une majorité de produit,

Les hormones peptidiques telles que l'EPO et l'hormone de croissance s'y trouvent en revanche en faible quantité, car celles-ci sont majoritairement dégradées par voie enzymatique.

Chez le cheval sain, il est important de noter que l'urine est une matrice sursaturée en sels dont les principaux sont présentés dans le Tableau I-2.

1.3. Concentrations physiologiques de l'hormone de croissance

La GH circule dans le sang sous forme libre ou liée aux GHBPs. Les valeurs rapportées dans la littérature concernant la concentration plasmatique en GH libre moyenne pour le cheval (Thompson *et al*, 1992 ; Thompson *et al*, 1994 ; Borromeo *et al*, 2005 ; Borromeo *et al*, 2007), l'homme (Strobl et Thomas, 1994), la vache laitière (Castigliero *et al*, 2006) et le porc (Secchi *et al*, 1999) indiquent que les concentrations circulantes sont en moyenne situées entre 1 et 10 ng.mL⁻¹. Cette gamme de concentration classe l'hormone de croissance parmi les composés se trouvant à l'état de trace dans le plasma.

Chez l'homme, des concentrations, intégrées sur 24 h, de GH urinaire ont été mesurées avec le test ELISA NordiTestTM u-hGH autour de 4 ng.L⁻¹ (Saugy *et al*, 1996). Cette très faible concentration s'explique par le fait qu'il n'y a qu'une infime partie de l'hormone de croissance qui est présente dans l'urine finale après la filtration glomérulaire (Johnson et Maack, 1977 ; Popii et Baumann, 2004). D'autre part, il est rapporté que la GH n'est stable dans l'urine humaine que pendant deux jours à température ambiante ou à 4 °C (Hourd et Edwards, 1994) mais qu'un stockage des échantillons de -20 à -80°C est favorable à la non dégradation de cette protéine pour augmenter le temps de conservation à 12 mois.

2. METHODES DE DEPISTAGE LES PLUS UTILISEES POUR LA DETECTION DE L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

Les méthodes analytiques de dépistage de l'administration de l'hormone de croissance sont basées sur le dosage de l'hormone de croissance (forme native et / ou recombinante) ou sur le suivi de biomarqueurs secondaires tels que les Insulins Growth Factors ou les anticorps anti-hormones de croissance.

2.1. Dosage de l'hormone de croissance

Certaines méthodes de détection de l'hormone de croissance sont basées sur l'utilisation de systèmes biologiques reconnaissant la structure tridimensionnelle de la protéine d'intérêt. Cette reconnaissance de la GH dans le milieu à analyser peut être effectuée soit par un récepteur cellulaire spécifique de la GH (bio-essais) ou par des anticorps spécifiques de la GH (méthodes immunologiques). Dans les deux cas, c'est l'interaction de la GH avec son récepteur ou anticorps spécifique qui est mesurée.

2.1.1. Les bio-essais

Les « bio-essais » sont des méthodes permettant de mesurer la présence de la molécule par son activité intrinsèque c'est-à-dire l'effet qu'elle va générer lors de sa fixation sur son récepteur spécifique. Les premiers dosages par bio-essai ont permis d'évaluer chez le rat, sa croissance, son gain de poids et sa production d'IGF-1 induite par la GH. Cependant, ils sont apparus très vite limitants par leur faible sensibilité, leur manque de spécificité, leur imprécision et leur coût élevé. De plus, ces techniques ne sont pas adaptées au dosage de GH dans le sang ou les urines ce qui réduit encore plus leur utilisation pratique (Sonksen, 2001).

Malgré ces inconvénients, une technique bio-essai, *in vitro* et sensible, basée sur la réponse de cellules lymphatiques (Nb2 Node) avec des hormones lactogènes (Prolactine, GH), a été développée. Dans la continuité de ces travaux, une méthode bio-essai ESTA (Eluted STain Assay system) a permis de mesurer la réponse des cellules Nb2 Node à l'exposition d'hormones lactogènes de manière colorimétrique par réduction d'un sel jaune de tetrazolium (Ishikawa *et al*, 2000).

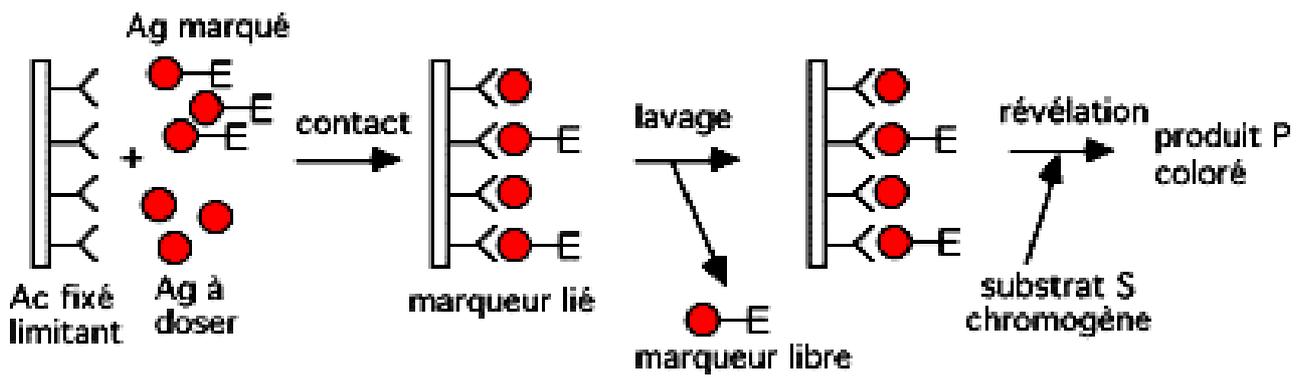


Figure I-10 : Principe du dosage ELISA direct

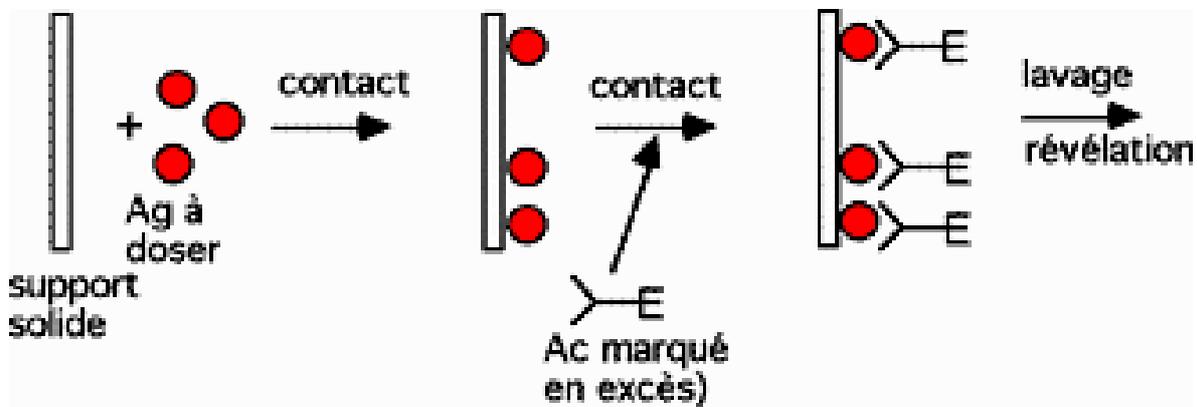


Figure I-11 : Principe du dosage ELISA indirect

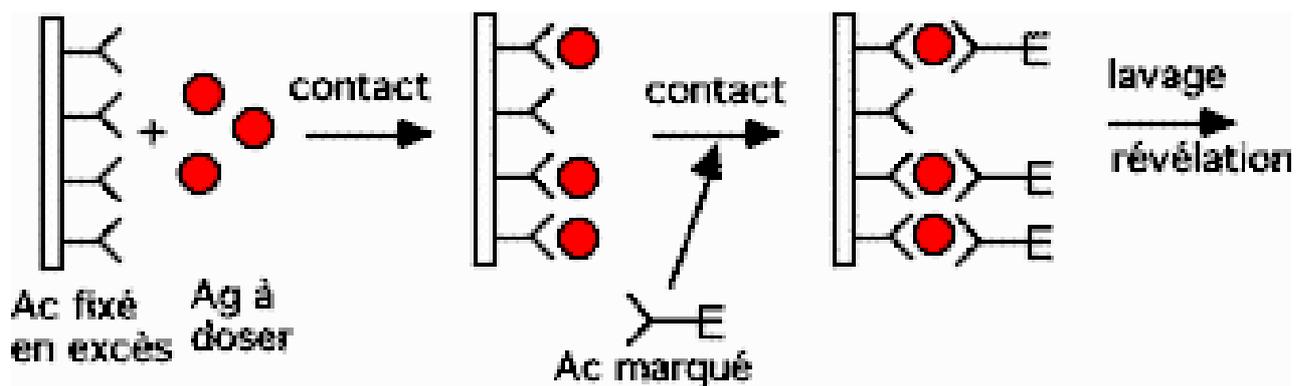


Figure I-12 : Principe du dosage ELISA sandwich

Néanmoins, la précision de réponse de ces tests associée à l'influence du stress et autres facteurs environnementaux ne permet pas de déterminer des concentrations de GH plasmatiques fiables d'où une utilité limitée pour le contrôle anti-dopage.

2.1.2. Les techniques immunologiques et radioimmunologiques

2.1.2.1. Principe

Les méthodes radioimmunologiques de type RIA (RadioimmunoAssay) ou immunoenzymatiques de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) présentent un mode opératoire principal identique qui correspond à une adsorption passive ou à une fixation covalente sur une phase solide d'un anticorps spécifique qui sera exposé à un mélange contenant l'antigène à doser dans l'échantillon (non marqué) et l'antigène marqué (concentration connue). Les molécules d'antigènes marqués et non marqués entrent en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps. La quantité d'antigène marqué qui se fixe est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon à doser. Ce type de dosage par compétition utilise un marquage enzymatique dans le cas de l'ELISA ou de marquage radio-isotopique pour le dosage de la RIA. La Figure I-10, la Figure I-11, et la Figure I-12 représentent schématiquement le principe du dosage ELISA direct, indirect et sandwich.

L'interaction d'un antigène et de son anticorps peut être également mesurée par les techniques dites de résonance plasmonique de surface. Elle consiste à mesurer la liaison d'un « ligand » sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique. Le système de détection est basé sur une variation de l'indice de réflexion de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs. Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface séparant un métal (or, argent...) d'un milieu diélectrique sans pertes (milieu biologique), parallèlement à laquelle elle se propage.

2.1.2.2. Application au dosage de la GH

De nombreuses méthodes ont été développées pour détecter des hormones, protéiques ou non, dans les fluides biologiques. L'hormone de croissance fait partie de ce panel de molécules détectées par ces techniques immunologiques. La sensibilité de ces tests pour la GH peut atteindre 0,5 à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ce qui est compatible avec les concentrations circulantes de GH attendues (Thompson Jr *et al*, 1992 ; Cahill *et al*, 1994 ; Christensen *et al*, 1997 ; Kennedy *et al*, 2002 ; Dart *et al*, 2003). Les techniques ELISA sont également très utilisées dans le dépistage de l'hormone de croissance contenue dans des matrices complexes telles que les tissus, le plasma ou encore le lait.

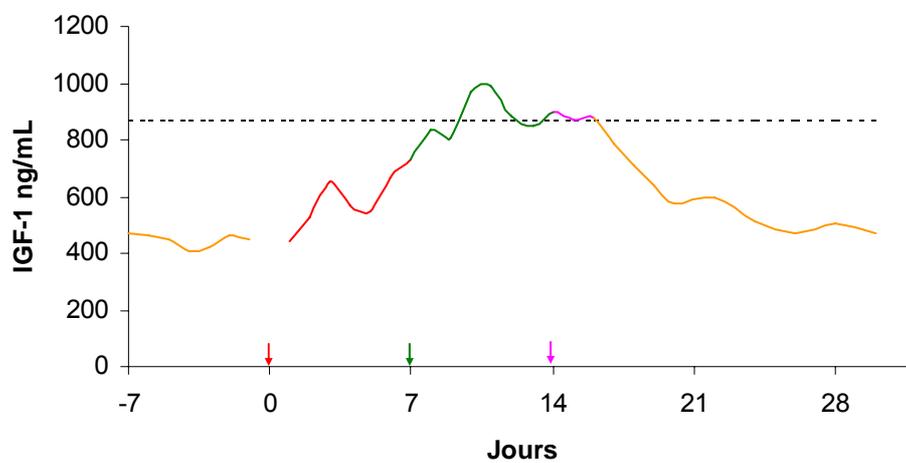


Figure I-13 : Concentrations en IGF-I plasmatiques déterminées par ELISA de J-7 à J+30 pour un cheval traité à la reGH (Bailly-Chouriberry *et al*, 2007) . Les flèches de couleur désignent les posologies de reGH administrées, rouge ($18 \mu\text{g.kg}^{-1}$), vert ($25 \mu\text{g.kg}^{-1}$), et rose ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Le trait en pointillé représente le seuil en IGF-I proposé à 860 ng.mL^{-1} (Bailly-Chouriberry, 2007).

Par exemple, une étude rapide et sensible de détection de l'hormone bovine, dans le sang et le lait, par ELISA, a été mise au point (Zwickl *et al*, 1990). En effet, la durée du dosage est de l'ordre de 4h avec une limite de détection de 0,2 ng.mL⁻¹ dans le lait et de 2 ng.mL⁻¹ dans le sang.

La technologie dite de SPR-BIA (Surface Plasmon Resonance-Biosensor ImmunoAssay) a quant à elle pu permettre le dépistage d'hormones de croissance dans des seringues suspectées d'être utilisées frauduleusement chez le bovin (Heutmekers *et al*, 2007).

Même si ces méthodes sont sensibles, l'ensemble de ces méthodes ne permet pas de différencier l'hormone de croissance naturelle des hormones de croissance recombinantes.

2.2. Dosage des marqueurs biologiques de l'administration de rGH

Des marqueurs secondaires de la GH ont été mis en évidence et utilisés comme stratégie de dépistage. Il s'agit le plus souvent des composants de l'axe somatotrope tel l'IGF-I dont la concentration est sous le contrôle de la GH. D'autres marqueurs ont été étudiés, comme la production d'anticorps anti-GH consécutive à un traitement à la GH ou bien des marqueurs de croissance de l'os.

2.2.1 L'IGF-I

Pendant un traitement à l'hormone de croissance, il a été observé chez l'homme, la vache laitière ou le cheval, une augmentation progressive de la concentration en IGF-I plasmatique (Popot *et al*, 2001 ; Noble *et al*, 2007).

Les IGFs humaines, bovines et équine étant identiques en séquence, les kits ELISA ou RIA utilisés par les laboratoires des courses hippiques sont d'origine humaine et validés chez le cheval. Au Laboratoire des Courses Hippiques Français (LCH), le kit ELISA est utilisé en routine pour déterminer les concentrations en IGF-I plasmatique. Chez le cheval, un seuil plasmatique de concentration en IGF-I a été défini et proposé à 860 ng.mL⁻¹ (Popot *et al*, 2002) au-delà duquel l'animal est suspecté d'avoir reçu de l'hormone de croissance. La Figure I-13 représente les concentrations en IGF-I plasmatique obtenues par ELISA pour un cheval traité à la reGH pendant 14 jours (Bailly-Chouriberry, 2007). Cette courbe montre une augmentation progressive des valeurs de concentration en IGF-I pour atteindre un maximum à J₊₁₁ (987 ng.mL⁻¹). Ces résultats démontrent ainsi que la reGH a un impact sur la physiologie des chevaux en augmentant la concentration en IGF-I d'où son intérêt dans le contrôle anti-dopage pour suspecter une administration de reGH entre 9 et 15 jours après le début d'un traitement.

La plupart des dosages d'IGF-I, par RIA, sont réalisés dans le but de contrôler leur teneur dans le lait (Burton *et al*, 1994). Comme observé sur la Figure I-13 pour l'espèce équine, les vaches laitières traitées à la rbST voient leurs teneurs en IGF-I augmentées (Schams *et al*, 1998 ; Wallace *et al*, 1999).

2.2.2 Les IGF Binding Protein (IGFBP)

Les IGFBPs sont des protéines comprenant environ 280 acides aminés. Chez l'homme, la circulation des IGF-I dans l'organisme est associée à au moins 6 protéines de transport, c'est pourquoi lorsque les concentrations en IGF-I augmentent, les taux circulants d'IGFBP-3 augmentent simultanément. Parmi cette famille, l'IGF-BP3 est quantitativement la plus importante. Elle s'associe aux IGFs pour former un complexe de haut poids moléculaire qui diminue leur élimination. Ainsi, la demi-vie de l'IGF-I dans ce complexe est de l'ordre de 15 à 20 heures au lieu de 20 minutes lorsqu'ils sont libres. La plupart des dosages de l'IGF-BP3 sont effectués par RIA (Girard *et al*, 1987 ; Albini *et al*, 1988).

2.2.3 Les anticorps anti-hormones de croissance

La production spécifique d'anticorps dirigés contre l'hormone de croissance, lorsque celle-ci est administrée au cours d'un traitement, est très documentée. Chez l'humain, il a été montré à de nombreuses reprises que le traitement à l'hormone de croissance pouvait induire la production d'anticorps spécifiques (Prader *et al*, 1964 ; Frasier et Smith, 1966).

Chez le cheval, avant la mise sur le marché de l'hormone de croissance équine recombinante, une recherche d'anticorps, consécutive à un traitement à l'hGH et à la bGH avait été réalisée par RIA et avait permis une détection d'anticorps à partir de 40 jours (Bonnaire *et al*, 1998) avec une plus forte immunisation signalée avec l'hormone humaine que l'hormone bovine. Les travaux de Bailly-Chouriberry (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008a) ont permis pour la première fois la mise en évidence de la production d'anticorps anti-reGH consécutive à un traitement à l'hormone de croissance équine recombinante. Cette mise en évidence peut être expliquée par la présence de la méthionine surnuméraire en position N-terminale mais surtout par la présence de séquences immunoréactives de l'hormone de croissance déjà rapportées dans la littérature (Mollerach-Gobbi *et al*, 1990). Les résultats obtenus grâce au moyen d'un test ELISA ont permis de ramener le délai de détection des anticorps anti-GH chez le cheval obtenu par Bonnaire (Bonnaire *et al*, 1998) de 40 jours à 9 jours après administration de rGH.

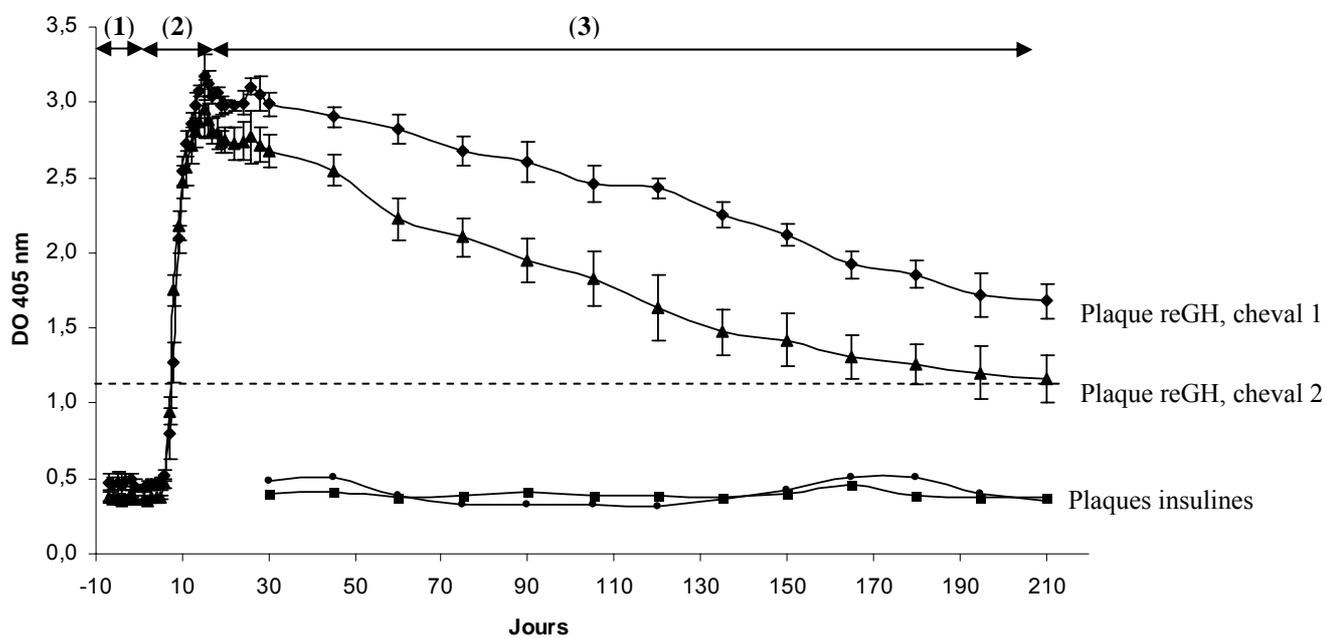


Figure I-14 : Cinétiques de production des anticorps anti-reGH obtenues à partir des échantillons sériques J₇ à J₊₂₁₀ (chevaux 1 et 2) mesurée par ELISA à 405 nm sur des plaques revêtues de reGH et sur une plaque revêtue d'insuline porcine (mesure des interactions non spécifiques). La valeur seuil est présentée en pointillés (Bailly-Chouriberry, 2007).

De surcroît, cette méthode a montré qu'elle pouvait permettre une détection des anticorps anti-reGH chez le cheval pendant 80 jours après le début du traitement, ceci avec une bonne répétabilité et spécificité. Elle est depuis utilisée comme moyen de dépistage d'un traitement à la reGH au Laboratoire des Courses Hippiques Français. La Figure I-14 illustre les cinétiques de production des anticorps contenus dans le sérum pour deux chevaux traités à la reGH. Trois phases peuvent être distinguées. La première correspond aux échantillons collectés avant (J_{-7} à J_{-1}) et au début du traitement (J_{+1} à J_{+7}) dans lesquels aucun anticorps anti-reGH n'est détecté. La seconde, très rapide, de J_{+8} à J_{+16} (pendant le traitement) est associée à une production exponentielle d'anticorps anti-reGH. La troisième de J_{+17} (fin du traitement) à la fin de la collecte (J_{+210}) correspond à l'étape de catabolisme de ces anticorps ainsi qu'à leur probable élimination dans des complexes communs. Cette Figure révèle l'intérêt de cette technique dans le contrôle anti-dopage en offrant une fenêtre de détection de la fraude de près de 200 jours soit 6 mois.

3. METHODES DE CONFIRMATION

3.1. Identification de la rGH

Après la réalisation d'une analyse de dépistage, les échantillons qui présentent des taux anormalement élevés en GH et/ou marqueurs doivent classiquement faire l'objet d'une seconde analyse afin de rechercher spécifiquement l'hormone de croissance recombinante. La forte homologie des séquences en acides aminés des GHs naturelles et recombinantes rend difficile la différenciation de ces deux hormones d'où la nécessité de mettre au point des techniques hautement spécifiques.

3.1.1. *Distinction entre la forme native et recombinante*

Les hormones recombinantes équine produites par l'industrie pharmaceutique ont une composition très proche en acides aminés par rapport à la forme endogène. Chez le cheval, l'hormone recombinante EquiGenTM se différencie de la forme endogène par une méthionine additionnelle soit une augmentation de la masse molaire de $150 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Une analyse qualitative de la composition en acides aminés des formes natives et recombinantes peut alors permettre une différenciation des deux hormones. Des stratégies analytiques de détection et d'identification, permettant la discrimination entre les formes endogènes et recombinantes de plusieurs hormones de croissance dans des matrices biologiques, sont présentées dans ce paragraphe.

Tableau I-3 : Conditions LC-MS pour l'analyse des peptides de la GH bovine et équine

	Le Breton <i>et al</i>	Bailly-Chouriberry <i>et al</i>	Dougherty <i>et al</i>	Chang <i>et al</i>
Nature rGH	Bovine	Equine	Bovine	Bovine
Colonne	Interchrom ModuloCart QS Uptisphere C18 (2.0 * 150 mm, 3 µm)	Modulo-Cart QK Uptisphere C4 (2 * 250 mm, 3 µm)	Rexchrom C8 (4,6 mm * 250 mm, 5 µm)	Zorbax SB 300 C8 (4,6 *1 50mm, 5 µm)
Appareillage HPLC	Agilent 1200	Agilent 1100	Hewlett Packard 1090 M	Waters 600 MS
Conditions HPLC				
<i>Débit</i>	0,3 mL/min	0,3 mL/min	1,5 mL/min	1 mL/min
<i>Phase mobile</i>	H ₂ O et ACN + 0,1% acide formique	H ₂ O et ACN + 0,2% acide formique	H ₂ O + 0,1% de TFA et 70 %ACN+0,085% TFA	H ₂ O et ACN+0,1% TFA
Appareillage SM	Analyseur triple quadripole (Agilent 6410, Etats-Unis)	Trappe (LTQ XL, Thermo Scientific, Etats-Unis)	Analyseur triple quadripole (TSQ Quantum Ultra, Thermo Scientific, Etats-Unis)	Analyseur simple quadripole (Sciex, Canada)
Conditions SM	Tension capillaire=4.5kV, Tension de cone= 40 V, Température source= 300°C Nebuliseur= 55 psi Débit de gaz= 13 L.min ⁻¹	Tension capillaire=4.5kV, Tension de cone= 40 V, Température du capillaire chauffé= 270°C	Tension capillaire=3.5kV, Tension de cone= 35 V, Température source= 150°C;	Tension capillaire= 5kV, Tension de cone= 85 V,
Acquisition SM	[M+H] ⁺ =1825 [M+2H] ²⁺ = 913 Mode MRM 913.2→ 1047.7 913.2→ 774.1 609.3→ 774	[M+H] ⁺ = 1865, [M+2H] ⁺ = 933 Mode SRM 933.3→ 933.3 933.3→ 794.0 933.3→1288.7	Mode SCAN	Mode SCAN [110 et 1200] [1000-2100]

3.1.2. Digestion enzymatique suivie d'une analyse par spectrométrie de masse

3.1.2.1 Hydrolyse enzymatique

La digestion enzymatique d'une protéine a pour avantage de fournir des coupures spécifiques et répétables. Une analyse rigoureuse des peptides générés donne une information sur leurs séquences en acides aminés et permet d'obtenir des informations précises sur la protéine mère dont ils sont issus.

Cette approche qui consiste à analyser les peptides de la GH, et en particulier les fragments N-terminaux qui permettent de discriminer les formes natives et recombinantes, s'apparente au « peptide mapping ». De nombreuses enzymes protéolytiques peuvent être utilisées pour la digestion enzymatique. La plus utilisée est la trypsine qui hydrolyse la liaison peptidique avec une spécificité au niveau de l'arginine et de la lysine ; l'hydrolyse se fait du côté C-terminal. Une autre enzyme fréquemment employée est la chymotrypsine, elle est spécifique des acides aminés de type aromatique : la tyrosine, la phénylalanine, et le tryptophane.

Divers protocoles sont utilisés, celui de Bailly-Chouriberry (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008b) consiste à réaliser un tampon EPAB (EDTA-Pepstatine A-Ammonium Bicarbonate) pH 7,8-7,9 contenant 10 mM d'EDTA, 1 μ M de Pepstatine A et 50 mM de bicarbonate d'ammonium. Les échantillons devant subir la digestion enzymatique sont repris par 120 μ L d'EPAB et 20 μ L d'acétonitrile avant d'être déposés en insert de vial HPLC ; 10 μ L de trypsine « sequence grade » à 200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ sont alors ajoutés et l'hydrolyse enzymatique est réalisée pendant 15 à 20 heures à 37°C.

2.2.1.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est utilisée afin de caractériser les peptides issus de la digestion enzymatique. La discrimination se base sur les séquences peptidiques de l'extrémité N-terminale qui sont différentes selon la nature de l'hormone de croissance.

• LC-ESI-MS-MS

Les peptides générés par la digestion enzymatique peuvent être analysés par différentes techniques de couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse (Dougherty *et al*, 1990 ; Chang *et al*, 1997 ; Le Breton *et al*, 2010 ; Bailly-Chouriberry *et al*, 2008b). Celles-ci sont répertoriées dans le Tableau I-3.

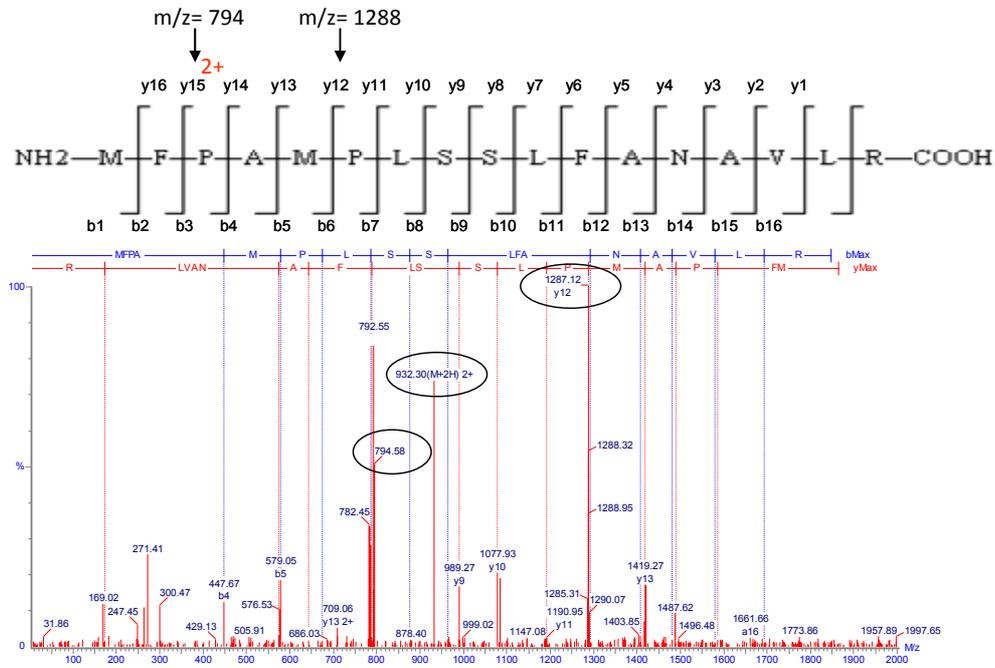


Figure I-15 : Spectre de masse représentant le peptide N-terminal reGH (m/z 933.5) et ses ions d'intérêts (m/z 794 et 1288)

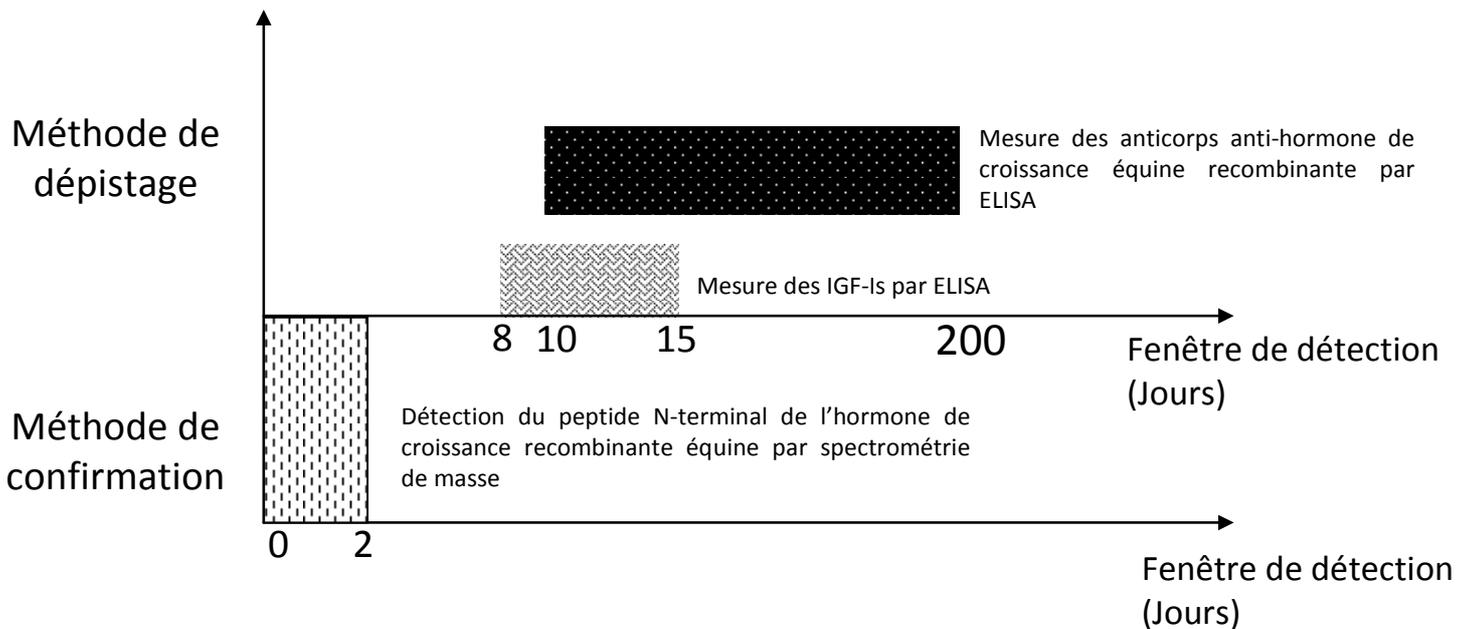


Figure I-16 : Schéma représentant les fenêtres de détection de trois techniques d'analyse utilisées pour le contrôle anti-dopage équin

Chez le cheval, trois transitions spécifiques sont choisies pour identifier l'hormone de croissance recombinante équine : 933,3>933,3 ; 933,3>794,0 et 933,3>1288,7. La Figure I-15 représente le spectre de masse du peptide N-terminal ($m/z=933,5$) et des ions d'intérêts ($m/z=794,0$; $m/z=1288,7$).

- Nano LC-MS-MS

Les peptides peuvent également être séparés par nano-chromatographie liquide. La séparation chromatographique, utilisée par Heutmekers (Heutmekers *et al*, 2007) est réalisée grâce à une colonne analytique Biosphere C18 20 cm * 50 μm * 3 μm (NanoSeparations, Niewkoop, the Netherlands) avec une pompe Agilent (Palo Alto, CA, USA, model 1100). Le spectromètre de masse utilisé est un Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA).

- MalDI-TOF MS

Les peptides produits après la digestion enzymatique peuvent également être analysés directement par MALDI-TOF-MS. La matrice utilisée, pour l'analyse de hGH, est de la CHCA (α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid) diluée dans de l'acétonitrile. A l'instar des techniques précédentes, la discrimination est réalisée grâce à l'identification du peptide N-terminal.

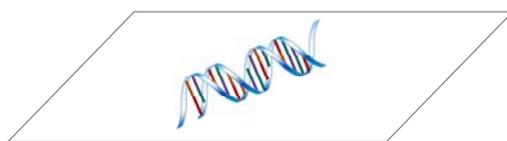
4. CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

Les méthodes de dépistage de l'administration de l'hormone de croissance et de ses biomarqueurs secondaires dans les fluides biologiques (plasma, sérum et urine) sont basées principalement sur des méthodes immunologiques de type RIA ou ELISA. Les formes endogènes et recombinantes ne peuvent cependant pas être différenciées.

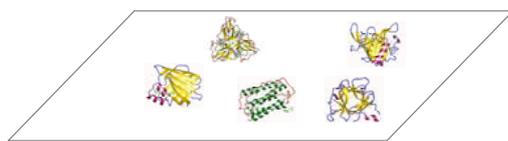
La confirmation de la présence de rGH est basée sur l'étude de ses peptides par spectrométrie de masse. Le peptide N-terminal, obtenu après hydrolyse enzymatique, est spécifique de l'hormone de croissance recombinante étudiée et permet ainsi une différenciation avec la forme native. Les performances des techniques de contrôle anti-dopage visant à détecter une administration d'hormone de croissance équine recombinante chez le cheval sont résumées sur la Figure I-16. Les fenêtres de détection montrent qu'il existe un laps de temps (entre 2 et 8 jours) ou le contrôle de l'administration de l'hormone de croissance est difficile.

Dans un contexte de dépistage plus général et pour tenter de pallier les lacunes des méthodes actuelles, des stratégies émergentes s'orientent vers la mise en évidence d'un effet biologique de la molécule d'intérêt. De telles stratégies sont basées sur l'étude des empreintes biologiques notamment grâce aux techniques « omiques » telles que la transcriptomique ou la métabolomique pour tenter de révéler une discrimination non ambiguë entre une population d'animaux témoins et traités.

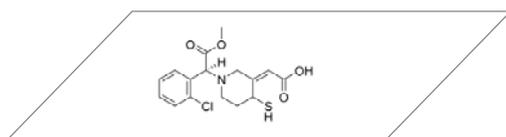
Les différents niveaux d'organisation



Génomique



Protéomique



Métabolomique

Profils biologiques

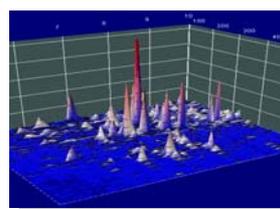
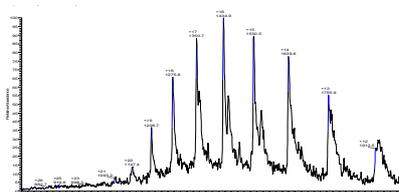
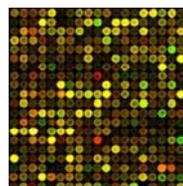


Figure I-17 : Différents niveaux d'organisation des techniques « omiques »

PARTIE - 3 LA METABOLOMIQUE EN TANT QUE NOUVEL OUTIL DE DEPISTAGE

1. LES DIFFERENTES APPROCHES OMIQUES

Les avancées technologiques réalisées en biologie moléculaire ont permis d'aboutir au séquençage complet des génomes d'individus procaryotiques (Sumner *et al*, 2003) et eucaryotiques. Un des enjeux majeurs est de relier les gènes identifiés aux fonctions physiologiques d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme. Les domaines d'étude se sont alors diversifiés (Figure I-17) et étendus à celui :

- des ARN messagers avec l'étude du transcriptome,
- des protéines avec l'étude du protéome,
- des métabolites avec l'étude du métabolome.

Ces études ont toutes pour but commun de répondre aux nombreuses questions qui subsistent à propos des fonctions et des mécanismes de régulation de l'expression des gènes.

1.1. Analyses génomiques

Le terme génome désigne l'ensemble des gènes de l'organisme (McKusick, 1997). Un gène est une unité d'hérédité contrôlant un caractère particulier et correspond à un segment d'ADN situé à un endroit particulier du chromosome. La structure originale de l'ADN est formée de deux brins (ou chaînes) enroulés en hélice. Ces chaînes sont constituées par des enchaînements de nucléotides : adénosine, guanosine, cytidine, et thymidine. Les nucléotides sont formés d'un groupe phosphate lié à un sucre, le désoxyribose, et à une base azotée ((A) : Adénine, (G) Guanine, (T) Thymidine, (C) Cytosine dont l'enchaînement détermine le contenu de l'information génétique. Cette information est à la base de nombreux aspects de la santé humaine et la connaissance des fonctions des gènes et des mécanismes régulant leur expression peut avoir un profond impact en matière de recherche biomédicale (recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, thérapie génique,...). Les premières études du génome ont été initiées dans le but de séquencer, d'annoter et de cartographier l'ensemble du génome humain. A l'heure actuelle, le génome de nombreux organismes a déjà été séquencé.

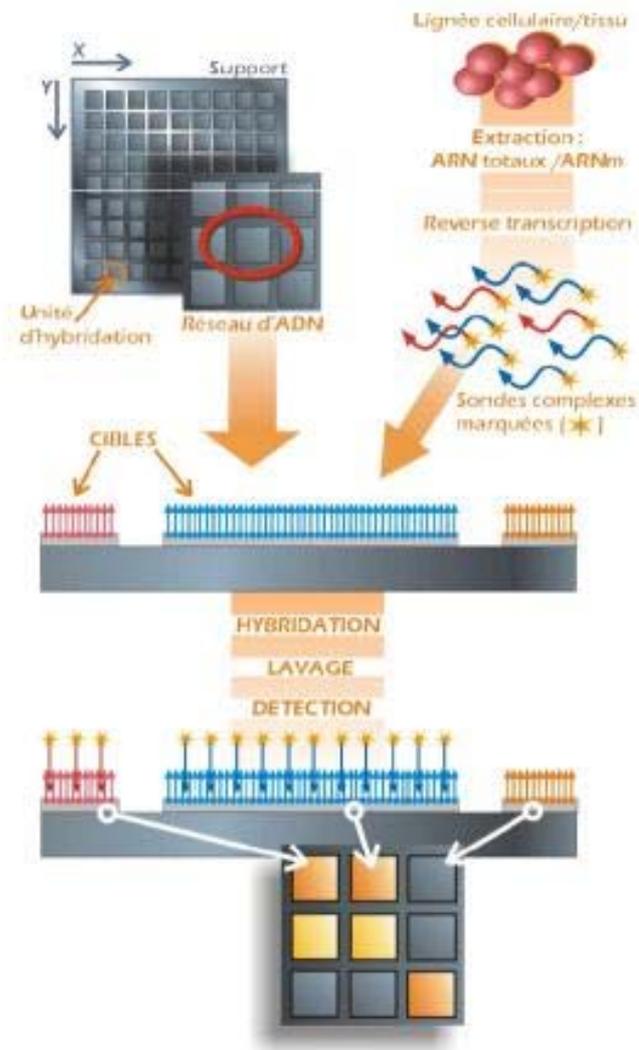


Figure I-18 : Principe de fonctionnement d'une puce à ADN

Cependant, l'expression des gènes est un processus multi étapes qui nécessite pour son étude la mise en place d'autres approches permettant d'envisager l'intégralité des systèmes biologiques. Ces différentes étapes de l'expression génique sont soumises à des mécanismes fins de régulation impliquant des protéines ou des métabolites.

Des études ont été menées au Laboratoire des Courses Hippiques Français en collaboration avec une plate-forme de l'INRA de Toulouse dans le but d'identifier de manière exhaustive l'ensemble des gènes impliqués dans un traitement à l'hormone de croissance recombinante équine chez le cheval. Pour sélectionner les gènes qui interviennent dans un traitement à la reGH, deux catégories d'outils : le SAGE, qui permet une analyse sérielle des gènes, ainsi que la PCR en temps réel, qui permet d'obtenir un très haut débit en terme d'individus validés, ont été évalués (Piquemal, 2009). Ces travaux ont aboutis à la sélection de 8 gènes permettant de suspecter l'administration d'hormone de croissance.

1.2. Etudes transcriptomiques

L'étude du transcriptome est l'une des premières approches à avoir été développée pour l'étude de la fonction des gènes (Lockhart et Winzeler, 2000). La transcriptomique peut être définie comme l'étude des ARNm (Acides ribonucléiques messagers) présents dans un milieu biologique donné. Ils représentent ainsi les gènes qui ont été transcrits. Bien que les ARNm ne constituent qu'une étape intermédiaire de l'expression des gènes, leur nature et leur abondance permet d'obtenir des informations sur la fonction des gènes. Contrairement au génome, le transcriptome évolue au cours du temps.

Les méthodes d'analyse fondées sur les puces à ADN sont à l'heure actuelle les plus utilisées (Lockhart *et al*, 1996). Le fonctionnement des puces à ADN est le suivant (Figure I-18): de courtes séquences d'ADN sont tout d'abord fixées sur un support dont la surface est miniaturisée. Les ARN totaux sont ensuite extraits des cellules dont on veut comparer l'expression des gènes. Ils sont ensuite purifiés puis transformés en ADN complémentaires (ADNc) par une technique de rétrotranscription et marqués par un colorant. Lors du dépôt sur le support, un ADNc étalon est alors ajouté aux ADNc préalablement préparés. Chaque point de la puce ou « spot » est ensuite scanné. Une valeur d'intensité, normalisée par rapport à l'ADN étalon, est alors attribuée.

Cette technique a été évaluée pour la mise en évidence d'administration de substances anabolisantes (Bailly-Chouriberry *et al*, 2010 ; Piquemal, 2008 ; Piquemal, 2009) telles que les hormones peptidiques (Piquemal, 2008).

Ainsi, le Laboratoire des Courses Hippiques Français s'est récemment équipé d'une plate-forme de biologie moléculaire capable de mesurer la quantité d'ARN messager extraite des cellules sanguines et provenant de l'expression de gènes cibles mis en évidence lors d'un traitement à l'hormone de croissance (annexe protocole de l'analyse transcriptomique visant à dépister une administration de GH) et à l'érythropoéitine (Bailly-Chouriberry, 2010).

1.3. Etudes protéomiques

Par analogie aux termes de génome et de transcriptome, le terme protéome (Kahn, 1995) fait référence à l'ensemble des protéines qui sont exprimées dans un échantillon biologique (cellule, tissu, organe). Si l'étude du transcriptome se limite à l'étude des ARN transcrits, la protéomique s'intéresse quant à elle au niveau où s'exprime le rôle final des gènes sur le fonctionnement cellulaire et le métabolisme.

L'étude du protéome implique en général deux étapes : la séparation puis l'identification des protéines. La séparation des protéines contenues dans un échantillon biologique peut être réalisée par chromatographie ou électrophorèse 2D. L'électrophorèse 2D permet de séparer les protéines en fonction de leur masse et de leur point isoélectrique. L'identification quant à elle est réalisée par spectrométrie de masse et interrogation des banques de données. En raison de leur sensibilité et de leur rapidité, les techniques fondées sur la spectrométrie de masse sont très utilisées pour l'identification des protéines.

Une étude protéomique basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été récemment menée dans le but de mettre en évidence une administration d'hormone de croissance recombinante humaine (Kay et Creaser, 2010). L'étude est fondée sur l'analyse d'échantillons de sérum collectés à la fois chez des individus traités à l'hormone de croissance et avec un placebo. Les résultats sont prometteurs car ils permettent de montrer la possibilité de discriminer les deux groupes d'études grâce au suivi et à la quantification d'une dizaine de protéines dont la Leucine-riche α -2-glycoprotéine (LRG), identifiée par des banques de données. La méthode nécessite néanmoins d'être validée sur un plus grand nombre d'individus pour pouvoir être utilisée comme un outil de dépistage.

Si l'étude du protéome permet de suivre les modifications du profil de l'expression des protéines, elle ne permet pas d'avoir accès aux informations concernant leur activité biologique. La compréhension des systèmes biologiques dans leur intégrité nécessite l'intégration des données issues du transcriptome, du protéome mais également des informations concernant l'activité des protéines et leur implication dans le métabolisme cellulaire, d'où la nécessité de s'intéresser également aux métabolites.

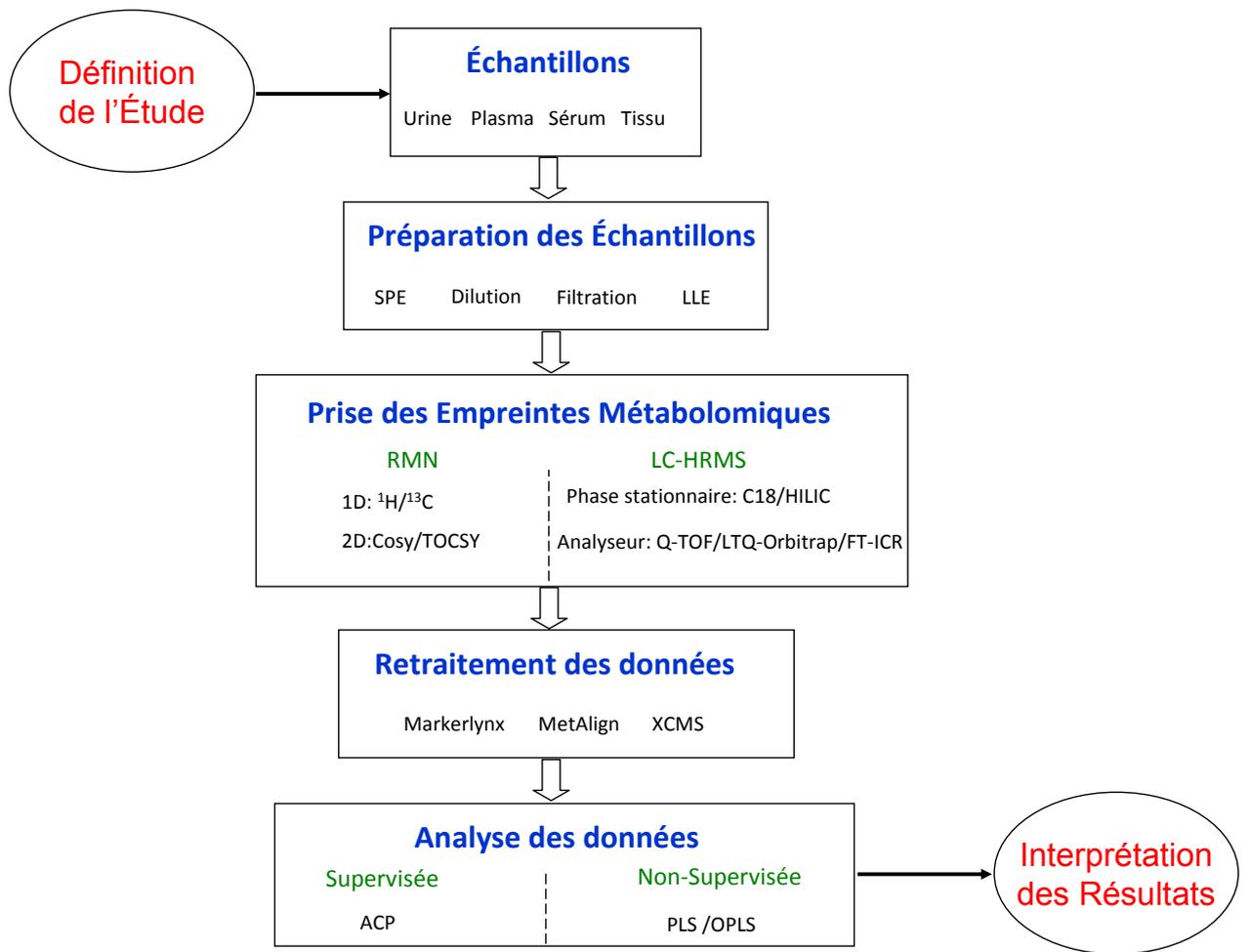


Figure I-19 : Schématisation de la stratégie analytique la plus fréquemment utilisée pour une approche non ciblée de type métabolomique

1.4. La métabolomique

La métabolomique fait référence à la totalité des métabolites présents dans un milieu biologique donné ; elle est donc caractéristique d'un état physiologique donné (Nicholson *et al*, 2002). Les métabolites peuvent être définis comme des composés impliqués dans les processus métaboliques, qu'ils en soient les produits ou nécessaires à leur déroulement (Dettmer et Hammock, 2004). Le terme métabolite inclu par conséquent toutes les molécules de faible masse moléculaire telles que les acides organiques, les sucres, les acides aminés mais aussi certains peptides ou vitamines. Le métabolome représente ainsi l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, une maladie, une exposition toxique ou encore un traitement (Keun *et al*, 2004). Il permet d'obtenir ainsi une vue globale du métabolisme cellulaire et de comprendre les relations et les régulations qui existent entre les différents niveaux de l'expression des gènes.

2. ANALYSE DU METABOLOME

2.1. Différents niveaux d'étude

En raison de la grande diversité des métabolites présents dans les milieux biologiques, l'étude du métabolome peut être effectuée à des niveaux de complexité différents selon les objectifs de l'étude. On distingue deux grands types d'analyse :

-l'analyse globale : ce premier niveau d'étude a pour but de fournir des informations de nature chimométrique susceptibles de permettre la classification d'échantillons biologiques en fonction de leur nature ou de leur origine. Il s'agit de réaliser une analyse comparative des profils métabolomiques de différents échantillons permettant d'identifier les variations métaboliques qui peuvent être à l'origine des différences de phénotype de ces échantillons. L'objectif est de caractériser des composés endogènes ou marqueurs biologiques qui varieraient au-delà du domaine de leurs valeurs physiologiques normales en comparant les empreintes métaboliques de l'individu à ceux de la population de référence à l'aide d'outils d'analyse statistique appropriés. Cette classification a nécessité le développement de méthodes d'analyse statistique multivariée permettant l'extraction des paramètres responsables des différences entre les différents échantillons (Figure I-19).

-l'analyse ciblée : ce deuxième niveau d'étude consiste à analyser un ou plusieurs métabolites prédéfinis (intermédiaires d'une voie métabolique, métabolites de la même famille,...). Il nécessite, par conséquent, la mise en œuvre de protocoles d'extraction et de préparation spécifiques de l'échantillon.

2.2. Méthodes d'analyse

La diversité structurale des métabolites empêche de couvrir l'ensemble du métabolome avec une seule technique. De plus, le type d'information diffère en fonction des techniques d'analyse utilisées. De façon générale, les principales méthodes d'analyse utilisées sont la Résonance Magnétique Nucléaire, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou encore la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

2.2.1. *La RMN*

La RMN est l'une des premières méthodes à avoir été appliquée avec succès à l'étude du métabolome (Nicholson *et al*, 1989, Holmes *et al*, 1998).

Cette méthode est basée sur l'existence de transitions entre les deux états énergétiques des noyaux atomiques ayant un moment magnétique non nul (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ...) qui existent lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. La RMN présente de nombreux avantages : elle est non destructive, rapide, simple à mettre en œuvre, robuste et génère des spectres riches en informations structurales dont les signaux subissent peu de décalage au cours de l'ensemble de l'analyse. Cependant, c'est une méthode d'analyse peu sensible qui nécessite une grande quantité d'échantillon. De plus, la présence universelle d'hydrogène dans les biomolécules, peut rendre l'attribution des signaux délicate pour la RMN du proton (^1H RMN). En effet, les spectres de RMN obtenus lors de l'analyse de biofluides contiennent des résonances de centaines de métabolites, dont un certain nombre se recouvre formant des multiplets indiscernables. Une deuxième dimension de RMN (Dumas *et al*, 2002) ou des méthodes chromatographiques peuvent être couplées à la RMN ^1H . La première preuve du concept de la réalisation des empreintes métaboliques pour mettre en évidence des situations de perturbations métaboliques dans le domaine du dopage chez l'animal de rente a été initiée par l'étude de l'effet des β -agonistes chez des veaux par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton et analyses discriminantes (Vogels *et al*, 1996).

2.2.2 *Les méthodes fondées sur la spectrométrie de masse*

Fondamentalement, un spectromètre de masse est composé des éléments suivants : un système d'introduction de la substance à analyser, une source pour ioniser cette substance, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les différents ions produits, un détecteur pour compter les ions, et un système de traitement des données fournissant le spectre de masse.

Un spectromètre de masse repose sur des sources d'ionisation ou de désorption ionisation sous vide ou à pression atmosphérique. Seules les sources les plus utilisées pour des applications métabolomiques sont présentées ci-dessous.

2.2.2.1 Les sources d'ionisation

- Impact électronique (Bleakney, 1929 ; Nier, 1947)

Cette source inventée par Dempster reste couramment utilisée en spectrométrie de masse. Elle est constituée d'un filament chauffé qui émet des électrons. Ceux-ci sont accélérés vers une anode à l'aide d'une différence de potentiel et entrent en interaction avec les molécules gazeuses de l'échantillon analysé introduit dans la source.

Lorsque l'énergie cinétique des électrons se situe entre 10 et 100 eV, les ions formés résultent alors de l'arrachement d'un électron à la molécule M :



L'ion M^+ est appelé ion moléculaire. Etant donné que l'énergie d'ionisation d'une molécule se situe entre 8 et 10 eV, les électrons d'énergie cinétique supérieure à cette valeur, pourront communiquer aux ions moléculaires une énergie interne qui provoquera leur dissociation :



- L'ionisation chimique (Harrison *et al*, 1983)

L'ionisation chimique consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires présents dans la source. Les ions primaires sont eux-mêmes produits par impact entre des électrons et un gaz réactif créant un plasma d'ionisation. Les ions de la substance à analyser se forment par réaction chimique avec les ions de ce plasma, donnant lieu à des réactions de transfert de protons, d'abstraction d'hydrure, d'addition, de transfert de charge.

- Les sources Electrospray (ESI : ElectroSpray Ionisation)

Cette technique développée par Fenn (Fenn *et al*, 1989) est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit.

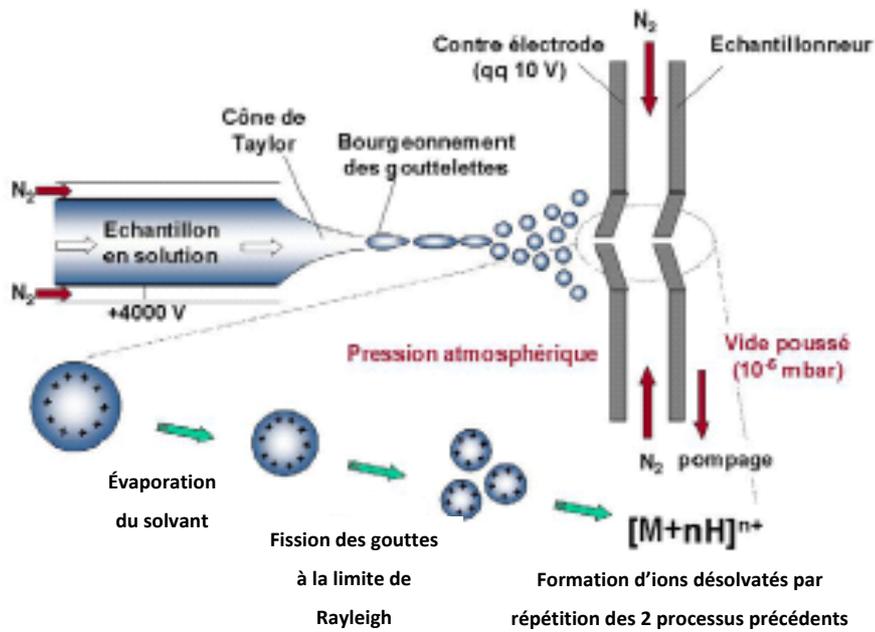


Figure I-20 : Schéma d'une source electrospray

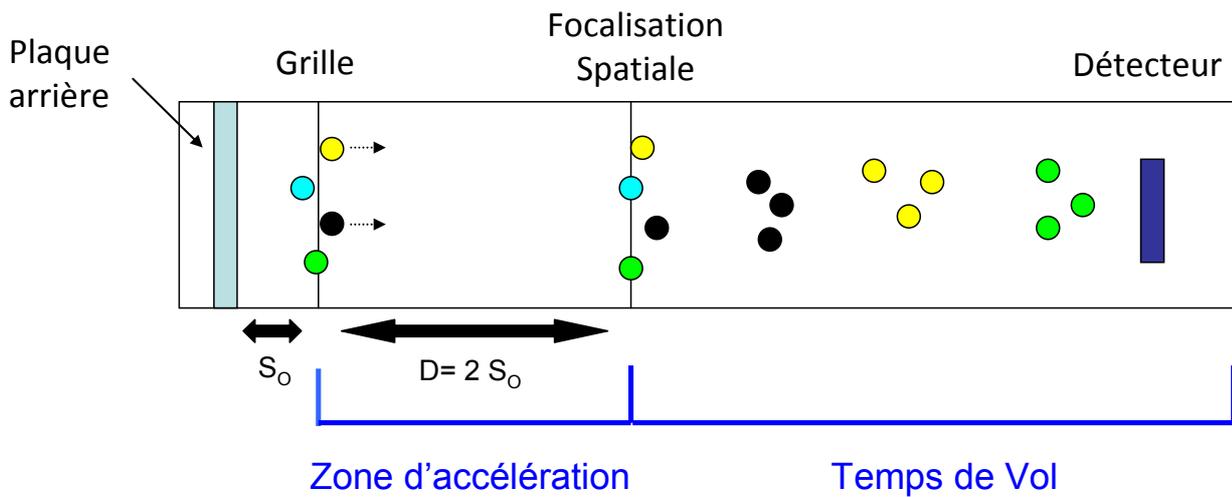


Figure I-21 : Principe du fonctionnement d'un analyseur à temps de vol

Ce champ électrique provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide qui se rompt pour former des gouttelettes fortement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes provoque leur réduction jusqu'au moment où les forces coulombiennes approchent les forces de cohésion et provoquent leur explosion (Figure I-20). Les gouttelettes deviennent alors de plus en plus petites jusqu'à provoquer la désorption des ions. Les ions produits sont ainsi accélérés vers l'analyseur et les molécules non chargées sont éliminées. Cette technique d'ionisation est la plus utilisée dans les études métabolomiques en raison de sa compatibilité avec la chromatographie liquide.

2.2.2.2 Les analyseurs haute-résolution

La nécessité d'identifier rapidement et formellement les métabolites d'intérêt biologique implique le recours à des analyseurs dits de haute résolution.

- Analyseur temps de vol

Le principe de l'analyseur à temps de vol, désigné TOF pour Time Of Flight, a été décrit en 1946 par Stephens (Stephens, 1946). Les ions sont accélérés vers le tube à temps de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Les particules ayant toutes la même énergie cinétique passent ensuite dans le tube de vol où elles sont séparées en fonction de leur vitesse acquise (Figure I-21). Les vitesses sont inversement proportionnelles à la racine carrée de leurs rapports m/z . Les ions plus légers de grande vitesse arrivent au détecteur plus rapidement que les ions lourds de plus faible vitesse. Afin d'accroître la résolution en masse des analyseurs à temps de vol, des améliorations ont été mises au point telles que l'utilisation d'un miroir ou d'un réflecteur électrostatique qui permet la focalisation des ions de même rapport m/z .

Les analyseurs hybrides de type Q-TOF (Quadrupole-Temps de Vol) sont apparus en 1995 (Figure I-22). Ils peuvent être considérés comme un triple quadripôle dans lequel le troisième quadripôle est remplacé par un analyseur à temps de vol. Ces analyseurs présentent de nombreux avantages tels que leur sensibilité et leur important pouvoir de résolution en masse ($m/\Delta m > 10000$ pour une masse de 1000 Daltons).

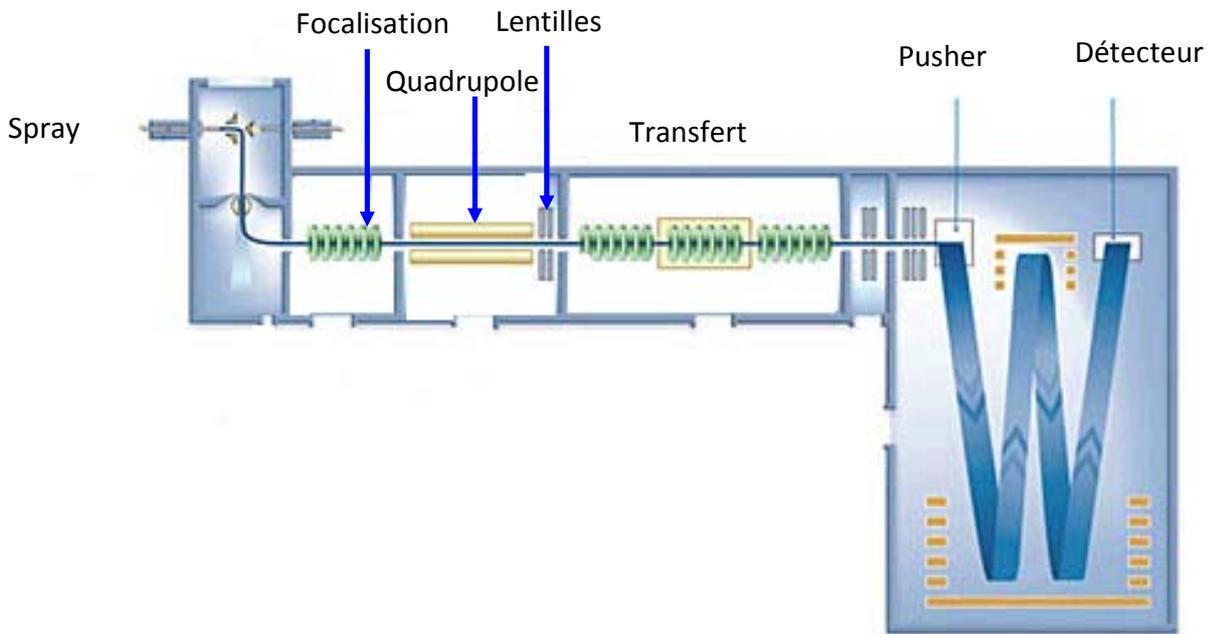


Figure I-22 : Principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse hybride quadrupôle-time of flight (Q-TOF)

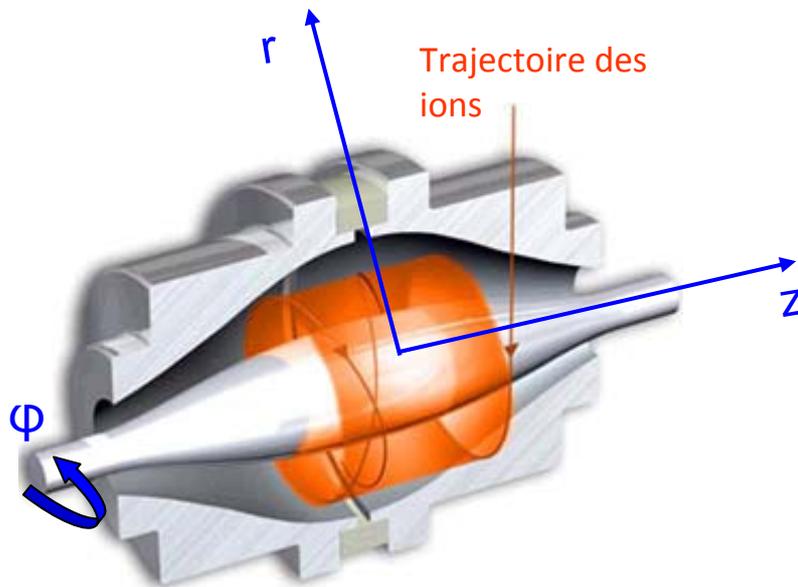


Figure I-23 : Trajectoire des ions dans la trappe orbitale caractérisée par la fréquence de rotation ω_ϕ , la fréquence d'oscillation radiale ω_r et la fréquence d'oscillation axiale ω_z .

- Le piège électrostatique ou Orbitrap™

Le principe de l'Orbitrap™ fut décrit en premier par Alexander Makarov (Makarov, 2000). L'Orbitrap™ est constitué de deux électrodes, la première est centrale et possède la forme d'un fuseau, la deuxième est extérieure et possède la forme d'un tonneau coupé en deux parties égales séparées par un espace étroit (Figure I-23). Les ions sont injectés tangentiellement par l'interstice séparant les deux moitiés de l'électrode externe. Les ions sont injectés à une énergie cinétique de quelques keV et se mettent à osciller suivant des spirales entremêlées autour de l'électrode centrale sous l'effet des tensions continues et de la géométrie du piège. Le passage des ions génère alors un courant induit sur lequel sera appliquée une transformée de Fourier afin de le convertir en signal m/z (Figure I-24).

L'Orbitrap™ a été couplé par la société Thermo Fisher avec un piège à ions pour former un spectromètre hybride, le LTQ-Orbitrap™. Cet hybride permet ainsi de faire de la MS^n , les ions produits étant analysés avec la même résolution que l'ion parent.

- Le FT-ICR

Le spectromètre de masse FT-ICR repose sur le principe du cyclotron où le piégeage des ions sur une trajectoire circulaire dans un champ magnétique crée un puit de pseudo potentiel. La fréquence résultante du mouvement de l'ion dépend du rapport m/z de l'ion et de la valeur du champ magnétique. Ce dernier leur impose un mouvement cyclotronique selon une fréquence inversement proportionnelle à la valeur du rapport m/z des ions. Une transformée de Fourier permet de convertir les différentes fréquences enregistrées en un spectre de rapport m/z (Figure I-25). Si ce n'est le prix très élevé de ces appareils, les spectromètres de masse FT-ICR présentent un certain nombre d'avantages (Brown *et al*, 2005) : ils sont notamment en mesure de fournir des déterminations de masse avec une précision suffisante (< 1 ppm) pour obtenir la composition élémentaire d'une molécule. La résolution obtenue sur ce type d'appareil peut atteindre 1 000 000 ce qui s'avère particulièrement adapté à l'analyse de mélanges complexes. Des expériences de fragmentations MS^n peuvent être réalisées avec une précision en masse conservée pour les ions fragments.

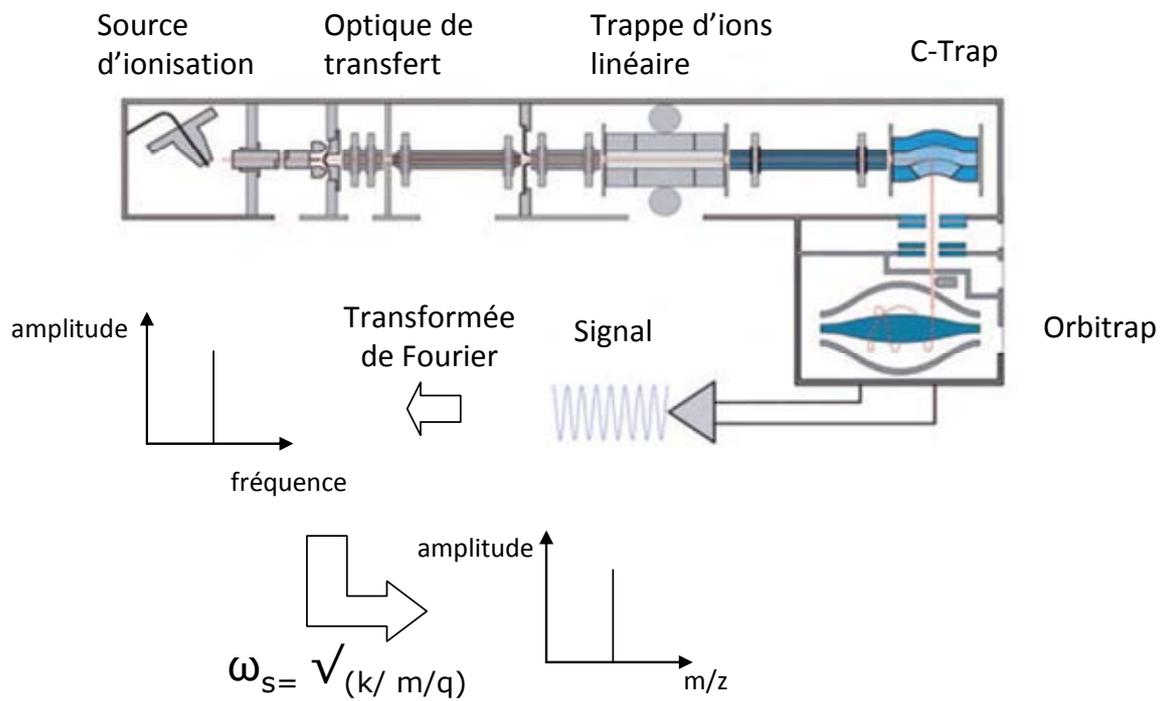


Figure I-24 : Principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap™

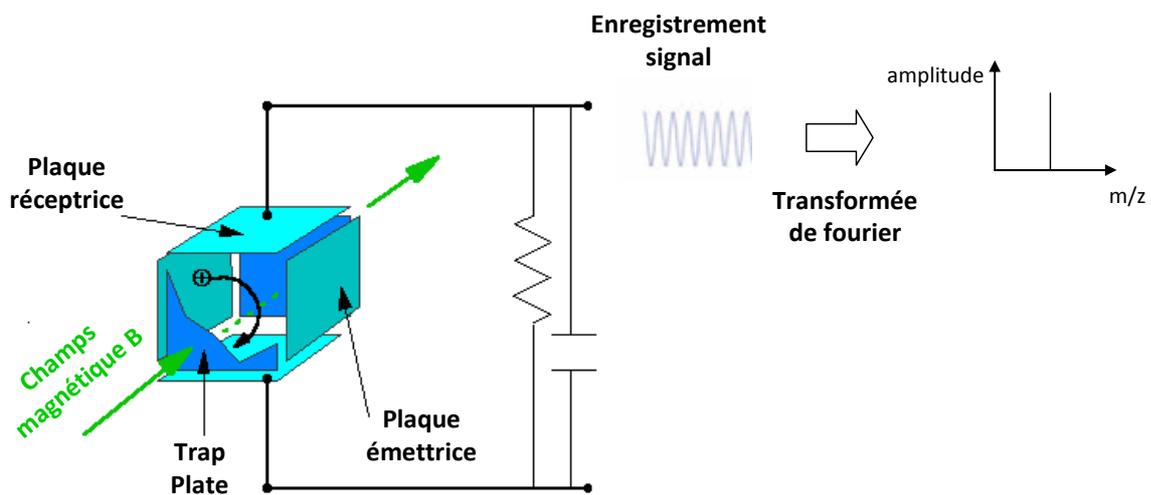


Figure I-25 : Principe de fonctionnement du FT-ICR

2.2.2.3 Couplages en chromatographie

• GC-MS

Développée dans les années 1960, la chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les différents composés en fonction de leur affinité entre une phase mobile (gaz) et une phase stationnaire. Elle est historiquement la méthode de séparation la plus utilisée dans le cadre des applications métabolomiques (Fiehn, 2007 ; Tian *et al*, 2008 ; Zhang *et al*, 2007). Son intérêt principal est sa sensibilité et sa robustesse (Huang *et al*, 2009). De plus, l'existence de bases de données regroupant les spectres de plus de 100 000 composés (comme celle du National Institute of Standards and Technology (NIST) par exemple) permet l'obtention d'informations structurales directes facilitant l'identification des métabolites. Cependant la GC-MS, nécessite une étape de modification chimique pour les composés polaires et peu volatiles ce qui tend à compliquer l'analyse des données acquises.

• LC-MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est devenue une méthode de choix pour l'analyse du métabolome. Contrairement à la GC-MS, la LC-MS présente l'avantage d'être directement compatible à l'analyse de composés non volatiles. Les méthodes les plus employées se concentrent sur les composés apolaires qui sont retenus sur les colonnes à polarité de phase inverse du type C18 (Wilson *et al*, 2005 ; Ducruix *et al*, 2008).

Afin d'éviter l'élution des molécules polaires dans le volume mort, de plus en plus de phases inverses sont modifiées par le greffage de groupements amines, carboxyles ou hydroxyles.

En parallèle, de nouvelles phases stationnaires telles que l'HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) se sont développées pour favoriser la rétention des molécules polaires (Idborg *et al*, 2005 ; Tolstikov *et al*, 2002).

Les analyses métabolomiques tendent de plus en plus à utiliser des systèmes UPLC (UltraHigh Performance Liquid Chromatography). Ce type de chromatographie est fondé sur l'utilisation de colonne dont les diamètres de particules sont inférieurs à 2 μm (Wang *et al*, 2009). La diminution du diamètre des particules entraîne une plus grande capacité de pics (nombre de pics par unité de temps), une meilleure résolution et une augmentation de la sensibilité. Ces systèmes permettent de réduire la durée des analyses tout en conservant la résolution obtenue avec des colonnes classiques.

Tableau I-4 : Exemples de logiciels commerciaux utilisés pour le retraitement des données métabolomiques

Name	Vendor	Features	Main application field and examples
BlueFuse	BlueGnome, Cambridge, UK	Filtering, peak detection, and alignment. Univariate and multivariate methods for data analysis	Metabolomics with MS and NMR data
Chenomx NMR Suite	Chenomx, Edmonton, Canada	Data conversion, analyzing spectra to compounds and concentrations	Metabolomics with NMR data
Genedata Expressionist	Genedata, Basel, Switzerland	Filtering, peak extraction, <i>m/z</i> and retention time alignment. Metabolite identification using third-party databases. Includes also analysis and interpretation modules and integrated database	Cross-omics platform for transcriptomics, proteomics and metabolomics. Metabolomics module works with MS data
LineUp	Infometrix	Alignment of chromatographic data. Alignment can be used also for spectroscopic data	Chromatographic alignment
MarkerLynx	Waters, Milford, MA, USA	Peak detection and alignment. Principal component analysis (PCA)	Metabolomics with LC-MS data
MarkerView	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	Peak detection and alignment. PCA and <i>t</i> -test methods for data analysis. Visualization and reporting	Metabolomics with LC-MS data
MassHunter Profiling software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Feature extraction and alignment	Proteomics with LC-MS data
Metabolic Profiler	Bruker Daltonic & Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA	Bucket raw data into retention time, <i>m/z</i> table with intensities. Identification using libraries. PCA for data analysis	Metabolomics with MS and NMR
metAlign	PlanResearch International B.V., Wageningen, The Netherlands	Filtering, baseline correction, peak detection, alignment	Broad, LC-MS and GC-MS data
MS Resolver	Pattern Recognition Systems, Bergen, Norway	Resolve multicomponent data from multidetection instrumentation into individual contributions	Broad, LC-MS and GC-MS data
Profile	Phenomenome Discoveries, Saskatoon, Canada	File conversion, peak detection and alignment. Tools for statistical analysis and data mining	Metabolomics with MS data
Rosetta Elucidator	Rosetta Biosoftware, Seattle, WA, USA	Peak detection and alignment, statistical analysis and visualization	Proteomics with LC-MS data
Sieve	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Direct comparison approach to comparing multiple LC-MS datasets. Uses ChromAlign for chromatographic alignment	Proteomics with LC-MS data

2.2.3 Traitement et analyse des données

Toutes les approches métabolomiques reposent sur l'utilisation de l'informatique aussi bien au niveau de l'acquisition, du stockage, que de l'analyse d'une grande quantité de données.

2.2.3.1 Traitement des données

Les empreintes métabolomiques obtenues en LC-MS génèrent un nombre important de données pour chaque échantillon. Elles sont rendues encore plus complexes par une quantité importante de bruit de fond, d'artefacts et de redondance dans les données. Un traitement de ces données afin d'extraire l'ensemble de l'information utile est donc nécessaire.

Le traitement des données s'effectue principalement par l'utilisation de logiciels commerciaux (Tableau I-4) ou open source (Tableau I-5). Ils ont pour but d'éliminer le bruit de fond, de détecter les pics par la mise en œuvre d'algorithmes, et d'aligner les pics entre les différents échantillons analysés.

Parmi les logiciels les plus utilisés, on peut citer Markerlynx (Waters) qui permet la détection des pics et l'alignement des données à l'aide de standards internes prédéfinis. XCMS (Scripps Research Institute ; Smith *et al*, 2006) est un logiciel téléchargeable gratuitement et largement utilisé pour les études métabolomiques en raison de sa rapidité, simplicité et efficacité. Par défaut, il divise les données en fenêtres de 0.1 m/z pour la détection des pics et utilise un alignement linéaire ou polynomial pour la correction des temps de rétention. Le retraitement des données permet de générer une liste des ions extraits qui sont ensuite traités individuellement.

D'autres logiciels tels que MetAlign (Plant Research International B.V ; Tikunov *et al*, 2005), MarkerView (applied biosystems/MDS Sciex) ou MZmine (Katajamaa *et al*, 2005) sont fréquemment utilisés pour la détection des pics et l'alignement des chromatogrammes.

Cette liste est non exhaustive, elle cite les logiciels les plus utilisés et ne tient pas en compte les logiciels propres à chaque laboratoire pouvant effectuer des analyses métabolomiques.

Tableau I-5 : Exemples de logiciels « open-source » utilisés pour le retraitement des données métabolomiques

Name	Features	Main application field and examples	License type	Platform
Chrompare	Comparison of chromatographic peak lists and raw chromatograms, automatic and manual normalization	Metabolomics with GC-FID data	License type unknown, available for download	Microsoft Excel Visual Basic
COMSPARI	Visualization to aid searching for differences between pair of runs	Metabolomics with LC-MS and GC-MS data	GNU General Public License	Implemented in C, for any recent platform including Linux and Windows Toolbox for Matlab
Continuous profile models	Alignment and normalization of time series data	Proteomics with LC-MS data	Free for educational and research use, source code available	
HiRes	Processing and analysis spectral data	Metabolomics with NMR data	Free for research and clinical purposes	Implemented in C++, for Windows platform
LCMSWARP	Retention time alignment and feature clustering	Proteomics with LC-MS and LC-MS/MS data	Unknown	Implemented in C++
MapQuant	Noise filtering, peak detection and visualization.	Proteomics with LC-MS data	Harvard University open-source compatible license	Implemented in C, for Windows and Linux platforms
MathDAMP	Direct comparison of raw data sets without peak picking. Includes methods for preprocessing (binning, baseline subtraction, smoothing) and normalization	Metabolomics with LC-MS, GC-MS and CE-MS data	Free	Package to Mathematica
MET-IDEA	Extracts ion intensity data for listed ion/retention time values from multiple runs	Metabolomics with LC-MS, GC-MS and CE-MS data	Freely available to academic users upon request	Windows, .NET platform
MSFACTS	Alignment and comparison of raw chromatograms or peak lists generated with a third-party software	Metabolomics with GC-MS and LC-MS data	Freely available upon request for academic and non-commercial use	Implemented in Java
MSight	Visualization and visual analysis and comparison of multiple runs	Proteomics with LC-MS data	Free of charge	Windows platform
msInspect	Peak detection, alignment, normalization and visualization	Proteomics with LC-MS data	Free software available under Apache 2.0 License	Implemented in Java. Requires R statistical language
MZmine	Noise filtering, peak detection, alignment, normalization and visualization. Distributed computing	Metabolomics with LC-MS and GC-MS data	GNU General Public License	Implemented in Java
SpecArray	Noise filtering, centroiding, peak detection, alignment and visualization	Proteomics with LC-MS data	GNU General Public License	Implemented in C, for Linux platform
SuperHirn (Mueller, submitted)	Peak detection, alignment and normalization. Includes also analysis capabilities	Proteomics with LC-MS data	Not yet available	Implemented in C++, for Unix platforms
Xalign	Peak detection, alignment between samples and quality control	Proteomics with LC-MS data	Available upon request from the author	Implemented in C++
XCMS	Noise filtering, peak detection and alignment	Metabolomics with LC-MS and GC-MS data	GNU General Public License	Implemented in R statistical language

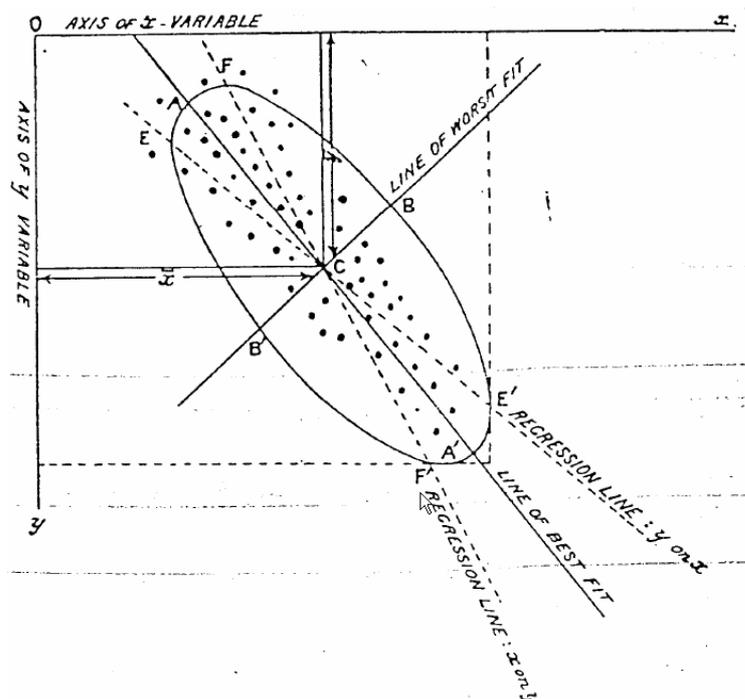


Figure I-26 : Extrait de l'article de Pearson de 1901 : la recherche de la « droite du meilleur ajustement »

2.2.3.2 Analyses des données : analyses statistiques multivariées

Identiquement aux études du transcriptome et du protéome, la métabolomique repose sur l'analyse différentielle d'empreintes. La difficulté est de gérer et de comparer ces empreintes qui contiennent de nombreux signaux correspondant à plusieurs centaines voire milliers de métabolites. Il est difficile de comparer visuellement ces données d'autant plus que le nombre d'échantillons est important. Les analyses statistiques multivariées sont alors utilisées afin d'étudier ou de décrire un ensemble de données. Elles permettent de synthétiser et de visualiser rapidement une grande quantité d'informations, ceci en projetant les données initiales dans un espace de dimensions réduites ce qui permet une visualisation aisée des données. Les analyses statistiques multivariées peuvent être divisées en deux groupes :

- Les analyses descriptives ou non supervisées qui ne nécessitent pas d'information « a priori » sur la nature des échantillons. Leur but est de décrire des données et de visualiser la répartition des échantillons. L'analyse en composante principale (ACP) est la plus représentative de ce groupe (Pearson, 1901 ; Hotelling, 1933). Pearson utilise ces corrélations pour décrire et résumer l'information contenue dans des variables (Figure I-26).

- Les analyses statistiques explicatives ou supervisées qui visent à expliquer une réponse (variable qualitative Y). Parmi ces méthodes, les régressions PLS (Partial Least Square ; Wold et Joreskog, 1982) présentent l'avantage d'être insensibles aux multicollinéarités c'est-à-dire à la présence de variables très corrélées. Ceci est particulièrement intéressant pour les études menées en spectrométrie de masse où les rapports m/z des fragments issus d'un même ion sont très corrélés.

Ces méthodes peuvent être utilisées dans un but prédictif. Un jeu de données initiales est utilisé pour construire un modèle explicatif, ce modèle est ensuite appliqué à un nouveau jeu de données qui pourront alors être classées.

Dans le cadre d'approches métabolomiques, les données sont organisées sous forme de matrices. Chaque individu est décrit par un certain nombre de variables quantitatives X, et parfois par des variables qualitatives Y.

Ainsi les colonnes des matrices sont constituées de variables X et parfois Y. Les lignes qui constituent les matrices correspondent aux individus. Dans le cas des études métabolomiques fondées sur la spectrométrie de masse, les données X correspondent aux rapports m/z des ions détectés. Les variables Y correspondent à la classe de l'échantillon.

Tableau I-6 : Présentation de bases de données disponibles sur Internet

	Site
<i>Beilstein</i>	www.beilstein.com
<i>Chemfinder</i>	http://chemfinder.cambridgesoft.com/
<i>Scifinder</i>	http://www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR/index.html
<i>NIST</i>	www.nist.gov/srd/nist1a.html
<i>Metlin</i>	http://metlin.scripps.edu
<i>Biocyc</i>	http://biocyc.org/
<i>Human metabolome database</i>	http://www.hmdb.ca
<i>Kegg</i>	www.genome.jp/kegg/

2.2.3.3 Problématique de l'identification des variables

Une fois les métabolites d'intérêt isolés, il faut les identifier afin de leur donner une signification biologique. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode universelle permettant à elle seule l'identification structurale des métabolites en particulier si aucun composé de référence n'existe. L'association de la RMN et de la spectrométrie de masse permet la mise en place d'hypothèses structurales. En parallèle, les bases de données permettent de sélectionner les composés les plus cohérents avec les données obtenues expérimentalement. Des bases de données accessibles au domaine public ont été développées. Un certain nombre d'entre-elles sont listées dans le Tableau I-6. En plus de lister une série de composés, elles donnent accès à des spectres de masse obtenus dans des conditions spécifiques. Or, les bibliothèques de spectres de masse en LC-MS étant la plupart du temps dépendant de l'instrument, la comparaison de ces spectres de masse avec les données obtenues est compliquée voire impossible. L'expertise dans le domaine de l'interprétation reste donc indispensable.

2.2.4 Domaines d'application

Sur le plan applicatif, de telles approches ont été d'ores et déjà employées avec succès dans le domaine clinique (Kind *et al*, 2007 ; Lewis *et al*, 2008), par exemple dans le contexte du marquage de pathologie ou de toxicité (Holmes *et al*, 1998 ; Robertson *et al*, 2005 ; Anti *et al*, 2004 ; Lei *et al*, 2008) ou encore de la nutrition (Rezzi *et al*, 2007).

La preuve de concept dans le domaine du dopage chez l'animal de rente a été apportée puisqu'il a en effet été possible de montrer que l'analyse des disruptions métaboliques peut faire émerger des ensembles de biomarqueur métabolique. Cette approche a été initiée par l'étude de l'effet des β -agonistes chez les veaux par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton et analyses discriminantes (Vogels *et al*, 1996). Dumas (Dumas *et al*, 2002) a pu également interpréter une réponse anabolisante, grâce à l'utilisation de la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire et la mise au point d'outils d'analyse, chez des veaux suite à l'injection de stéroïdes. Plus récemment, d'autres études métabolomiques fondées sur la spectrométrie de masse ont montré la possibilité de discriminer, grâce à l'analyse d'échantillons urinaires, des animaux traités avec différents anabolisants : le clenbutérol (Courant *et al*, 2009) ; la nandrolone et l'œstradiol (Pinel *et al*, 2010), ou encore l'androstenedione (Anizan *et al*, 2010).

3. CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE

Le développement d'approches globales telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique permet de caractériser les variations d'expression des gènes, des ARN, des protéines et des métabolites. Plus précisément ces métabolites, endogènes ou exogènes, peuvent être des peptides, des acides aminés, des acides nucléiques, des sucres, des acides organiques, des vitamines, des polyphénols, des alcaloïdes ou tout autre molécule qui peut être ingérée, utilisée ou synthétisée par une cellule ou un organisme donné.

La métabolomique, également connue sous le nom de métabonomique ou profilage métabonomique, n'est devenue envisageable que grâce aux progrès récents dans les domaines de la séparation et identification des biomolécules ainsi que dans les analyses statistiques des données générées. Ces technologies, dont les avancées récentes ont rendu possible la mise en œuvre des stratégies de profilage métabolomique, sont la spectrométrie de masse haute résolution, la résonance magnétique nucléaire, et des méthodes de chromatographie liquide à ultra haute performance qui assurent une séparation rapide et fine des molécules.

Il y a encore quelques années, les travaux en métabolomique étaient destinés principalement à des applications cliniques ou pharmaceutiques telles que la recherche de nouveaux médicaments, ou encore l'analyse toxicologique. Mais, la métabolomique commence à s'étendre à d'autres champs d'application tels que la nutrition ou le contrôle anti-dopage avec un double objectif qui est de pouvoir discriminer les populations étudiées et trouver de nouveaux biomarqueurs associés à la problématique donnée .

CHAPITRE - II

MATERIEL ET METHODES



Figure II-1 : Flacon d'EquiGen-5[®] contenant l'hormone de croissance équine recombinante (solution à 5 mg/mL)

PARTIE - 1 MATERIEL BIOLOGIQUE

Deux différentes expérimentations animales ont été conduites: la première, réalisée au centre expérimental de Coye la Forêt rattaché à la Fédération Nationale des Courses Hippiques, la seconde à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). L'expérimentation menée à Coye la Forêt porte sur l'étude de deux animaux contrairement à celle de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse qui repose sur une population plus conséquente constituée de 13 animaux. Ces deux expérimentations ont permis d'administrer de l'hormone de croissance équine recombinante à des chevaux afin de collecter des matrices biologiques d'intérêts (plasma, urine). Les échantillons de la première expérimentation ont été étudiés dans le but de mettre au point une stratégie analytique et ainsi d'évaluer la faisabilité et la pertinence de l'approche pour répondre à la problématique posée. La seconde expérimentation a été établie en vue de réaliser les prises d'empreintes métabolomiques sur un nombre d'animaux statistiquement pertinents qui permettrait de dégager de nouveaux métabolites marqueurs de l'administration de l'hormone de croissance. Les différentes étapes du processus de prise d'empreintes métabolomiques sont décrites dans ce chapitre.

1. ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE AUX CHEVAUX DU CENTRE D'EXPERIMENTATION DE COYE LA FORET

1.1. Référence de l'hormone de croissance administrée

L'hormone de croissance équine recombinante commercialisée sous le nom d'EquiGen-5[®] (Bresagen Limited, Thebarton, Australie) a été utilisée pour cette expérimentation (Figure II-1).

Tableau II-1 : Caractéristiques des chevaux choisis pour l'expérimentation de Coye la Forêt.

Référence	Nom du cheval	Age	Sexe	Poids
<i>Cheval 1</i>	Palladia	5 ans	Hongre	547 kg
<i>Cheval 2</i>	Grandet	5 ans	Mâle	575 kg

La solution administrée aux chevaux de l'expérimentation est obtenue en ajoutant 2 mL d'eau PPI pour donner une solution à 5 mg.mL⁻¹ en reGH. Cette solution doit être utilisée dans les 48 heures après reconstitution et stockée à 4°C.

1.2. Voie d'administration et identification des échantillons

Les injections d'hormone de croissance ont été réalisées par voie sous-cutanée à l'encolure.

Le sang a été collecté dans la veine jugulaire de l'animal. Le plasma a été obtenu sur un tube hépariné (9 mL) après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes puis séparation du plasma et congélation immédiate (-80°C). Le sérum a été collecté sur tubes secs (10 mL) après décantation 24h à 4°C puis centrifugé (15 min, 3000 rpm) le lendemain avec identification et congélation rapide à -80°C.

L'urine a été collectée par miction naturelle de l'animal dans un pot de prélèvement d'urine puis aliquotée dans des flacons plastiques en polypropylène (3 x 30mL + le reste dans un flacon de plus grande capacité) identifiés par le nom de l'animal et le jour de prélèvement puis congelés rapidement (-20°C).

1.3. Prélèvement des échantillons

Les caractéristiques des deux chevaux pur-sangs sont notées dans le Tableau II-1. Le sang et les urines ont été collectés pendant 7 jours avant le début du traitement (J₋₇ à J₋₁) afin de réaliser une série de blancs. Le traitement a été réalisé à la dose de 18 µg.kg⁻¹ la première semaine et 25 µg.kg⁻¹ la deuxième semaine. Deux jours à 30 µg.kg⁻¹ ont été ajoutés pour clôturer l'expérimentation (J₊₁₅ à J₊₁₇).

Le sang et les urines ont été collectés tous les jours de J₊₁ à J₊₂₀, et tous les deux jours de J₊₂₀ à J₊₃₀.

Tableau II-2 : Caractéristiques des chevaux choisis pour l'expérimentation de Toulouse

Référence	Nom du cheval	Age	Sexe	Poids	Traitement
<i>Cheval 1</i>	Lago	15 ans	Hongre	575 kg	ReGH
<i>Cheval 2</i>	Isis	10 ans	Femelle	503 kg	ReGH
<i>Cheval 3</i>	Longo 1	4 ans	Femelle	430 kg	ReGH
<i>Cheval 4</i>	Laius	8 ans	Hongre	575 kg	ReGH
<i>Cheval 5</i>	Haxius	12 ans	Hongre	470 kg	ReGH
<i>Cheval 6</i>	Nora	6 ans	Femelle	610kg	ReGH
<i>Cheval 7</i>	Gamin	13 ans	Hongre		Contrôle
<i>Cheval 8</i>	Idéfix	11 ans	Hongre		Contrôle
<i>Cheval 9</i>	Longo 2	4 ans	Femelle		Contrôle
<i>Cheval 10</i>	Oscar	5 ans	Hongre		Contrôle
<i>Cheval 11</i>	Mirage	22 ans	Hongre		Contrôle
<i>Cheval 12</i>	Utopie	13 ans	Femelle		Contrôle
<i>Cheval 13</i>	Milton	7 ans	Hongre		Contrôle

2. ADMINISTRATION DE L’HORMONE DE CROISSANCE AUX CHEVAUX DE L’ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

2.1. Référence de l’hormone de croissance administrée et de l’excipient

La même hormone de croissance équine recombinante EquiGen-5[®] (Bresagen Limited, Thebarton, Australie) que celle utilisée pour l’expérimentation de Coye la Forêt a été administrée à six chevaux. La solution administrée a été préparée de telle sorte à obtenir une concentration de 5 mg.mL⁻¹ (ajout de 2 mL d’eau PPI).

Dans le but de disposer d’individus témoins, sept chevaux ont été administrés avec seulement du sérum physiologique.

2.2. Voie d’administration et identification des échantillons

Les injections d’hormone de croissance ont été réalisées par voie sous-cutanée dans une zone située dans le creux de l’épaule (en avant de la scapula).

Le sang a été collecté dans la veine jugulaire de l’animal. Le plasma a été obtenu sur un tube hépariné (9 mL) après centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 minutes puis congélation immédiate (-20°C).

Les urines ont été obtenues par sondage urinaire pour les juments et par mictions spontanées pour les hongres. Elles ont ensuite été réparties en 3 fractions aliquotées de 30 mL environ, identifiées et congelées à -20°C.

2.3. Prélèvement des échantillons

Les caractéristiques des 13 chevaux de cette expérimentation sont présentées dans le Tableau II-2. Le plasma et l’urine ont été collectés comme matrice d’intérêt pour suivre l’impact du traitement de la reGH sur le métabolisme des chevaux à court et long terme (jusqu’à 3 mois). Les matrices des chevaux témoins et traités à la reGH ont également été collectées une semaine avant l’expérimentation afin de disposer d’une série d’échantillons blancs.

Le traitement a été réalisé à la dose de 18 µg.kg⁻¹ la première semaine (J₊₁ à J₊₇) et 25 µg.kg⁻¹ la deuxième semaine (J₊₈ à J₊₁₄).

Le plasma et les urines ont été collectés deux jours avant administration (J_{-2} à J_{-1}), tous les deux jours de J_{+1} à J_{+13} , puis tous les jours de J_{+14} à J_{+17} et enfin aux jours de prélèvement J_{+19} , J_{+23} , J_{+30} , J_{+40} , J_{+52} , J_{+69} .

3. ETUDE DE POPULATION EN VUE DE LA MISE EN PLACE D'UN OUTIL METABOLOMIQUE PREDICTIF

Afin d'établir un nouvel outil de dépistage de l'administration de l'hormone de croissance sur la base d'un modèle chimiométrique prédictif, 120 urines ont été collectées. 1/6 des prélèvements ont été effectués sur des chevaux du centre expérimental de Chamberet, les autres échantillons correspondent à des urines tout venant du Laboratoire des Courses Hippiques.

Les matrices urinaires provenant de la station expérimentale des Haras nationaux de Chamberet ont été prélevées sur 20 chevaux non traités à la reGH dans des conditions parfaitement définies et maîtrisées. Les urines provenant du Laboratoire des Courses Hippiques ont été prélevées chez des chevaux de courses en compétition ou à l'entraînement. Une analyse systématique de contrôle anti-dopage comprenant la recherche de stéroïdes, corticostéroïdes, β -agonistes, diurétiques, et hormones peptidiques a été effectuée pour chaque prélèvement. Seuls les échantillons pour lesquels les analyses se sont révélées négatives vis-à-vis du contrôle anti-dopage ont été sélectionnés.

PARTIE - 2 PRISES D'EMPREINTES METABOLOMIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION

2.1. Réactifs

Tous les solvants sont de la pureté requise pour réaliser de l'analyse HPLC. L'eau Milli Q est contrôlée par mesure directe de sa conductivité sur l'appareil. La valeur doit être de l'ordre de $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. Les standards testostérone-D3 et épitestostérone-D3-glucuronide utilisés comme étalons externes proviennent de LGC Standards (Molsheim, France). Les standards de glucose, L-carnitine, L-acétylcarnitine ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Toutes les solutions ont été préparées dans l'éthanol, à une concentration de $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ et conservées au réfrigérateur (4°C) à l'abri de la lumière.

2.2. Traitement de l'échantillon

2.2.1. Filtration sur des filtres de seuil de coupure 10 kDa

Des filtres de centrifugation Vectaspin de capacité maximale 3 mL et de seuil de coupure 10 kDa ont été utilisés dans le but d'éliminer les molécules de très haut poids moléculaire tout en conservant les molécules de faible poids moléculaire. Après décongélation des échantillons plasmatiques ou urinaires, les échantillons sont déposés sur la membrane inerte en polysulfone des filtres Vectaspin.

Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 4000 rpm (4°C). Seul le filtrat contenant les molécules de faibles poids moléculaires est conservé et analysé par LC-HRMS.

2.2.2. Filtration sur des filtres de seuil de coupure 10 kDa suivie d'une étape de lyophilisation

Après filtration sur des filtres de seuil de coupure 10 kDa, une étape supplémentaire de lyophilisation a été évaluée pour la préparation des échantillons urinaires.

Le filtrat obtenu après centrifugation est congelé (-20°C) pendant une nuit. Les échantillons sont ensuite placés dans un lyophilisateur pendant 48h. La matière sèche est reprise dans de l'eau ultra pure de telle sorte à normaliser tous les échantillons à une concentration de $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les échantillons sont congelés à -20°C jusqu'à leur analyse par LC-HRMS.

2.2.3. Extraction sur phase solide

Des cartouches Oasis HLB (60 mg, Waters, Saint Quentin en Yvelines) ont été testées. Le protocole a consisté à déposer 1 mL d'échantillon urinaire sur la cartouche. La cartouche a ensuite été lavée avec 1 mL d'eau puis 4 mL de méthanol ont été utilisés pour l'élution. La SPE a été réalisée sous automatisation par un XL4. L'éluant a été évaporé sous azote et repris dans 1 mL d'eau ultra pure. Les échantillons sont congelés à -20°C jusqu'à leur analyse par LC-HRMS.

2.2.4. Préparation des étalons externes

Avant les analyses LC-HRMS, une solution contenant les étalons externes testosterone-D3 et epitestosterone-D3-glucuronide à une concentration de $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a été préparée. 5 μL de cette solution ont été ajoutés à 20 μL de chaque échantillon à analyser. Le mélange avec une concentration en étalon externe égale à $0.6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ est ensuite agité puis injecté sur le système LC-HRMS.

2.2.5. Préparation des contrôles qualités

Avant chaque analyse LC-HRMS, 20 μL de chaque échantillon à analyser ont été prélevés et mélangés dans un même aliquot afin de disposer de contrôles qualités. 5 μL de cette solution sont alors injectés à plusieurs reprises, en début, milieu et fin de séquences (Sangster *et al*, 2006).

2.3. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Parmi les différents types de chromatographie en phase liquide, la chromatographie de partage est celle qui a été utilisée dans cette étude.

2.3.1. Conditions HPLC

Trois colonnes chromatographiques ont été utilisées :

- l'Uptisphere C18 HDO commercialisée par la société Interchim (Montluçon, France) dont les caractéristiques sont : phase C18, diamètre interne 2,1 mm, longueur 150 mm, et diamètre des particules 3 μm .
- la Luna HILIC commercialisée par la société Phenomenex (Le Pecq, France) dont les caractéristiques sont : diamètre interne 2,1 mm, longueur 150 mm, et diamètre des particules 3 μm .
- l'Uptisphere Strategy NEC commercialisée par la société Interchim (Montluçon, France) dont les caractéristiques sont : diamètre interne 2,1 mm, longueur 100 mm, et diamètre des particules 2,2 μm .

Les séparations ont été réalisées sur une HPLC Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne) pour les échantillons injectés sur la colonne Uptisphere C18 et sur HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Saint Quentin en Yveline, France) pour les échantillons injectés sur les colonnes Luna HILIC et Uptisphere Strategy NEC.

Tableau II-3 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses effectuées sur le système Thermo Surveyor à l'aide de la colonne Uptisphere C18 HDO

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	H2O (0.1% Acide acétique)	Acétonitrile (0.1 % Acide Acétique)
0		100	0
30		0	100
40	0, 2	0	100
60		100	0

Tableau II-4 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses effectuées sur l' Ultimate 3000 à l'aide de la colonne Luna HILIC

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	H2O (20 mM d'acétate d'ammonium)	Acétonitrile (20 mM d'acétate d'ammonium)
0		10	90
25		25	75
35	0, 2	25	75
45		40	60
55		10	90
60		10	90

Tableau II-5 : Gradient d'élution utilisé pour les analyses effectuées sur l'Ultimate 3000 à l'aide de la colonne Uptisphere Strategy NEC

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	H2O (0.1% Acide acétique)	Acétonitrile (0.1 % Acide Acétique)
0		100	0
13		0	100
14	0, 2	0	100
18		100	0
20		100	0

Tableau II-6 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre de masse hybride, LTQ-OrbitrapTM en mode d'ionisation ESI+

Tension du capillaire	5 kV
Température du capillaire chauffé	350°C
Tension de cône	30 V
Débit de gaz gaine (Sheath)	40 ua
Débit de gaz auxiliaire (Aux.)	6 ua

Les gradients d'élution choisis sont décrits dans le Tableau II-3, Tableau II-4, Tableau II-5 et correspondent respectivement aux analyses effectuées à l'aide des colonnes Uptisphere C18, Luna HILIC et Uptisphere Strategy NEC.

2.3.2. Conditions Spectrométriques

Plusieurs spectromètres de masse ont été utilisés en mode d'ionisation positif (ESI+) et négatif (ESI-). Le travail s'est toutefois principalement basé sur un spectromètre de masse hybride composé d'un quadripôle et d'un temps de vol (Q-TOF, Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) et un spectromètre de masse hybride composé d'une trappe linéaire couplée à une trappe orbitale (LTQ-Orbitrap™, Thermo Scientific, Brême, Allemagne). Les principes de fonctionnement de ces deux analyseurs ont été détaillés dans le chapitre Travaux Antérieurs/partie 3.

2.2.4.1 Paramètres MS

• LTQ-Orbitrap™

Les empreintes métabolomiques ont été effectuées en mode balayage Full Scan de 50 à 800 m/z. La trappe linéaire (LTQ) est alors utilisée en mode de transmission. Elle est équipée d'une source d'ionisation électrospray (ESI) utilisée uniquement en mode positif.

La résolution de la trappe orbitale est quant à elle fixée à 30 000. Les paramètres utilisés sont répertoriés dans le Tableau II-6. Les données brutes obtenues ont été converties en donnée plus universelles (.cdf) via le logiciel Xcalibur pour l'étape future de retraitement.

• TOF

Le profilage métabolomique a été effectué en mode balayage Full Scan de 50 à 800 m/z sur le MicroTOF™ commercialisé par la société Bruker Daltonics (Brême, Allemagne) et équipée d'une source ESI. Seules des analyses en mode d'ionisation positif ont été réalisées. Les paramètres utilisés sont répertoriés dans le Tableau II-7. Les données brutes ont été converties en données plus universelles (.cdf) via le logiciel DataAnalysis pour l'étape de retraitement des données.

• Q-TOF

Les études métabolomiques ont été réalisées en mode balayage Full Scan de m/z 50 à 800 et de m/z 200 à 1500 pour les analyses respectives des échantillons urinaires et plasmatiques. Le spectromètre de masse utilisé est le microTOF-Q-II commercialisé par la société Bruker Daltonics (Brême, Allemagne). Les deux modes d'ionisation ESI+ et ESI- ont été testés.

Tableau II-7 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre MicroTOF en mode d'ionisation ESI+

Tension du capillaire	5 kV
Température du capillaire en verre	180°C
Tension de cône	40 V
Débit du gaz nébuliseur	14.5 psi
Débit du gaz rideau	8 L.min ⁻¹

Tableau II-8 : Conditions d'ionisation utilisées pour les prises d'empreintes sur le spectromètre hybride, Q-TOF en mode d'ionisation ESI+

Tension du capillaire	5 kV
Température du capillaire en verre	195°C
Tension de cône	40 V
Débit du gaz nébuliseur	34.8 psi
Débit du gaz rideau	8 L.min ⁻¹

Tableau II-9 : Conditions d'ionisation utilisées pour la MS-MS sur le spectromètre Exactive en mode d'ionisation ESI+

Tension du capillaire	4.5 kV
Température du capillaire chauffé	300°C
Tension de cône	47 V
Débit de gaz gaine (Sheath)	60 ua
Débit de gaz auxiliaire (Aux.)	7 ua

Les paramètres utilisés sont répertoriés dans le Tableau II-8. Les données brutes ont été converties en données plus universelles (.cdf) via le logiciel DataAnalysis pour l'étape de retraitement des données.

2.2.4.2 Paramètres de fragmentation d'un métabolite d'intérêt : la vitamine b5

Les fragments d'un métabolite d'intérêt de l'administration de l'hormone de croissance équine recombinante ont été étudiés avec un Q-TOF (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) et un Exactive (Thermo Scientific, Brême, Allemagne).

- MS-MS utilisant un Q-TOF

L'analyse d'un métabolite d'intérêt en mode « balayage des ions produits » a permis de définir les paramètres du quadripôle les plus sensibles et spécifiques pour son élucidation structurale.

La fenêtre d'isolation, l'énergie de collision et la Rf du quadripôle ont été fixées aux valeurs respectives de 8, 10 eV, et 120 V.

Les paramètres d'ionisation sont les mêmes que ceux présentés dans le Tableau II-8.

- MS-MS utilisant un Exactive

L'analyse du métabolite d'intérêt et de ses fragments a également été réalisée à l'aide d'un spectromètre Exactive (ThermoScientific, Brême, Allemagne). Les paramètres d'ionisation sont répertoriés dans le Tableau II-9.

PARTIE - 3 RETRAITEMENT ET ANALYSES DES DONNEES METABOLOMIQUES

Comme évoqué dans le chapitre I, la quantité et la complexité des données LC-HRMS requièrent l'utilisation de logiciels pour le retraitement et l'analyse des données.

Tableau II-10 : Paramètres importants du logiciel XCMS optimisés pour le retraitement des données acquises sur les spectromètres de masse MicroTOF, MicroTOF-Q-II, et LTQ-Orbitrap™

	Spectromètre de masse MicroTOF Spectromètre de masse MicroTOF-Q-II	Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap
Extraction des pics (xcmsSet)		
FWHM	10 secondes	20 secondes
Snthresh	6	3
Step	0,1 m/z	0,1 m/z
Création de groupes (group)		
Minsamp	1	1
Minfrac	0,95	0,5
Bw	5 sec	10 sec
Alignement des pics (Retcor)		
Algorithme	Linéaire	Polynomial

3.1. Traitement des données (Tableau II-10)

3.1.1. Paramètres du logiciel XCMS

Les profils métabolomiques ont été extraits et alignés par le logiciel XCMS fonctionnant sous l'environnement R. Il en résulte une matrice de données composée verticalement des rapports m/z des ions détectés et horizontalement des échantillons sur lesquels une valeur d'intensité MS est attribuée pour chaque ion.

Le logiciel fonctionne en différentes étapes :

-L'extraction des pics (appelée sous R la fonction « XCMSSet »). Le logiciel permet le fractionnement du spectre de masse en différentes sections (par défaut 0,1 m/z). Dans chacune de ces sections, l'extraction du pic sera effectuée si celui-ci est présent dans plusieurs balayages (scans) successifs. Plusieurs paramètres doivent être réglés :

Fwhm : représente la largeur à mi-hauteur d'un pic pour qu'il soit extrait.

Snthreshold : représente la valeur seuil qui permet l'extraction d'un pic comparé au bruit de fond.

Step : définit la largeur de la fenêtre m/z pour l'extraction des pics chromatographiques de chaque ion (ion base peak chromatogram).

-La comparaison des pics extraits entre les différents échantillons et création de groupe (appelée sous R la fonction « group »). Elle correspond à une phase d'alignement des pics à travers les échantillons. Un groupe est un ion qui est considéré comme identique dans un ensemble d'échantillons. Cette commande est sous le contrôle de plusieurs paramètres :

Minfrac : représente le pourcentage d'échantillons dans lequel l'ion extrait doit être présent pour être aligné.

Bw : correspond à la largeur à mi-hauteur minimum du pic chromatographique pour qu'il soit extrait et aligné.

-Correction du temps de rétention (appelée sous R fonction « Retcor »). Dans l'ensemble des ions alignés, un certain nombre d'ions bien représentés dans la majorité des échantillons seront utilisés comme référence pour corriger la valeur du temps de rétention de l'ensemble des ions.

-Recherche des données manquantes (appelée sous R fonction « Fillpeaks »). Si un ion n'est pas extrait dans un échantillon, le logiciel recherche dans le chromatogramme la valeur d'intensité à l'endroit supposé du pic.

L'ensemble de ces paramètres dépend des conditions chromatographiques et spectrométriques, propres à chaque étude. Les paramètres utilisés pour les analyses réalisées sur les spectromètres MicroToF, MicroToF Q-II et LTQ-OrbitrapTM sont regroupés dans le Tableau II-10.

3.1.2. Traitement secondaire des données

Cette étape de prétraitement des données permet de minimiser certaines sources de variations intrasèques aux données métabolomiques. Plusieurs phénomènes sont à l'origine de cette variation : la variation instrumentale, l'écart des valeurs absolues entre les ions et la détection des polluants. Afin de corriger ces effets, les données peuvent être transformées par des méthodes de prétraitement :

-La variance unitaire (UV) : Chaque variable est centrée et le poids de chaque variable est pondéré par son écart-type ($1/\sigma$). Toutes les variables ont donc le même poids.

Cette transformation est une normalisation de choix lorsque les variables ont un intérêt démontré pour l'étude. L'UV a donc été appliquée seulement aux ions qui ont fait l'objet d'une recherche de biomarqueurs spécifiques de l'administration de la reGH.

-Pareto (Par) : Chaque variable est centrée et pondérée par la racine carrée de son écart-type ($1/\sqrt{\sigma}$). Cette normalisation est utilisée quand il existe une forte disparité dans les intensités des variables. Ce mode de traitement des données a été utilisé pour les analyses fondées sur la globalité des empreintes.

Toutes ces méthodes ont été testées et ont permis de démontrer que la transformation des données en logarithme était particulièrement adaptée à nos jeux de données. En effet, cette transformation permet de corriger la variation statistique intrinsèque au modèle appelée hétéroscédasticité et ainsi d'améliorer l'ensemble des modèles prédictifs.

3.2. Analyse des données

Le logiciel Simca-p v 12.0 (Umetrics, Suède) a été utilisé pour l'ensemble de l'analyse des jeux de données.

Dans un premier temps des analyses en composante principale (ACP) ont été réalisées afin de visualiser la répartition des échantillons dans un espace en deux dimensions. Dans un second temps, des analyses supervisées telles que l'OPLS (Orthogonal Partial Least Square) ont été appliquées au jeu de données afin d'affiner les résultats et de déterminer quelles variables participent le plus à la différenciation des groupes (i.e, non-traités et traités à la reGH). En raison de la complexité des données, une étape préalable de transformation des données en logarithme a été effectuée pour chaque jeu de données comme énoncé ci-dessus.

3.3. Validation des modèles

3.4.1. Indicateurs R^2 et Q^2

La pertinence des modèles statistiques issus d'une analyse est évaluée en étudiant la répartition des groupes au travers des coefficients $R^2(X)$ (cum) et Q^2 (cum) pour l'ACP, $R^2(Y)$ cum et Q^2 (cum) pour l'OPLS dont les valeurs se situent dans l'intervalle [0-1]. Les coefficients R^2 indiquent la proportion de la variance des données qui peut être expliquée par le modèle utilisé. Un faible coefficient R^2 indique qu'il existe un bruit important ou des informations non pertinentes dans les données. Les coefficients Q^2 indiquent la proportion de la variance des données qui peut être prédite par le modèle utilisé. Pour un modèle non supervisé de type ACP, le but est de restituer un maximum de variance c'est-à-dire restituer au mieux l'information contenue dans le tableau initial du jeu de données. Pour un modèle supervisé de type OPLS, le but est d'expliquer dans le cas de la présente étude la différence entre des animaux témoins et traités à la reGH.

3.4.2. Validation croisée et test de permutation

Dans la mesure où le nombre de variables est souvent largement supérieur au nombre d'individus, il est important de s'assurer que la discrimination des groupes n'est pas le fruit du hasard. Les modèles doivent donc être validés. Deux tests sont particulièrement intéressants :

- La validation croisée qui consiste à scinder les jeux de données en deux groupes. 2/3 du jeu de données sert à établir un modèle de base descriptif tandis que l'autre tiers du jeu de données sert de groupe de validation. Ce deuxième groupe ne participe pas au calcul du modèle, il sert à la validation et à l'estimation de la qualité de prédiction. Les paramètres R^2 et Q^2 permettront de rendre compte de la capacité explicative et de la qualité du modèle.
- Un test de permutation qui consiste à réaffecter aléatoirement les individus afin de vérifier que le modèle n'est pas dû au hasard. Ce test s'applique uniquement aux modèles supervisés qui incluent une variable qualitative Y.

3.4.3. CV-ANOVA (*Cross Validation-ANalysis Of Variance*)

La CV-ANOVA est basée sur un test-F où sa signification est elle-même liée à l'hypothèse nulle que les résidus de deux modèles sont identiques (Eriksson *et al*, 2007). Elle s'applique uniquement à des modèles supervisés.

Dans le cas d'une analyse OPLS, la matrice X peut être décomposée de la manière suivante :

$$X = T_p P_p + T_o P_o + E \quad \text{avec}$$

T_p = Matrice score prédictive (corrélée à Y)
 T_o = Matrice score orthogonale à Y
 P_p = Poids de la matrice liée à la composante Y
 P_o = Poids de la matrice orthogonale à la composante Y
 E = Résidus

La CV-ANOVA consiste à tout d'abord effectuer un (ou des) test(s) de permutation pour le(s)quel(s) une (ou des) nouvelle(s) valeur(s) de résidu E est (sont) calculée(s). Puis, une ANOVA est réalisée entre la valeur E du modèle de base et la ou (les valeurs) E des modèles permutés. Dans le cas où le modèle de base est robuste, la valeur E du modèle de base doit être significativement différente de celle (s) des modèles permutées. L'hypothèse nulle de départ est donc rejetée et la valeur de probabilité p de la CV-ANOVA est faible. Pour être significative p doit être inférieure à 0.05.

CHAPITRE - III

RESULTATS ET DISCUSSION

Comme présenté dans le chapitre I, les hormones de croissance sont suspectées d'être utilisées pour accroître la production de lait des vaches laitières, comme promoteur de croissance en production animale (bovins, porcins) et pour améliorer les performances physiques des chevaux de course. La législation interdit leur utilisation dans plusieurs pays d'Europe et en particulier en France. Dans ce contexte, des tests de dépistage de l'administration frauduleuse des hormones de croissance ont été développés notamment pour la mise en évidence de biomarqueurs secondaires tels que l'IGF-I (Popot *et al*, 2001) et les anticorps anti-reGH (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008a). De surcroît, une méthode de confirmation a été développée (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008b) pour la recherche de l'hormone de croissance recombinante équine dont la séquence peptidique est connue et décrite mais inadaptée à la mise en évidence de dopage par d'autres formes recombinantes inconnues ou par stimulations en amont de l'axe somatotrope. Malgré les performances analytiques de ces méthodes en terme de sensibilité, spécificité et répétabilité, le dépistage de l'administration de l'hormone de croissance reste difficile les premiers jours suivant le traitement.

Notre projet s'inscrit dans ce contexte et a pour objectif d'évaluer la pertinence d'une approche de type « omique » fondée sur l'étude de profils métaboliques.

La première partie de ce travail a consisté à développer une démarche méthodologique visant à mettre au point une méthode analytique robuste d'extraction et de détection des métabolites présents dans l'urine et le plasma permettant ainsi d'évaluer l'impact de la reGH sur le métabolisme des chevaux. La deuxième partie de ce travail s'est intéressée plus précisément à évaluer l'intérêt et la compatibilité de la métabolomique en tant qu'outil prédictif dans le contrôle anti-dopage. Ce travail permet ainsi de donner des éléments de réponse sur l'intérêt des méthodes indirectes telles que la métabolomique par rapport aux méthodes de dépistage actuelles de l'hormone de croissance ou aux méthodes en voie d'évaluation telles que la transcriptomique.

PARTIE-1 DEVELOPPEMENT D'UNE DEMARCHE METHODOLOGIQUE EN VUE DE L'ETUDE D'UN TRAITEMENT A LA REGH

1. ETUDE DE FAISABILITE SUR DEUX ANIMAUX

1.1. Introduction

Le but de cette première étude est de développer une stratégie analytique qui permette de mettre en évidence des perturbations métaboliques autorisant la discrimination entre les échantillons collectés avant et après traitement à la reGH. Une étude pilote a alors été réalisée au centre expérimental de Coye la Forêt dans le but de réaliser des empreintes ou profils métaboliques urinaires par couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) et de définir une stratégie de retraitement et d'analyse des données. L'expérimentation animale conduite dans ce cadre a été réalisée sur deux chevaux. Le nombre d'individus (n=2) peut paraître peu élevé mais il est important de rappeler que cette étude a pour unique but de mettre au point une stratégie et de valider certains paramètres comme les doses d'hormone de croissance administrées, le choix de la méthode d'acquisition mais également celui des méthodes de retraitement et d'analyse des données.

Au début du projet, aucune information sur la dose administrée et la durée d'un traitement à la reGH, pour entraînant des perturbations significatives sur le métabolisme des chevaux, n'était disponible dans la littérature. Les doses de reGH administrées ont alors été choisies en fonction des recommandations reçues par le fournisseur. De même, la littérature n'a pas pu fournir d'informations sur le temps nécessaire pour induire une réponse sur le métabolisme des chevaux, il a alors été décidé d'effectuer des prélèvements de matrices biologiques jusqu'à 30 jours après le début du traitement.

Le métabolome est constitué de centaines de molécules aux propriétés physico-chimiques et polarités très différentes. Leur analyse par une seule méthode analytique n'est donc pas possible. La stratégie analytique développée impose donc des choix à chaque étape (préparation des échantillons, analyse LC-HRMS, retraitement et analyse des données) et nécessite de conserver un regard critique sur les conséquences de ces choix.

Il a été choisi d'appliquer une méthodologie la moins sélective possible afin de ne pas restreindre la gamme des potentiels métabolites d'intérêt. Notre approche est plus précisément basée sur la comparaison de profils métabolomiques (ou empreintes) obtenus par couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). L'ensemble des échantillons provenant de l'expérimentation de Coye la Forêt a été préparé par filtration suivie d'une étape de lyophilisation. Une attention particulière a été portée à la procédure de retraitement et d'analyse des données afin d'avoir accès au plus grand nombre de métabolites possibles.

Une fois la stratégie validée, celle-ci sera étendue à une étude de population afin d'entamer une recherche de métabolites spécifiques de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine.

1.2. Stratégie analytique

1.2.1. Echantillonnage et préparation des échantillons

Après la collecte et la préparation des échantillons urinaires en vue d'une analyse par LC-MS, une attention particulière a été portée à la conservation des échantillons afin de limiter les processus d'activité enzymatique ou d'oxydation qui pourrait altérer les composés contenus dans l'urine. Plusieurs techniques ont été utilisées pour éviter la dégradation des échantillons telles que la congélation dans l'azote liquide, le traitement à l'acide (Theobald *et al.*, 1993) ou encore les techniques de trempage à basse température dans de l'eau salée contenant du méthanol (Maharjan et Ferenci, 2003).

Dans le cas de cette étude, les échantillons ont été décongelés une seule fois après leur collecte pour la préparation des échantillons. Ce choix de conservation s'est révélé très adapté au stockage d'échantillons urinaires humains à -20°C et à leur analyse métabolomique. En effet, sur la base d'une analyse ACP, ces travaux ont montrés qu'il n'y avait pas de différence dans les profils des échantillons stockés à -20°C et à -80°C (Gika *et al.*, 2008).

Tous les échantillons urinaires de J-7 à J₊₃₀ (n=66) ont été préparés par filtration sur des membranes de seuil de coupure 10 kDa suivi d'une étape de lyophilisation. La filtration permet ainsi l'élimination des grosses molécules et du mucus tout en conservant l'intégralité des petites molécules. La lyophilisation a été introduite dans le but de normaliser la matière sèche de l'ensemble des échantillons à une même valeur de 30 mg.mL⁻¹ afin de corriger le facteur de dilution naturel.

1.2.2. Choix et validation des conditions LC-HRMS

1.2.2.1. Temps d'analyse

Le choix de la durée de l'analyse et plus précisément de la montée en gradient chromatographique représente un compromis entre un temps d'analyse raisonnable et une détection optimale du plus grand nombre de métabolites possibles. Plus l'analyse est longue, plus le nombre de pics détectés est potentiellement augmenté (Wilson *et al*, 2005). Cela est dû principalement à la réduction des recouvrements spectraux et au phénomène de suppression d'ionisation qui en découle. Cependant si l'augmentation du temps d'analyse est désirable pour l'obtention d'une empreinte la plus complète possible, il doit rester compatible avec l'analyse d'un grand nombre d'échantillon. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une colonne Uptisphere C18 avec un temps d'analyse d'une heure, ce compromis semble en accord avec les conditions décrites dans la littérature (Yang *et al*, 2005 ; Dunn et Ellis, 2005),

1.2.2.2. Ordre d'injection des échantillons

Les échantillons ont été injectés au hasard sans ordre prédéfini. Le but est de s'affranchir de la variabilité induite par l'instrument pour mettre en avant la variabilité induite par le traitement à la reGH. Dans toutes les études métabolomiques publiées, une attention particulière a été portée à l'ordre d'injection des échantillons qui, s'il n'est pas réalisé au hasard, peut conduire à des conclusions erronées (Llorach *et al*, 2009).

1.2.2.3. Etudes de répétabilité et de stabilité

Les études métabolomiques n'exigent pas de quantifier de manière précise la concentration des molécules composant les empreintes métabolomiques globales mais s'attachent à détecter des variations semi-quantitatives. Néanmoins, des études de répétabilité et de stabilité doivent être réalisées afin de s'affranchir des variations qui seraient imputables à la méthode ou à la dégradation des métabolites pendant la durée des analyses.

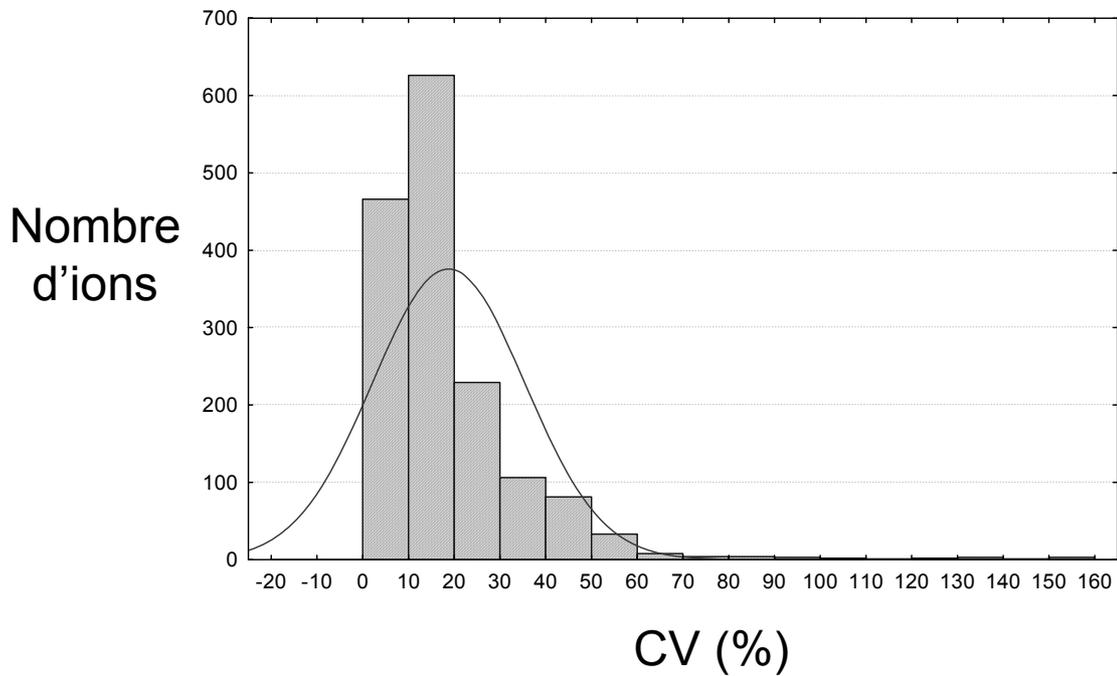


Figure III-1 : Validation globale de la répétabilité n=5 échantillons

Tableau III-1: Validation de la stabilité sur 24 heures.

	Nombre de variables	Moyenne	Ecart-type	Probabilité	Différence observée à la moyenne	Différence observée aux écart-types
Extraits T0	271	13558	32991	0.5	128	2595
Extraits T24	271	13686	35586			

1.2.2.3.1. Répétabilité de la mesure

Cinq injections successives d'un échantillon témoin et d'un échantillon traité à la reGH (prélevé à J₊₁₅) ont été réalisées sur un système LC-HRMS composé d'une colonne chromatographique Uptisphere C18 HDO et d'un analyseur LTQ-OrbitrapTM. Le traitement des données des chromatogrammes témoins et traités a été effectué à l'aide du logiciel XCMS. Cette étape a permis d'extraire et de sélectionner les pics composant les empreintes (1956 pics). Les moyennes, écarts-types et CV des intensités de ces pics ont été calculés. La majorité des pics (environ 75%) présentent un CV inférieur à 25 % ce qui est tout à fait acceptable. Les ions détectés sont donc exploitables analytiquement pour que l'on puisse détecter une éventuelle variation de leur intensité liée à l'administration de la reGH (Figure III-1). Le même processus a été effectué pour cinq autres échantillons et a conduit au même résultat.

1.2.2.3.2. Stabilité des échantillons

Trois extraits ont été injectés une première fois (T0) sur une colonne chromatographique Uptisphere C18 HDO couplée à un spectromètre de masse, conservés à 4°C dans l'injecteur puis réinjectés 24 heures plus tard (T24). Les données LC-HRMS ont ensuite été retraitées par le logiciel XCMS et seul les ions possédant un signal sur bruit supérieur à trois ont été sélectionnés. Sur la base des intensités MS de ces ions, des moyennes ont été calculées pour chaque groupe (T0 et T24) et comparées grâce au test de student via un test t pour des échantillons appariés. Les composés sont considérés comme instable si le coefficient alpha associé au test de student est inférieur à 0,05 (5%).

Le Tableau III-1 démontre que les variables sont stables avec une valeur de $p=0,5$ (soit, très nettement supérieur à 0,05). En effet, aucune différence significative entre les échantillons du groupe T0 et T24 ne peut être mise en évidence.

Tableau III-2: Composés composant la solution de standards

Composés	Temps de rétention (min)	[M+H] ⁺	Famille
Daidzéine	26,9	255,06	Phytoestrogènes
Biochanine A	31,9	285,07	
Méthyltestostérone	31,6	303,23	
MedroxyProgestérone acétate	33,4	387,25	Stéroïdes
Triamcinolone	24,6	395,16	
Ponastérone A	27,7	465,32	Ecdystéroïdes
MRFA	14,2	524,26	Peptides

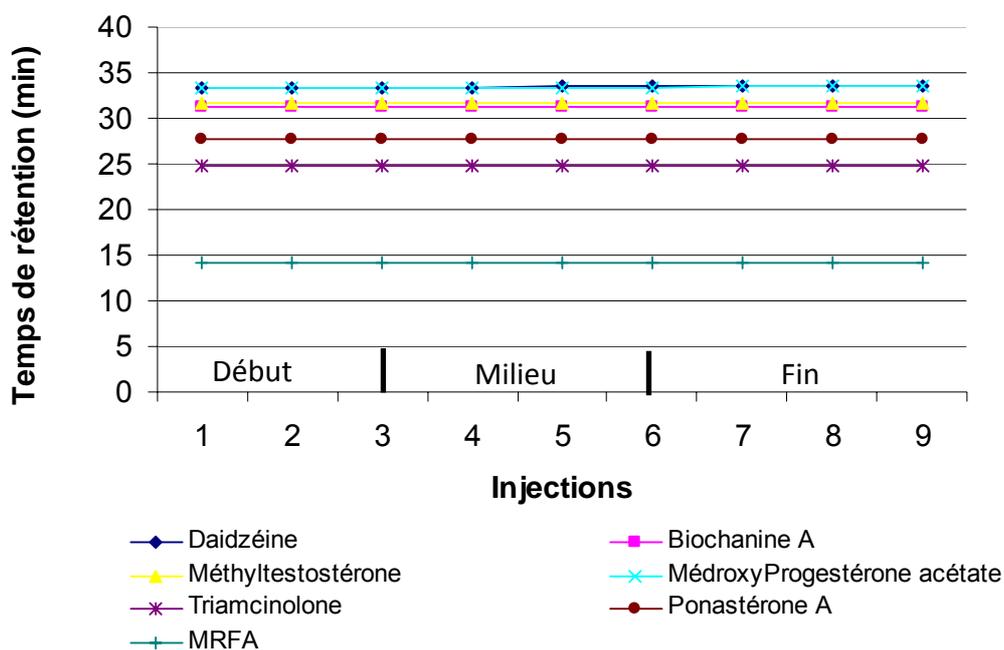


Figure III-2 : Evolution des temps de rétention pour chaque analyte composant la solution de référence en début, milieu et fin de séquence.

1.2.2.4. Contrôles qualités de la mesure

Les approches métabolomiques ne reposent pas sur la mesure de composés cibles, il est donc difficile d'évaluer le maintien des performances du système dans le temps en se basant sur un ou des signaux particuliers. Dans ce contexte, des « contrôles qualités » ont été introduits au sein des séquences analysées dans le but d'évaluer la répétabilité, la reproductibilité et la sensibilité de la mesure.

Une solution de référence, correspondant à un mélange équimassique de sept analytes permettant de couvrir des gammes de temps de rétention et de rapports masse sur charge différents, a été injectée en début, milieu et fin de séquence afin de vérifier la sensibilité (intensité MS), la répétabilité, la précision de la mesure et ainsi de valider chaque série d'analyse (Tableau III-2). L'évolution du temps de rétention des analytes au sein d'une séquence est illustrée sur la Figure III-2 et ne montre aucune dérive. De même, la Figure III-3 montre l'abondance des intensité MS de chaque analyte en début, milieu, et fin de séquence. Les performances de l'appareil ont été jugées satisfaisantes et à peu près équivalentes pour les analyses réalisées au sein d'une séquence donnée autorisant la poursuite du traitement et de l'analyse des données.

1.2.3. *Retraitement des données*

1.2.3.1. Evolution globale du métabolome

L'ensemble des extraits urinaires collectés au cours de l'expérimentation de Coye la Forêt, de J₋₇ à J₊₃₀ (n= 66), sur les deux chevaux a été analysé en vue d'établir des empreintes métaboliques urinaires. Les données brutes déconvoluées par le logiciel XCMS ont permis de mettre en évidence un total de 2375 ions intégrés constituant les empreintes métaboliques urinaires. Le logiciel utilisé intègre de surcroît une première étape de retraitement statistique puisqu'il réalise un test de Student (**t-test**) sur les ions intégrés afin de déterminer leur degré de significativité statistique (**p-value**) en terme de discrimination des sous-groupes d'échantillons préalablement spécifiés lors du retraitement des données (dans le cas présent, les échantillons collectés avant expérimentation (J₋₇ à J₋₁) et les échantillons collectés après traitement (J₊₁ à J₊₃₀). Les ions sont ensuite classés selon ce caractère discriminant du plus significatif au moins significatif et un rang correspondant leur est attribué. Le logiciel calcule également le rapport d'abondance moyenne observé pour chacun des ions entre les groupes à discriminer (**ratio**).

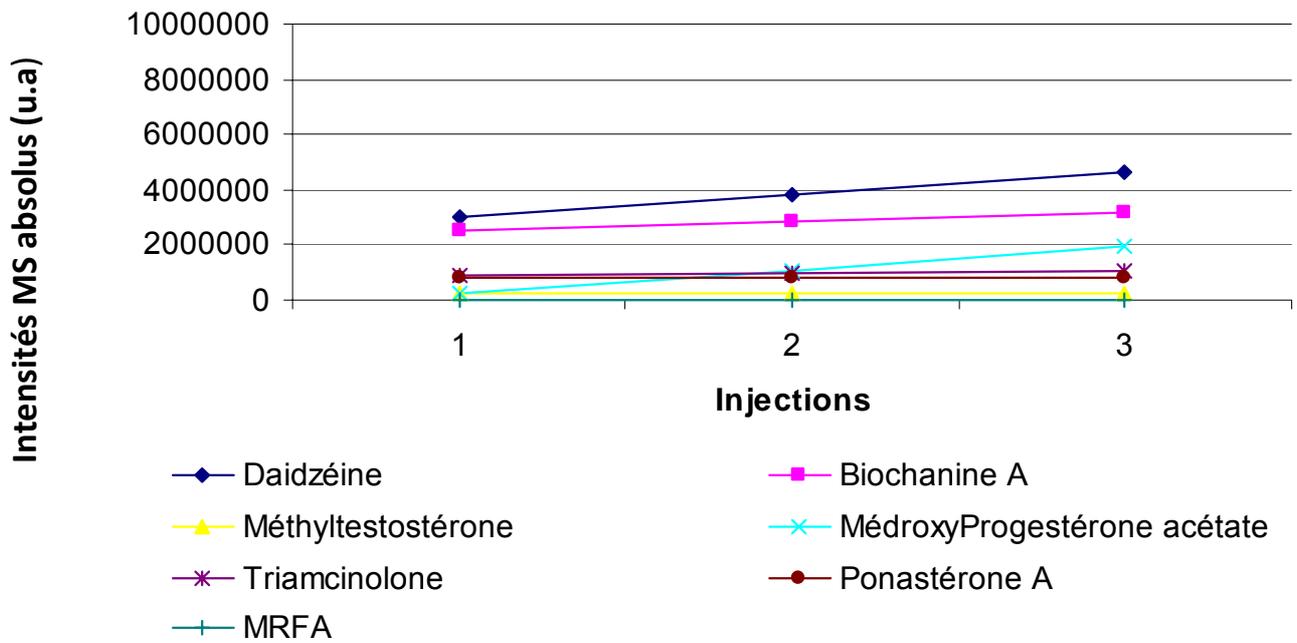


Figure III-3 : Moyenne des intensités MS de chacun des 7 analytes composant la solution de référence en début (1), milieu (2), et fin (3) d'une séquence donnée.

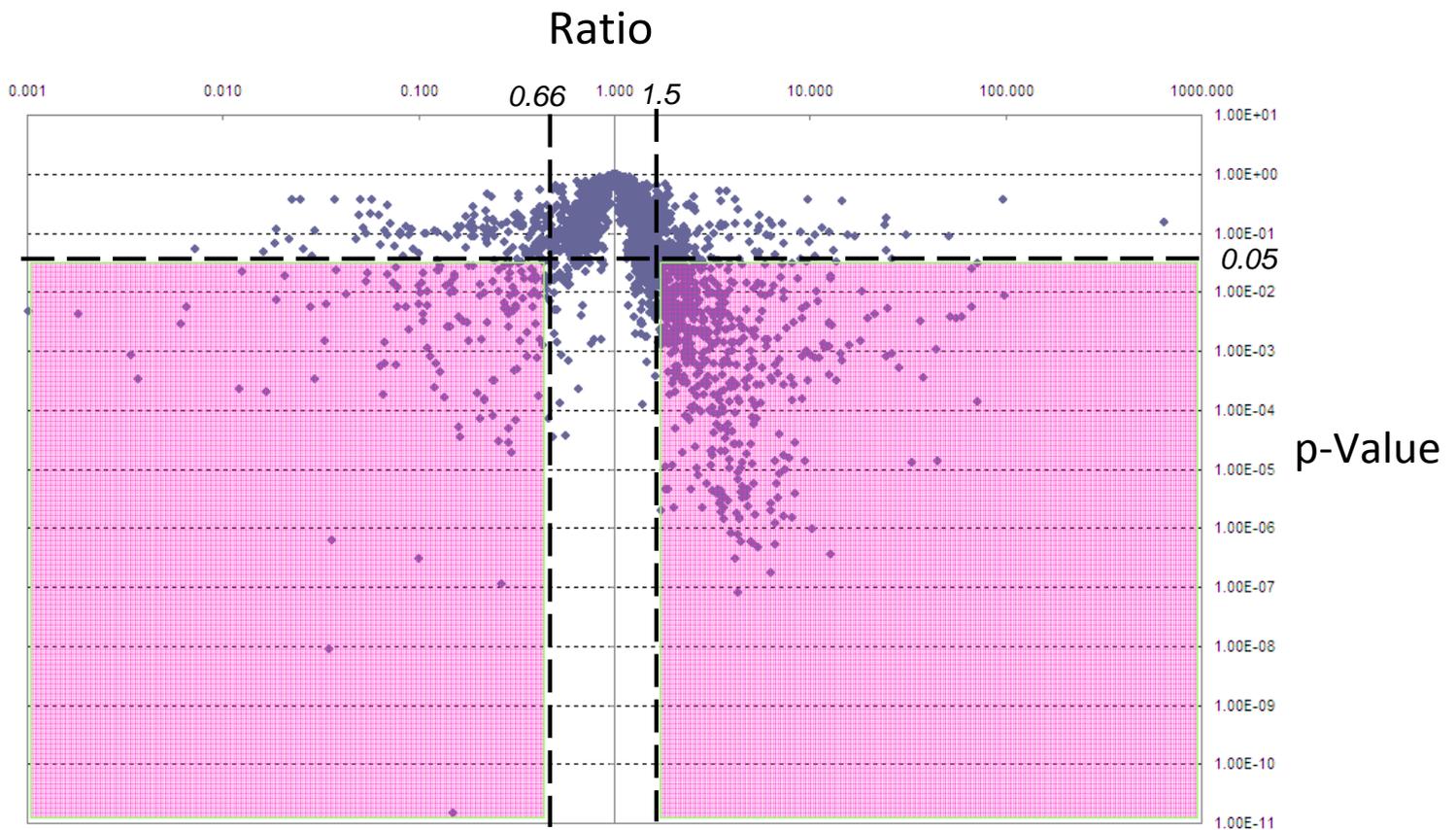


Figure III-4 : Volcano-plot des 2375 ions extraits par le logiciel XCMS pour l'analyse des échantillons urinaires collectés à J₊₇.

Ces trois indicateurs permettent donc une première caractérisation du pouvoir discriminant des ions constituant l’empreinte et sont donc une indication quant à leur intérêt potentiel en tant que candidat biomarqueur.

Une première représentation rapide des données acquises, « le volcano-plot », consiste en la représentation pour un jour donné de chaque ion constituant les empreintes (caractérisé par un T_r et m/z donnés) en fonction de sa valeur de ratio (en abscisse) et de son degré de significativité (p -value, en ordonnée). Les ions se situant à gauche du graphique correspondent à des ions qui sont en moyenne plus abondants dans le profil métabolique urinaire des chevaux avant traitement que ceux après traitement. De la même façon, les ions situés à droite sur le graphique sont des ions en moyenne plus abondants dans les empreintes urinaires des chevaux traités. Des limites d’acceptabilité des ions peuvent ainsi être fixées afin d’éliminer les composés dont le pouvoir discriminant ne serait pas suffisant pour permettre la séparation de deux groupes d’animaux. Ainsi classiquement, la limite de la p -value est fixée à 0,05. D’autres limites ont été fixées à un ratio soit inférieur à 0,66 soit supérieur à 1,5, ceci correspondant à des ions d’un groupe qui seraient en moyenne 50% plus abondants que dans l’autre groupe. Ainsi, les ions qui répondent à ces critères et qui apparaissent les plus pertinents en vue de discriminer les deux populations (J_{+7}) se situent dans la partie rose du graphique Figure III-4.

Au regard du « volcano-plot » obtenu pour le jour de prélèvement J_{+7} , un nombre important d’ions (920 ions d’intérêt dans la partie en rose) apparaît comme pertinent en vue de discriminer les deux populations. Ce résultat montre que le métabolome global des chevaux est affecté après traitement à l’hormone de croissance recombinante équine. Suite à l’administration de reGH, il apparaît que le nombre d’ions dont l’abondance est supérieure chez les animaux traités est plus élevé. Le profil métabolique urinaire des animaux traités semble donc se caractériser par une surreprésentation d’un certain nombre de composés.

Ces premiers résultats encourageants montrent qu’il est nécessaire d’étudier plus profondément ces empreintes. Un recours aux outils statistiques est à ce stade indispensable au vu du nombre élevé d’ions impliqués dans cette étude.

1.2.3.2. Analyses statistiques

L’objectif de ces analyses est de mettre au point un modèle statistique descriptif et prédictif, basé sur les différents signaux spectrométriques constituant les empreintes métaboliques, permettant de discriminer les urines collectées avant et après traitement à la reGH.

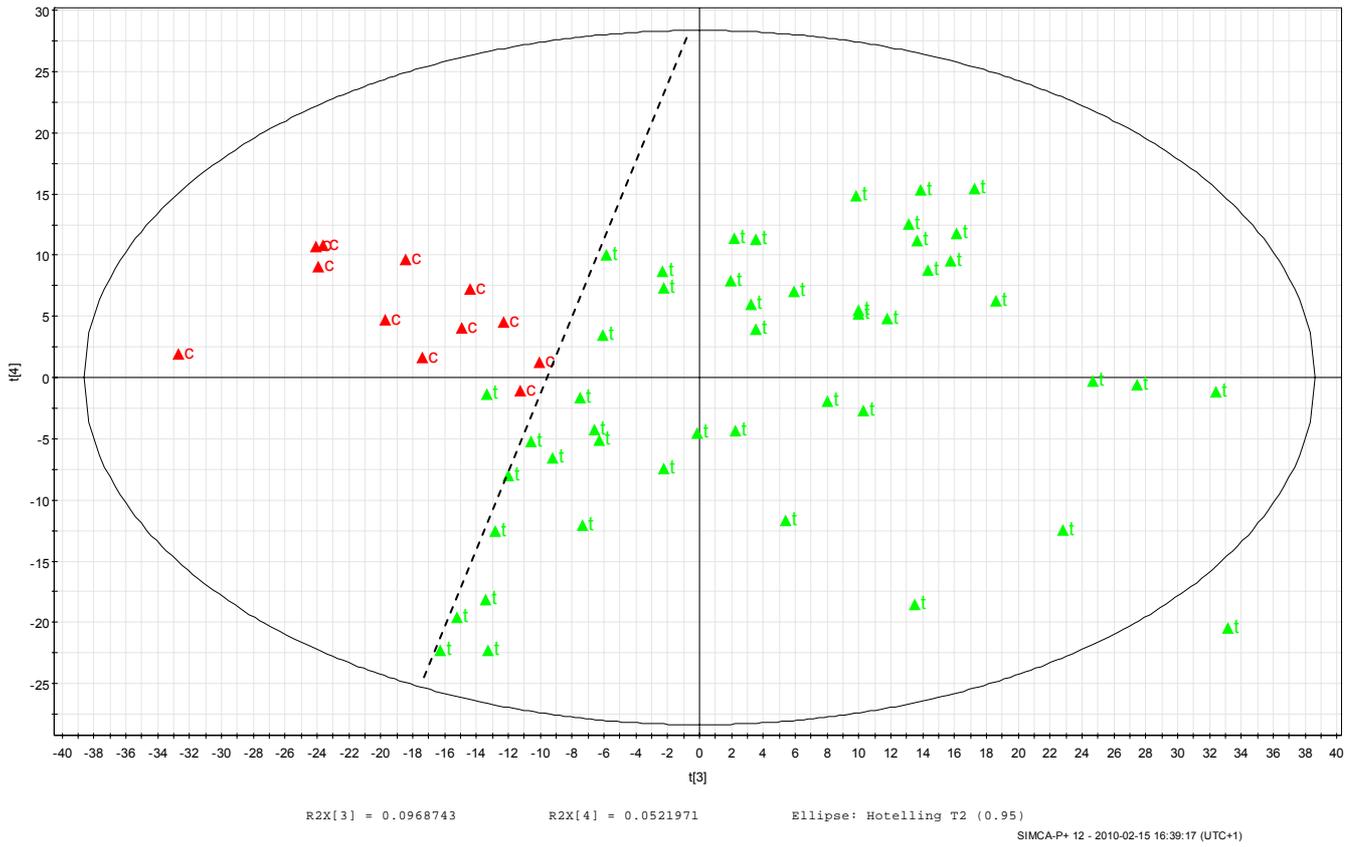


Figure III-5 : ACP réalisée sur la base des 2375 ions formant les empreintes métaboliques urinaires de tous les jours de collecte. Les triangles verts représentent les observations correspondant aux animaux traités ; les triangles rouges représentent les observations correspondant aux animaux avant traitement.

Le nombre très important de ces signaux est tel que les outils statistiques de type multivariés sont indispensables pour l'extraction et la visualisation de l'information utile contenue dans les données.

Des analyses statistiques adaptées aux tableaux composés de plusieurs échantillons et de plusieurs dizaines de variables ont été réalisées. Une analyse en composante principale (méthode non supervisée) et une analyse discriminante de type OPLS ont été appliquées aux jeux de données de l'étude.

1.2.3.2.1. Analyse non supervisée de type ACP

Une Analyse en Composante Principale (ACP) a été effectuée sur les 2375 signaux intégrés par le logiciel XCMS suite au retraitement des acquisitions correspondant à toutes les journées de collecte.

L'objectif d'une ACP est de restituer et de synthétiser l'information contenue dans une matrice X qui correspond aux données de départ, i.e aux différents ions intégrés. Dans ce but, des composantes principales sont calculées. Elles correspondent à des combinaisons linéaires des variables initiales (i.e ions) qui s'attachent à restituer la variabilité des données originelles. La première composante principale est donc extraite afin de restituer le maximum de variabilité des données.

Pour simplifier la visualisation des résultats, les urines collectées avant le traitement sont annotées sous le sigle c (contrôle), et les urines collectées après le début du traitement et jusqu'à la fin des prélèvements sont annotées sous le sigle t (traité).

Les résultats obtenus (Figure III-5) montrent qu'il est possible de mettre en évidence une différenciation entre les échantillons collectés avant et après administration de reGH uniquement sur les projections des composantes principales 3 et 4 (pointillés noirs). Même si les valeurs de R^2X sont relativement faibles ($R^2X(3)=0,09$ et $R^2X(4)=0,04$), cette analyse montre qu'il est possible de discriminer les échantillons collectés en fin d'expérimentation (J_{+30}) des échantillons collectés avant administration de reGH et semble ainsi démontrer que le métabolisme des chevaux reste affecté 30 jours après le début du traitement. Si il peut paraître surprenant que les premières composantes principales (axe 1 et 2) ne jouent a priori aucun rôle dans la discrimination des échantillons, ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les axes sont certainement construits dans le but d'expliquer des facteurs de variabilité autres que celui lié au traitement de l'hormone de croissance équine recombinante.

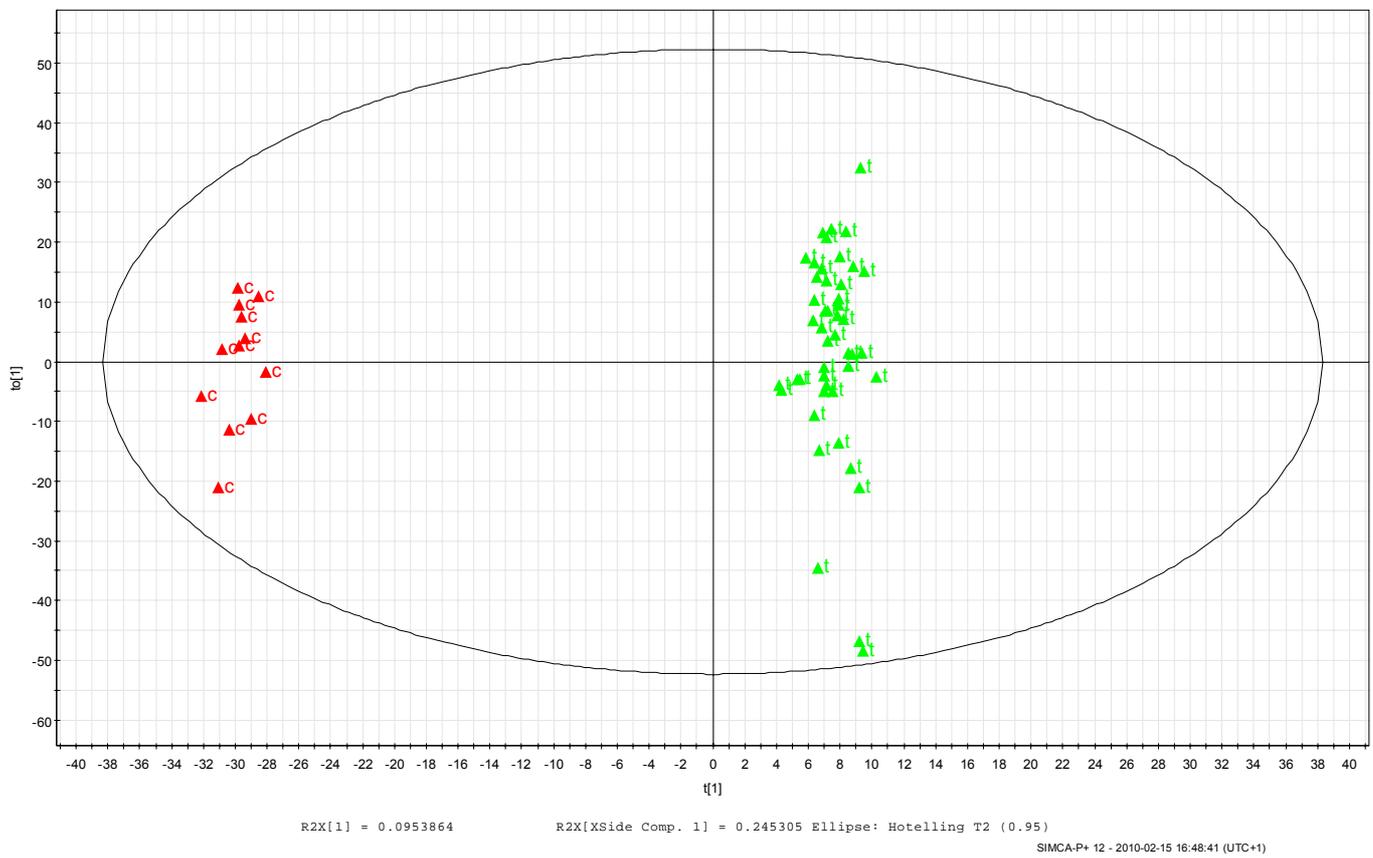


Figure III-6 : OPLS réalisée sur la base de 2375 ions formant les empreintes métaboliques urinaires de tous les jours de collecte.

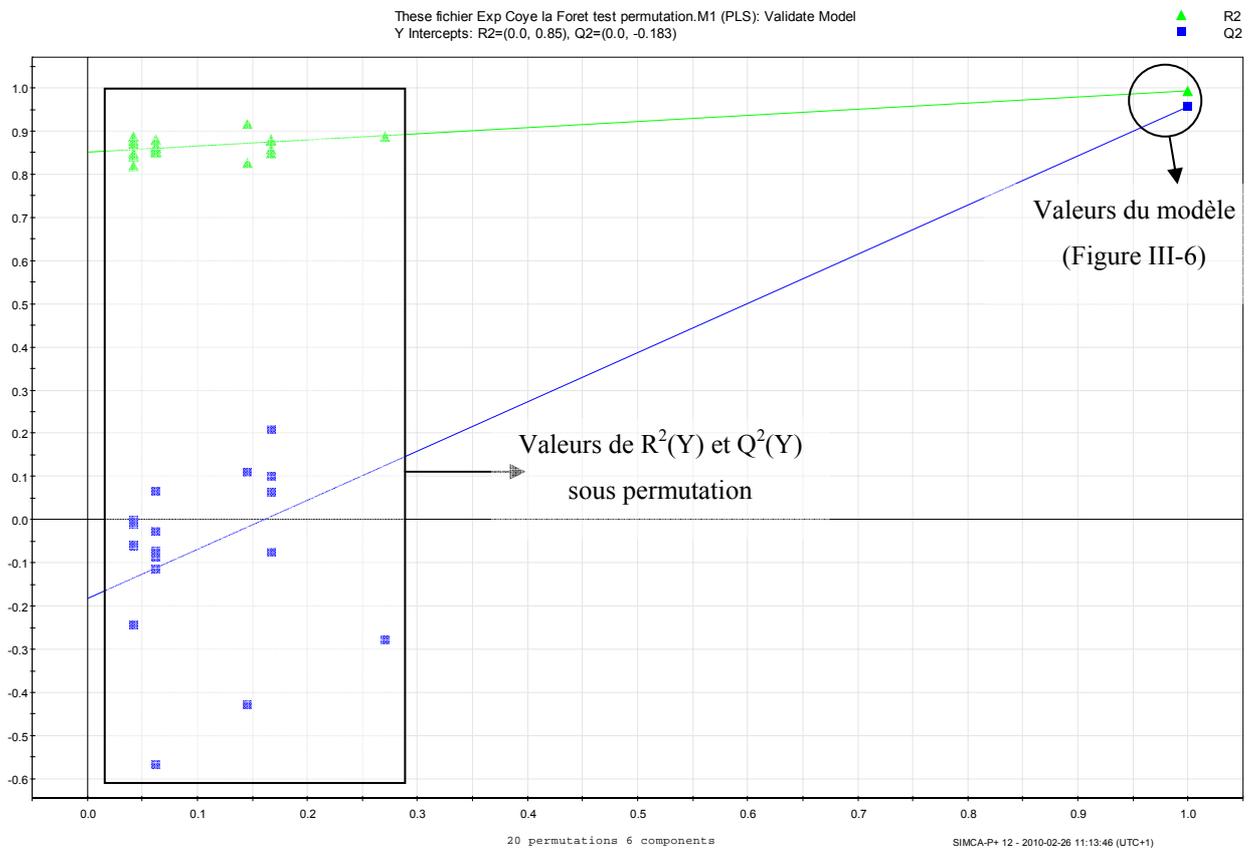


Figure III-7 : Test de permutation effectué sur l'analyse OPLS présentée en figure III-6

En effet, les facteurs de variabilité biologiques ou analytiques peuvent souvent masquer l'information recherchée, il est donc intéressant d'introduire une variable Y (dans notre cas le statut de l'animal, i.e traité ou contrôle) afin de réaliser une nouvelle analyse de type OPLS qui permet de rechercher l'information liée à la problématique (dans notre cas, différenciation d'un animal non traité et d'un animal traité à la reGH).

1.2.3.2.2. Analyse supervisée de type OPLS

Afin de diminuer l'influence des facteurs de variabilité autres que celui étudié, une variable Y est introduite dans le jeu de données grâce à une analyse supervisée de type OPLS (Orthogonal Partial Least Square).

L'analyse OPLS relie une variable Y à expliquer, dans notre cas l'appartenance de chaque observation à un groupe donné (i.e celui des urines collectées avant ou après traitement à la reGH), à un bloc de variables explicatives X, dans notre cas les signaux identifiés par XCMS. La qualité des modèles ainsi construits peut être évaluée par deux paramètres : $R^2(Y)$, qui correspond à la proportion de variance qui peut être expliquée par la variable Y, et, $Q^2(Y)$ la capacité à restituer (prédire) la variable Y.

L'OPLS réalisée sur l'ensemble des 2375 ions (Figure III-6) montre une forte discrimination entre les échantillons collectés avant et après traitement à la reGH. De plus, ces résultats confirment par rapport à l'ACP qu'il est toujours possible de discriminer les échantillons collectés 30 jours après le début de l'expérimentation. La séparation géographique des deux populations sur le graphique est associée avec une valeur élevée de $R^2(Y)=0,98$ et de $Q^2(Y)=0,92$. Le modèle se montre d'un point de vue descriptif excellent et bien meilleur que celui obtenu avec une analyse en composante principale. La validation de ce modèle constitue l'étape suivante.

1.2.3.2.3. Validation du modèle OPLS

• Par test de permutation

L'analyse OPLS présentée en Figure III-6 est fondée sur 2375 ions détectés dans les 60 échantillons analysés. Puisque le nombre d'échantillons est nettement inférieur au nombre de variables, il est donc important de vérifier que la discrimination observée sur la Figure III-6 n'est pas liée à des variables non significatives et par conséquent à un facteur chance. Un test de permutation qui consiste à réaffecter aléatoirement le statut des animaux pris en compte dans la variable Y a alors été effectué et est présenté sur la Figure III-7.

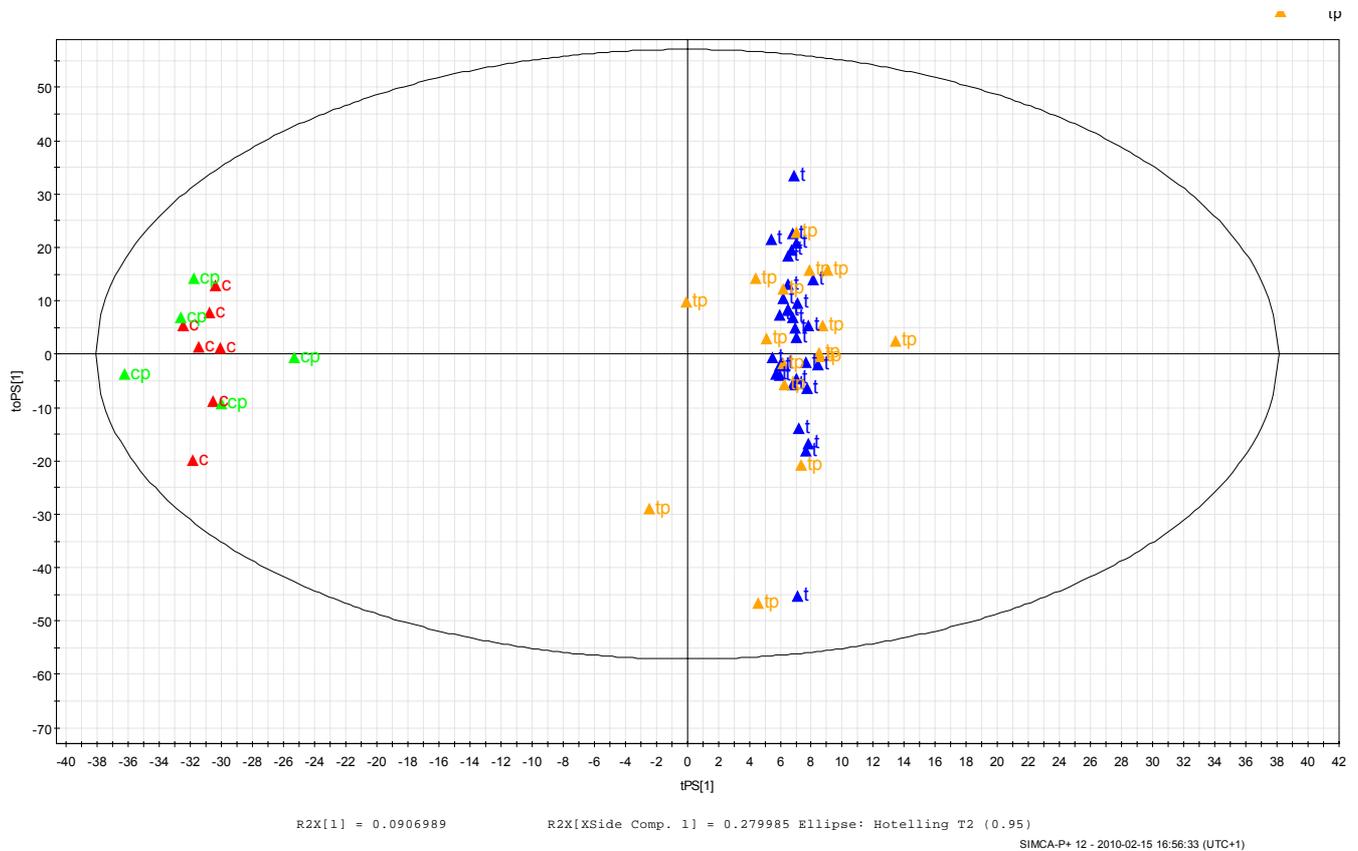


Figure III-8 : OPLS réalisée sur la base de 2375 ions formant les empreintes métaboliques urinaires de tous les jours de collecte. Les triangles rouges et bleus représentent respectivement les échantillons collectés avant et après administration de reGH du jeu d'étalonnage. Les triangles verts et jaunes représentent respectivement les échantillons collectés chez les animaux non traités et traités à la reGH du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédits par le modèle.

Les résultats indiquent clairement que les valeurs de $R^2(Y)$ et surtout de $Q^2(Y)$ deviennent plus faibles lorsque la variable Y est soumise à des permutations ($n=20$). Ils démontrent ainsi que le modèle n'est pas le résultat d'un facteur chance mais d'une réelle différence observée entre les échantillons collectés avant et après administration de reGH.

• Par validation croisée

Pour évaluer le modèle OPLS, les échantillons ont été divisés en deux jeux de données : un jeu comprenant 2/3 ($n=44$) des échantillons correspondant au jeu d'étalonnage et un jeu comprenant le tiers ($n=22$) restant correspondant au jeu de validation.

L'objectif est d'établir un modèle descriptif et prédictif sur le jeu d'étalonnage et de vérifier les performances du modèle sur le jeu de validation.

Sur la base des 2375 variables sélectionnées, le jeu d'étalonnage a été soumis à une analyse OPLS : deux composantes ont été extraites (1 prédictive+ 1 orthogonale). La Figure III-8 représente la composante prédictive et la composante orthogonale du modèle mis en place.

Pour le jeu d'étalonnage, les extraits urinaires collectés avant et après administration de reGH sont parfaitement discriminés. Les caractéristiques du modèle sont les suivants : $R^2(Y)=0,95$ et $Q^2(Y)=0,88$. Ces valeurs indiquent que le modèle restitue parfaitement la variable Y (l'appartenance de chaque échantillon au groupe des animaux non traités ou traités) et qu'il a un bon pouvoir prédictif qui se traduit par la classification sans erreur du jeu de validation. Le modèle peut donc être qualifié de pertinent sur le point de vue descriptif et prédictif.

1.2.3.2.4. Conclusions

L'utilisation d'une analyse statistique de type OPLS a permis de mettre au point un modèle chimiométrique robuste d'un point de vue descriptif et prédictif pour l'analyse métabolomique d'échantillons urinaires. Comparé à l'analyse en composante principale (ACP), ce modèle permet une meilleure discrimination des échantillons collectés avant et après administration de reGH.

Ce modèle n'a pas pour but d'être utilisé comme outil prédictif car il repose sur l'étude d'un nombre très limité d'animaux ($n=2$) mais il démontre la faisabilité d'une approche métabolomique. En effet, il conforte les choix réalisés en ce qui concerne les doses de reGH administrées, la préparation des échantillons, les prises d'empreintes par spectrométrie de masse, le traitement et les analyses de données. Cependant, cette recherche doit être étendue à une population plus élargie composée d'animaux contrôles et traités pour utiliser la métabolomique comme un outil prédictif et conforter l'intérêt d'une telle méthode pour le contrôle anti-dopage.

2. ETUDE D'UNE POPULATION CONSTITUEE DE 13 ANIMAUX

2.1. Optimisations techniques

Les travaux précédents ont permis de mettre en place les différentes étapes nécessaires à la réalisation de notre étude et ont confirmé la faisabilité d'une approche globale de type métabolomique pour la problématique associée à l'administration de reGH. En effet, les résultats ont montré qu'il était possible de souligner des différences significatives entre les profils métaboliques urinaires collectés avant et après administration de reGH à deux chevaux. Le but de ces travaux était de vérifier que la stratégie adoptée permettait de mettre en évidence des perturbations métaboliques. Cependant, aucune optimisation sur la préparation des échantillons, les conditions chromatographiques ou spectrométriques n'a été réellement effectuée. Dans l'optique d'appliquer cette stratégie à une étude de population composée d'individus contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine, une optimisation technique a été engagée.

Elle a pour but d'obtenir des empreintes métaboliques à haut débit les plus riches possibles pour lesquelles les ions d'intérêts devront présenter des exigences analytiques suffisantes pour pouvoir amorcer une étape d'élucidation structurale.

2.1.1. *Optimisation de la préparation des échantillons*

La qualité de la préparation des échantillons est un facteur important pour le succès de la procédure analytique. Elle intervient à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elle permet d'extraire les analytes des matrices complexes d'intérêt telles que le plasma et l'urine. De plus dans le cas de métabolites présentant de faibles concentrations, la technique de préparation des échantillons est une étape critique pour la détection future de ces composés par le système d'analyse.

Dans le cas d'une approche ciblée, la préparation d'échantillons doit être la plus spécifique possible afin d'obtenir la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité possibles sur les composés cibles d'intérêt présents à l'état de trace. Cependant dans le cas d'une approche métabolomique non ciblée, l'ensemble des composés à faible poids moléculaire présente un intérêt. Par conséquent, la préparation des échantillons doit être la plus simple possible.

Il n'existe pas de technique universelle et plusieurs types de préparation des échantillons peuvent être utilisés.

Tableau III-3: Liste des prélèvements utilisés pour l'optimisation de différents paramètres analytiques

Référence	Nom du cheval	Statut du cheval	Prélèvements analysés
<i>Cheval 1</i>	Lago	Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 2</i>	Isis	Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 3</i>	Longo 1	Traité	J+3, J+7, J+15, J+69
<i>Cheval 4</i>	Laius	Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 5</i>	Haxius	Traité	J+3, J+7, J+15, J+69
<i>Cheval 6</i>	Nora	Traité	J+3, J+7, J+15, J+69
<i>Cheval 7</i>	Gamin	Non Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 8</i>	Idéfix	Non Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 9</i>	Longo 2	Non Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 10</i>	Oscar	Non Traité	J+3, J+7, J+15, J+69
<i>Cheval 11</i>	Mirage	Non Traité	J-2, J+5, J+11, J+23
<i>Cheval 12</i>	Utopie	Non Traité	J+3, J+7, J+15, J+69
<i>Cheval 13</i>	Milton	Non Traité	J+3, J+7, J+15, J+69

Parmi elles, l'extraction liquide-liquide (LLE) (Wu *et al*, 2008), l'extraction sur phase solide (Idborg-Bjorkman *et al*, 2003), l'injection directe, la précipitation des protéines (Bruce *et al*, 2009) et la filtration sont les plus fréquemment employées dans les études métabolomiques.

La filtration suivie d'une étape de lyophilisation comme premier choix de préparation des échantillons nous a permis d'obtenir des résultats pertinents sur l'étude des échantillons de Coye la Forêt. Cependant, dans le but d'étendre ce choix de préparation des échantillons à une étude de population qui engendre l'analyse de plusieurs centaines d'échantillons, l'extraction sur phase solide et la filtration sans étape de lyophilisation ont été testées.

2.1.1.1. Echantillons et protocoles

L'optimisation de la préparation des échantillons a porté sur l'étude de plusieurs échantillons collectés lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les échantillons ont été choisis de telle sorte à obtenir un panel représentatif des populations contrôle et traitée à l'hormone de croissance. Les différents échantillons urinaires analysés pour chaque cheval sont répertoriés dans le Tableau III-3.

La première technique consiste à filtrer les extraits urinaires sur des filtres 10 kDa (Méthode A), la seconde méthode consiste à rajouter une étape de lyophilisation après la filtration des extraits urinaires (Méthode B), et la troisième méthode est une extraction sur phase solide peu spécifique (Méthode C). Les protocoles des trois techniques de préparation des échantillons sont décrits dans le chapitre II Matériel et Méthode.

L'ensemble des échantillons a été préparé pour chaque méthode et injecté en chromatographie liquide équipée avec un spectromètre de masse hybride Q-TOF.

2.1.1.2. Richesse des empreintes LC-HRMS

Pour mesurer la richesse des empreintes LC-HRMS obtenues avec les trois méthodes de préparation des échantillons, des blancs constitués d'eau ultra pure ont été injectés au sein de la séquence HPLC. Le retraitement des données par le logiciel XCMS repose sur la comparaison des empreintes urinaires de l'ensemble des 52 échantillons urinaires avec les empreintes des blancs (n=40).

Tableau III-4 : Richesse des empreintes métabolomiques obtenus pour les trois techniques de préparation des échantillons

	Nombre d'ions constituant les empreintes
Filtration sans étape de lyophilisation (Méthode A)	6511
Filtration suivie d'une étape de lyophilisation (Méthode B)	6681
Cartouche SPE Oasis (Méthode C)	5716

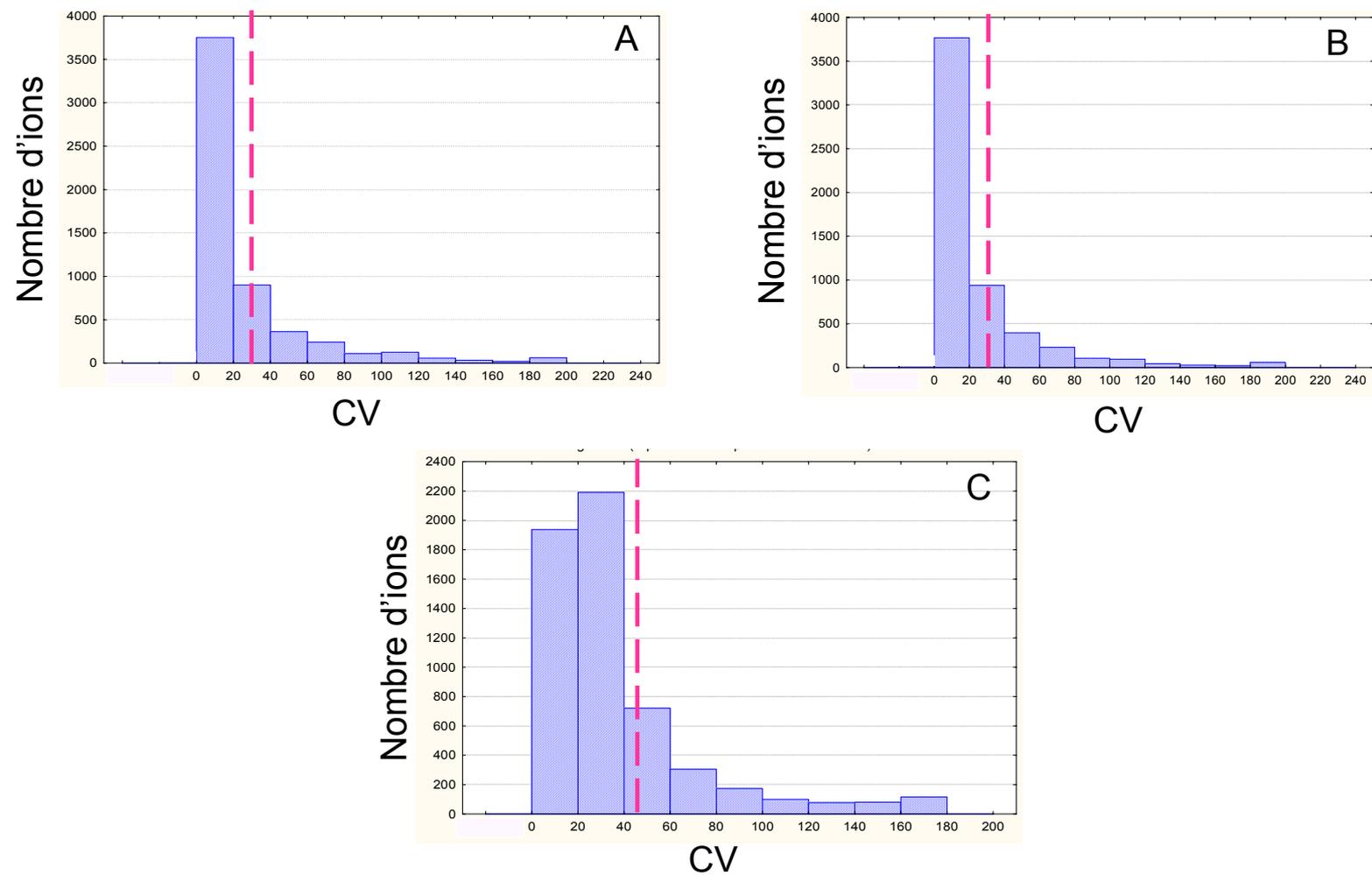


Figure III-9 : Histogrammes représentant les coefficients de variation obtenus pour chaque technique de préparation des échantillons. (A) Filtration sur des membranes de coupure de seuil 10kDa, (B) Filtration suivie d'une étape de lyophilisation, (C) Extraction sur phase Oasis HLB.

Les résultats du Tableau III-4 montrent que chacune des méthodes testées permet de générer des empreintes riches (>5000), néanmoins, le nombre d'ions constituant les empreintes métabolomiques est plus élevé pour l'étape de filtration suivie d'une étape de lyophilisation (Méthode B). La richesse des empreintes ne peut pas être l'unique facteur qui caractérise la pertinence d'une technique de préparation des échantillons, il est également important d'évaluer sa répétabilité.

2.1.1.3. Répétabilité

Afin d'évaluer la répétabilité de chaque technique de préparation des échantillons, un même extrait urinaire a été préparé 5 fois, pour chacune des méthodes, chaque extrait a été injecté sur le LC-Q-TOF. Les données LC-HRMS ont ensuite été retraitées par le logiciel XCMS. Des calculs de coefficient de variation (CV) fondés sur les cinq injections du même échantillon ont alors été effectués sur la totalité des ions extraits par le logiciel. Les résultats sont présentés sur la Figure III-9. Pour les Méthodes A et B, les coefficients de variation sont pour la majorité des ions inférieurs à 35 % (trait en pointillé rose) contrairement à la méthode C où les coefficients de variation sont pour la majorité des ions inférieurs à 45 %. La méthode de préparation fondée sur une extraction sur phase solide présente donc la plus mauvaise répétabilité. La variabilité due à cette méthode pourrait alors masquer une variation des intensités des ions d'intérêt. La méthode C a alors été exclue.

Les méthodes A et B diffèrent seulement par une étape de lyophilisation. Cependant, cette étape représente un coût élevé en appareillage et temps qui pourrait rendre difficile la réalisation d'analyses à haut débit en routine. Il est donc important de savoir si le nombre plus élevé d'ions constituant les empreintes obtenues pour la méthode B permet d'extraire des ions d'intérêt supplémentaires comparé à la méthode A. Des analyses statistiques ont alors été effectuées dans le but de comparer les ions extraits pour les méthodes A et B.

2.1.1.4. Comparaison des ions obtenus par les Méthodes A et B

Une étude approfondie des ions constituant les empreintes urinaires obtenues après une préparation des échantillons par la méthode A et la méthode B a été effectuée. Cette étude révèle que 95% des ions sont communs aux deux méthodes. Les 5% d'ions restant sont pour la plupart des ions uniquement extraits par la méthode B.

Tableau III-5: Caractéristiques des colonnes Uptisphere C18 HDO, Uptisphere Strategy et Luna HILIC

Caractéristiques	Uptisphere C18 HDO (15cm * 0,2cm; 3µm)	Uptisphere Strategy NEC (10cm * 0,2cm; 3µm)	Luna HILIC (150cm * 0,2cm; 3.5µm)
Taille des particules (µm)	2.2	3	3.5
Teneur en carbone total (%)	17	18	
Surface (m ² /g)	320	425	200
Diamètre moyen des pores(A)	120	100	200
Gamme de pH	1.5-7	1.5-7	1.5-8

La totalité de ces 5% d'ions restants (150 ions) possèdent des p-value très inférieures à 0,05 et un examen visuel des chromatogrammes d'ions extraits a révélé qu'il s'agissait souvent d'ions chromatographiquement mal résolus. Leur intérêt en tant que potentiel biomarqueur est donc très peu probable.

2.1.1.5. Conclusions

L'intégralité de cette étude révèle que la méthode de préparation des échantillons par filtration sur des filtres présentant des coupures de seuil de 10 kDa avec ou sans étape de lyophilisation permet d'obtenir des empreintes métabolomiques riches et pour lesquelles la répétabilité est très acceptable. Une étude approfondie a montré que les deux méthodes permettent d'extraire à plus de 95% les mêmes ions. Les 5% d'ions restants sont des ions uniquement extraits par la méthode B. Pour la discrimination des animaux non traités et traités à la reGH, leur intérêt semble limité en raison de leur mauvaise résolution chromatographique et faible degré de significativité accordé. Il existe donc peu de différences entre les méthodes de préparation A et B en terme de composition des empreintes métabolomiques urinaires. Afin de diminuer le temps et le coût de l'analyse, la filtration sans étape de lyophilisation a donc été choisie comme préparation des échantillons pour l'étude future des échantillons provenant de l'expérimentation de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

2.1.2. Optimisation de la chromatographie

Dans le but de sélectionner une phase stationnaire permettant la détection d'un nombre maximum de métabolites tout en respectant des critères de performance chromatographique et un temps d'analyse respectable, trois colonnes ont été testées. Il s'agit des colonnes Uptisphere C18, Uptisphere Strategy NEC et Luna HILIC dont les caractéristiques concernant la taille des particules, la surface, et la teneur en métal, sont présentées dans le Tableau III-5. Ce choix repose sur les données bibliographiques qui montrent que la plupart des applications LC-HRMS dans le domaine de la métabolomique reposent sur l'utilisation de colonnes conventionnelles avec un diamètre interne compris entre 2,1- 4,6 mm, une longueur de colonne entre 5 et 25 cm et une granulométrie entre 3 et 5 μm (Lenz *et al*, 2004 ; Wagner *et al*, 2006). La plupart des phases stationnaires employées sont des phases inverses greffées par des chaînes octadécyle mais des groupements polaires de type carbonyle ou amide sont de plus en plus insérés afin d'améliorer la rétention des composés polaires. En parallèle, les phases de type HILIC (Hydrophilic interaction chromatographic) sont de plus en plus utilisées pour l'analyse des composés polaires.

Tableau III-6 : Nombre d'ions détectés après retraitement des données LC-MS obtenues avec trois phases chromatographiques différentes.

	Nombre d'ions détectés par le logiciel XCMS
Colonne Uptisphere C18 HDO (150*2 mm; 3µm)	2088
Colonne Uptisphere Strategy NEC (100*2 mm; 2,2 µm)	6506
Colonne Luna HILIC (150*2 mm; 3µm)	2280

Tableau III-7 : Calcul des performances chromatographiques obtenus pour l'analyse de 4 composés ciblés

	Uptisphere C18 HDO			Uptisphere Strategy NEC			Luna HILIC		
	<i>Tr (min)</i>	<i>Largeur à mi-hauteur (min)</i>	<i>Nombre plateaux théoriques</i>	<i>Tr (min)</i>	<i>Largeur à mi-hauteur (min)</i>	<i>Nombre plateaux théoriques</i>	<i>Tr (min)</i>	<i>Largeur à mi-hauteur (min)</i>	<i>Nombre plateaux théoriques</i>
Acétylcarnitine	2,80	0,12	3011	1,76	0,08	2681	4,6	0,22	2420
L-carnitine	2,05	0,14	1184	1,46	0,12	808	3,00	0,39	328
Glucose	6,64	0,14	12454	3,74	0,08	12108	5,60	0,54	654
Delta-12-Prostaglandine J2	21,06	0,21	55621	9,72	0,08	81872	Bruit de fond		

2.1.2.1. Comparaison de la richesse des empreintes

Les échantillons présentés dans le Tableau III-3 (n=52) ont été préparés par filtration puis injectés sur chaque phase stationnaire. Les prises d'empreintes acquises sur le Q-TOF ont ensuite été retraitées par le logiciel XCMS de telle sorte à pouvoir comparer les empreintes des animaux contrôlés versus celles des animaux traités.

Le nombre d'ions détectés après retraitement de l'ensemble des données LC-HRMS est présenté dans le Tableau III-6. Ce tableau montre que le nombre d'ions détectés est plus élevé lorsque les analyses sont réalisées à l'aide d'une colonne Uptisphere NEC et démontre ainsi que les empreintes urinaires sont plus riches sur ce type de phase inverse. La richesse des empreintes métaboliques urinaires peut être considérée comme un premier indicateur de la capacité d'une colonne à séparer des composés d'un mélange complexe. Cependant, l'efficacité de cette colonne doit être calculée en complément afin de s'assurer et de valider son intérêt.

2.1.2.2. Calcul des performances chromatographiques

Les performances chromatographiques de chaque colonne ont été calculées en se basant sur l'analyse d'un seul échantillon urinaire. L'échantillon a été choisi au hasard et injecté 10 fois sur le système LC-Q-TOF. Parmi les nombreuses molécules constituant les empreintes, 4 composés (le glucose, la L-carnitine, l'acétylcarnitine et la delta-12-prostaglandine) ont pu être identifiés grâce à l'injection de standards qui ont permis de vérifier la masse exacte, le temps de rétention ainsi que la formule brute.

Les résultats, spécifiques de chaque colonne, obtenus pour chaque composé sont présentés dans le Tableau III-7. Ils montrent que le nombre de plateaux théoriques calculés pour les quatre composés recherchés est équivalent avec l'utilisation d'une colonne Uptisphere C18 HDO et d'une colonne Strategy NEC. Ces travaux démontrent ainsi que la résolution chromatographique sur la colonne Uptisphere Strategy NEC est maintenue bien que le temps d'analyse soit diminué par 3. Par conséquent, elle s'avère être la colonne chromatographique la plus intéressante en terme de temps d'analyse, de nombre d'ions séparés, et de résolution chromatographique.

La phase stationnaire HILIC a été testée dans le but principal d'améliorer la rétention des composés polaires.

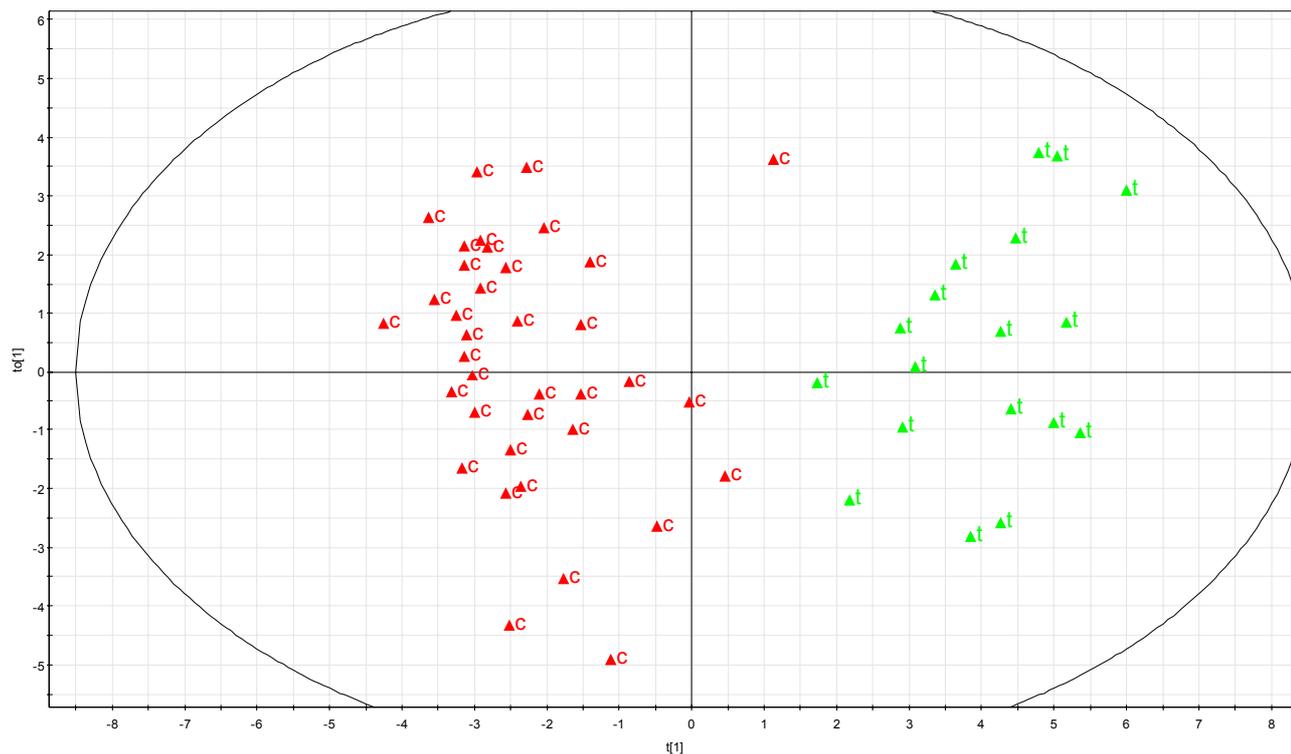


Figure III-10 : Analyse OPLS des empreintes plasmatiques de 56 échantillons analysés en mode d'ionisation négatif. Les échantillons provenant des animaux contrôles et traités à la reGH sont respectivement notés sous le sigle c et t

Le nombre de plateaux théoriques calculés s'avère très faible comparé aux deux autres colonnes. Ce résultat peut paraître surprenant puisque l'HILIC est une colonne qui a pour but d'améliorer la rétention des composés polaires et a fortiori le nombre de plateaux théoriques. Cependant, le nombre de plateaux théoriques calculé pour les standards préparés dans l'éthanol est largement supérieur (multiplié par 5) par rapport aux molécules extraites de la matrice urinaire. Ce résultat pourrait alors être expliqué par le fait que les performances chromatographiques sont fortement altérées par la matrice biologique.

2.1.2.3. Conclusions

La colonne Uptisphere Strategy NEC présente les meilleures performances en terme de temps d'analyse et de résolution chromatographique pour l'analyse du glucose, de la L-carnitine, l'acétylcarnitine et la delta-12 prostaglandine. Les excellents résultats obtenus pour ces quatre composés aux polarités et propriétés physico-chimiques différentes suggèrent que cette colonne est appropriée pour une analyse métabolomique non ciblée.

2.1.3. Comparaison des modes d'ionisation positif et négatif

Les échantillons plasmatiques (n=52) et urinaires (n=52) présentés dans le tableau III-3 ont été préparés par filtration sur des membranes de seuil de coupure 10kDa puis analysés par LC-HRMS en mode d'ionisation positif et négatif. Les échantillons ont ensuite été retraités par le logiciel XCMS.

Il s'avère que le nombre d'ions constituant les empreintes métabolomiques est plus faible en mode d'ionisation négatif. En effet, le rapport entre le nombre d'ions composant les empreintes métabolomiques en mode d'ionisation négatif par rapport au mode d'ionisation positif est d'environ 2/3. Les métabolites extraits seraient alors plus facilement ionisables en mode d'ionisation electrospray positif.

Une étude approfondie des empreintes obtenues en mode d'ionisation négatif et positif démontre la possibilité de mettre en évidence un nombre relativement élevé d'ions répondant à des critères statistiques tels qu'une p-value inférieure à 0,05, un ratio compris entre 0,66 et 1,5, et des résolutions chromatographiques excellentes. Ainsi, la Figure III-10 représente une OPLS fondée sur les intensités MS de 86 ions présents dans les empreintes plasmatiques analysés en mode d'ionisation négatif de chevaux contrôles et traités à la reGH.

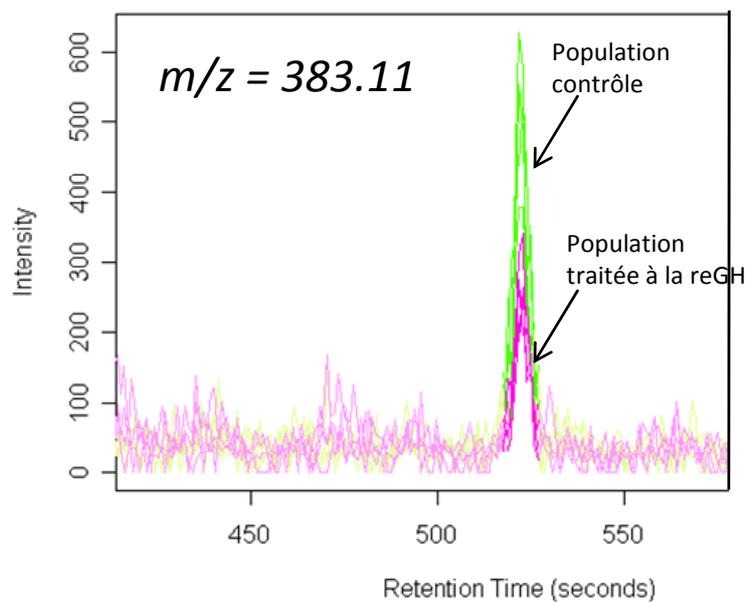


Figure III-11 : Chromatogramme d'un ion statistiquement pertinent extrait des empreintes plasmatiques en mode d'ionisation ESI-.

L'ensemble de ces ions a été sélectionné grâce à l'application des critères énoncés ci-dessus. Cette analyse montre une séparation remarquable entre les échantillons collectés chez la population contrôle et traitée à la reGH avec des valeurs de $R^2(Y)=0,82$ et $Q^2(Y)=0,72$. Cependant, les ions intéressants pour cette étude en mode d'ionisation négatif ont des intensités relativement faibles (Figure III-11). Le même phénomène a été observé pour l'analyse des extraits urinaires en mode d'ionisation négatif. Dans l'optique d'envisager une étape d'élucidation structurale sur ces ions d'intérêt, une purification supplémentaire devra être effectuée avant d'entamer toute étape de fragmentation MS-MS.

Pour l'ensemble de ces raisons, l'ionisation en mode positif pour la mise au point de modèles chimiométriques descriptifs et prédictifs a donc été choisie préférentiellement au mode d'ionisation négatif.

2.1.4. Comparaison des performances de trois analyseurs

Comme nous l'avons vu précédemment, la diversité des métabolites en termes de structure chimique, polarité et concentration empêche l'analyse du métabolome par une seule méthode. Il est donc important de réaliser plusieurs séries de tests pour les choix de préparation des échantillons, de séparation chromatographique mais également des paramètres spectrométriques dans le but de sélectionner les conditions les plus adaptées à notre étude. Dans ce contexte, les empreintes métabolomiques urinaires obtenus sur trois appareils de spectrométrie de masse : LTQ-OrbitrapTM, MicroTOF et MicroTOF-Q-II ont été comparées.

2.1.4.1. Echantillons, préparation et conditions chromatographiques

Plusieurs échantillons collectés lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ont été analysés de telle sorte à obtenir un panel représentatif des populations contrôle et traitée à l'hormone de croissance. Les différents échantillons urinaires analysés pour chaque cheval sont répertoriés dans le Tableau III-3.

Les échantillons ont été filtrés sur des membranes de coupure de seuil 10kDa avec une prise d'essai de 400 μ L. Ils ont ensuite été congelés à -20°C jusqu'à leur analyse. La séparation chromatographique a été effectuée avec la colonne Uptisphere C18 HDO dont le gradient a été fixé à une durée de 1 heure.

Ils ont été ensuite analysés à l'aide de trois appareils de spectrométrie de masse : LTQ-OrbitrapTM, MicroTOF et MicroTOF-Q-II. Les données brutes LC-MS ont été retraitées par le logiciel XCMS dont certains paramètres ont été ajustés en fonction de l'analyseur utilisé.

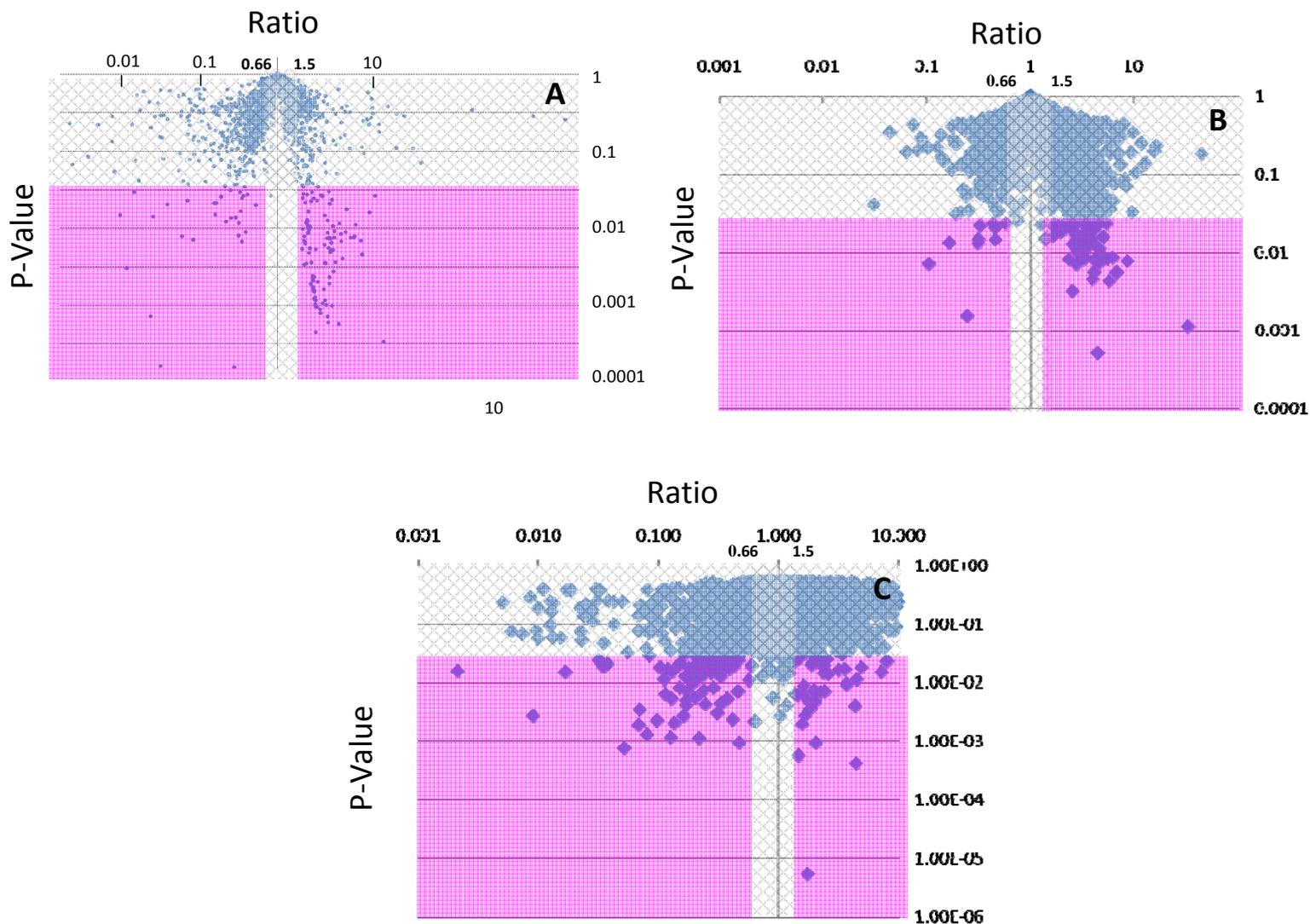


Figure III-12 : Representation en volcano-plot (pour le jour de prélèvement J+7) de la p-value et du ratio des ions obtenus après le retraitement par le logiciel XCMS des empreintes urinaires acquises sur les appareil de spectrométrie de masse LTQ-OrbitrapTM (A), MicroTOF (B), MicroTOF-Q-II (C).

2.1.4.2. Mesure de l'effet global de l'administration de reGH sur le métabolisme des chevaux

Les trois jeux de données correspondant aux analyses effectuées sur les trois spectromètres de masse ont été retraités par le logiciel XCMS. Une matrice de x colonnes (nombre d'ions extraits par le logiciel XCMS) et y lignes (nombre d'échantillons ou empreintes) a été générée. Les 52 empreintes proviennent des échantillons collectés à J₋₂, J₊₃, J₊₅, J₊₇, J₊₁₁, J₊₁₅, J₊₂₃ et J₊₆₉. Le retraitement des données LC-HRMS a alors permis d'extraire 1896, 2856, et 4450 ions des empreintes métabolomiques urinaires obtenues respectivement sur le LTQ-OrbitrapTM, MicroTOF, et MicroTOF-Q-II. Le nombre d'ions extraits à partir des données LC-HRMS acquises sur le spectromètre de masse hybride Q-TOF est largement plus élevé comparé aux deux autres appareils. Même si la richesse des empreintes est un indicateur intéressant, il est important d'évaluer l'implication de ces ions extraits dans le traitement à l'hormone de croissance recombinante équine.

Pour les trois appareils de masse, des graphiques « volcano-plot » ont été réalisés (Figure III-12). Ils consistent à représenter pour chaque ion constituant les empreintes d'un jour donné (J₊₇), sa valeur de ratio (en abscisse) et son degré de significativité statistique (p-value, en ordonnée). Cette rapide visualisation permet d'avoir accès à une représentation des perturbations métabolomiques entraînées par l'administration de reGH. Les ions qui apparaissent les plus intéressants en vue de discriminer la population non traitée de la population traitée à la reGH se situent dans la partie en rose du graphique délimitée par les limites d'acceptabilité à savoir la p-value fixée à 0,05 et des valeurs de ratio inférieures à 0,66 ou supérieures à 1,5.

Les trois graphiques montrent qu'un nombre élevé d'ions répond à ces critères. Les résultats démontrent alors qu'il est possible de mettre en évidence une perturbation du métabolome global des animaux par les trois spectromètres de masse utilisés.

Une étude plus approfondie montre qu'exactement 67, 133, et 174 ions se révèlent pertinents d'un point de vue statistique pour les échantillons collectés à J₊₇ (Figure III-12) et correspondant respectivement aux analyses effectuées sur le LTQ-OrbitrapTM, MicroTOF et MicroTOF-Q-II. L'étude des autres jours de collecte aboutit à la même conclusion à savoir que les empreintes urinaires obtenues sur le LC-Q-TOF sont d'une part les plus riches en terme de nombre d'ions détectés mais également celles qui possèdent le plus d'ions pertinents d'un point de vue statistique.

2.1.4.3. Analyses statistiques en vue de la création de modèles statistiques et descriptifs

Le retraitement des empreintes LC-HRMS acquises sur le LC-LTQ-OrbitrapTM, LC-TOF, et LC-Q-TOF a permis d'extraire respectivement 1896, 2856, et 4450 ions. Une recherche des ions répondant aux critères statistiques énoncés précédemment a été effectuée pour chaque jour de collecte étudié. Le regroupement de ces ions a permis de sélectionner exactement 180, 350 et 600 ions statistiquement pertinents pour les jeux de données provenant des analyses réalisées sur le LC-LTQ-OrbitrapTM, LC-TOF et LC-Q-TOF. Ces ions ont tout d'abord été étudiés en analyse en composante principale (ACP). Cette analyse n'a pas permis d'extraire l'information liée à l'administration de reGH et ainsi d'observer une discrimination entre les échantillons collectés chez des animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine (données non montrées).

Les ions extraits pour chaque jeu de données ont alors été soumis à une analyse statistique OPLS. L'introduction d'une variable Y permet alors d'observer pour les trois analyses une parfaite discrimination entre les deux populations (contrôle versus traité). Les valeurs caractéristiques obtenues sont $R^2(Y) = 0,72 ; 0,73 ; 0,94$ et $Q^2(Y) = 0,28 ; 0,51 ; 0,54$ pour les analyses effectuées respectivement sur les spectromètres LTQ-OrbitrapTM, MicroTOF, et microTOF-Q-II.

Les valeurs de $R^2(Y)$ sont acceptables pour les trois modèles et se traduisent par la séparation visuelle des deux populations étudiées. Les valeurs prédictives de $Q^2(Y)$ sont plus faibles mais peuvent être expliquées par le fait que les modèles reposent sur un nombre d'échantillons relativement peu élevé ($n=52$). En effet, un modèle ne peut permettre la prédiction de nouveaux échantillons que s'il est représentatif d'une population totale.

En l'occurrence, le nombre d'échantillons ainsi que le nombre d'individus est trop faible pour pouvoir prétendre à des valeurs de $Q^2(Y)$ élevées.

Cependant, les résultats obtenus montrent que les valeurs de $R^2(Y)$ sont acceptables pour les trois types d'analyse et démontrent ainsi que les données obtenues avec les trois types d'appareillage permettent la création de modèles chimiométriques corrects d'un point de vue descriptif. Le pouvoir descriptif du modèle fondé sur les intensités MS des ions détectés par analyse LC-Q-TOF peut même être qualifié d'excellent avec une valeur de $R^2(Y)=0,943$. Quant aux valeurs de $Q^2(Y)$, elles révèlent que le pouvoir prédictif est plus élevé dans le cas d'analyses effectuées à l'aide d'un spectromètre équipé d'un TOF ou d'un Q-TOF. Ces résultats sont certainement liés aux valeurs des intensités MS des ions qui participent fortement à la discrimination des deux populations.

D'une part, les ions détectés avec un analyseur de type TOF ou Q-TOF sont plus nombreux que ceux détectés avec un analyseur LTQ-Orbitrap™. D'autre part, une étude approfondie sur la nature des ions a révélé que 95% des ions détectés à l'aide d'un analyseur TOF et Q-TOF sont communs alors que seulement 15% d'ions communs ont pu être mis en évidence entre un analyseur LTQ-Orbitrap™ et Q-TOF. Les ions qui participent à la discrimination des deux populations, dans le cas d'analyses effectuées sur un appareillage de type LC-LTQ-Orbitrap™ et LC-TOF ou Q-TOF, sont donc très probablement différents de par leur nature et propriétés physico-chimiques. Par conséquent, selon leurs concentrations, propriétés et variations au cours du traitement, le pouvoir prédictif ne sera pas le même.

2.1.4.4. Conclusions

Ces résultats démontrent la possibilité de mettre en place des modèles métabolomiques fiables indépendamment du spectromètre de masse utilisé. Cependant, dans le cas particulier de cette étude, les résultats obtenus sur un système LC-Q-TOF et LC-TOF permettant la détection d'un nombre important de biomarqueurs statistiquement pertinents ont conduit à privilégier ce type d'instrument. De plus les modèles métabolomiques fondés sur la détection de ces ions se sont avérés excellents d'un point de vue descriptif et prédictif. L'ensemble de ces résultats mais également sa disponibilité et la possibilité de réaliser des études de fragmentation, nous a amené à continuer nos analyses sur un LC-Q-TOF pour l'étude métabolomique d'une population traitée à l'hormone de croissance.

2.1.5. Conservation des échantillons

L'ensemble des échantillons urinaires et plasmatiques collectés au cours de l'expérimentation a été congelé à -20°C jusqu'à analyse. Une attention particulière a été portée au nombre de congélation-décongélation subi à chaque échantillon. La stabilité des composés au bout de trois cycles de congélation-décongélation a été étudiée sur un même échantillon urinaire et plasmatique. Le traitement des données des trois chromatogrammes (un pour chaque cycle de congélation-décongélation) obtenus pour chaque échantillon a été effectué à l'aide du logiciel XCMS. L'application d'un test de bilarité a permis de montrer que moins de 5 % des variables sont instables sur un cycle de congélation-décongélation.

Les empreintes chromatographiques conservent le même aspect suivant les cycles. De plus, l'examen des rapports d'intensité des masses entre les différents cycles n'a pas mis en évidence des problèmes liés à la stabilité. Les composés sont dans l'ensemble stables sur les différents cycles de congélation-décongélation mais nous avons décidé de ne pas excéder 3 cycles.

2.2. Application de la stratégie aux 13 chevaux de l'expérimentation de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

La stratégie analytique développée sur deux animaux d'expérimentation nous a permis de démontrer la faisabilité et la pertinence d'une approche métabolomique appliquée à la mise en évidence d'un traitement de l'hormone de croissance recombinante équine.

Puis, une optimisation de la préparation des échantillons, des conditions chromatographiques et spectrométriques nous a permis sur un nombre d'échantillons représentatif de la population non traitée et traitée à la reGH (n=52) de choisir les paramètres les plus favorables à la détection d'un grand nombre de métabolites. Le but d'une telle démarche était de mettre en évidence un maximum de signaux spectrométriques correspondant à de potentiels biomarqueurs et autorisant la discrimination d'échantillons traités à la reGH de ceux d'animaux témoins.

Les travaux menés dans cette partie portent sur l'étude des échantillons urinaires et plasmatiques collectés sur les animaux contrôles et traités à la reGH lors de l'expérimentation conduite au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Ils sont axés principalement sur le retraitement et l'analyse des empreintes métabolomiques et ont pour but la mise en place de modèles chimiométriques capables de discriminer des individus traités à l'hormone de croissance sur la base de la détection de candidats biomarqueurs.

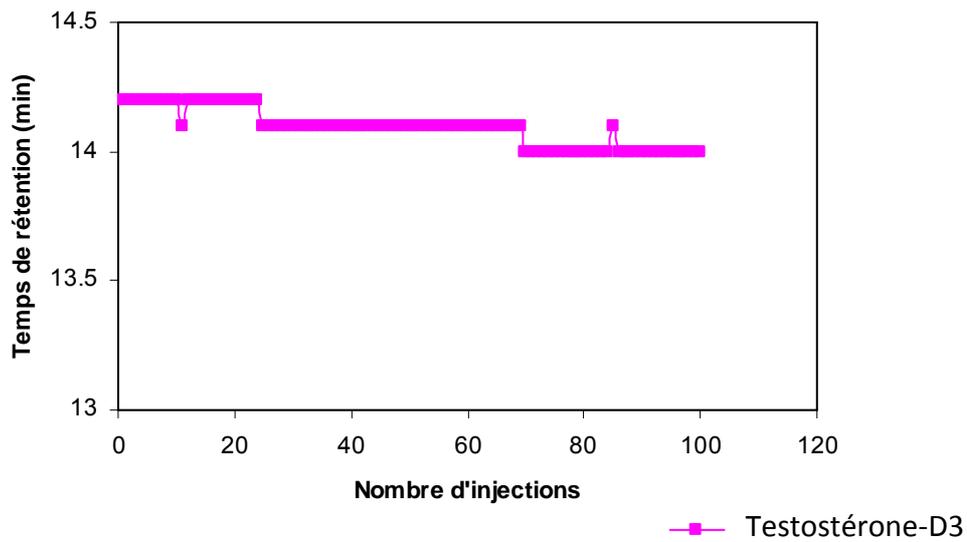


Figure III-13 : Evolution des temps de rétention de la Testostérone-D3 au cours de 100 injections

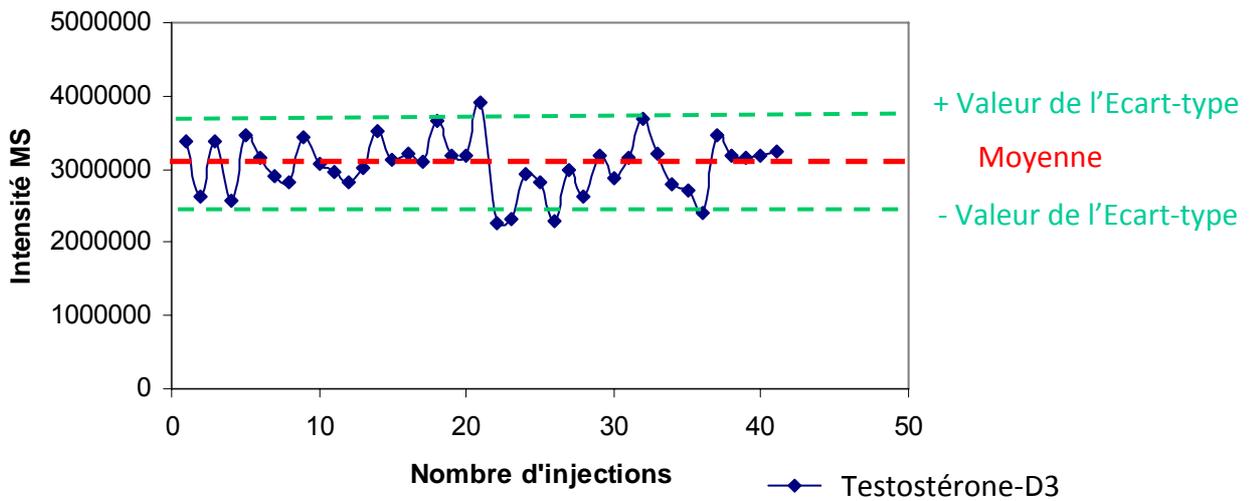


Figure III-14 : Evolution des intensités MS de la Testostérone-D3 au cours de 40 injections

2.2.1. Etude des extraits urinaires

2.2.1.1. Empreintes LC-HRMS

2.2.1.1.1. Qualités des données acquises

Si dans le cadre d'analyses ciblées conventionnelles, le contrôle qualité des données est effectuée par l'ajout d'étalons internes spécifiques, ce type d'approche est plus difficile dans le cadre d'analyses métabolomiques où les échantillons contiennent jusqu'à 10 000 composés aux propriétés physico-chimiques et concentrations très différentes. Il est cependant très important de contrôler la qualité des données outre que par l'ajout d'étalons externes.

Des étalons externes : la testostérone-D3 ($m/z = 291,23$, $T_r=9,31$ min) et la glucuronide-testostérone-D3 ($m/z= 467,27$, $7,56$ min) ont été ajoutés dans chaque extrait avant les analyses LC-HRMS. Ils ont pour but de s'assurer de la qualité de la mesure en ce qui concerne l'évolution du temps de rétention, l'écart à la masse exacte et la variation des intensités MS. L'évolution du temps de rétention est relativement stable au cours des injections (dérive inférieure à 2% par rapport à la valeur moyenne). Un exemple de déviation du temps de rétention de la testostérone-D3 au cours d'une séquence d'injection est donné en Figure III-13. La Figure III-14 illustre l'abondance de l'étalon externe testostérone-D3 au cours de 40 injections au sein d'une même séquence. Elle démontre que les performances de l'appareil fluctuent peu au cours du temps puisque la quasi-totalité des intensités MS relevées se situent entre la moyenne plus ou moins la valeur de l'écart type. Enfin, la Figure III-15 représente l'écart à la masse des étalons externes au cours des injections. Aucune déviation significative n'est observée.

De surcroît, afin de garantir la qualité des données, des pools de contrôle qualité (PQC) ont été injectés au sein de chaque séquence. Pour cela, les extraits urinaires ont été divisés en deux groupes, ceux appartenant à la population non traitée et ceux appartenant à la population traitée à la reGH. Vingt μL des extraits urinaires de chaque population ont été mélangés dans un même aliquot. Les deux aliquots ont ensuite été injectés au hasard en début, milieu et fin de chaque séquence. La Figure III-16 représente une analyse en composante principale des profils métabolomiques urinaires de 150 échantillons urinaires collectés chez des animaux contrôles (c) et traités à la reGH (t) ainsi que les pools.

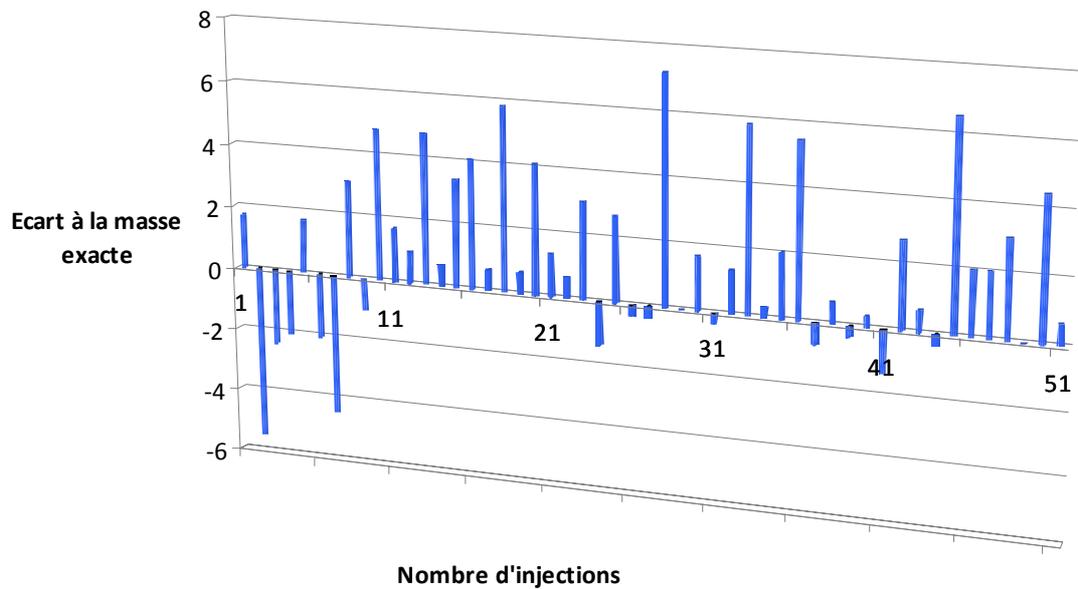


Figure III-15 : Différence entre la masse exacte théorique et la masse mesurée pour la D3-testostérone utilisé comme étalon externe.

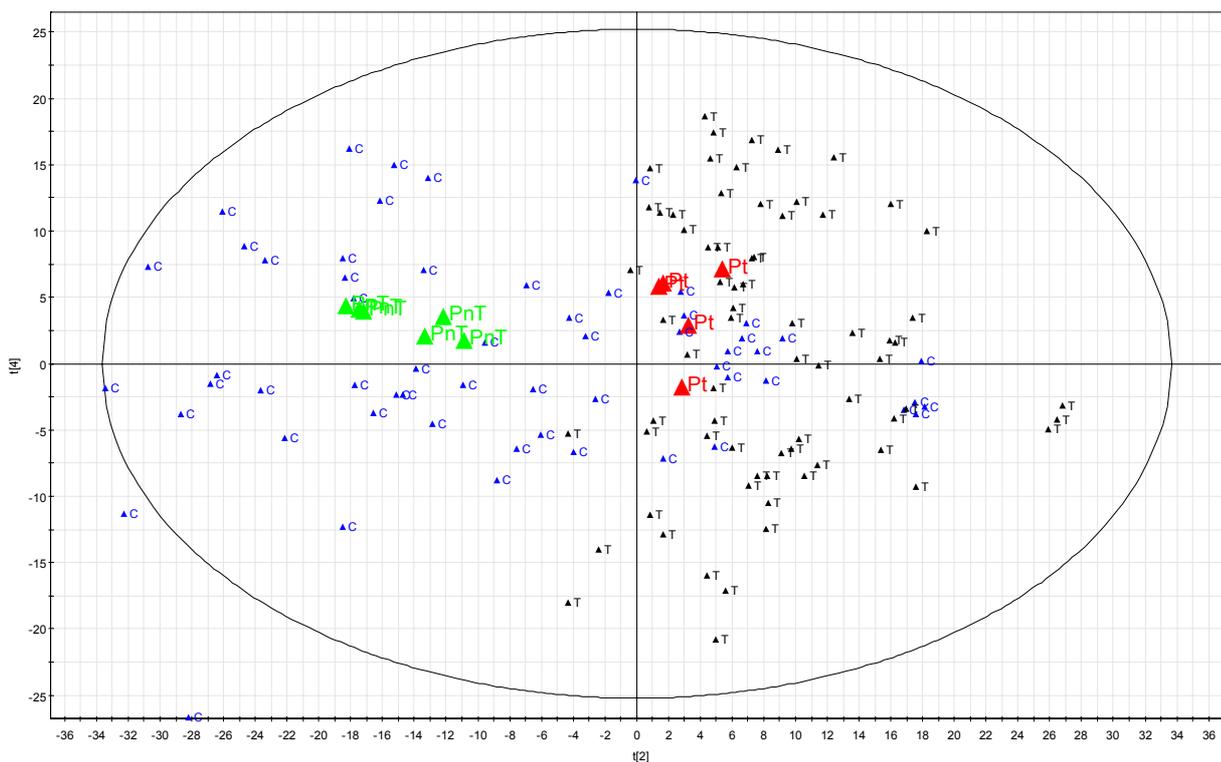


Figure III-16 : Analyse en composante principale de 150 échantillons biologiques collectés chez des animaux contrôles (c) et traités à la reGH (t) et de 12 échantillons de contrôles qualité (6 pools provenant de la population contrôlée (PnT) et 6 pools provenant de la population traitée (PT)).

Les 12 échantillons de « contrôle qualité » sont repartis en 6 échantillons provenant des pools effectués sur la population contrôle et 6 échantillons provenant des pools de la population traitée à la reGH. Les données ont été normalisées par centrage et pondération par l'écart-type (UV). On peut noter que les échantillons de chaque contrôle qualité sont regroupés au sein de chaque population. En effet, les PQC notés PnT sont regroupés au sein de la population contrôle (c) et les PQC notés PT sont regroupés au sein de la population traitée (t).

Cette figure illustre que la variabilité due aux échantillons biologiques est supérieure à la variabilité liée au système analytique. Ce résultat démontre qu'une confiance peut être accordée aux données qui sont acquises.

2.2.1.2. Retraitement et analyse des données

L'ensemble des extraits urinaires collectés (n=150) au cours de l'expérimentation, de J₋₂ à J₊₆₉, sur des chevaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine a été analysé en vue d'établir des empreintes métabolomiques urinaires. Les données brutes ont été déconvoluées par le logiciel XCMS de telle sorte à comparer les empreintes provenant des animaux contrôles et traités pour chaque jour de collecte. Cette étape a permis la détection de 4877 ions constituant les 150 empreintes métabolomiques urinaires réalisées.

L'objectif des étapes de retraitement et des analyses de données est de mettre en place un modèle statistique descriptif et prédictif, basé sur les différents signaux spectrométriques extraits par le logiciel XCMS et permettant de discriminer des urines provenant des chevaux non traités de celles des chevaux traités.

Les analyses réalisées sont des analyses de type multivariées, indispensables pour l'extraction et la visualisation de l'information utile contenue dans ce type de vaste ensemble de données.

2.2.1.2.1 Analyse en composante principale

Cette analyse appartient à la famille des analyses factorielles. Elle a pour but de réduire la dimensionnalité d'une étude tout en étant capable de restituer une grande partie de l'information. Toutes ces méthodes effectuent automatiquement un travail en cherchant dans l'espace initiale à haute dimensionnalité, des variables combinées que l'on appellera axe (ou composante) qui vont créer le sous-espace le plus représentatif. De cette manière l'analyse en composante principale va synthétiser l'information contenue dans notre matrice X constituée de 150 lignes (nombre d'empreintes urinaires métaboliques) et 4877 colonnes (nombre d'ions constituant les empreintes).

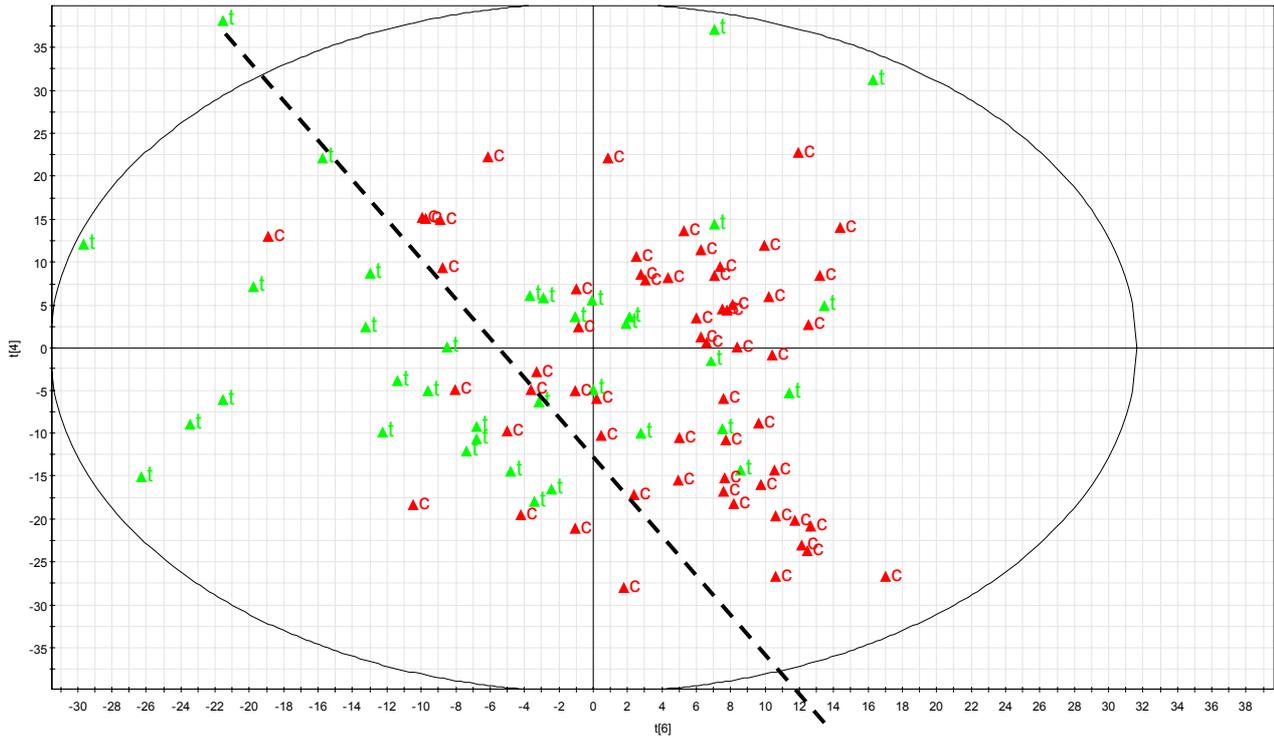


Figure III-17 : Analyse en composante principale effectuée sur les 4877 ions extraits lors du retraitement des empreintes métabolomiques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

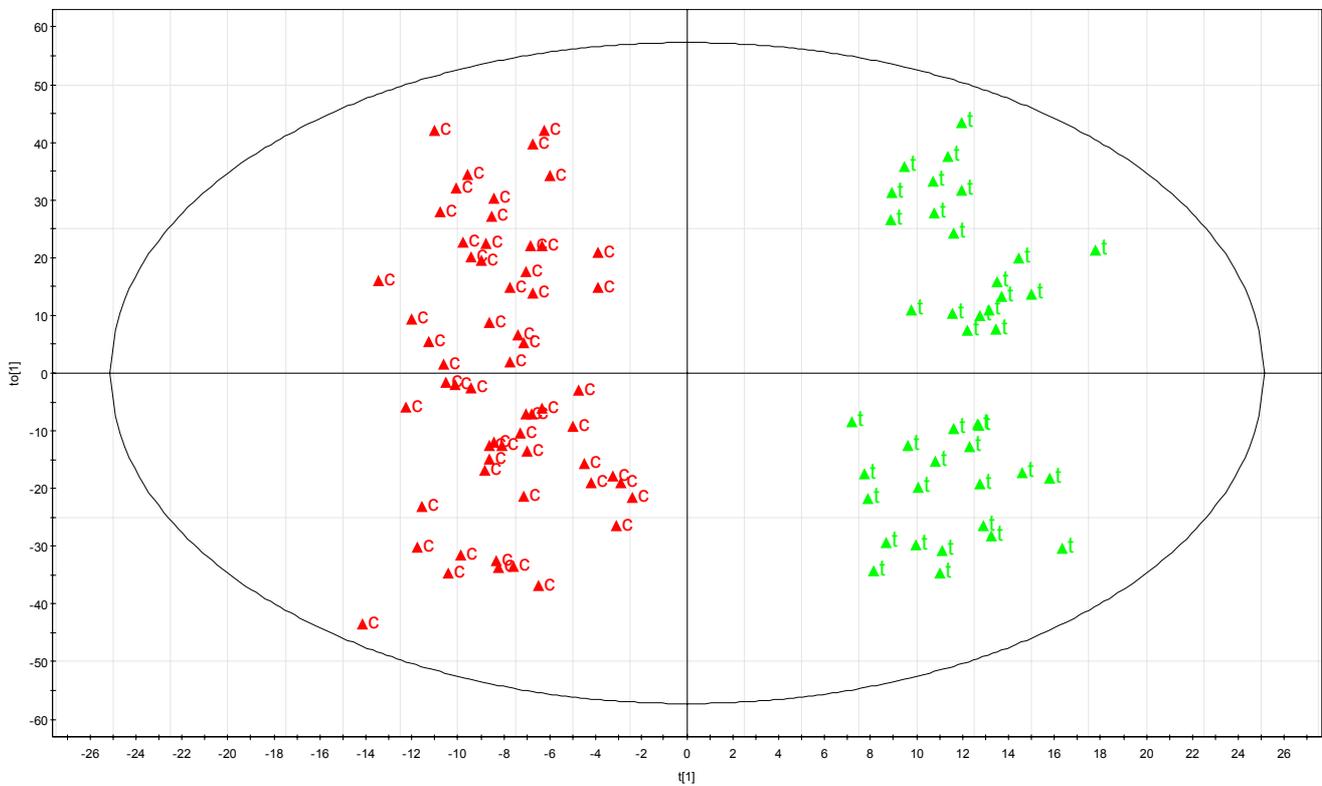


Figure III-18 : Analyse OPLS effectuée sur les 4877 ions extraits lors du retraitement des empreintes métabolomiques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

13 composantes qui sont des combinaisons linéaires des variables initiales et qui s'attachent à restituer la variabilité des données originelles ont pu être extraites par le logiciel Simca-p. La première composante est toujours extraite de manière à restituer le maximum de variabilité des données. L'ACP présentée en Figure III-17 représente la projection des échantillons sur les composantes 4 et 6. Elle est l'unique représentation permettant d'observer un début de discrimination entre les échantillons provenant de la population contrôle (c) et de la population traitée (t) à la reGH (trait en pointillés noirs). L'ACP ne permet pas une meilleure séparation des deux populations car elle a pour objectif principal d'expliquer les facteurs de variabilité principaux, biologiques ou analytiques, qui sont dans ce cas plus importants que le facteur de variabilité ciblé, c'est à dire l'influence du traitement à la reGH.

2.2.1.2.2 Analyse OPLS

Afin d'orienter la création du modèle et de diminuer l'influence des facteurs de variabilité autres que celui étudié, il a été décidé de réaliser une analyse supervisée de type OPLS (Orthogonal Partial Least Square).

La Figure III-18 montre les résultats de l'analyse OPLS réalisée sur la base des 4877 ions révélés par le logiciel XCMS dans les différents échantillons analysés et collectés de J₋₂ à J₊₆₉. Une excellente discrimination entre les extraits urinaires des deux populations peut être observée. Cette discrimination se traduit par une valeur très élevée de $R^2(Y)=0,93$. La valeur de $Q^2(Y)=0,44$ est plus faible mais comme expliquée précédemment, cette valeur est liée au nombre d'animaux étudiés pour l'analyse.

2.2.1.3. **Réduction du nombre d'ions pertinents**

Il est à ce stade de l'étude important de réduire le nombre d'ions pertinents. L'objectif final est d'identifier un nombre relativement restreint d'ions les plus pertinents que possible et correspondant ainsi à de nouveaux biomarqueurs de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine.

2.2.1.3.1 Critères statistiques

Le premier critère choisi dans la sélection des ions est leur pertinence sur le plan strictement statistique.

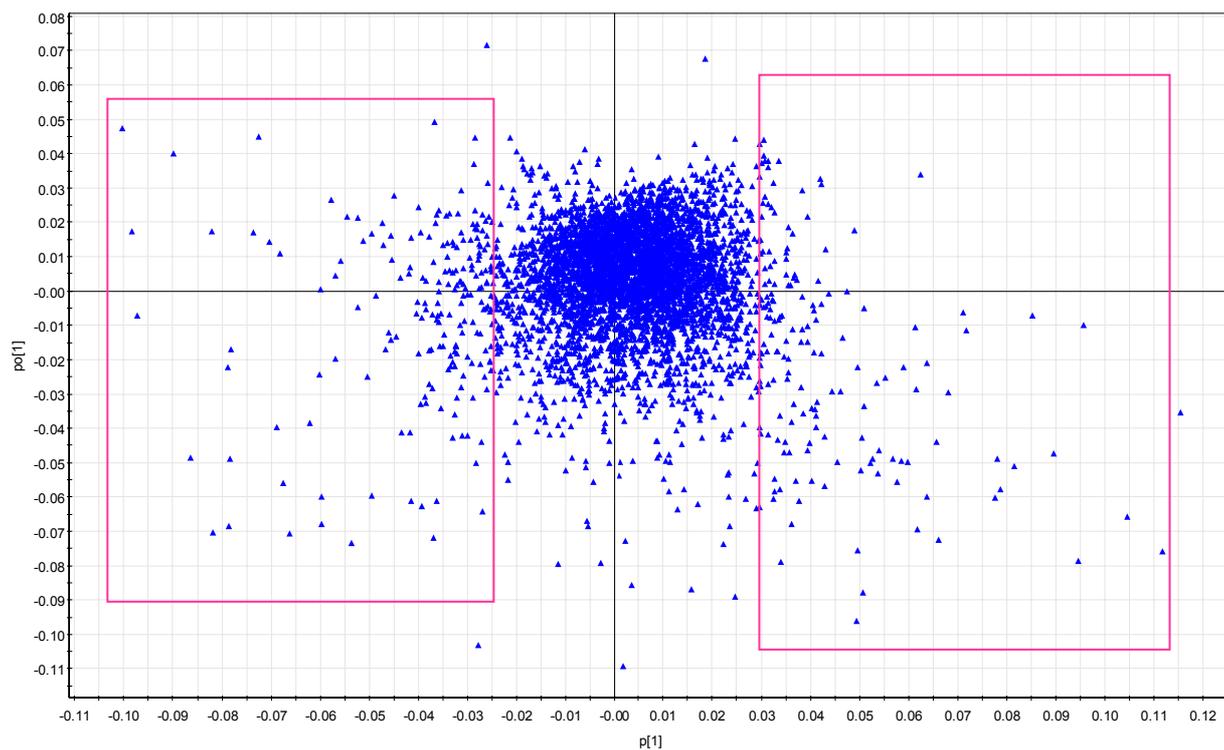


Figure III-19 : Loading plot permettant la représentation des ions extraits dans les empreintes métabolomiques urinaires en fonction de leur contribution à la composante 1.

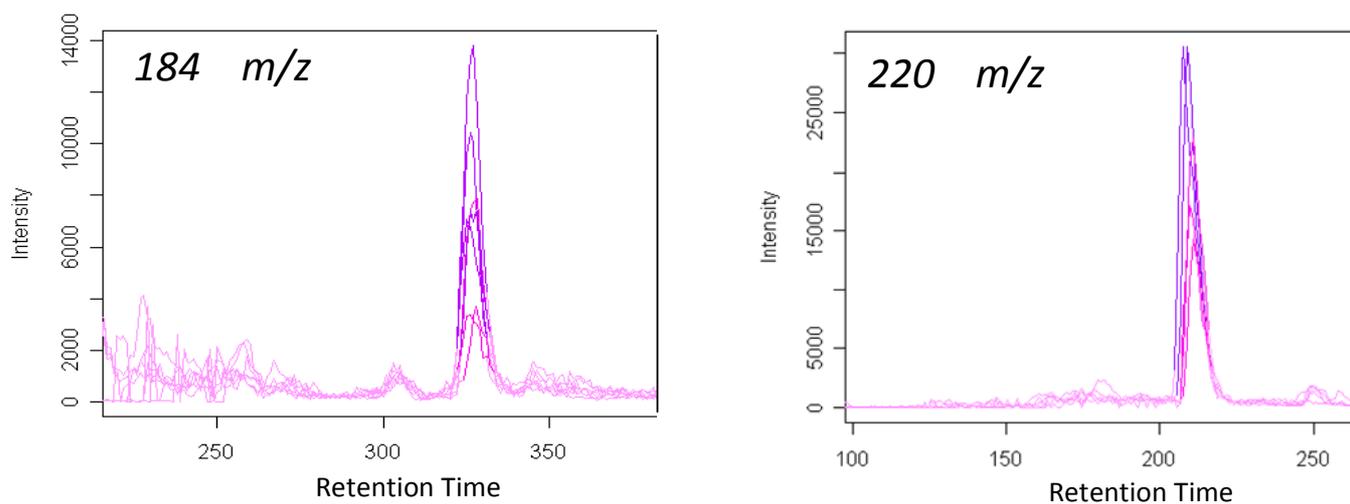


Figure III-20 : Chromatogrammes d'ions extraits des ions m/z 184 et m/z 220 identifiés comme ions d'intérêt présents dans la matrice urinaire.

Ainsi dans chaque extrait urinaire analysé, les critères statistiques suivants ont été appliqués :

- p-value inférieure à 0,05
- ratio inférieur à 0,66 ou supérieur à 1,5

L'application de ces critères réduit le nombre d'ions statistiquement pertinents de 4877 à 1200 ce qui élimine 75% des ions. Le nombre d'ions retenus suite à ce filtrage reste néanmoins élevé et peu compatible avec l'objectif ultime du suivi de quelque dizaine d'ions, dans le cadre d'une recherche de biomarqueurs.

Un deuxième critère de sélection a donc été appliqué.

2.2.1.3.2 Critères portant sur l'étude des « loading plot »

Le « loading plot » correspond à la représentation graphique des relations entre les variables (ions constituant les empreintes). Il permet de mettre en évidence les variables contribuant le plus aux axes factoriels et qui donc caractérisent le mieux les deux groupes d'observations (animaux contrôles et traités). La Figure III-19 met en évidence les variables qui contribuent majoritairement à la discrimination des deux groupes pour tous les jours de collecte (J₋₂ à J₊₆₉). Seuls les ions fortement corrélés sont donc sélectionnés comme ions d'intérêt. Le nombre d'ions se réduit à 350.

2.2.1.3.3 Critères portant sur la résolution chromatographique

Les ions uniquement valides d'un point de vue chromatographique peuvent être considérés comme de potentiels candidats biomarqueurs. Pour cela, l'ensemble des chromatogrammes d'ions sélectionnés aux étapes précédentes est examiné. Cette étape consiste donc à confirmer l'intérêt d'un ion au regard de l'aspect réel des chromatogrammes correspondants. Ce travail est absolument nécessaire pour valider le fait qu'un ion puisse être un biomarqueur potentiel.

A titre illustratif, la Figure III-20 présente deux exemples de signaux chromatographiques correspondant à des ions sélectionnés.

2.2.1.3.4 Conclusions

Finalement, 80 ions répondant à l'ensemble des critères énoncés ci-dessus ont pu être sélectionnés. Une analyse OPLS a été réalisée sur la base de ces 80 candidats biomarqueurs (Figure III-21). Elle démontre la possibilité de toujours discriminer des urines collectées chez des animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine jusqu'à 69 jours après le début de l'expérimentation.

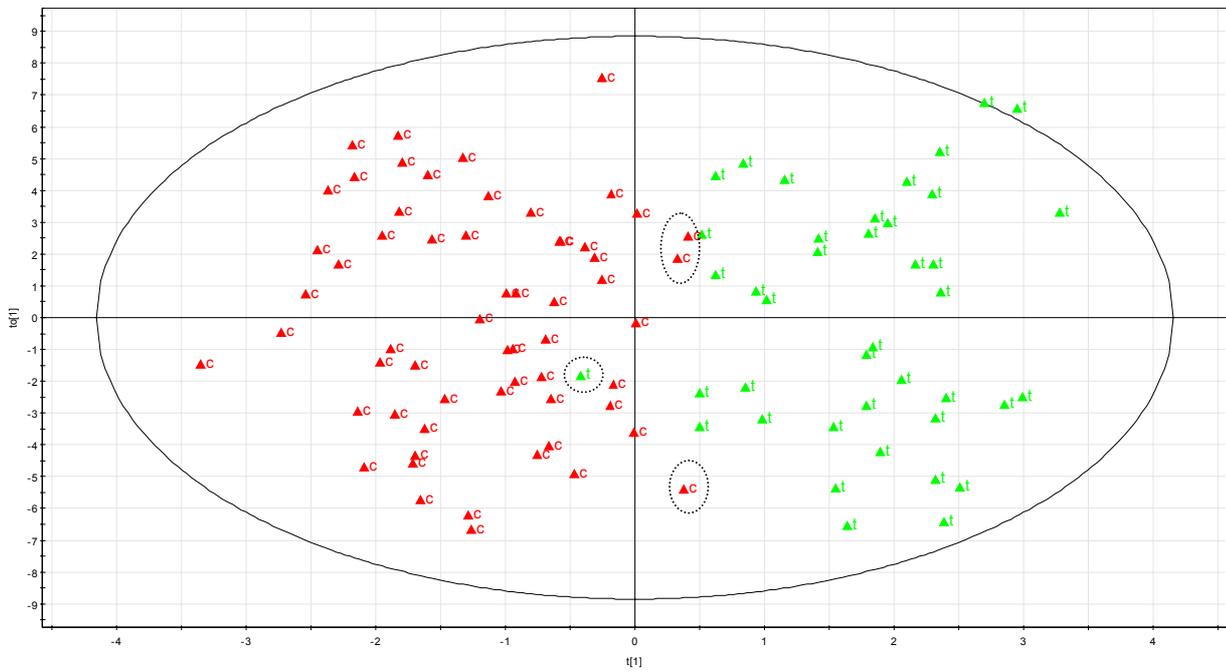


Figure III-21 : Analyse OPLS effectuée sur les 80 ions extraits lors du retraitement des empreintes métabolomiques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

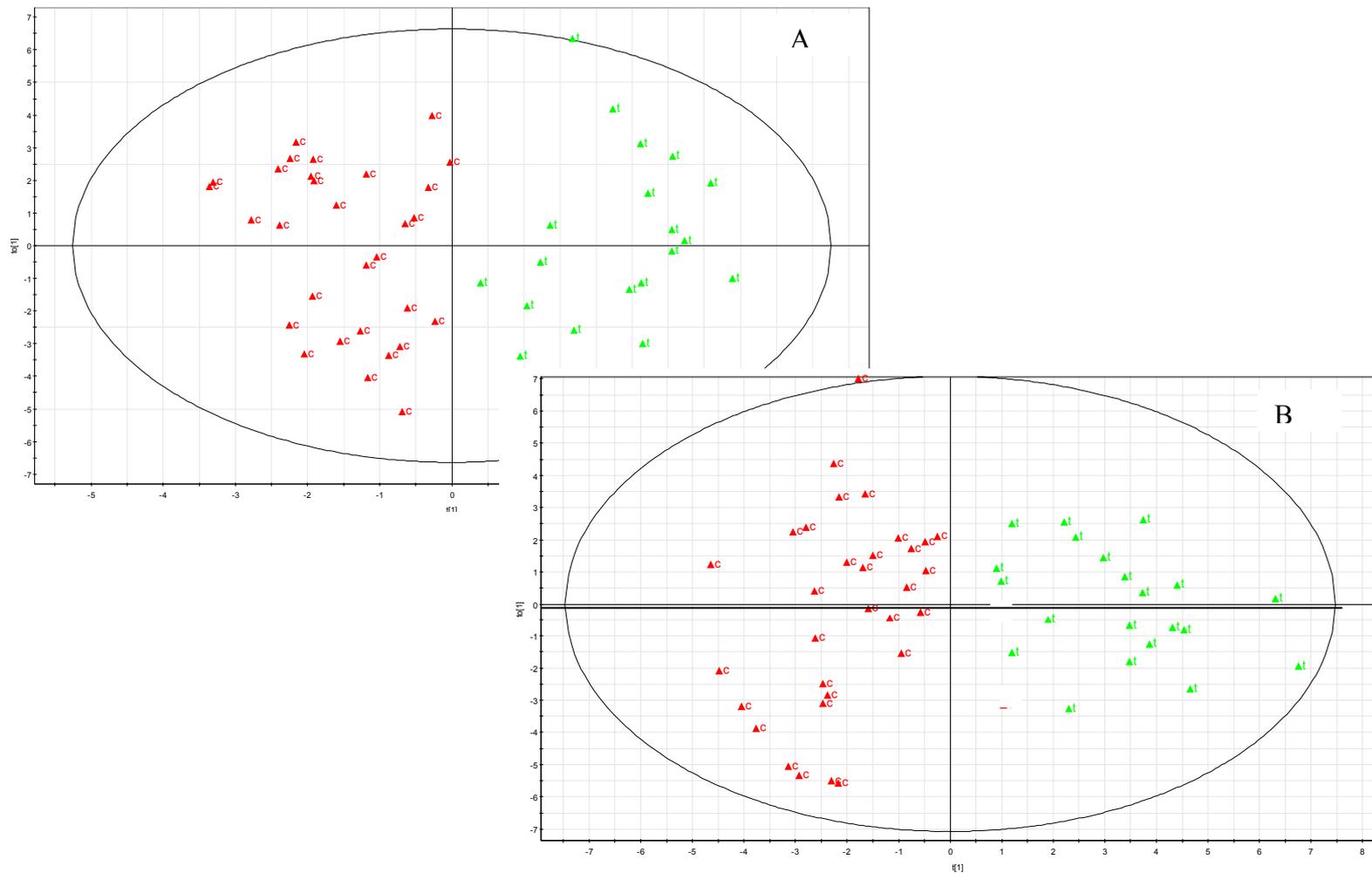


Figure III-22 : Analyses OPLS effectuées sur les 80 ions extraits lors du retraitement des empreintes métabolomiques urinaires prélevées de J-2 à J+69 lors de l'expérimentation effectuée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et analysés sur deux séquences A et B.

Quelques échantillons apparaissent néanmoins mal classés (cf cercles noirs Figure III-21). Or, l'analyse de l'ensemble des extraits urinaires (150 échantillons) de l'expérimentation a été répartie sur deux séquences analytiques afin de limiter l'« encrassement » de la source et les phénomènes de suppression d'ions. Il est donc très probable que la variabilité analytique soit à l'origine de la mal-classification de ces échantillons. Pour s'en assurer, une analyse OPLS a été réalisée pour chaque séquence (séquence A et B). Chaque analyse OPLS (Figure III-22) démontre la possibilité de discriminer les deux populations au sein de chaque séquence sans problème de classification et confirme ainsi l'hypothèse de départ.

Ces ions d'intérêt présentent des rapports masse sur charge compris entre 110 et 730 u.m. Les propriétés physico-chimiques des composés semblent assez hétérogènes en raison de leur diversité observée en termes de rapport masse sur charge et temps de rétention.

Ils présentent une pertinence tant statistique que chromatographique dans la discrimination des animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine et pourraient donc être considérés comme de nouveaux candidats biomarqueurs de l'administration de reGH.

Cependant, une étude basée sur des tests de validation croisée et de permutation doit être effectuée afin de pouvoir valider définitivement l'intérêt de ces ions.

2.2.1.4. Validation du modèle

Les validations ont été effectuées sur les modèles présentés en Figure III-22 afin de s'affranchir de la variabilité analytique exposée précédemment. Chaque séquence est composée de 75 individus.

2.2.1.4.1 Validation croisée

Les échantillons (n=75 pour une séquence donnée) ont donc été divisés en deux jeux de données : le jeu d'étalonnage (n=50) et celui de validation (n=25). Sur la base des 80 variables sélectionnées comme des marqueurs potentiels d'une administration d'hormone de croissance recombinante équine, le jeu d'étalonnage a été soumis à une analyse OPLS : 3 composantes ont été extraites (1 prédictive + 2 orthogonales). La Figure III-23 représente la composante prédictive et la première composante orthogonale du modèle mis en place pour une séquence donnée (séquence A) comprenant l'analyse de 75 échantillons.

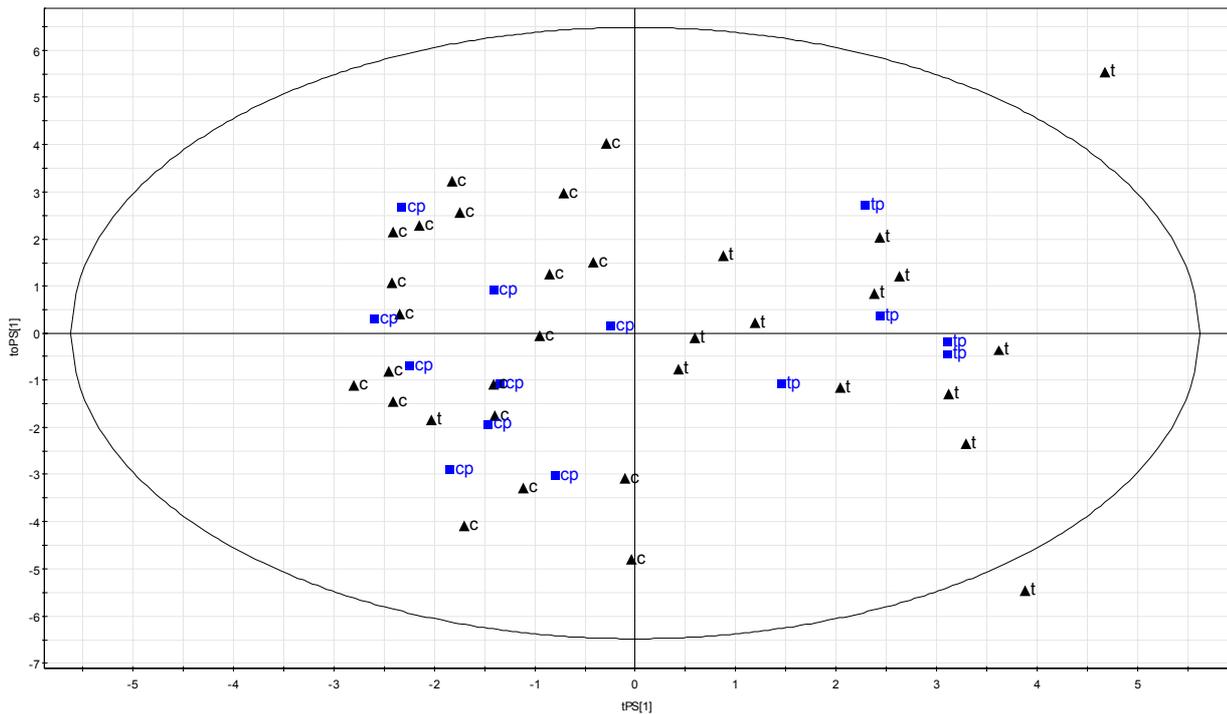


Figure III-23 : OPLS réalisée sur la base de 80 ions sélectionnés et présents dans les empreintes urinaires. 75 échantillons ont été analysés au sein d'une même séquence et divisés en deux jeux de données. Les triangles noirs c et t représentent respectivement les chevaux contrôles et les chevaux traités du jeu d'étalonnage. Les carrés bleus cp et tp représentent respectivement les chevaux contrôles et traités du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédit par le modèle.

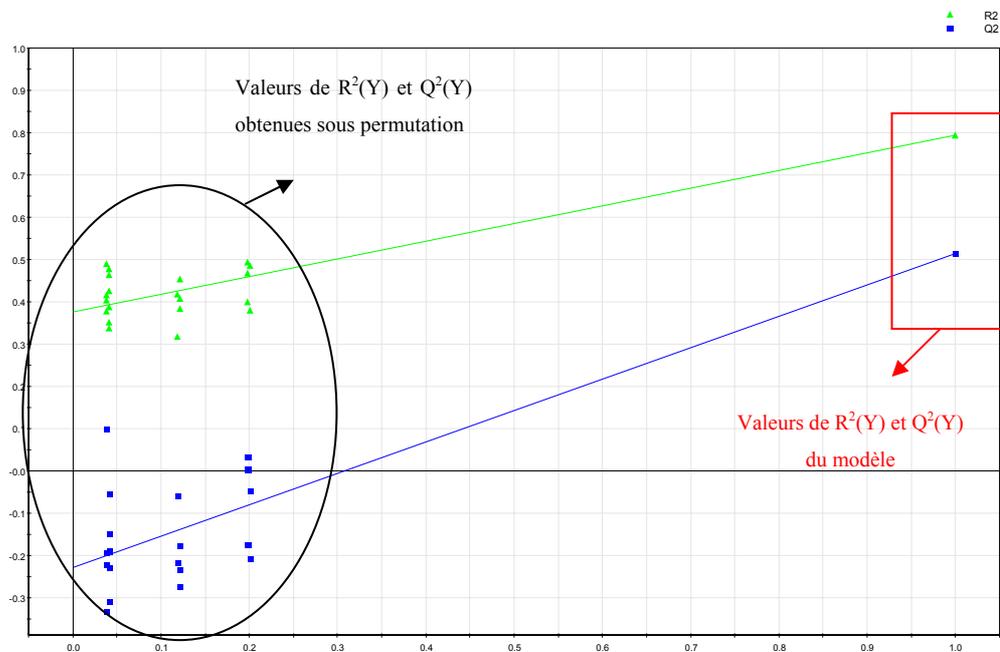


Figure III-24 : Test de permutation consistant à réaffecter aléatoirement la variable Y du jeu de donnée provenant de l'analyse des extraits urinaires de l'expérimentation de Toulouse.

Dans le jeu d'étalonnage (50 échantillons), les extraits urinaires des chevaux traités à l'hormone de croissance recombinante équine et des chevaux témoins sont discriminés. Les caractéristiques du modèle sont les suivants : $R^2(Y)= 0,8$ et $Q^2(Y)=0,6$. Les valeurs de $R^2(Y)$ et $Q^2(Y)$ indiquent que le modèle restitue parfaitement la variable Y (l'appartenance de chaque échantillon au groupe des chevaux contrôles ou traités). Le jeu de validation a ensuite été prédit par le modèle et tous les échantillons ont été bien classés, confirmant les excellentes qualités du modèle. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'analyse des 75 autres échantillons urinaires analysés dans la séquence B (données non montrées).

Le modèle établi sur la base des 80 ions sélectionnés pour leur pertinence statistique et chimique permet une excellente discrimination des extraits urinaires de chevaux traités et témoins sur l'ensemble des jours de collecte (J_{-2} à J_{+69}). Cependant, il est important de vérifier que ces résultats ne sont pas dus à un facteur chance. Un test de permutation a alors été réalisé.

2.2.1.4.1 Test de permutation/Valeur de CV ANOVA

Un test de permutation consiste à réaffecter au hasard le statut des échantillons à savoir contrôle ou traité. La variable Y n'a donc plus aucun sens. Les valeurs de $R^2(Y)$ et de $Q^2(Y)$ doivent alors diminuer. La Figure III-24 montre effectivement une baisse des valeurs de $R^2(Y)$ et $Q^2(Y)$ lorsque la variable Y est soumise à des permutations. Le modèle d'un point descriptif et prédictif est très affecté par cette permutation ce qui démontre que le modèle métabolomique urinaire développé n'est pas le résultat du hasard.

En complément, un calcul de CV-ANOVA a été réalisé et une valeur de $p=0,008$ a été obtenue démontrant que le modèle est hautement significatif.

2.2.1.5. **Conclusions**

L'analyse des extraits urinaires de l'expérimentation de Toulouse a confirmé la faisabilité de l'approche métabolomique pour la problématique de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine. Les résultats ont montré qu'il existe des différences significatives jusqu'à 69 jours après le début du traitement entre les profils métabolomiques urinaires des populations de chevaux non traités et traités à la reGH. Une recherche approfondie des biomarqueurs pertinents a permis d'aboutir à la mise en place d'un modèle descriptif de type OPLS fondé sur les intensités MS de 80 ions. Les tests de validation croisée et de permutation ont permis de valider ce modèle et de prouver leur robustesse.

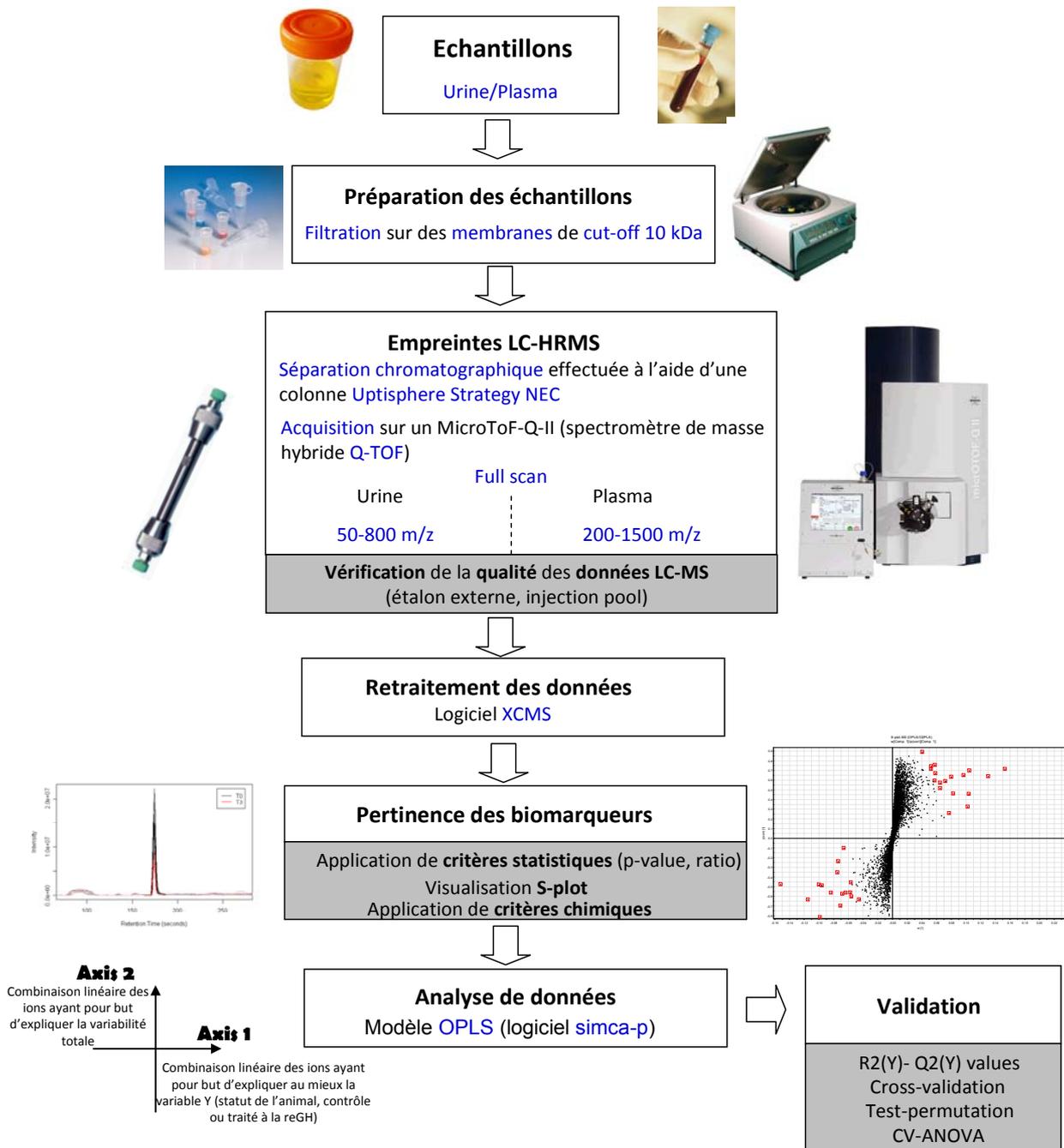


Figure III-25 : Stratégie analytique appliquée pour l'analyse des extraits urinaires et plasmatiques

L'objectif à présent est de compléter ces résultats par l'étude des extraits plasmatiques pour pouvoir ensuite envisager la mise en place d'un nouvel outil de détection de l'administration de reGH capable de prédire des échantillons inconnus grâce à leur empreinte métabolomique.

2.2.2. Etude des extraits biologiques plasmatiques

La même stratégie que celle développée pour la mise en place d'un modèle métabolomique fondé sur l'étude des extraits urinaires a été appliquée et est résumée sur la Figure III-25.

2.2.2.1. Empreintes LC-HRMS

96 échantillons plasmatiques provenant de l'analyse des échantillons collectés de J₂ à J₊₆₉ lors de l'expérimentation de Coye la Forêt ont été préparés par filtration sur des membranes de coupure de seuil 10 kDa. Les échantillons ont été analysés par LC-HRMS en mode d'ionisation electrospray positif. Les spectres de masse ont été obtenus en mode centroïde avec des rapports masse sur charge compris entre 200 et 1500. Ce mode d'acquisition diffère légèrement de celui choisi pour l'étude des extraits urinaires mais a été spécialement adapté à l'analyse de composés solubles dans le plasma tels que les sucres, les lipides et les petits peptides.

Les données LC-MS ont été contrôlées de la même manière que pour l'étude des extraits urinaires. Deux étalons externes (testostérone-D3 et l'épi-testostérone-D3 glucuronide) ont été ajoutés à chaque extrait plasmatique avant l'analyse par LC-HRMS afin de contrôler la dérive potentielle des temps de rétention et les performances de l'appareil. Les différentes analyses réalisées ont conduit aux mêmes conclusions que celles obtenues pour l'analyse des extraits urinaires c'est-à-dire que le temps de rétention des standards reste stable au cours des différentes injections et leur sensibilité reste identique du début jusqu'à la fin de la séquence. L'écart à la masse exacte mesuré est toujours resté inférieur à 5 ppm.

Par ailleurs, des pools des échantillons à analyser ont été préparés et injectés en début, milieu et fin de chaque séquence dans le but de s'assurer de la robustesse de l'analyse.

2.2.2.2. Retraitement et analyse des données

De la même façon que pour l'analyse des extraits urinaires, l'objectif consiste à mettre en place un modèle statistique descriptif et prédictif permettant de discriminer les échantillons urinaires provenant d'animaux contrôles de ceux provenant d'animaux traités à l'hormone de croissance recombinante équine.

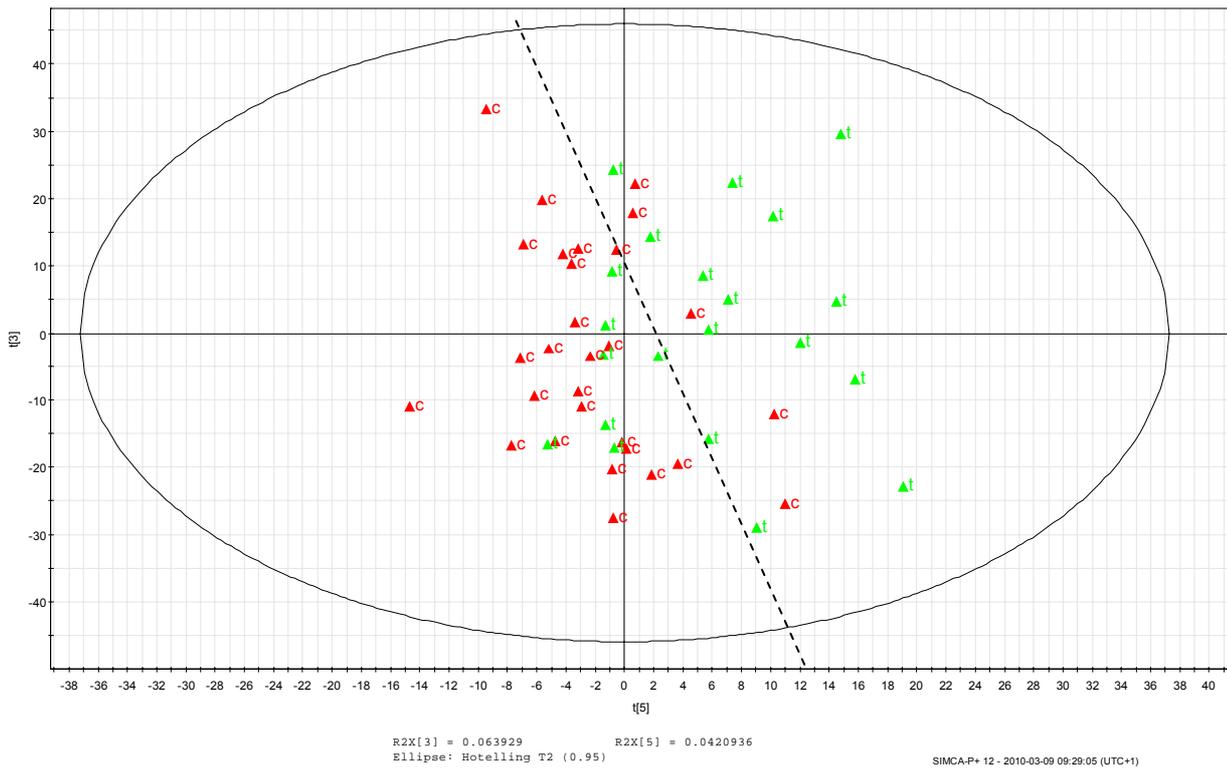


Figure III-26 : ACP réalisée sur les 5086 ions formant les empreintes métaboliques plasmatiques de tous les jours de collecte. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.

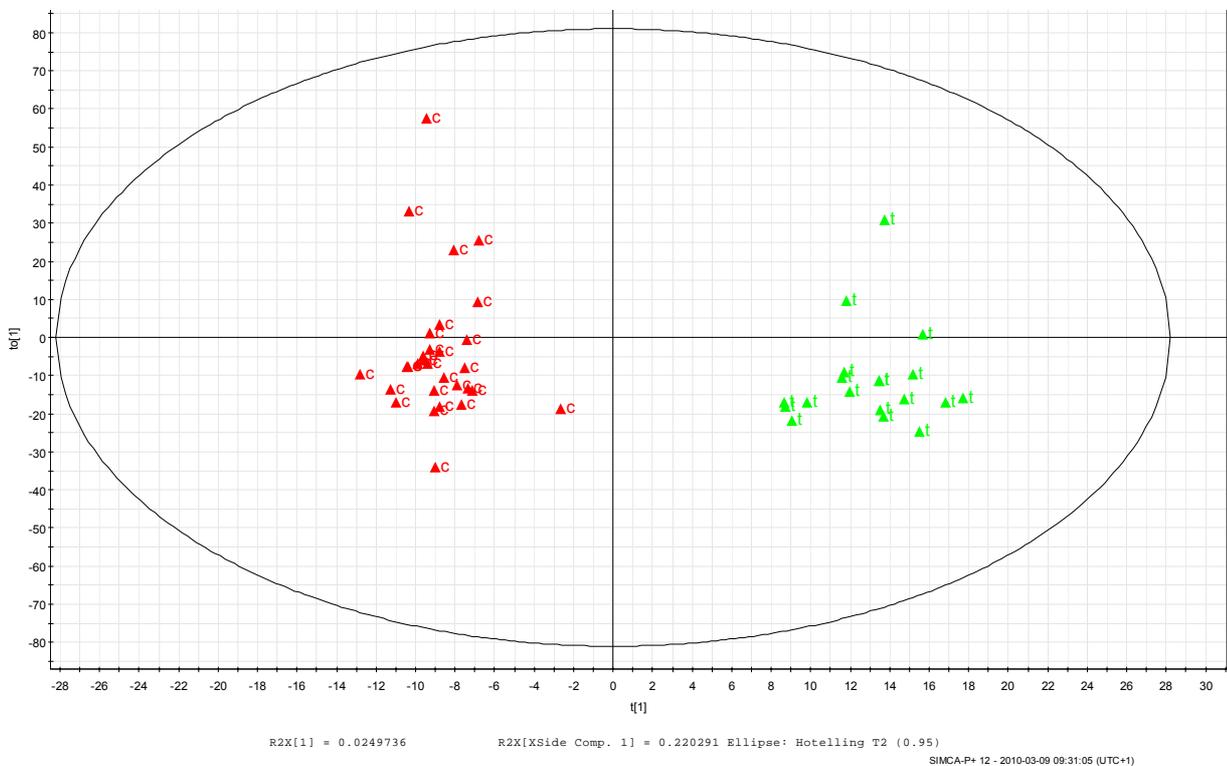


Figure III-27 : OPLS réalisée sur les 5086 ions formant les empreintes métaboliques plasmatiques de tous les jours de collecte. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.

Des analyses statistiques multivariées de type non supervisé (analyse en composante principale) et supervisé (analyse OPLS) ont été appliquées à nos jeux de données afin d'extraire et de visualiser l'information utile contenue dans le vaste ensemble de données générées.

2.2.2.2.1 Analyse non supervisée de type ACP

Dans un premier temps, une Analyse en Composante Principale (ACP) a été effectuée sur les 5086 ions identifiés par le logiciel XCMS suite au retraitement des acquisitions correspondant à tous les jours de collecte. Six composantes ont été extraites. L'ACP présentée en Figure III-26 représente la projection des échantillons sur les composantes 4 et 6. Elle est l'unique représentation permettant d'observer un début de discrimination entre les échantillons provenant de la population contrôle (c) et traitée (t) à la reGH (trait en pointillés noirs).

Cependant, cette analyse ne s'avère pas suffisamment satisfaisante pour pouvoir mettre en avant de manière non ambiguë l'appartenance d'un échantillon à un groupe donné, celui des chevaux contrôles ou des chevaux traités.

2.2.2.2.2 Analyse supervisée de type OPLS

Afin d'orienter la création du modèle et de diminuer l'influence des facteurs de variabilité autre que l'influence du traitement, le jeu de données a été soumis à une analyse supervisée.

Une variable Y correspondant à l'appartenance de chaque observation à un groupe a été introduite dans le jeu de données.

La Figure III-27 montre le résultat de l'OPLS réalisée sur la base des 5086 ions révélés pour lesquelles 4 composantes ont été extraites (1 prédictive + 3 orthogonales). Elle représente la composante prédictive et la première composante orthogonale du modèle mis en place. Les deux groupes d'échantillons contrôle et traité à la reGH sont parfaitement discriminés. Les caractéristiques du modèles sont les suivantes : $R^2(Y)=0,85$ et $Q^2(Y)=0,50$. Ces valeurs indiquent donc que le modèle restitue parfaitement la variable Y.

2.2.2.3. **Réduction du nombre d'ions**

De la même façon que pour l'analyse des extraits urinaires, l'objectif final est de mettre en évidence un nombre relativement restreint d'ions comme étant pertinents et robustes pour discriminer des individus contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine. Comme précédemment, une réduction du nombre d'ions doit être opérée grâce à l'application de différents critères.

S-plot.M2 (OPLS/O2PLS)
w[Comp. 1]/p[corr][Comp. 1]

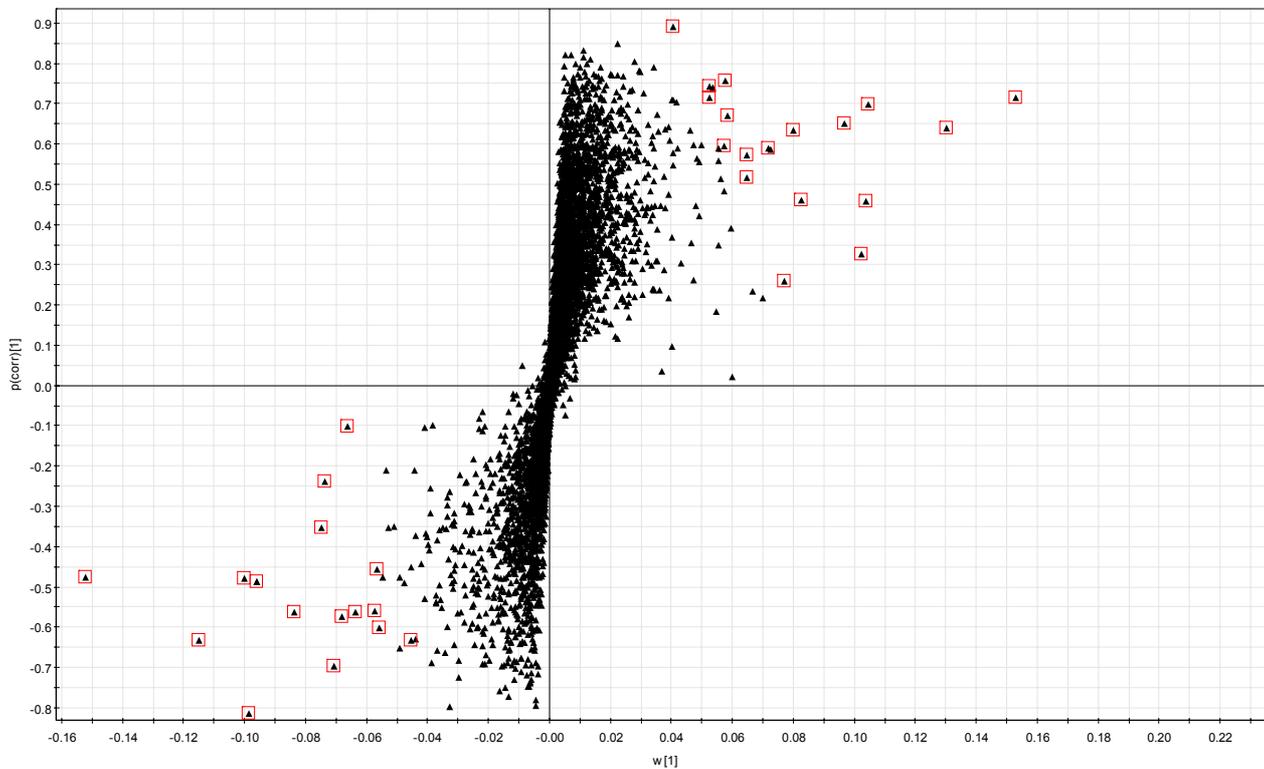


Figure III-28 : « S-plot » représentant les 5086 variables utilisés pour construire le modèle présenté à la Figure III-27. Les ions caractérisés par une contribution importante sont encadrés en rouge.

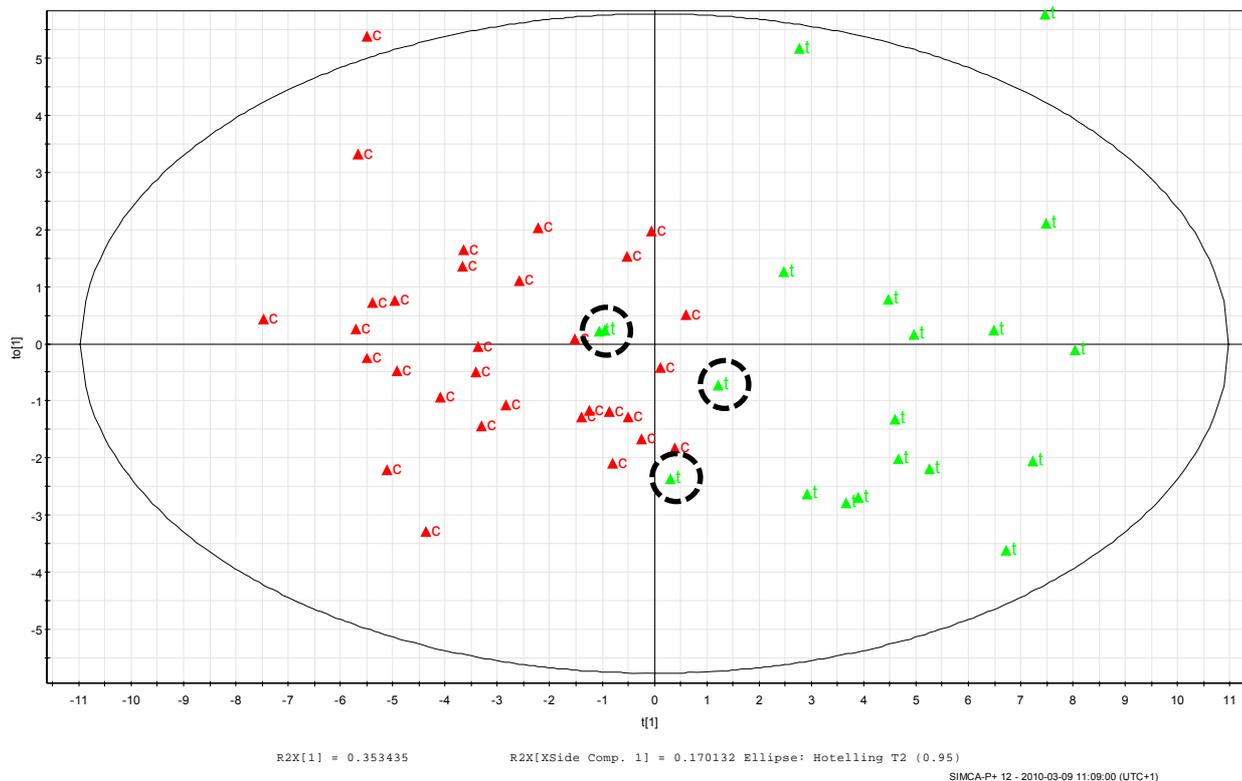


Figure III-29 : OPLS réalisées sur les 56 ions sélectionnés et présents dans les empreintes métabolomiques plasmatiques. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités.

Tout d'abord, seuls les ions possédant un degré de significativité suffisant (p -value $< 0,05$ et $0.66 > \text{ratio} > 1,5$) ont été retenus. Dans un deuxième temps, un graphique S-plot associé à l'analyse présentée en Figure III-27 a été réalisé (Figure III-28). Enfin, un examen visuel des chromatogrammes d'ions extraits a permis d'éliminer les artéfacts potentiels. L'application de ces critères successifs a alors permis de sélectionner 56 ions.

Une nouvelle analyse OPLS a été réalisée sur la base de ces 56 ions. Elle est présentée en Figure III-29. Cette analyse démontre la possibilité de séparer les deux groupes avec des valeurs de $R^2(Y)=0,70$ et $Q^2(Y)=0,55$. Cependant les échantillons collectés 69 jours après la première administration (cercles noirs) possèdent des coordonnées proches des échantillons appartenant à la population contrôle ce qui suggère que ce modèle ne permet pas de mettre en évidence une administration à très long terme. Une étape de validation a été effectuée afin de s'assurer de la robustesse et de la fiabilité du modèle.

2.2.2.4. Validation

2.2.2.4.1 Etape de validation croisée

De la même façon que pour le modèle fondé sur l'analyse des extraits urinaires, les échantillons ont été divisés en deux jeux de données : un jeu comprenant 2/3 des échantillons correspondant au jeu d'étalonnage et un jeu comprenant le tiers restant correspondant au jeu de validation. Sur la base des 56 variables sélectionnées comme des marqueurs potentiels de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine, le jeu d'étalonnage a été soumis à une analyse OPLS : trois composantes ont été extraites (1 prédictive + 2 orthogonales). La Figure III-30 représente la composante prédictive et la première composante orthogonale du modèle mis en place.

Dans le jeu d'étalonnage, les extraits plasmatiques des chevaux traités à l'hormone de croissance recombinante équine et des chevaux contrôles sont correctement discriminés. Les caractéristiques du modèle sont satisfaisantes avec les valeurs suivantes : $R^2(Y) = 0,78$ $Q^2(Y) = 0,51$. Le jeu de validation a ensuite été prédit par le modèle et les échantillons ont été correctement classés.

Le modèle établi sur la base des 56 ions semble pertinent d'un point de vue statistique. En complément, un test de permutation a été réalisé afin de s'assurer que ces résultats ne sont pas dus au hasard.

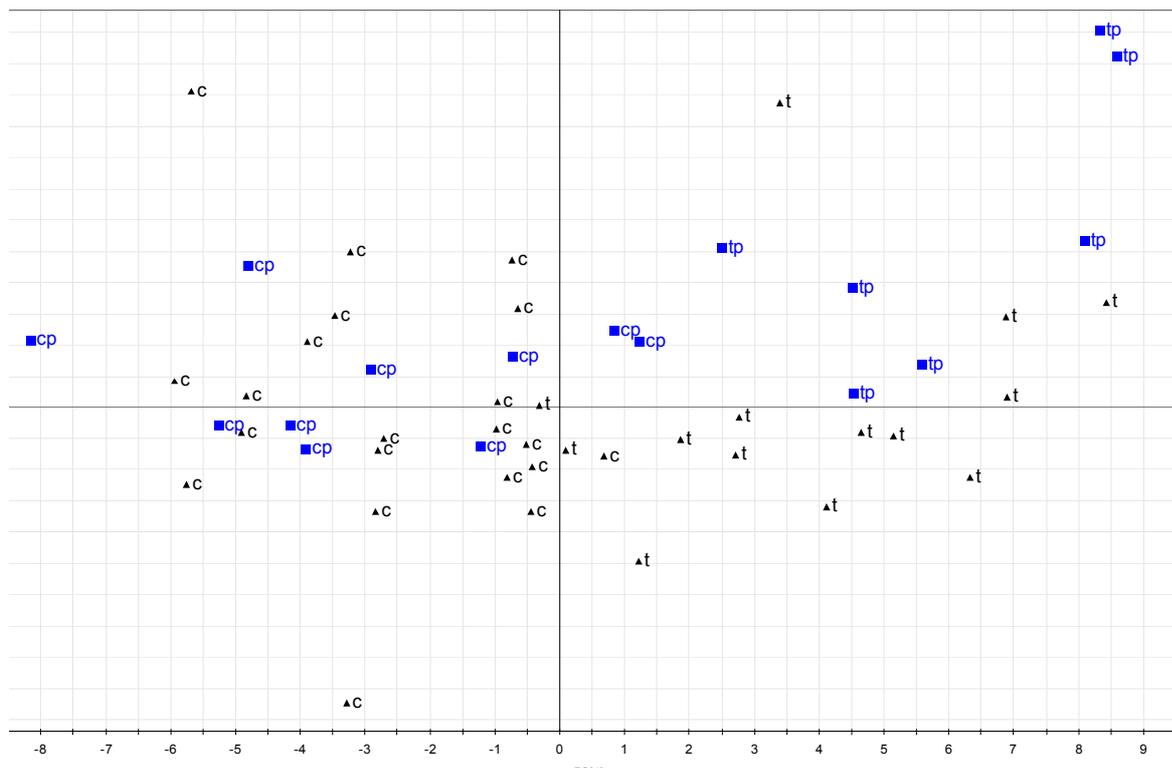


Figure III-30 : OPLS réalisée sur la base de 56 ions sélectionnés et présents dans les empreintes plasmatiques. Les triangles noirs c et t représentent respectivement les chevaux contrôles et les chevaux traités du jeu d'étalonnage. Les carrés bleus cp et tp représentent respectivement les chevaux contrôles et traités du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédit par le modèle.

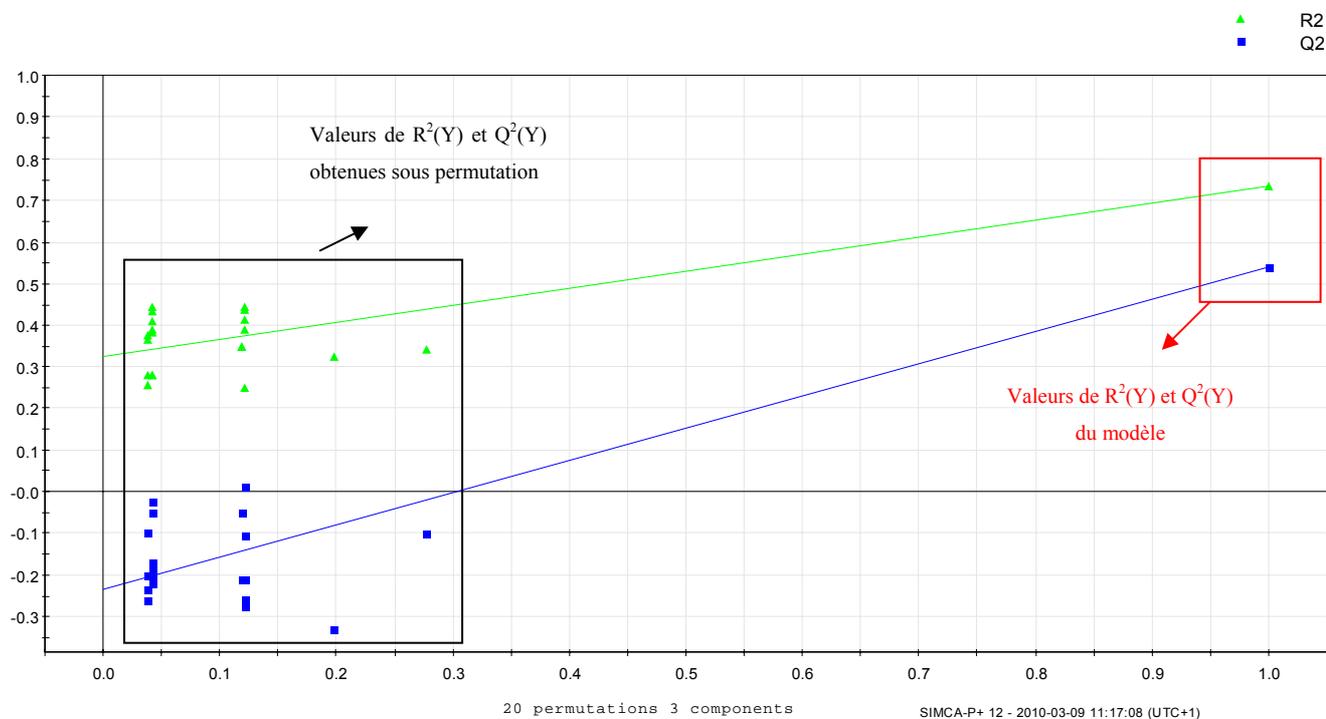


Figure III-31 : Test de permutation consistant à réaffecter aléatoirement la variable Y du jeu de donnée provenant de l'analyse des extraits plasmatiques de l'expérimentation de Toulouse.

2.2.2.4.1 Test de permutation

La Figure III-31 résulte du test de permutation effectuée sur la variable Y. Il montre effectivement une baisse des valeurs de $R^2(Y)$ et $Q^2(Y)$ lorsque la variable Y est soumise à des permutations. Le modèle d'un point descriptif et prédictif est très affecté par cette permutation ce qui démontre que le modèle métabolomique plasmatique développé n'est pas du à un facteur chance.

En complément, un calcul de CV-ANOVA a été réalisé et une valeur de $p=0,004$ a été obtenue démontrant que le modèle est hautement significatif.

2.2.2.5. **Comparaison et conclusions**

Les ions mis en évidence dans ce modèle plasmatique sont différents en terme de rapport masse sur charge et temps de rétention des ions sélectionnés lors de l'étude des empreintes métabolomiques urinaires ce qui tend à conclure que les deux matrices ne révèlent pas la même information et que différents niveaux, correspondant peut être à différentes voies métaboliques, sont investigués au travers de ces deux matrices biologiques.

Les 80 ions extraits lors de l'analyse des empreintes métabolomiques urinaires ont montré la possibilité de discriminer des échantillons collectés chez des chevaux contrôles de ceux d'animaux traités jusqu'à 69 jours après le début du traitement. Des différences significatives entre les profils métabolomiques plasmatiques de chevaux non traités et traités à la reGH, grâce à la stratégie développée, ont également été observées. Un modèle chimiométrique de type OPLS fondé sur les intensités MS de 56 ions hautement impliqués dans la discrimination des deux populations a été mis en place. Le modèle possède un pouvoir descriptif et prédictif acceptable mais ne permet pas une discrimination des échantillons collectés 69 jours après le début du traitement contrairement au modèle fondé sur l'analyse des extraits urinaires.

Il est cependant important de rappeler que ces deux modèles font preuve d'une grande fiabilité et d'une grande robustesse et que leur complémentarité peut être un avantage pour la future mise au point d'un outil de dépistage par approche métabolomique.

2.3. Conclusions de la première partie et perspectives

L'étude des profils métabolomiques au regard d'une administration d'hormone de croissance recombinante équine a été envisagée afin d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies de dépistage. Les résultats issus de l'analyse des extraits urinaires et plasmatiques ont permis de souligner l'intérêt, la faisabilité et la pertinence d'une approche métabolomique appliquée à cette problématique. Le retraitement et l'analyse des empreintes métabolomiques urinaires et plasmatiques ont tout d'abord montré des modifications importantes dans le profil métabolomique des chevaux traités. Une étude approfondie des ions qui participent à la discrimination des chevaux contrôles et traités a permis de sélectionner 80 et 56 biomarqueurs potentiels de l'administration de reGH présents respectivement dans l'urine et le plasma. La fiabilité et la robustesse des modèles établis sur les intensités MS de ces ions sont la force de ces deux modèles. Une extension et une validation de l'étude est à présent à envisager en incluant un grand nombre d'échantillons appartenant à la population contrôle pour prendre en compte les variabilités inter-individus (sexe, âge, condition d'élevage, alimentation,...). Des échantillons déclarés négatifs envers la recherche de produits dopants provenant du Laboratoire des Courses Hippiques ainsi que des échantillons « blancs » provenant d'un centre d'expérimentation localisé à Chamberet ont alors été analysés dans la deuxième partie de ce chapitre. Cette étude a pour but la mise au point d'un nouvel outil de dépistage de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine. Plus largement, la contribution de cette nouvelle technique au contrôle anti-dopage équin sera abordée.

PARTIE-2 APPORT DE LA METABOLOMIQUE AU CONTROLE ANTI-DOPAGE DE L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE RECOMBINANTE EQUINE

A l'heure actuelle, les méthodes de chimie analytique permettent de détecter un grand nombre de produits thérapeutiques et dopants et assurent un niveau de contrôle des pratiques illégales satisfaisant. Cependant, certaines catégories de molécules telles que les hormones peptidiques restent difficiles à extraire et à détecter. En ce qui concerne le contrôle anti-dopage équin, des progrès spectaculaires concernant la détection de l'érythropoïétine (EPO) et de l'hormone de croissance (GH) ont été réalisés récemment. En effet, l'utilisation de l'EPO recombinante humaine (Guan *et al*, 2007 ; Guan *et al* 2008) et de l'hormone de croissance recombinante équine (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008b) peuvent être désormais détectés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Or, ces méthodes sont des méthodes dites de confirmation qui ne sont efficaces dans ce cas précis que pendant quelques heures suivant l'administration et restent spécifiques d'une forme recombinante particulière. Ainsi, l'hormone de croissance recombinante équine ne peut être détectée que dans les 48 heures suivant son administration. Des méthodes de dépistage qui sont alors basées sur la mesure de l'effet d'une molécule grâce à la détection de biomarqueurs spécifiques et non plus sur la mesure de la molécule elle-même se sont alors développées et restent en constant développement.

Dans la première partie de ce travail, nous avons vu qu'il était possible de mettre au point des modèles chimiométriques à partir de prise d'empreintes métaboliques urinaires et plasmatiques. Ces modèles fondés sur quelques dizaines de candidats biomarqueurs permettent de discriminer des chevaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine. Si les résultats obtenus sont d'un point de vue statistique pertinents puisqu'ils reposent sur une expérimentation impliquant 13 animaux, ces modèles ne peuvent pas être utilisés en tant qu'outil prédictif dans le cadre d'un contrôle anti-dopage équin. En effet, la variabilité inter-individus incluse dans ces modèles n'est pas suffisante pour permettre une prédiction sans ambiguïté d'échantillons inconnus.

Dans un premier temps, ce travail a consisté à analyser un grand nombre d'échantillons urinaires « blancs » ($n > 100$) afin d'étendre les résultats obtenus pour l'analyse des échantillons urinaires de l'expérimentation de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le but est de mettre au point un nouvel outil de dépistage de l'administration de la reGH. La deuxième partie de ce travail s'attarde sur les résultats engendrés par la mise en place de ce nouvel outil de prédiction. Elle montre aussi l'apport de la métabolomique dans le contrôle anti-dopage équin et dans quelle mesure elle peut participer à la mise en place de passeports biologiques.

1. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL DE DEPISTAGE PAR APPROCHE METABOLOMIQUE

Les travaux développés dans la partie I ont permis de mettre au point des modèles mathématiques, fondés sur l'analyse d'extraits urinaires et plasmatiques capables, de discriminer des chevaux contrôlés de chevaux traités à l'hormone de croissance recombinante équine. Ils reposent sur l'analyse d'échantillons provenant d'expérimentations animales contrôlées et collectés sur une quinzaine d'animaux différents. Même si la validation a permis de prouver que les modèles développés étaient robustes et fiables, ces modèles doivent être étendus à l'analyse d'autres échantillons pour pouvoir être utilisés comme outil prédictif et ainsi envisagés comme un nouvel outil de dépistage. En effet, des modèles fondés sur 13 individus différents ne sont pas suffisants d'un point de vue statistique pour assurer la prédiction de nouveaux échantillons avec une forte probabilité. De nouveaux échantillons prenant en compte la variabilité inter-individus (âge, sexe, alimentation, ...) doivent alors être incorporés dans le modèle de base. Pour augmenter la variabilité au sein du groupe témoin, des échantillons « blancs » provenant d'animaux pour lesquels aucune trace de produits dopants ou thérapeutiques n'a été retrouvée dans les matrices biologiques, ont été analysés. Ces échantillons correspondent à la fois à des échantillons « tout venant » du Laboratoire des Courses Hippiques pour lesquels la recherche de produits dopants s'est avérée négative et à des échantillons collectés chez des animaux non traités élevés au centre d'expérimentation de Chamberet.

La population traitée à la reGH sera constituée par les échantillons collectés lors des deux expérimentations (Coye la Forêt et l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse).

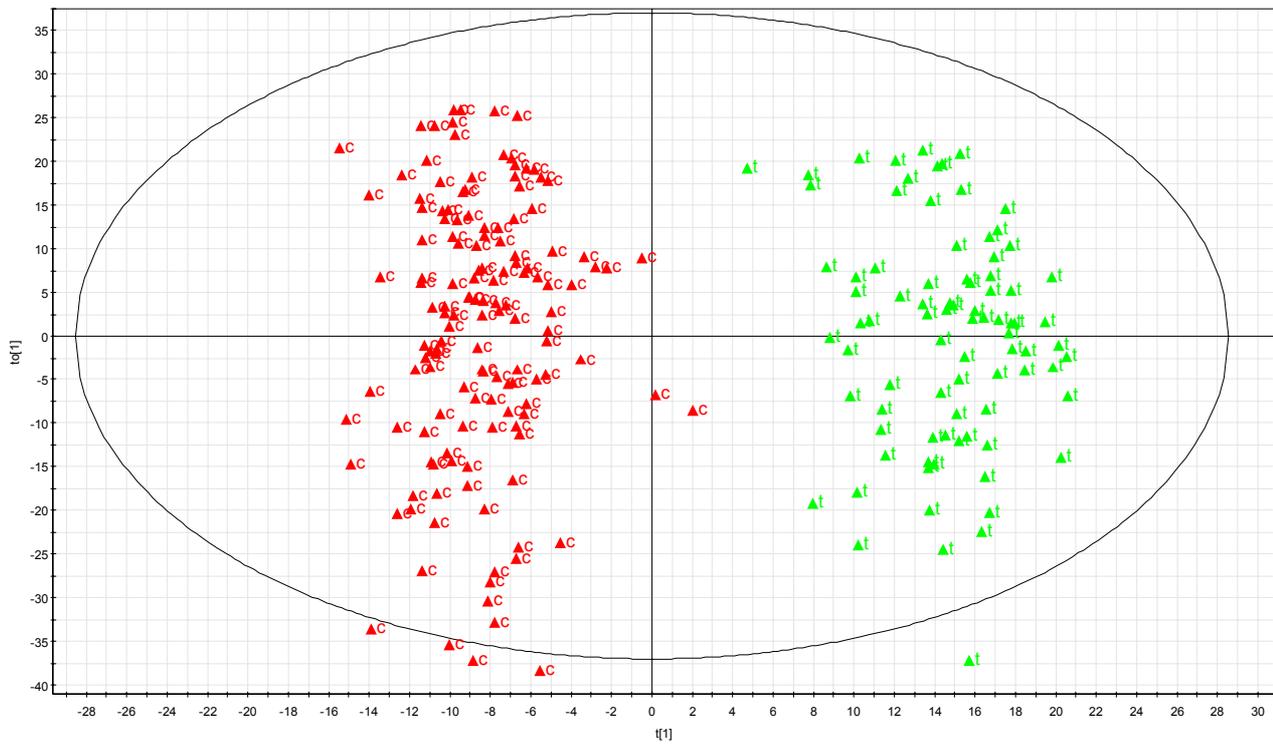


Figure III-32: OPLS réalisée sur les 2035 ions extraits et présents dans les empreintes métabolomiques urinaires. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités

1.1 Mise en place d'un modèle métabolomique descriptif et prédictif

1.1.1. Echantillons, préparation et conditions d'analyse

Les échantillons urinaires analysés se décomposent en deux catégories : ceux appartenant à la population contrôle et ceux appartenant à la population traitée à la reGH.

Les prélèvements constituant la population contrôle comprennent cent échantillons tout venant du Laboratoire des Courses Hippiques et vingt échantillons collectés au centre expérimental de Chamberet mais également les échantillons provenant des 7 animaux non traités de l'expérimentation de Toulouse et les échantillons collectés avant administration de reGH lors de l'expérimentation de Coye la Forêt. L'ensemble de ces prélèvements représente une population contrôle constituée de plus de 160 échantillons.

Les prélèvements constituant la population traitée à l'hormone de croissance recombinante équine sont au nombre de 90 échantillons collectés lors des expérimentations de Coye la Forêt et de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Tous les échantillons urinaires (n=250) ont été préparés de la même manière par filtration sur des membranes de seuil de coupure 10kDa. Ils ont été congelés à -20°C jusqu'à leur analyse par LC-HRMS.

Afin de contrôler la qualité des données LC-HRMS, des pools constitués par l'ensemble des échantillons appartenant à la population contrôle ainsi que des pools constitués par l'ensemble des échantillons appartenant à la population traitée à la reGH ont été préparés comme précédemment décrit et injectés en début, milieu et fin de séquence.

1.1.2. Retraitement et analyse des données

L'ensemble des extraits urinaires collectés chez les populations contrôle et traitée à l'hormone de croissance recombinante équine a été analysé en vue d'établir des empreintes métaboliques urinaires. Les données brutes ont été déconvoluées à l'aide du logiciel XCMS et ont permis d'extraire 2035 ions.

1.1.2.1 Analyse des empreintes globales

Dans une première approche, les signaux identifiés ont été analysés par une méthode supervisée de type OPLS telle que précédemment éprouvée.

La Figure III-32 montre le résultat de l'analyse OPLS réalisée sur la base des 2035 ions révélés par le logiciel XCMS

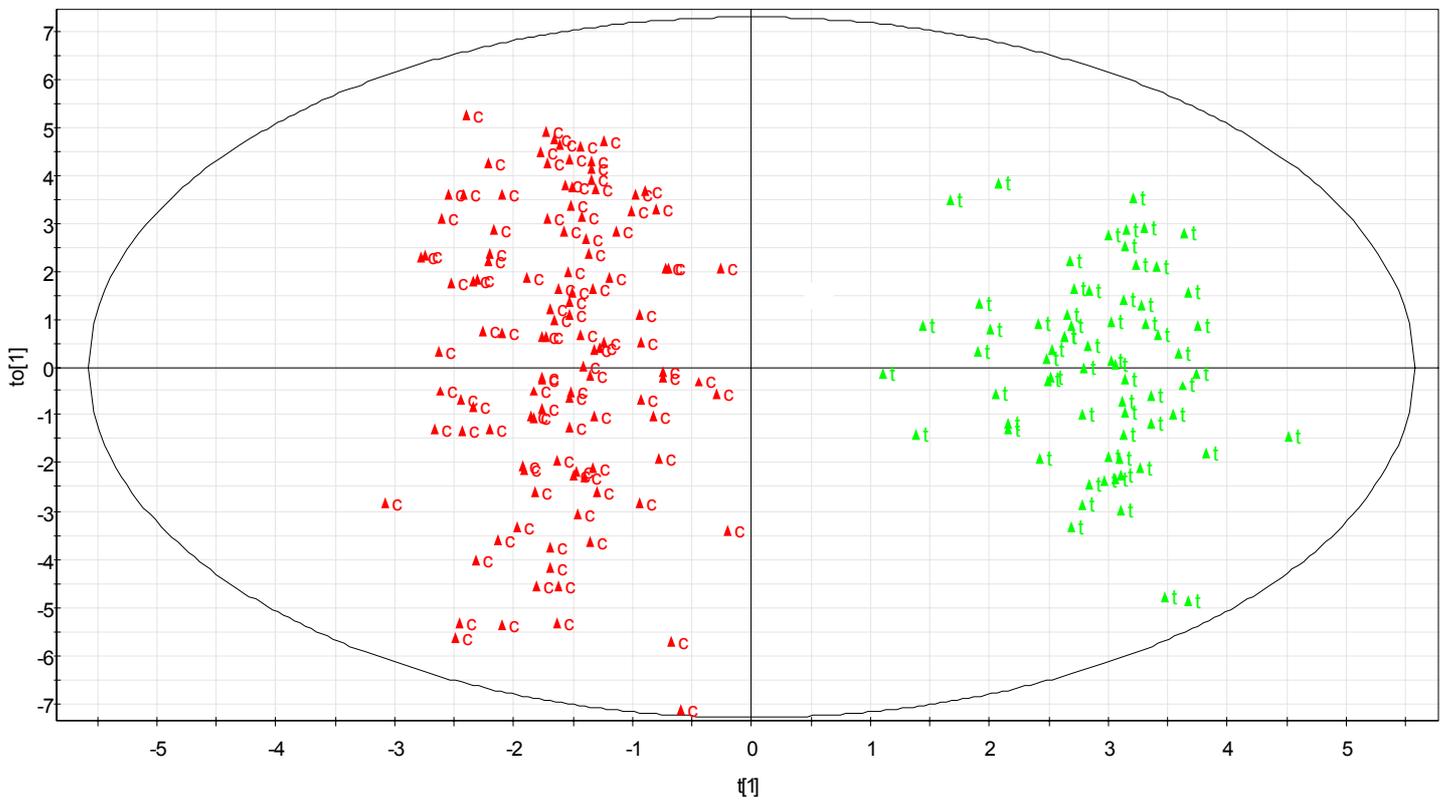


Figure III-33 : OPLS réalisée sur les 80 ions extraits comme potentiels biomarqueurs et présents dans les empreintes métabolomiques urinaires. Les triangles rouges représentent les observations correspondant aux chevaux contrôles et les triangles verts représentent les observations correspondant aux chevaux traités

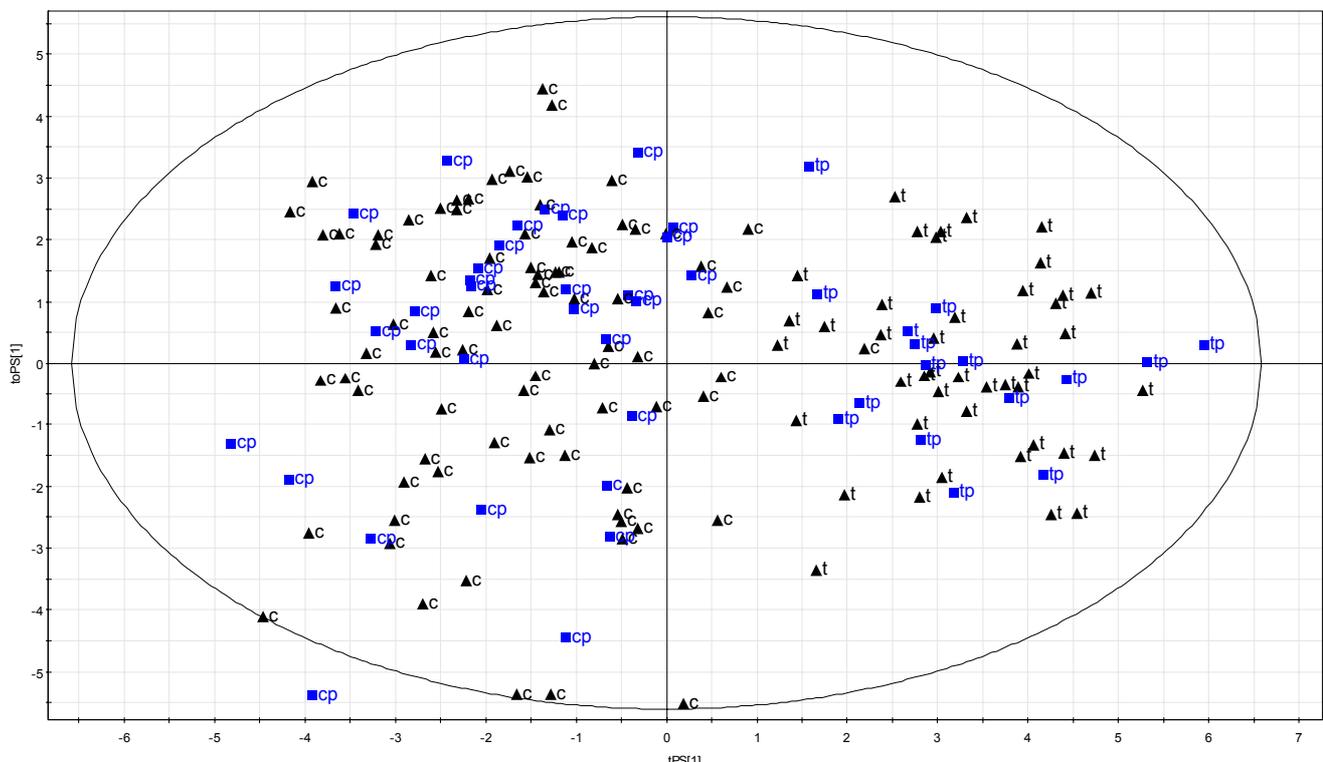


Figure III-34 : OPLS réalisée sur la base de 80 ions extraits comme de potentiels biomarqueurs et présents dans les empreintes urinaires. Les triangles noirs c et t représentent respectivement les chevaux contrôles et les chevaux traités du jeu d'étalonnage. Les carrés bleus cp et tp représentent respectivement les chevaux contrôles et traités du jeu de validation, c'est-à-dire qui ont été prédit par le modèle.

Une nette séparation entre les différents échantillons collectés chez la population contrôle et traitée à la reGH apparaît sur cette Figure. Les caractéristiques du modèle sont excellentes avec des valeurs de $R^2(Y)= 0,92$ et $Q^2(Y)= 0,80$. Ces résultats démontrent d'une part que la variabilité inter individus est inférieure à la variabilité induite par le traitement puisque la discrimination entre les deux populations reste possible avec l'analyse d'échantillons collectés chez une population très hétérogène. D'autre part, la valeur élevée de $Q^2(Y)$ confirme que le pouvoir prédictif d'un modèle augmente lorsque la variabilité inter individuelle est prise en compte dans l'analyse.

1.1.2.2 Analyse fondée sur les intensités MS de 80 biomarqueurs

Les analyses réalisées dans la partie I ont permis la mise en évidence de 80 biomarqueurs potentiels très impliqués dans la discrimination des échantillons urinaires collectés chez des chevaux témoins et traités à l'hormone de croissance recombinante équine.

La Figure III-33 montre le résultat de l'analyse OPLS réalisée sur la base de ces 80 ions. Elle révèle également une très forte discrimination entre les échantillons collectés chez la population contrôle et celle traitée à la reGH ce qui se traduit par des valeurs élevées de $R^2(Y)= 0,78$ et $Q^2(Y)= 0,70$. Cette analyse renforce d'une part la validité des ions sélectionnés précédemment qui conservent leur pouvoir discriminant. D'autre part, la valeur de $Q^2(Y)$ est élevée ce qui suggère que le modèle pourra permettre la prédiction d'échantillons inconnus avec une forte probabilité.

1.1.3. Validité du modèle

Le modèle présenté en Figure III-33 a été soumis à une validation afin de s'assurer de sa robustesse et de sa fiabilité.

1.1.3.1 Validation croisée (Figure III-34)

De la même manière que pour les analyses réalisées dans la première partie, la validation croisée repose sur la division du jeu de données initial en deux nouveaux jeux : un jeu d'étalonnage comprenant 2/3 des données initiales et un jeu de validation ($n=170$) comprenant le tiers restant des données. L'objectif est d'établir un modèle descriptif fiable sur le jeu d'étalonnage et de tester son pouvoir prédictif grâce au jeu de validation.

Sur la base des 80 variables sélectionnées comme des marqueurs potentiels de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine, le jeu d'étalonnage ($n= 80$) a été soumis à une analyse OPLS permettant d'extraire 6 composantes (1 prédictive + 5 orthogonales).

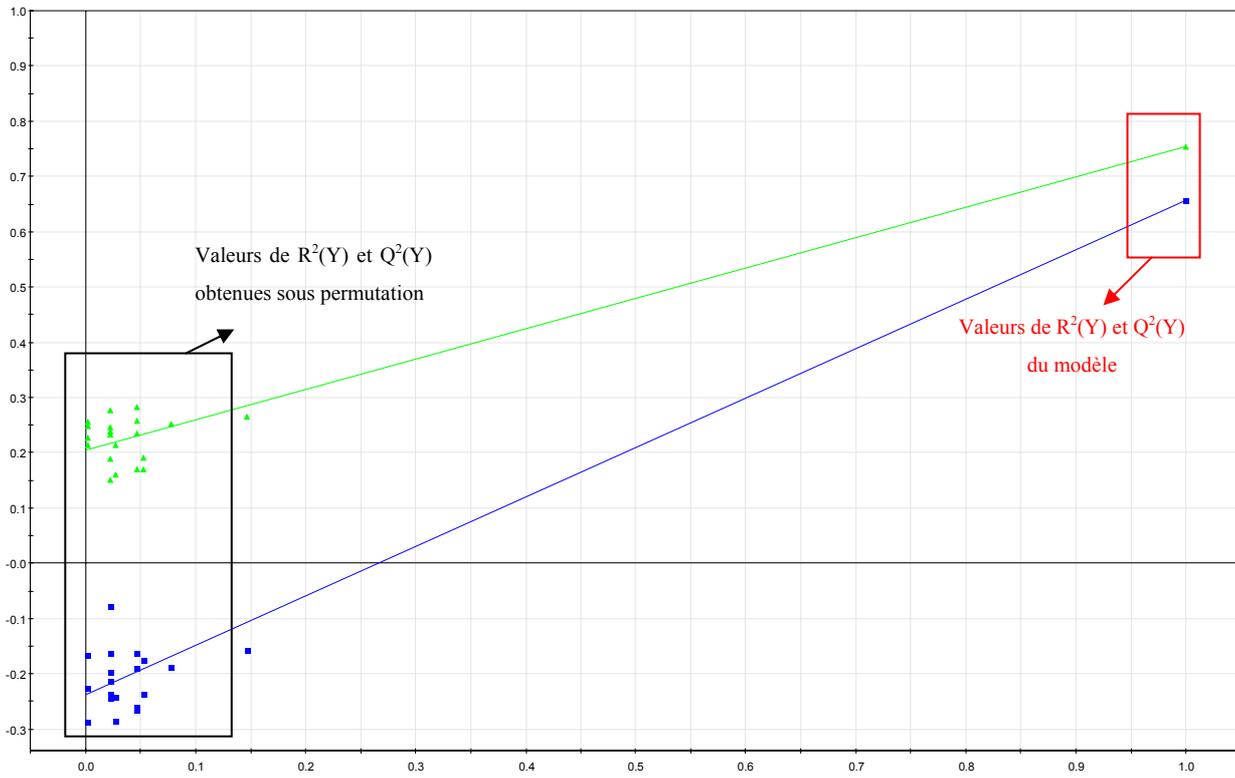


Figure III-35 : Test de permutation consistant à réaffecter aléatoirement la variable Y du jeu de donnée provenant de l'analyse des extraits plasmatiques de l'expérimentation de Toulouse.

La Figure III-34 représente la composante prédictive et la première composante orthogonale du modèle mis en place. Les échantillons urinaires appartenant à la population contrôle et celle traitée à la reGH sont parfaitement discriminés dans le jeu d'étalonnage (sigles noirs). Les caractéristiques du modèle sont les suivantes : $R^2(Y) = 0,78$ et $Q^2(Y) = 0,62$. Ces valeurs indiquent que le modèle restitue parfaitement la variable Y (l'appartenance de chaque échantillon au groupe de la population contrôle ou traitée à l'hormone de croissance recombinante équine). Le jeu de validation a ensuite été prédit par le modèle (sigles bleus) et tous les échantillons ont été bien classés confirmant les excellentes qualités du modèle. De plus, les probabilités qu'ont les échantillons d'appartenir au modèle sont excellentes (supérieur à 95%).

Le modèle établi sur la base des 80 ions choisis est donc robuste et fiable. Néanmoins, un test de permutation a été réalisé afin de conforter ces résultats.

1.1.3.2 Test de permutation

La Figure III-35 résulte du test de permutation effectué sur la variable Y. Elle montre une baisse significative des valeurs de $R^2(Y)$ et $Q^2(Y)$ lorsque la variable Y est soumise à vingt permutations. Le modèle d'un point descriptif et prédictif est très affecté par cette permutation ce qui démontre que le modèle n'est pas du à un facteur chance.

En complément, un calcul de CV-ANOVA a été réalisé et une valeur de $p = 4E-15$ a été obtenue démontrant que le modèle est hautement significatif.

1.1.4. Conclusions

L'analyse d'un grand nombre d'échantillons ($n > 250$) a permis de mettre au point un modèle chimiométrique capable de discriminer une population de chevaux contrôles ($n > 160$) d'une population traitée à l'hormone de croissance recombinante équine ($n > 90$) à partir de leurs prises d'empreintes urinaires. Une étape de validation croisée a permis de prouver que le modèle était capable de prédire des échantillons connus sans erreur de classification et avec une très forte probabilité. De plus, les tests de permutation ont montré que le modèle était fiable et robuste. Tous ces résultats laissent penser que ce nouvel outil dépistage pourra donc permettre la prédiction d'échantillons inconnus.

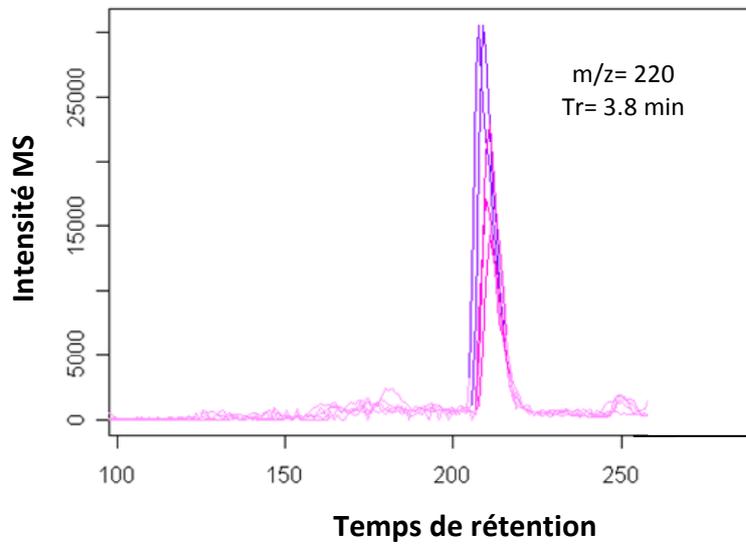


Figure III-36 : Chromatogramme d'ion extrait du métabolite d'intérêt choisi pour l'élucidation structurale en mode d'ionisation positif

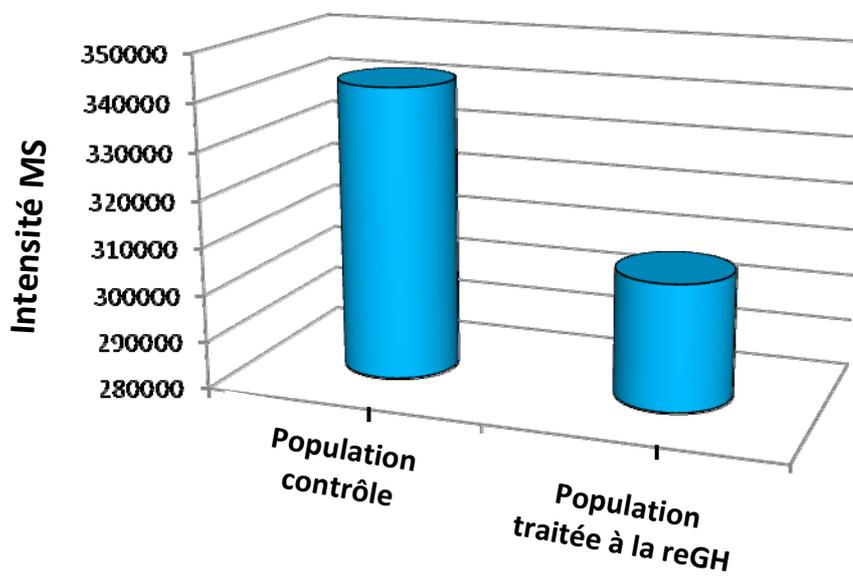


Figure III-37 : Différence d'intensité MS observée entre la population contrôle et traitée à l'hormone de croissance recombinante équine pour l'ion $m/z=220$ et $tr=3.8\text{ min}$ détecté en mode d'ionisation positif.

1.2 Stratégie d'élucidation structurale d'un biomarqueur d'intérêt

Outre la possibilité d'approfondir les connaissances fondamentales sur un sujet donné, l'identification des métabolites est une étape qui peut permettre la découverte de nouveaux biomarqueurs. C'est un processus long et laborieux. Si l'on compare cette tâche avec les identifications en analyses transcriptomiques et protéomiques, elle s'avère peu aisée. En effet, en transcriptomique, les séquences basiques des produits des gènes peuvent être déchiffrées à l'aide du code à quatre lettres des nucléotides ; il en est de même en protéomique avec le code à 20 lettres des acides aminés. Cependant, dans le cadre d'une approche métabolomique, chaque métabolite doit être identifié *de novo*.

A l'heure actuelle, la liste des structures chimiques non identifiées issues des analyses métabolomiques croît exponentiellement. La mise en place de bases de données telles que HMDB ou KEGG facilite cette étape. Cependant, une interprétation poussée des spectres CID obtenus lors des analyses reste l'étape clef pour réussir une étape d'élucidation structurale. Dans ce paragraphe, une stratégie d'élucidation structurale a été développée pour tenter d'identifier un métabolite d'intérêt.

1.2.1 Propriétés du biomarqueur d'intérêt

La mise au point du modèle métabolomique présenté en Figure III-33 est fondée sur 80 biomarqueurs pertinents d'un point de vue statistique et chromatographique. Ces ions présentent des propriétés différentes en terme de rapport masse sur charge, de temps de rétention et d'intensité MS. Comme évoqué précédemment, l'élucidation structurale est une étape longue et fastidieuse qui nécessiterait un travail de plusieurs mois voire plusieurs années pour élucider les 80 ions d'intérêts sélectionnés. Nous avons donc décidé de développer une stratégie d'élucidation structurale sur un seul métabolite d'intérêt car le modèle chimiométrique développé est suffisant pour être utilisé tel quel en dépistage.

L'ion $m/z=220$ et $Tr=3,8$ minutes a été choisi pour le développement de notre stratégie d'élucidation structurale (Figure III-36). L'intensité MS de cet ion a été un facteur de choix décisif dans sa sélection. En effet, son abondance dans les extraits urinaires est relativement élevée ce qui a permis d'envisager directement une étape de fragmentation sans purification préalable.

Des différences d'intensité MS très significatives de cet ion ont été relevées en début du traitement entre la population contrôle et traitée à la reGH (Figure III-37).

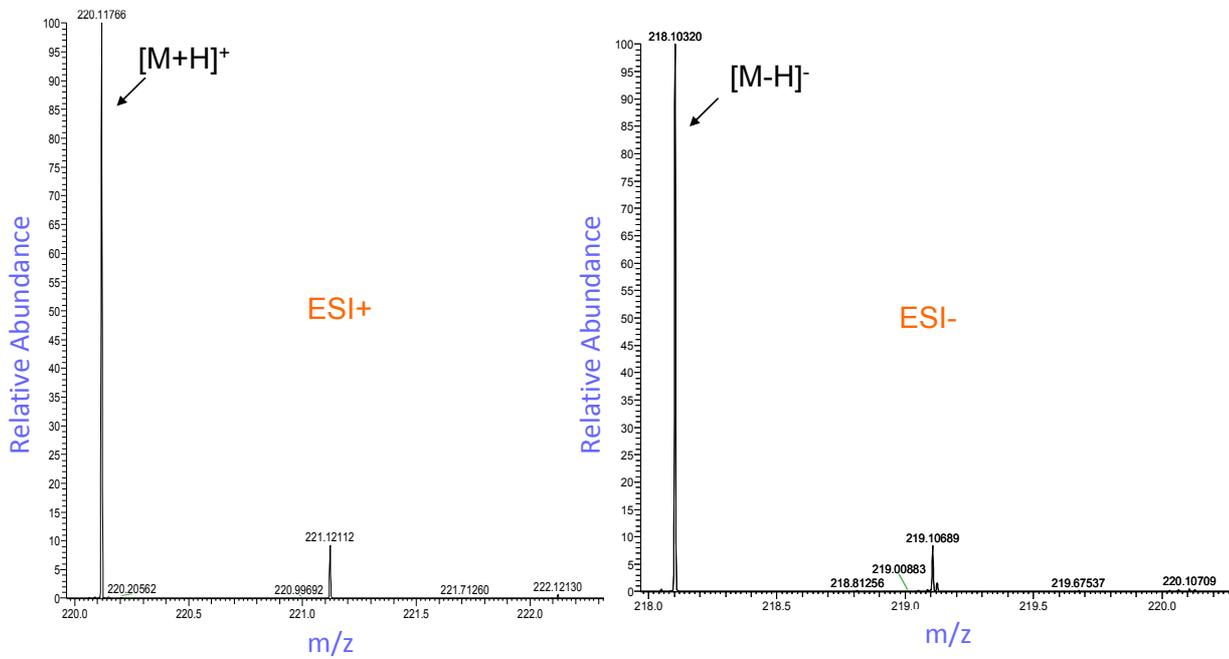


Figure III-38 : Mesure de la masse exacte de l'ion d'intérêt en mode d'ionisation positif et négatif

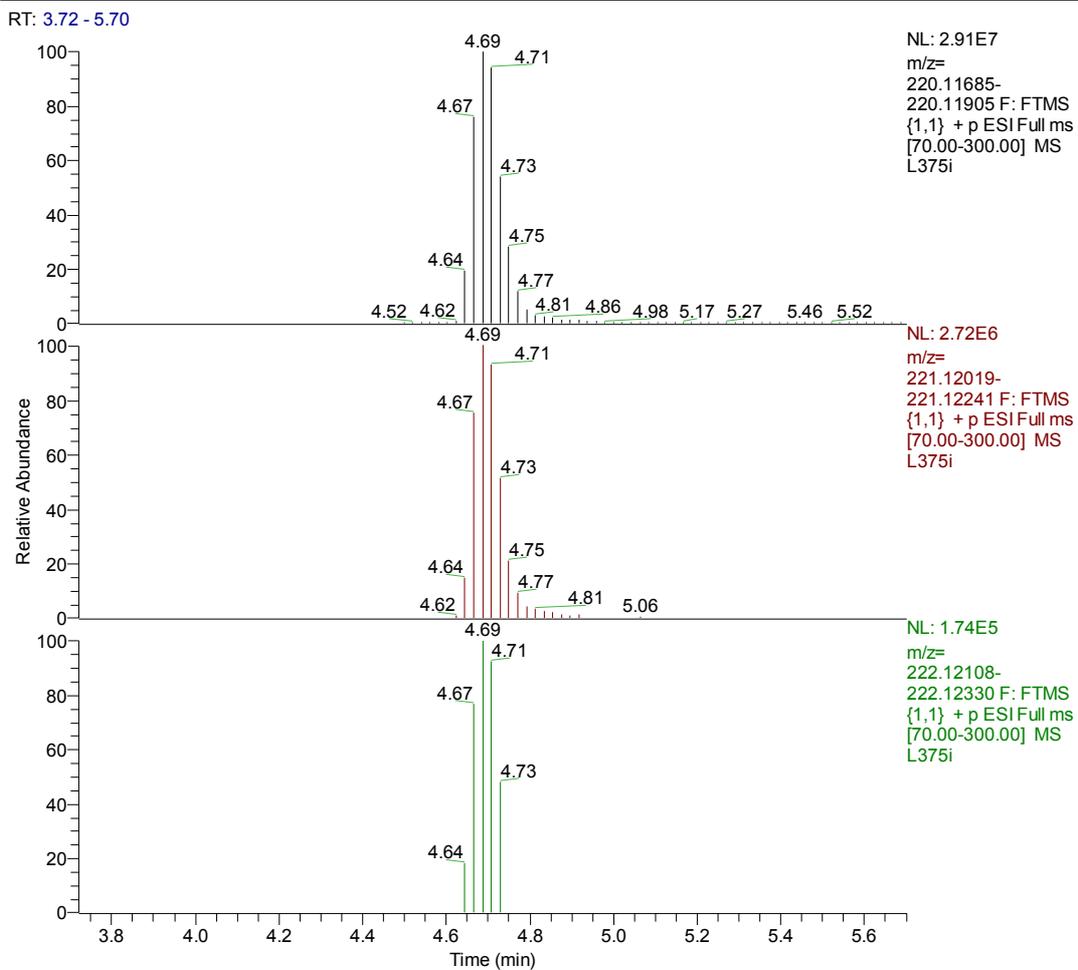


Figure III-39 : Nombre de point par pic pour la mesure de l'ion d'intérêt en mode d'ionisation négatif

Elle représente plus précisément les intensités MS observées pour les deux populations après 3 jours de traitement à l'hormone de croissance recombinante équine.

1.2.2 Mesure de la masse exacte par spectrométrie de masse haute résolution

Avant de fragmenter l'ion d'intérêt, une mesure de masse exacte par spectrométrie de masse haute résolution a été effectuée. Une trappe orbitale (Exactive, Thermo Scientific) a été utilisée. Cette mesure a été effectuée en mode d'ionisation positif et négatif à une résolution fixée à 30 000 (Figure III-38). Les valeurs de masse obtenues sont les suivantes : $[M+H]^+ = 220,11766$ et $[M-H]^- = 218,1038$. Ces deux mesures de masse exacte conduisent à la même proposition de formule brute $C_9H_{17}NO_5$. Le nombre de points par pic est acceptable comme l'atteste la Figure III-39.

Les bases de données ont alors été interrogées afin de savoir si des composés de masse exacte proche de celle mesurée et répondant à la même formule brute proposée étaient répertoriés. La vitamine B5 de masse exacte $M = 219,1106 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ soit $[M+H]^+ = 220,1178$, listée dans la base de données HMDB metabolome, s'est avérée un candidat potentiel. Une étape de fragmentation MS-MS a alors été entreprise pour confirmer ou réfuter cette hypothèse.

1.2.3 Fragmentation et analyse du spectre CID

L'ion d'intérêt a été fragmenté en mode d'analyse « Fragment ion scan » (ou Product ion scan ou Daughter scan). Dans ce mode, un ion parent de rapport m/z donné est sélectionné. Il est fragmenté puis l'ensemble de la gamme de masse est balayé pour analyser les ions fragments produits. Pour cette étape de fragmentation, nous avons décidé d'utiliser le spectromètre de masse hybride Q-TOF en mode d'ionisation positif. Le spectre de masse obtenu est présenté en Figure III-40. Comme on peut l'observer, le spectre de masse obtenu en MS^2 présente de nombreux fragments dont les ions de rapport $m/z = 202,1061$, $m/z = 184,0978$, $m/z = 116,9866$ et $m/z = 90,0542$. Les deux premiers ions fragments ($m/z = 202$ et $m/z = 184$) sont caractéristiques de la perte de molécules d'eau. Le standard de la vitamine B5 a alors été commandé et analysé par MS^2 sur le spectromètre Q-TOF. Ces analyses ont permis de montrer que le métabolite d'intérêt et le standard possèdent le même temps de rétention et les mêmes fragments. Cette étape confirme de manière définitive l'hypothèse de départ.

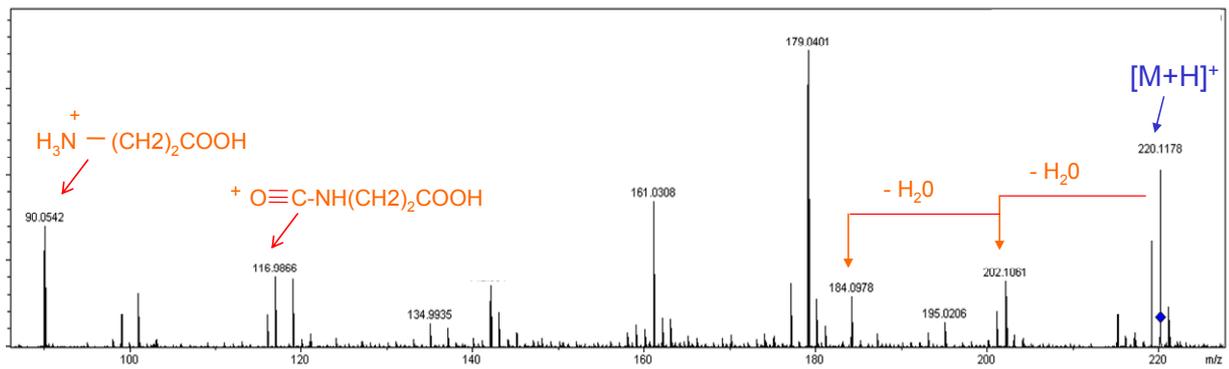


Figure III-40 : Spectre de fragmentation de l'ion d'intérêt obtenu en mode d'ionisation positif.

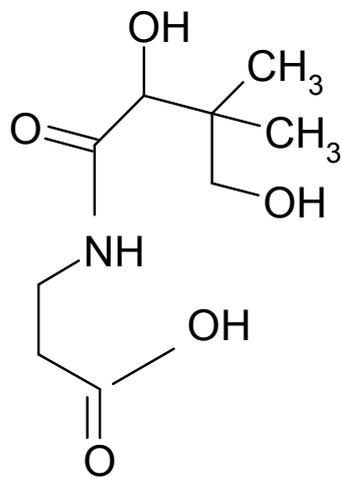


Figure III-41 : Structure développée de la vitamine B5

1.2.4 La vitamine B5 : un nouveau candidat biomarqueur de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine ?

La vitamine B5 est une vitamine hydrosoluble également appelée acide pantothénique ou encore panthenol (Figure III-41). Cette vitamine provient de l'alimentation et est en particulier concentrée dans les germes et céréales complètes. Son apport est donc exogène.

Précurseur et constituant du coenzyme A, la vitamine B5 favorise la croissance et la résistance de la peau et des muqueuses. Elle est nécessaire au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines.

La diminution de sa concentration urinaire chez les animaux traités à l'hormone de croissance recombinante équine pourrait être expliquée par le fait qu'elle est utilisée pour produire d'avantage de Coenzyme A qui intervient dans la dégradation des lipides (hélice de Lynen) et du glucose (glycolyse), effets biologiques connus de l'hormone de croissance. Son implication dans la discrimination des populations contrôlée et traitée à l'hormone de croissance recombinante équine pourrait ainsi être justifiée.

2. APPORT DE LA METABOLOMIQUE AU CONTROLE ANTI-DOPAGE DE L'UTILISATION DE GH : MISE EN PLACE DE PASSEPORT BIOLOGIQUE

2.1 Introduction

Depuis l'émergence des techniques « omiques », le Laboratoire des Courses Hippiques a décidé de s'engager dans de nouvelles stratégies pour le contrôle de l'administration de l'hormone de croissance en complément des méthodes de dépistage préalablement développées (mesure de l'IGF-I, anticorps anti-reGH, détection directe par spectrométrie de masse). Ces nouveaux travaux de recherche ont d'une part porté sur l'étude par transcriptomique de l'expression des gènes affectés par un traitement à l'hormone de croissance, et d'autre part sur l'étude d'empreintes métabolomiques collectées chez des chevaux contrôlés et traités qui a fait l'objet de la présente thèse et qui a été développée dans ce manuscrit.

En parallèle, les organisations internationales responsables de coordonner et de superviser la lutte contre le dopage dans le sport ont pris l'initiative de développer le concept du passeport biologique de l'athlète (Sottas *et al*, 2010a).

Le développement de ces passeports biologiques constitue une vraie révolution puisque la suspicion de l'administration d'une substance peut être apportée à la fois par sa détection directe mais également par des méthodes de détection indirectes reposant sur le suivi de biomarqueurs spécifiques (Sottas *et al*, 2010b).

Le principe fondamental de ce passeport est basé sur le suivi longitudinal d'un certain nombre de variables biologiques d'un sportif permettant de faciliter la détection du dopage, plutôt que sur la détection directe traditionnelle du dopage.

Concernant le contrôle anti-dopage équin, l'application de cette mesure correspond à une extension de l'article 6 de la Fédération internationale des autorités hippiques des courses au galop qui stipule que « la présence de tout indicateur scientifique permettant de prouver l'administration ou l'exposition à une substance interdite est équivalent à la détection directe de cette substance ».

Ce paragraphe vise à présenter et comparer les résultats issus des premières études qui ont été initiées au Laboratoire des Courses Hippiques en collaboration avec l'association du Cheval Français pour établir un suivi longitudinal des cinquante meilleurs trotteurs Français. Les différents résultats obtenus proviennent de l'analyse des méthodes de contrôle anti-dopage classiques effectuées au LCH fondées sur des biomarqueurs indirects tels que les IGF-Is ou les anticorps anti-hormone de croissance. Mais ils proviennent également de la mesure de nouveaux paramètres comme la variation de gènes (étude transcriptomique) ou la variation de métabolites (étude développée dans ce manuscrit). Ces premiers résultats permettent ainsi d'apporter certains éléments de réponse sur l'intérêt et l'apport de la métabolomique dans le contrôle anti-dopage.

2.2 Approche fondée sur des paramètres multiples

Comme évoqué dans le chapitre I « Travaux Antérieurs », le temps de demi-vie très court de l'hormone de croissance ainsi que sa ressemblance en terme de séquence peptidique avec les différentes formes recombinantes disponibles rendent difficile sa détection directe.

Les marqueurs indirects sont alors une alternative intéressante. Au lieu d'être focalisé sur la molécule elle-même, les marqueurs indirects permettent de révéler des modifications biologiques induites par l'hormone de croissance. L'Insulin Growth Factor-I (Popot *et al*, 2001) et les anticorps anti-hormone de croissance (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008b) sont des biomarqueurs indirects bien connus et décrits dans le chapitre I.

Les biomarqueurs mis en évidence grâce aux récentes analyses transcriptomiques et métabolomiques, portant respectivement sur la variation de huit gènes et de 80 métabolites, sont également utilisées au Laboratoire des Courses Hippiques pour établir les passeports biologiques d'une cinquantaine de chevaux de course.

2.3 Résultats des analyses longitudinales réalisées sur plusieurs chevaux de course

Pendant l'année 2009 et au cours de l'année 2010, les échantillons biologiques des cinquante meilleurs trotteurs Français ont été analysés tous les mois afin de mesurer différents paramètres biologiques en vue de l'établissement de passeport biologique et plus précisément de l'amélioration du contrôle anti-dopage à l'hormone de croissance.

2.3.1 Mesure de l'IGF-I

Lorsque l'hormone de croissance est administrée, celle-ci agit directement sur le foie des animaux, l'un de ses tissus cibles, augmentant ainsi la concentration d'IGF-I libérée. Ce marqueur secondaire de la GH a été très étudié et un seuil à 860 ng.mL⁻¹ a été défini et proposé au-delà duquel l'animal est suspecté avoir reçu de l'hormone de croissance. L'IGF-I a été dosée dans les échantillons par ELISA (annexe protocole de détection de l'IGF-I dans le plasma).

Les analyses réalisées dans le cadre de l'établissement de passeport biologique n'ont pas permis de suspecter une administration de reGH conformément au seuil de 860 ng.mL⁻¹. Les interprétations avancées sont les suivantes :

- Il n'y a eu effectivement aucune administration d'hormone de croissance recombinante,
- Le seuil fixé à 860 ng.mL⁻¹ est relativement élevé afin d'éviter les faux positifs,
- Les prélèvements ont été effectués en dehors des fenêtres de détection.

2.3.2 Mesure des anticorps anti-hormone de croissance

Comme évoqué dans les travaux antérieurs, une production spécifique d'anticorps dirigés contre l'hormone de croissance, lorsque celle-ci est administrée au cours d'un traitement, apparaît.

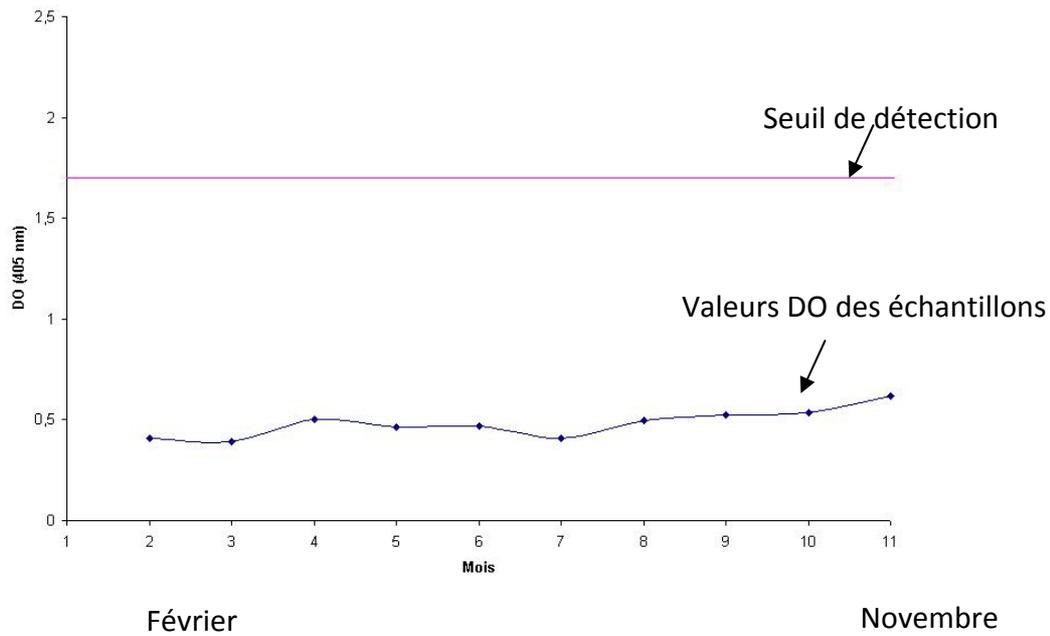


Figure III-42 : Evolution de la production d'anticorps en fonction des mois de prélèvements dans des échantillons plasmatiques collectés sur un cheval donné.

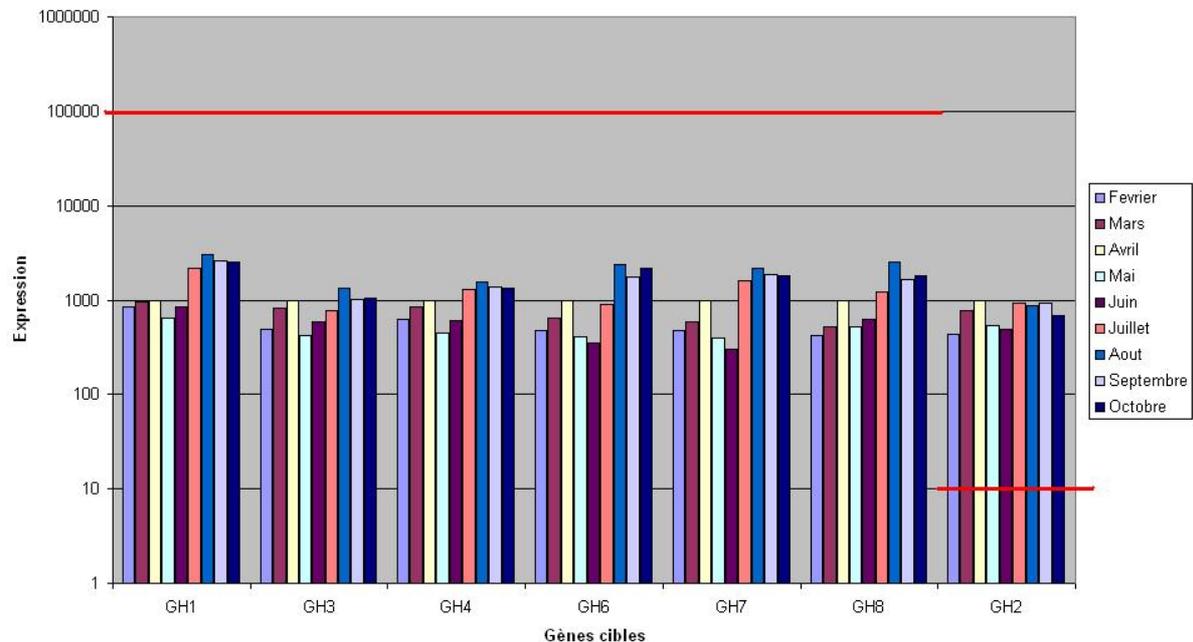


Figure III-43 : Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR à partir d'échantillons sanguins.

La mesure des anticorps dirigés contre l'hormone de croissance a été effectuée par ELISA (Bailly-Chouriberry *et al*, 2008b ; annexe protocole de détection des anticorps anti-reGH par ELISA dans le sérum). Pour ce test, une valeur seuil a été définie à $DO_{405nm} = 1,7$, correspondant à trois fois la DO mesurée pour la valeur moyenne de la ligne de base. Pour les analyses réalisées, la valeur de densité optique relevée est dans 85% des cas inférieure à celle du seuil de détection. Par exemple, la Figure III-42 présente l'évolution de la densité optique mesurée de Février à Novembre 2009 chez un cheval pour lequel aucune anormalité n'a pu être mise en évidence.

Les 15% d'échantillons suspects peuvent être liés à :

- la présence d'anticorps anti-hormone de croissance produits suite à une administration d'hormone de croissance,
- l'injection d'autres produits dopants capables d'être reconnus par les anticorps anti hormone de croissance,
- la présence de réactions immunitaires liées à la bactérie *Escherichia coli* (faux suspects).

2.3.3 Mesure de l'expression des gènes

Huit gènes affectés par un traitement à l'hormone de croissance recombinante équine ont pu être mis en évidence lors d'une étude génomique menée par le LCH. La finalité est de pouvoir quantifier l'expression de ces gènes par une analyse transcriptomique à un instant t et dans un environnement donné. La quantité des ARN messagers extraits dans les cellules sanguines et provenant de l'expression des 8 gènes ciblés est mesurée par RT-qPCR. Une surexpression des gènes GH1, GH3, GH4, GH5, GH6, GH7, et GH8 et une sous expression du gène GH2 apparaît lors d'un traitement à l'hormone de croissance recombinante équine. L'analyse de l'ensemble des échantillons n'a pas permis de suspecter une administration quelconque. Le profil de l'expression des gènes obtenu pour un cheval donné est présenté sur la Figure III-43. Les causes de ce résultat peuvent être diverses :

- Il n'y a eu effectivement aucune administration d'hormone de croissance recombinante
- La méthode n'est pas suffisamment sensible pour la détection d'une administration d'hormone de croissance à très faible dose dans des cocktails
- Les prélèvements effectués ne coïncident pas avec les fenêtres de détection

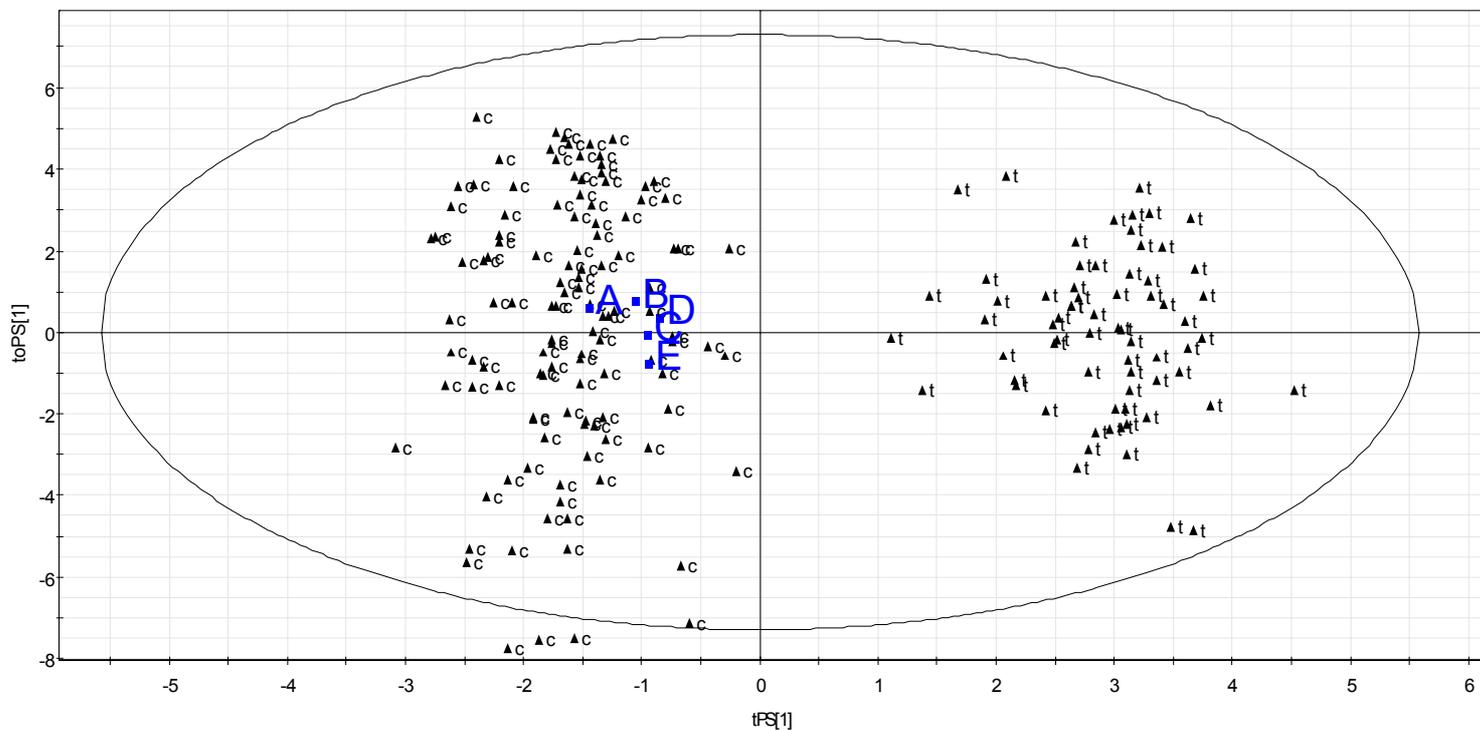


Figure III-44 : Prédiction des échantillons urinaires (A, B, C, D, E,) collectés chez 5 chevaux au profil « métabolomique normal » sur le modèle métabolomique développé en Figure III-33 composé d'échantillons urinaires collectés chez des chevaux non traités (c) et traités à la reGH (t) et fondé sur 80 biomarqueurs.

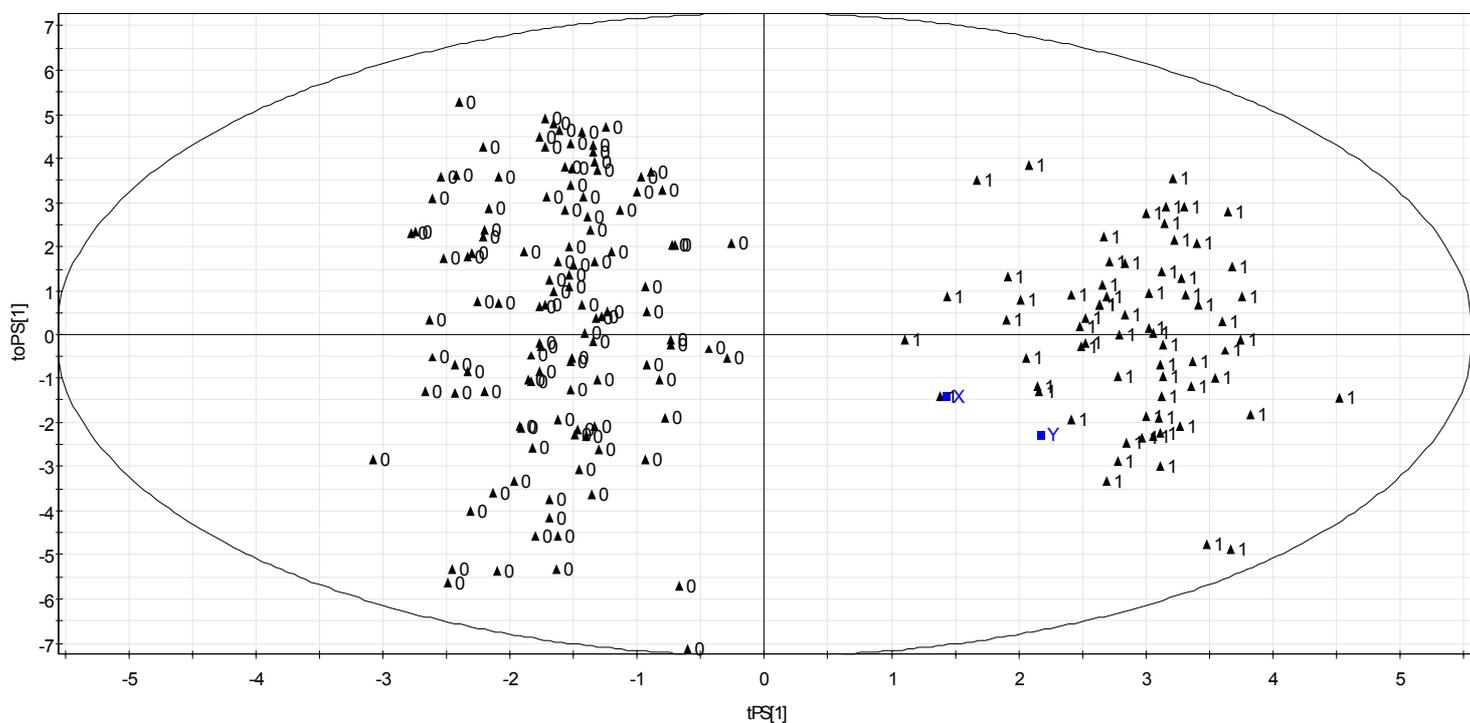


Figure III-45 : Prédiction des échantillons urinaires (X, Y) collectés chez deux chevaux au profil « métabolomique anormal » sur le modèle métabolomique développé en Figure III-33 composé d'échantillons urinaires collectés chez des chevaux non traités (c) et traités à la reGH (t) et fondé sur 80 biomarqueurs.

2.3.4 Mesure de la variation de 80 métabolites

Le modèle métabolomique qui a été mis en place grâce à l'analyse d'échantillons collectés chez des animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance et présentée sur la Figure III- 33 a servi pour la prédiction des échantillons urinaires collectés lors de la mise en place de passeport biologique. Tous les échantillons collectés dans le cadre de l'élaboration de passeport biologique ont pu être prédits avec une excellente probabilité sur le modèle. 90% des analyses réalisées conduisent à des profils métabolomiques normaux où les coordonnées des échantillons prédits possèdent des coordonnées similaires à la population contrôle (Figure III-44).

Les 10% d'échantillons suspects (Figure III-45) peuvent être liés à :

- l'administration d'hormone de croissance,
- l'administration d'une autre substance ayant le même métabolisme ou un effet que l'hormone de croissance,
- une forte perturbation métabolique provoquée par un facteur extérieur.

2.3.5 Conclusions

Cette étude a permis pour la première fois l'application de différentes méthodes de dépistage de l'administration de l'hormone de croissance et en particulier celle reposant sur une approche métabolomique pour l'analyse d'échantillons collectés chez des trotteurs Français. Toutes ces analyses ont été réalisées dans le cadre de la mise en place de passeport biologique. Concernant le contrôle de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine, les résultats obtenus ont globalement montré une convergence et une cohérence des différentes techniques utilisées. Néanmoins, l'analyse d'un nombre minoritaire d'échantillons a permis de suspecter une administration d'hormone de croissance par une méthode de dépistage donnée sans que cette suspicion puisse être confirmée par les autres méthodes. Ainsi, une concentration en anticorps-anti hormone de croissance supérieure au seuil de détection a pu être observée pour une dizaine d'échantillons pour lesquels les profils métabolomiques et transcriptomiques étaient normaux. De la même manière, une dizaine d'autres échantillons ont présenté des profils métabolomiques anormaux avec des concentrations en ARN messagers et anticorps anti-hormone de croissance conformes à la normale. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ces résultats. Tout d'abord, les études fondées sur la recherche d'anticorps anti-hormone de croissance nécessitent un délai avant d'induire une réponse immunitaire.

Il est donc probable que des échantillons prélevés quelques jours après un traitement ne permettent pas de mesurer une concentration anormalement élevée en anticorps mais puissent être à l'origine d'un profil métabolomique suspect.

De façon plus probable, les méthodes de dépistage développées et utilisées ne sont peut être pas spécifiques uniquement de l'administration d'hormone de croissance. L'injection de molécules proches par leur structure ou leurs effets biologiques de l'hormone de croissance pourrait également induire une réponse positive. Un travail conséquent d'analyse doit à présent être réalisé pour établir une relation entre la prise de produits dopants (la cause) et toutes les modifications observées pour chaque paramètre mesuré (les effets). L'équipe du laboratoire d'analyse de dopage suisse fournit beaucoup d'efforts à ce sujet avec notamment le développement de l'approche de Bayes (Sottas *et al*, 2010a ; Sottas *et al*, 2010b) afin de pouvoir l'utilisation du passeport biologique dans un contexte judiciaire.

3. CONCLUSIONS DE LA SECONDE PARTIE

L'étude de profils métaboliques consécutivement à une administration d'hormone de croissance a permis d'ouvrir la voie à une nouvelle stratégie de dépistage. Les points forts de cette technique sont la quasi absence de préparation des échantillons, le faible volume d'échantillon consommé et sa compatibilité avec des analyses haut débit qui sont des critères de choix pour le développement d'une méthode de dépistage. Les résultats issus de l'analyse d'extraits urinaires collectés chez plus de 160 chevaux ont permis de valider la robustesse des modèles établis dans la première partie de cette étude uniquement fondés sur des animaux d'expérimentation. En prenant en compte cette variabilité inter individus, le modèle métabolomique développé peut maintenant être utilisé comme un nouvel outil prédictif.

En complément, une stratégie d'élucidation structurale a été développée. Grâce à la qualité des spectres MS et MS² obtenus et à la recherche effectuée sur des bases de données adaptées, de type HMDB ou KEGG, la vitamine B5 a pu être identifiée comme un métabolite d'intérêt dans la discrimination d'animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance.

Pour la première fois une étude reposant sur trois méthodes différentes de dépistage de l'hormone de croissance en vue de l'établissement de passeport biologique d'une cinquantaine de chevaux a été réalisée au Laboratoire des Courses Hippiques. Elle fut une opportunité pour tester l'approche métabolomique sur des échantillons de routine et pour comparer les résultats obtenus avec ceux fondés sur la mesure des anticorps anti-hormone de croissance et l'expression des gènes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En raison de ses propriétés uniques associées à la croissance en général, l'hormone de croissance a été particulièrement étudiée depuis près de 60 ans. Les stratégies analytiques dédiées à la mise en évidence de son utilisation ont connu un véritable essor ces cinq dernières années et permettent d'assurer un contrôle de son usage conformément aux réglementations en vigueur. Ainsi, dans le cadre du contrôle anti-dopage équin, la détection des anticorps anti-hormone de croissance dans le plasma par test ELISA permet de suspecter une administration pendant plusieurs mois. La confirmation d'une suspicion est réalisée par détection directe de l'hormone de croissance dans le plasma. Cette analyse est réalisée par LC-MS-MS et autorise une détection jusqu'à 48 heures après l'injection de la molécule au cheval.

Cependant en raison de sa rapide élimination dans le sang, de l'homologie des séquences peptidiques entre les formes natives et recombinantes, ainsi que du délai nécessaire pour induire une réponse de ses marqueurs spécifiques, la détection de l'administration de l'hormone de croissance reste encore difficile les premiers jours suivant une administration. Aux difficultés de détection propres à chaque molécule s'ajoutent les contraintes associées aux nouvelles pratiques illégales rapportées dans le domaine de l'élevage et du sport. Parmi elles, l'utilisation de cocktails très faiblement dosés. Ces stratégies nouvelles pourraient ainsi rendre transparentes ces pratiques eu égard aux méthodes de contrôle actuelles. Dans cette hypothèse, le recours à de nouvelles méthodes de détection et d'identification devient nécessaire pour dissuader de telles pratiques et ainsi améliorer le contrôle de l'utilisation de promoteurs de croissance.

Dans un contexte plus général, les techniques « omiques » telles que la génomique, la protéomique et la métabolomique se sont développées ces dernières années. Leur essor est né de la nécessité de comprendre la nature fondamentale des mécanismes de toxicité et du développement des maladies. En particulier, le développement des études du métabolome, ensemble des métabolites présents dans un milieu biologique donné, présente à l'heure actuelle de nombreux domaines d'application et est reconnu comme une technique d'intérêt dans les laboratoires et industries pharmaceutiques et agroalimentaires. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte de recherche de nouvelles stratégies de mise en évidence de pratiques anabolisantes.

Notre objectif a été de développer et d'évaluer la faisabilité, la pertinence et l'apport d'une approche métabolomique pour le contrôle anti-dopage de l'administration de l'hormone de croissance recombinante équine. Nous avons pour cela choisi d'utiliser la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Dans cette perspective, ce travail de thèse s'est articulé autour de trois grands axes :

Dans un premier temps, une méthode d'analyse globale du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été développée. Elle est fondée sur l'étude d'échantillons biologiques urinaires collectés sur deux animaux d'expérimentation. Cette méthode est caractérisée par l'utilisation de conditions les moins exhaustives possibles afin de détecter un maximum de métabolites. Ainsi, la préparation d'échantillon consiste à filtrer les échantillons sur des membranes de seuil de coupure 10 kDa suivi d'une étape de lyophilisation. Les conditions chromatographiques d'élution sont relativement lentes avec un temps d'analyse de 1 heure dans le but de limiter les phénomènes de coélution et de suppression d'ions. Cette méthode analytique a été complétée par le développement d'une procédure de traitement des données permettant le traitement des données issues des analyses LC-HRMS, cette étape devant être optimisée afin de limiter au maximum la perte d'information. La mise en place d'analyses statistiques multivariées a constitué la dernière étape de cette approche métabolomique. La validation de l'approche a fait l'objet d'une attention particulière ; en effet, une validation classique ne peut pas être envisagée sur un tel nombre de composés à étudier. Certains paramètres doivent cependant être pris en compte comme la répétabilité, la stabilité, afin de s'assurer que les variations observées ne sont pas attribuables aux erreurs analytiques mais bien aux phénomènes biologiques étudiés. Au vu des résultats obtenus, la faisabilité d'une approche métabolomique pour la mise en place future d'un nouvel outil de dépistage a été démontrée. Cette étude fondée uniquement sur deux animaux a alors été étendue à une population plus large afin de pouvoir être définitivement validée et ainsi entamer une étape de recherche de biomarqueurs intervenant dans la discrimination d'animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine.

La deuxième partie de ce travail a consisté à optimiser certains paramètres de la méthode mise au point afin de pouvoir analyser des échantillons urinaires et plasmatiques collectés chez une population plus conséquente constituée de 13 animaux.

Le travail d'optimisation nous a permis de réduire le temps de préparation des échantillons ainsi que le temps d'analyse tout en préservant la qualité des empreintes métabolomiques en terme de nombre d'ions détectés et de résolution chromatographique.

Cette démarche a été importante pour pouvoir analyser à haut débit l'ensemble des échantillons urinaires et plasmatiques. L'analyse des empreintes spectrométriques et le retraitement des données acquises ont permis d'une part d'établir des modèles descriptifs autorisant la discrimination parfaite entre des animaux contrôles et traités à l'hormone de croissance recombinante équine et d'autre part de mettre en évidence un certain nombre de signaux spectrométriques hautement impliqués dans cette discrimination. Au regard des résultats, l'administration de l'hormone de croissance engendre incontestablement des modifications dans le profil métabolomique urinaire et plasmatique des chevaux traités. La force des modèles établis est leur validité et robustesse éprouvées lors des tests de validation croisée et de permutation.

La troisième partie de ce travail a consisté à étendre et à valider l'étude développée en incluant un grand nombre d'échantillons ($n > 150$) afin de prendre en compte la variabilité inter-individus. Ce travail a permis la mise au point d'un nouvel outil de dépistage capable de prédire sans ambiguïté des échantillons inconnus. De plus, une stratégie d'identification structurale de nouveaux biomarqueurs de l'administration de l'hormone de croissance a pu être initiée. Elle est fondée sur des études de fragmentation MS-MS alliées à la recherche dans des bases de données adaptées. Ces travaux ont pu être mis en application et testés au Laboratoire des Courses Hippiques dans le cadre de l'établissement de passeport biologique d'une cinquantaine de chevaux. Les premiers résultats obtenus dans ce contexte n'ont pas permis de suspecter de manière ferme une administration de reGH. Cependant, les dernières avancées scientifiques pourront permettre de faciliter le lien entre la prise d'un produit dopant (la cause) comme l'hormone de croissance et les différents paramètres mesurés (les effets) à l'aide de différentes techniques d'analyse.

Ces travaux s'inscrivent dans le développement des approches non ciblées visant, à partir d'un volume faible de sang ou d'urine, à caractériser un état physiologique d'un individu et à mesurer son éventuelle déviation par rapport à son état de base. Ces analyses ont pour objectif final de générer de façon rapide et simple un maximum d'informations sur un échantillon donné afin de pouvoir révéler des profils anormaux pour les orienter vers des analyses de confirmation. Le travail restant à réaliser, pour améliorer le contrôle anti-dopage de manière générale, est toutefois très important car il s'agit de développer et multiplier à grande échelle les approches métabolomiques mais également les outils d'analyse des données pour que les passeports biologiques puissent devenir des armes efficaces.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*Selon la convention dite de Vancouver,
International Committee of Medical Journal Editors, 1991*

- Albini C, Quattrin T, Vandllen R, Macgillivray M. Quantitation of urinary growth hormone in children with normal and abnormal growth. *Pediatric Research* 1988;23(1):89-92.
- Anizan S, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP, Le Bizec B. A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry. 2010, Accepted to *Journal of Chromatography A*.
- Ankersen M, Hansen T, Ahnfelt-Ronne I and kappelgaard A. Growth hormone secretagogue: recent advances and applications. *Drug Discovery Today* 1999;4(11):497-506.
- Antti H, Ebbels T, Keun H, Bollard M, Beckonert O, Lindon J, Nicholson J, Holmes E. Statistical experimental design and partial least squares regression analysis of biofluid metabonomic NMR and clinical chemistry data for screening of adverse drug effects. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2004;73:139-149.
- Bailly-Chouriberry L. Détection de l'administration de l'hormone de croissance equine recombinante: application au contrôle antidopage dans les courses hippiques. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, 23 Novembre 2007.
- Bailly-Chouriberry L, Chu-Van E, Pinel G, Garcia P, Popot MA, André-Fontaine G, Bonnaire Y, Le Bizec B. Detection of secondary biomarker of met-eGH as a strategy to screen for somatotropin misuse in horseracing. *Analyst* 2008a;133(2):270-276.
- Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y and Le Bizec B. Elimination kinetic of recombinant equine growth hormone (reGH) in horse plasma by LC-MSⁿ (linear trap) measurements. *Analytical Chemistry* 2008b;80(21):8340-8347.
- Bailly-Chouriberry L. Evaluation of mRNA biomarkers in equine EPO doping control. 18th ICRAV conference, New Zealand, 7-13 March 2010.
- Bak J, Moller N, Schmitz O. Effects of growth hormone on fuel utilization and muscle glycogen synthase activity in normal humans. *American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism* 1991;23(5):E736-E742.
- Bleakney W. A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor. *Physical Review* 1929;34:157-160.
- Beaulieu E and Kelly P, 1990. *Hormones*, Paris.
- Bobin S, Popot M, Bonnaire Y, Tabet J. Approach to the determination of insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) concentration in plasma by high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry: use of a deconvolution algorithm for the quantification of multiprotonated molecules in electrospray ionization. *The Analyst* 2001;126:1996-2001.
- Bollard M, Stanley E, Lindon J, Nicholson J, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR in Biomedicine* 2005;18:143-162.

- Bonnaire Y, Bobin S, Popot M, Tabet J and Closset J, 1998. Studies of the structures of extractive and recombinant growth hormone from different species by mass spectrometry. In: B. Laviolette and M. Koupai-Abyazani (Eds), 12th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Vancouver, British Columbia, Canada, p. 58-65.
- Borromeo V, Abbate F, Berrini A, Bartolone A and Secchi C. Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine growth hormone in plasma. *Veterinary Research Communications* 2005;29 (Suppl. 2):173-176.
- Borromeo V, Berrini A, Gaggioli D and Secchi C. Heterophile antibody interference in a solid phase sandwich immunoassay for detection of equine growth hormone in plasma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;115:1-9.
- Botfields C, Ross R, Hinds C. The role of IGFs in catabolism. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;11(4):679-697
- Bowers C, Momany F, Reynolds G, Hong A. On the vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984;114(5):1537-1545.
- Branden C and Tooze J, 1996. Introduction à la structure des protéines, Paris.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. protein synthesis. *Science* 1973;179(5):77-79.
- Brown S, Kruppa G, Dasseux JL. Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* 2005;24(2):223-231.
- Bruce S, Tavazzi I, Parisod V, Rezzi S, Kochhar S, Guy P. Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2009;81(9):3285-3296.
- Burton J, McBride B, Block E, Glimm D, Kennely J. A review of bovine growth hormone. *Canadian Journal of Animal Science* 1994;74:167-201.
- Cahill C, Van der Kolk H, Goode J and Hayden T. Development of homologous radioimmunoassays for equine growth hormone and equine prolactin and their application to the detection of circulating levels of hormone in horse plasma. *Reproduction Nutrition Development* 1994;34:309-328.
- Cameron C, Kostyo J, Adamafio N, Brostedt P, Roos P, Skottner A. The acute effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis. *Endocrinology* 1988;122(2):471-474.
- Casanueva F. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1992;21:483-517.
- Castigliengo L, Lannone G, Grifoni G, Rosati R, Gianfaldoni D and Guidi A. Natural and recombinant bovine somatotropin, immunodetection with sandwich ELISA. *Journal of Dairy Research* 2007;74:79-85.

- Chang J, Kiehl D, Kennington A. Separation and characterization of the tryptic peptide mapping of recombinant bovine growth hormone by reversed-phase high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Rapid communications in Mass Spectrometry* 1997;11(12):1266-1270.
- Chantalat L, Jones N, Korber F, Navaza J and Pavlovsky A. The crystal-structure of wild-type growth-hormone at 2.5 Å resolution. *Protein and Peptide Letters* 1995;2:333-340.
- Chilliard Y, Colleau J, Disenhaus C, Lerondelle C, Mouchet C, Paris A. L'hormone de croissance recombinante : intérêt et risques potentiels de son utilisation pour la production laitière bovine. *INRA Production Animal* 1998;11(1):15-32.
- Courant F, Pinel G, Bichon E, Monteau F, Antignac J, Le Bizec B. Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst* 2009;134(8):1637-1646.
- Christensen R, Malinowski K, Scanes C and Hafs H. Pulsatile release of somatotropin related to meal feeding and somatotropin response to secretagogues in horses. *Journal of Animal Science* 1997;75:2770-2777.
- Cuneo R, Salomon F, Wiles C, Hesp R and Sönksen P. Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. I. Effects on muscle mass and strength. *The American Physiological Society* 1991a:688-694.
- Cuneo R, Salomon F, Wiles C, Hesp R and Sönksen P. Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. II. Effects on exercise performance. *The American Physiological Society* 1991b:695-700.
- Cuneo R, Salomon F, Wilmschurst P, Byrne C, Wiles C, Hesp R and Sonksen P. Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults: stimulation of the renin-aldosterone system. *Clinical Sciences* 1991c:81:587-592.
- Dart A, Strong M, Rose R, Hodgson D. Effects of two large doses of equine recombinant growth hormone on clinical, haematological and serum biochemical variables in adult horses. *Australian Veterinary Journal* 1998;76(5):339-342.
- Dart A, Little C, Hughes C, Chu Q, Dowling B, Hodgson D, Rose R and Johnson K. Recombinant equine growth hormone administration: effects on synovial fluid biomarkers and cartilage metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal* 2003;35:302-307.
- Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;275(2):477-480.
- De Palo E, De Filippis V, Gatti R, Spinella P. Growth hormone isoforms and segments/fragments: Molecular structure and laboratory measurement. *Clinica Chimica Acta* 2006;364(1):67-76.
- D'Ercole A, Stiles A, Underwood L. Tissues concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1984;81(3):935-939.

- Desvigne N. Is growth hormone really doping? *Science & sports* 2005;20(2):65-73
- Dettmer K, Hammock B. Metabolomics-A new exiting field within the omics sciences. *Environmental Health Perspectives* 2004;112:A396-A397.
- Dougherty J, Snyder L, Sinclair R, Robins R. High-performance tryptic mapping of recombinant bovine somatotropin. *Analytical biochemistry* 1990;190(1):7-20.
- Ducruix C, Vaillhen D, Werner E, Fievet J, Bourguignon J, Tabet JC, Ezan E, Junot C. Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pre-treatment methods for further statistical analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2008;91:67-77.
- Dumas M, Debrauwer L, Beyet L, Lesage D, Andre F, Paris A, Tabet J. Analyzing the physiological signature of anabolic steroids in cattle urine using pyrolysis/metastable atom bombardment mass spectrometry and pattern recognition. *Analytical Chemistry* 2002;74(20):5393-5404.
- Dunn W and Ellis D. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry* 2005(24):285-294.
- Du Vigneaud V, Ressler C, Swan C, Roberts C, Katsotannis P and Gordon S. The synthesis of an octapeptide amide with hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* 1953;75(19):4879-4880.
- Eriksson L, Trygg J, Wold S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS models. *Journal of Chemometrics* 2007;22:594-600.
- Etherton T and Bauman D. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews* 1998;78(3):745-761.
- Etherton T. Emerging strategies for enhancing growth: is there a biotechnology better than somatotropin ? *Domestic Animal Endocrinology* 1999b;17:171-179.
- Evans H and Long J. The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity, and oestrus cycles of the rat. *The Anatomical Record* 1921;21:62.
- Feng B, Yue F, Zheng MH. Urinary markers in colorectal cancer. *Advances in Clinical Chemistry* 2009;47:45-57.
- Fenn J, Mann M, Meng C, Wong S, Whitehouse C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246(4926):64-71
- Fiehn O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* 2007;27(3):261-269.
- Frasier S and Smith FJ. Antibodies to human growth hormone. *American Journal of Diseases of Children* 1966;112(5):383-388.
- Friesen H, Guyda H and Hardy J. Biosynthesis of human growth hormone and prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1970;31(6):611-624.

- Fukui Y, Kato M, Inoue Y, Matsubara A, Itoh K. A metabonomic approach identifies human urinary phenylacetylglutamine as a novel marker of interstitial cystitis. *Journal of chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009;877:3806-3812.
- George H, L'Italien J, Pilacinski W, Glassman D and Krzyzek R. High-level expression in *Escherichia coli* of biologically active bovine growth hormone. *DNA* 1985;4(4):273-81.
- Gika H, Theodoridis G, Wilson I. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine. Sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. 2008;1189:314-322.
- Gilpin D, Barrow R, Rutan R, Broemeling L and Herndon D. Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. *Annals of Surgery* 1994;220:19-24.
- Girard J, Erb T, Pampalone A, Eberle A, Baumann J. Growth hormone in urine: development of an ultrasensitive assay applicable to plasma and urine. *Hormone Research* 1987;28(1):71-80
- Green J and Harris G. The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *Journal of Endocrinology* 1947;5:136-146.
- Guan F, Uboh C, Soma L, Birks E, Chen J, Mitchell J, You Y, Rudy J, Xu F, Li X, Mbuy M. LC-MS/MS method for confirmation of recombinant human erythropoietin and darbepoetin in equine plasma. *Analytical Chemistry* 2007;79:4627-4635.
- Guan F, Uboh C, Soma L, Birks E, Chen J, You Y, Rudy J, Xiaoqing L. Differentiation and identification of recombinant human erythropoietin and darbepoetin alpha in equine plasma by LCMS/ MS for doping control. *Analytical Chemistry* 2008;80: 3811-3817.
- Guler H, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch E. Recombinant human IGF-1 stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomised rats. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1988;85:4889-4893.
- Harrison. A, Gaumann T, Stahl D. Structure and fragmentation of $[C_3H_7O^+]$ ions formed by chemical ionization. *Organic Mass Spectrometry* 1983;18(12):517-524.
- Hashida S, Ishikawa E, Mohri Z, Nakanishi T, Noguchi H, Murakami Y. Sensitive sandwich enzyme immunoassay of human growth hormone (hGH) in serum and urine using monoclonal antibodycoated polystyrene balls. *Endocrinology Japan* 1988;35(1):171-180.
- Hashizume T, Horiuchi M, Tate N, Nonaka S, Mikami U, Kojima M. Effects of ghrelin on growth hormone secretion from cultured adenohypophysial cells in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 2003;24(3):209-218.
- Hashizume T, Horiuchi M, Nonaka S, Kasuya E, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Effects of ghrelin on growth hormone secretion in vivo in ruminants. *Regulatory Peptides* 2005;126(1-2):61-65.

- Hennies M, Holtz W. Enzyme immunoassay for the determination of bovine growth hormone using avidin-biotin-peroxidase complexes. *Journal of Immunology Methods* 1993;157(1-2):149-153.
- Heutmekers T, Bremer M, Haasnoot W and Nielen M. A rapid surface plasmon resonance (SPR) biosensor immunoassay for screening of somatotropins in injection preparations. *Analitica Chimica Acta* 2007;586:239-245.
- Hirel P, Schmitter J, Dessen P, Fayat G and Blanquet S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989;86:8247-8251.
- Holmes E, Nicholson J, Nicholls A, Lindon J, Connors C, Polleys S, Connelly J. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 1998;44(1-2):245-255.
- Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 1933;24: 417-441.
- Hourd P and Edwards R. Current methods for the measurement of growth hormone in urine. *Clinical Endocrinology* 1994;40:155-170.
- Houseknecht K, Bauman D, Vernon R, Byatt J and Collier R. Insulin-like growth factors-I and -II, somatotropin, prolactin and placental lactogen are not acute effectors of lipolysis in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* 1996;13(3):239-249.
- Huang Q, Yin P, Lu X, Kong H, Xu G. Applications of chromatography-mass spectrometry in metabonomics. *Chinal Journal of chromatography* 2009;27(5):566-572.
- Idborg-Bjorkman H, Edlund P, Kvalheim O, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson S. Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis. *Analytical Chemistry* 2003;75(18):4784-4792.
- Idborg H, Zamani L, Edlund P, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson S. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005;828(1-2):9-13.
- Idelman S and Verdetti J, 2000. *Endocrinologie et communications cellulaires*, Les Ulis - France.
- Ishikawa M, Nimura A, Horikawa R, Katsumata N, Arisaka O, Wada M, Honjo M, Tanaka T. A novel specific bioassay for serum human growth hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000;85(11):4274-4279.
- Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A* 2004;1023(2):317-320.
- Johnson V and Maack T. Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone. *The American Journal of Physiology* 1977;233(3):F185-F196.

- Jones J and Clemmons D. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 1995;16(1):3-34.
- Kahn P. Molecular Biology: From Genome to Proteome: Looking at Cell's Proteins. *Science* 1995;270(5235):369-370.
- Katajamaa M, Oresic M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC bioinformatics* 2005;6:179.
- Kay R and Creaser C. Application of mass spectrometry-based proteomics techniques for the detection of protein doping in sports. *Expert Review of proteomics* 2010;7:185-188.
- Kazmer G, Zinn G, Stausbaugh L. Growth hormone response to somatostatin-28 and growth hormone releasing factor in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 2000;83(10):2282-2284.
- Kennedy S, Thompson D, Pruett H, Burns P and Deghenghi R. Growth hormone response to a novel growth hormone-releasing tripeptide in horses: interaction with gonadotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and sulpiride. *Journal of Animal Science* 2002;80:744-750.
- Keun H, Ebbels T, Bollard M, Beckonert O, Antti H, Holmes E, Lindon J, Nicholson J. Gemoetric trajectory analysis of metabolic responses to toxicity can define treatment specific profiles. *Chemical Research in Toxicology* 2004;17(5):579-587.
- Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss R. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Analytical Biochemistry* 2007;363(2):185-195.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999;402(9):656-660.
- Korbonits M and Grossman A. Growth hormone-releasing peptide and its analogues. Novel stimuli to growth hormone release. *Trends Endocrinology Metabolism* 1995;6(2):43-49
- Kostyo J. Rapid effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis. *Annals of the New-York Academy Science* 1968;148:389-407.
- Kurien B and Scofield R. Western blotting. *Methods* 2006;38:283-293.
- Le Breton M, Rochereau-Roulet S, Chereau S, Delatour T, and Le Bizec B. Identification of cows treated with recombinant bovine somatotropin. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010;58:729-733.
- Le Cam A and Legraverend C. Mode d'action de l'hormone de croissance. *Médecine/Sciences* 1993;9:1352-1361.
- Lei R, Wu C, Yang B, Ma H, Shi C, Wang Q. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particles-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 232:292-301.

- Lenz E, Bright J, Knight R, Wilson I, Major H. A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using ¹HNMR and HPLC-TOF/MS: time dependant changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. *Analyst* 2004;129:535-542.
- Lewis G, Asnani A, Gerszten R. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *Journal of the American College of cardiology* 2008;52(2):117-123.
- Llorach R, Urpi-Sarda M, Jauregui O, Monagas M, Andres-Lacueva C. An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *Journal of Proteome Research* 2009;8(11):5060-5068.
- Lockhart D, Dong H, Byrne M, Folletie M, Gallo M, Chee M, Wang C, Kobayashi M, Norton H, Brown E. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 1996;14(13):1675-1680.
- Lockhart D and Winzeler E. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000;405(6788):827-836.
- Mac Gorman L, Rizza R, Gerich J. Physiological concentrations of growth hormone exert insulin-like and insulin antagonistic effects on both hepatic and extrahepatic tissues in man. *Journal of Clinical Endocrinology*, 1981;53(3):556-559.
- MacRae V, Faisal Ahmed S, Mushtaq T, Farquharson C. IGF-1 signalling in bone growth: inhibitory actions of dexamethasone and IL-1 β . *Growth Hormone & IGF Rresearch* 2007;17(5):435-439.
- Maharjan RP, Ferenci T. Global metabolite analysis: The influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 2003;313:145-154.
- Makarov A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* 2000;72(6):1156-1162.
- Malinowski K, Christensen R, Konopka A, Scanes C and Hafs H. Feed intake, body weight, body condition score, musculation, and immunocompetence in aged mares given equine somatotropin. *Journal of Animal Science* 1997;75:755-760.
- McKusick V. Structural and Functional Studies of Genomes. *Genomics* 1997;45:444-449.
- McPhee C, Thorton R, Trappet P, Biggs J, Fergusson D. A comparison of the effects of porcine somatotropine, genetic selection and sex performance, carcass quality traits of pigs fed ad libitum. *Livestock Production Science* 1991;28(2):151-162.
- Merrifield B. The chemical synthesis of proteins. *Protein Science* 1951;5(9):1947-1951.
- Moller N, Gjedsted J, Gormsen L, Fuglsang J, Djurhuus C. Effects of growth hormone on lipid metabolism in humans. *Growth Hormone & IGF Research* 2003;13:S18-S21.
- Mollerach-Gobbi B, Retegui L and Pena C. Equine growth hormone. Detection of immunoreactive sequences using poly- and monoclonal antibodies. *International Journal of Peptide and. Protein Research* 1990;35:105-110.

- Momamy F, Bowers C, Reynolds G., Chang. D, Hong.A, Newlander.K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone, in vitro. *Endocrinology* 1981;108(1):31-39.
- Mondal M and Prakash B. Effects of long term GH-releasing factor administration on patterns of GH and LH secretion in growing female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reproduction* 2004;127:45-55.
- Mondal M, Rajkhowa C, Prakash B. Exogenous GH-releasing hormone increases GH and LH secretion in growing mithuns (*Bos frontalis*). *General and Comparative Endocrinology* 2006;149(2):197-204.
- Nadal M, Thompson D and Kincaid L. Effect of feeding and feed deprivation on plasma concentrations of prolactin, insulin, growth hormone, and metabolites in horses. *Journal of Animal Science* 1997;75:736-744.
- Nicholson J, Wilson I. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 1989;21(4-5):449-501.
- Nicholson J, Lindon J, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Review Drug Discovery* 2002;1(2):153-161.
- Nier A. A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Review of scientific instruments* 1947;18(6):398-415.
- Noble G, Houghton E, Roberts C, Faustino-Kemp J, de Kock S, Swanepoel B and Sillence M. Effect of exercise, training, circadian rhythm, age, and sex on insulin-like growth factor-1 in the horse. *Journal of Animal Science* 2007;85:163-171.
- Nürnberg K, Wegner J, Ender K. Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science* 1998;56(2):145-146.
- Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical magazine* 1901: 559-572.
- Piquemal D. 8^{ème} colloque national Fondation Sport Santé. Paris, 14 et 15 mars 2008.
- Piquemal D. 9^{ème} colloque national Fondation Sport Santé. Paris, 2009.
- Pinel G, André F and Le Bizec B. Discrimination of recombinant and pituitary-derived bovine and porcine growth hormone by peptide mass mapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:407-414.
- Pinel G, Buon R, Aviat F, Larre C, André-Fontaine G, André F and Le Bizec B. Recombinant bovine somatotropine misuse in cattle. Evaluation of Western blotting and 2D electrophoresis methods on biological samples for the demonstration of its administration. *Analytica Chimica Acta* 2005;529:41-46.
- Pinel G, Weigel S, Lommen A, Rambaud L, Essers M, Stolker L, Courant F, Antignac JP, Nielen M, Le Bizec B. Assessment and comparison of two complementary metabolomic strategies based on LC-HRMS fingerprints as a tool to screen for anabolic treatment in calves. In preparation (2010).

- Popii V and Baumann G. Laboratory measurement of growth hormone. *Clinica Chimica Acta* 2004;350:1-16.
- Popot M, Bobin S, Bonnaire Y, Delahaut P and Closset J. IGF-I plasma concentrations in non-treated horses and horses administered with methionyl equine somatotropin. *Research in Veterinary Science* 2001;71:167-173.
- Popot M, Bobin S, Bonnaire Y, Pirens G, Delahaut P, Lyazrhi F and Tabet J, 2002. IGF-I concentrations in the horse: determination of a threshold value. In: D. Hill and W. Hill (Eds), 14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians. R & W Publications (Newmarket) Limited, Orlando, Florida, USA.
- Postel-Vinay M, Kelly P. Growth hormone receptor signalling. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996;10(3):323-336.
- Prader A, Wagner H, Szeky J, Illig R, Touber J and Maingay D. Acquired resistance to human growth hormone caused by specific antibodies. *The Lancet* 1964;128:378-382.
- Raamsdonk L, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh M, Berden J, Brindle K, Kell D, Rowland J, Westerhoff H, Dam K, Oliver S. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology* 2001;19:45-50.
- Raben M. Treatment of pituitary dwarf with human growth hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1958;18:901-903.
- Rezzi S, Ramadan Z, Fay L, Kochhar S. Nutritional metabonomics: Applications and perspectives. *Journal of Proteome Research* 2007;6(2):513-525.
- Rijk JC, Lommen A, Essers M, Groot M, Van Hende J, Doeswijk T, Nielen M. Metabolomics approach to anabolic steroid urine profiling of bovines treated with prohormones. *Analytical Chemistry* 2009;81:6879-6888.
- Robertson D. Metabonomics in Toxicology: A review. *Toxicological Sciences* 2005;85(2):809-822.
- Sangster T, Major H, Plumb R, Wilson A, Wilson I. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabonomic analysis. *The analyst* 2006;131:1075-1078.
- Saugy M, Cardis C, Schweizer C, Veuthey J and Rivier L. Detection of human growth hormone doping urine: out of competition tests are necessary. *Journal of Chromatographie B* 1996;687:201-211.
- Schally A, Comaru Schally A, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga J, Halmos G. Hypothalamic hormones and cancer. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2001;22(4):248-291.
- Schams D, Winkler U, Schallenger E, Karg H. Growth hormone and insulin-like growth factor-I (somatomedin C) blood levels in cattle from birth through sex maturation. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1998;95(9):360-362.
- Schippo M, Degand G, Duyckaerts A, Maghuin-Rogister G. Identification de vaches laitières traitées à la somatotropine bovine. *Annales de Medecine Vétérinaire* 1997;141:381-390.

- Secchi C, Berrini A, Gaggioli D, Acocella F, Beattie J and Borromeo V. Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme linked immunosorbent assay for detection of porcine growth hormone in plasma. *Analytica Chimica Acta* 1999;402:37-45.
- Smith C, Want E, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* 2006;78(3):779-787.
- Smith L, Thompson D, French D and Leise B. Effects of recombinant equine somatotropin on wound healing, carbohydrate and lipid metabolism, and endogenous somatotropin responses to secretagogues in geldings. *Journal of Animal Science* 1999;77:1815-1822.
- Sonksen P. Insulin, growth hormone and sport. *Journal of Endocrinology*, 2001;170(1):13-25.
- Sottas PE, Robinson N, Saugy M. The Athlete's Biological Passport and Indirect Markers of Blood Doping. *Handbook of experimental pharmacology* 2010a:195:305-326.
- Sottas PE, Saugy M, Saudan C. Endogenous steroid profiling in the athlete biological passport. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 2010b:39:59-73.
- Stephen W. A pulsed mass spectrometer with improved resolution. *Physical Review* 1946;69:691.
- Stewart F, Goode J and Allen W. Growth hormone secretion in the horse: unusual pattern at birth and pulsatile secretion through to maturity. *Journal of Endocrinology* 1993;138:81-89.
- Strobl J and Thomas M. Human growth hormone. *Pharmacological Reviews* 1994;46(1):1-34.
- Sumner L, Mendes P, Dixon R. Plant Metabolomics : Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 2003;62(6):817-836.
- Szeszycki E, Puckett A, Ziegler T. Les effets métaboliques de l'hormone de croissance. *Nutrition Clinique Metabolisme* 1996;10(4):311-323.
- Tannenbaum G and Martin J. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1976;98(3):562-570.
- Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M. In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Analytical Biochemistry* 1993;214:31-37.
- Thompson Jr D, DePew C, Ortiz A, Sticker L and Rahmanian M. Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone. *Journal of Animal Science* 1994;72:2911-2918.
- Thompson Jr D, Rahmanian M, DePew C, Burleigh D, DeSouza C and Colborn D. Growth hormone in mares and stallions: pulsatile secretion, response to growth hormone-releasing hormone, and effects of exercise, sexual stimulation, and pharmacological agents. *Journal of Animal Science* 1992;70:1201-1207.

- Tian J, Shi C, Gao P, Yuan K, Yand D, Lu X, Xu G. Phenotype differentiation of three E.Coli strains by GC-FID and GC-MS based metabolomics. *Journal of Chromatography B Hyphenated Techniques for Global Metabolite Profiling* 2008;871:220-226.
- Tikunov Y, Lommen A, Ric de Vos C, Verhoeven H, Bino R, Hall R, Bovy A. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiology* 2005;139: 1125-1137.
- Tinsley F, Grinnan E, Baker S, Powell J, Bémis K, Sharr C. The 20,000 dalton structural variant of recombinant DNA-derived methionyl human growth hormone has early insulin-like effects in hypophysectomized rats. *Biochemical Biophysical Research Communication* 1986;138: 342-348.
- Tolstikov V, Fiehn O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydroPHILIC interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2002;301:298-307.
- Ullman M, Oldfords A. Effects of growth hormone on skeletal muscle: studies on normal adult rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 1989;135(4):531-536.
- Van der Hel W, Verstegen M, Schrama J, Brandsma H, Sutton A. Effect of varying ambient temperature and porcine somatotropine treatment in pigs on feed intake and energy balance traits. *Livestock Production Science* 1991;51: 21-28.
- Vogels J, Tas A, Van Baak M, Van der Greef J. Application of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis as an indirect screening method for monitoring the illegal use of growth promoters. In: *EuroResidue III, Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, 1996, Veldhoven, The Netherlands 1996.
- Wallace J, Cuneo R, Baxter R, Orskov H, Keay N, Pentecost C, Dall R, Rosén T, Jorgensen J, Cittadini A, Longobardi S, Sacca L, Christiansen J, Bengtsson B, Sönksen P. Responses of the Growth Hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, GH withdrawal in trained adult males: A potential test for GH abuse in sport. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999;84(10):3591-3601.
- Wagner S, Scholz K, Donegan M, Burton L, Wingate J, Volkel W. Metabonomics and biomarker discovery: LC-MS metabolic profiling and constant neutral loss scanning combined with multivariate data analysis for mercapturic acid analysis. *Analytical Chemistry* 2006;78(4):1296-1305.
- Wang J, Reijmers T, Chen L, Van der Heijden R, Wang M, Peng S, Hankemeier T, Xu G, Van der Greef J. Systems toxicology study of doxorubicin on rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry based metabolomics. *Metabolomics* 2009;5(4): 407-418.
- Wilson I, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz E. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *Journal of chromatography B Coupled column Systems in the Biosciences* 2005;817:67-76.
- Wold S, Joreskog K. *Soft modelling: The basic design and some extensions* 1982.
- Wolfsdorf J, Sadeghi-Nejad A, Senior B. Hypoketonemia and age-related fasting hypoglycemia in growth hormone deficiency. *Metabolism* 1983;32(5):457-462.

- Woodhouse L, Asa S, Thomas S, Ezzat S. Measures of submaximal aerobic performance evaluate and predict functional response to growth hormone (GH) treatment in GH-Deficient Adults. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999;84(12):4570-4577.
- Wu H, Southam A, Hines A, Viant M. High-throughput tissue extraction protocol for NMR-and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry* 2008;372(2):204-212.
- Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Wang C, Zhao X, Pang T. Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography* 2005;(1084):214-221.
- Zhang Q, Wang G, Du Y, Zhu L. GC/MS analysis of the rat urine for metabonomic research. *Journal of Chromatography B* 2007;854:20-25.
- Zwickl C, Smith H, Tamura R and Bick P. Somatotropin antibody formation in cows treated with a recombinant bovine somatotropin over two lactations. *Journal of Dairy Science* 1990;73:2888-2895.

ANNEXES

Protocole de détection des IGF-I dans le plasma :

La mesure des concentrations en IGF-1 dans le plasma a été réalisée en suivant la procédure de routine en vigueur au laboratoire des Courses Hippiques N°: I08/64 utilisant le kit commercial ELISA « Equine IGF-1 » (Biocode). 50 µL de plasma sont prélevés et déposés en Eppendorf® avec 400 µL de solution d'extraction (éthanol/HCl 2 N, 87,5/12,5 %) puis mélangés 5 secondes au vortex. Le mélange est laissé 30 min à température ambiante puis les échantillons sont centrifugés 4 minutes à 4°C à 10000 rpm. 100 µL de surnageant sont prélevés en faisant attention de ne pas troubler la solution et mélangés à 50 µL de solution de neutralisation et 100 µL de solution de dilution dans un tube en polypropylène. 25 µL d'échantillon et de standard sont déposés dans la plaque ainsi que 100 µL de conjugué (Mab de souris anti-IGF-1, marqué PAL). Le mélange est placé sous agitation mécanique pendant 90 min à température ambiante. La plaque est lavée avec le laveur automatique (programme IGF-1/Biocode). 100 µL de substrat (PNPP) sont déposés puis la plaque est incubée 30 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL de solution d'arrêt (non communiquée). La mesure des absorbances est réalisée à 405 nm.

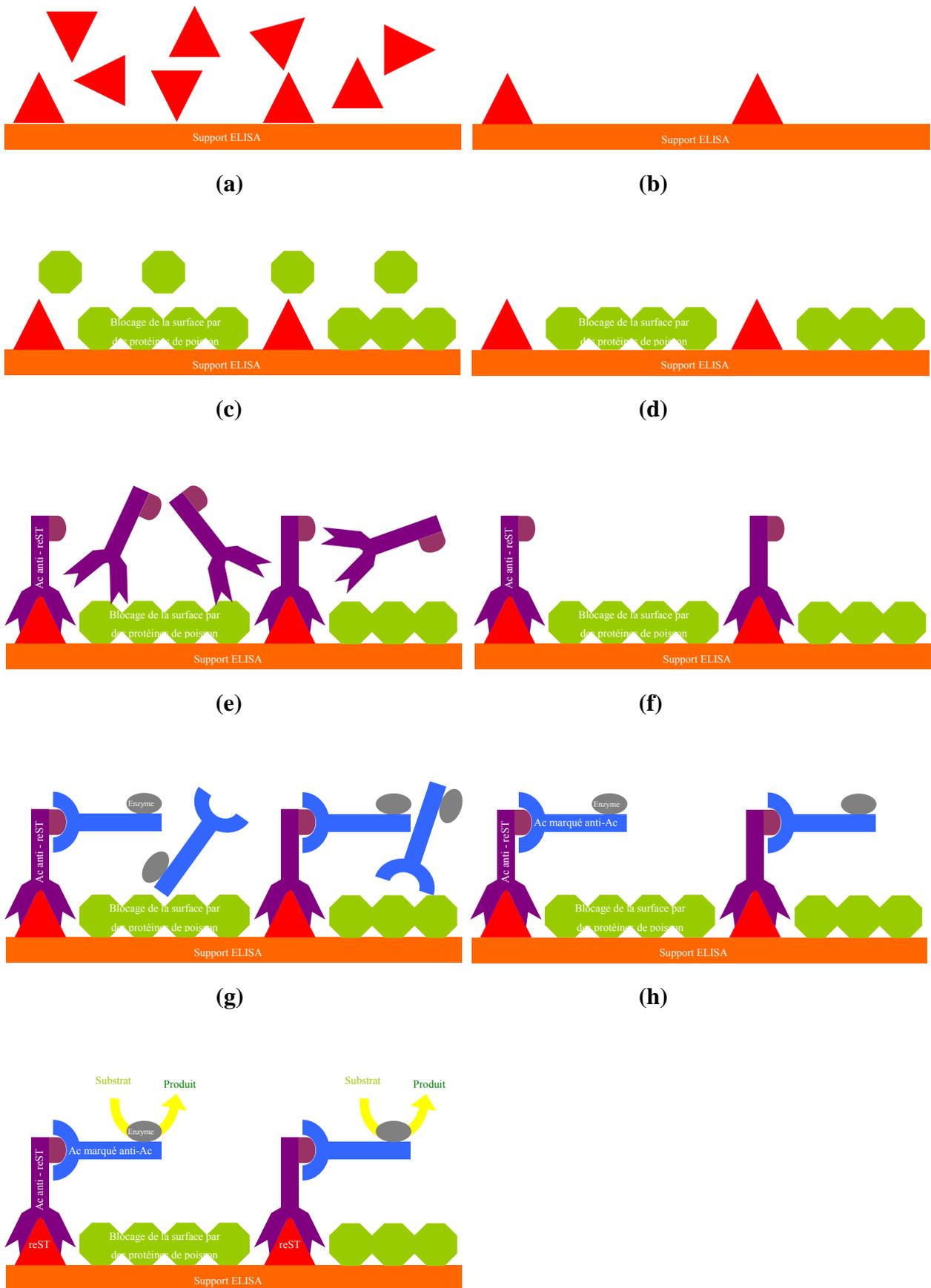


Figure IV-1 : description du fonctionnement du test ELISA de détection des anticorps anti-reGH (Bailly-Chouriberry, 2007)

Protocole de la détection des anticorps anti-reGH par ELISA dans le sérum:

Dans une microplaque pouvant contenir jusqu'à 96 puits coniques, 15 μL d'acide caprylique et 25 μL d'HCl à une concentration de 0.5 M ont été ajoutés à 260 μL de plasma. La solution est ensuite mélangée par aspiration et refoulement. La précipitation est réalisée 15 minutes à température ambiante. Après centrifugation (4100 rpm, 20 minutes), les échantillons sont dilués 100 fois dans le PBST contenant 2% de Seablock à pH 7.4.

L'hormone de croissance équine recombinante est préparée à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en **tampon de greffage** et diluée au 1/10. Ensuite, 500 μL de cette solution sont dilués dans 9,5 mL de **tampon de greffage** pour obtenir $[\text{reGH}] = 5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure IV-1). 100 μL sont délivrés dans chaque cupule pour obtenir une quantité de protéines à 500 ng/puit (**a**). Le type de plaque choisi pour réaliser le test ELISA est F16 Maxisorp loose (NUNC). La plaque est incubée couverte toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, le matériel et la plaque sont sortis au préalable au moins 20 minutes à température ambiante pour limiter les effets de bord. La plaque est lavée trois fois en **tampon de lavage**, 300 μL par cupule (**b**). Le blocage des sites non spécifiques se fait en SeaBlock dilution au 1/50^e (v/v) dans du **tampon de dilution**. 100 μL sont déposés dans chaque cupule. Laisser incuber 1h à 37°C (**c**). La plaque est ensuite lavée trois fois en **tampon de lavage**, 300 μL par cupule (**d**).

100 μL d'échantillon par puits est déposé et incubé 1h30 à 37°C (**e**). La plaque est ensuite lavée trois fois en **tampon de lavage**, 300 μL par cupule (**f**). L'anticorps secondaire marqué est reconstitué avec 2 mL d'eau MilliQ puis homogénéisé et stocké à 4 °C. 100 μL par puits d'une dilution au 1/8000 en PBS sont déposés et la plaque est incubée 1h à 37°C (**g**). La plaque est lavée trois fois en **tampon de lavage**, 300 μL par cupule (**h**). Pour une plaque, 10 mL de **tampon chromogène** [Phosphate/Citrate/ABTS] sont décongelés, puis 10 μL de H_2O_2 30% sont ajoutés extemporanément. 100 μL du mélange sont déposés dans chaque puits et la réaction se développe pendant 80 min à 37°C. La plaque est lue à une absorbance de 405 nm (**i**).

Protocole de l'analyse transcryptomique visant à dépister une administration d'hormone de croissance:

L'extraction des ARN totaux a été réalisée en utilisant des kits de sang PAXgen pour ARN (Qiagen). L'intégrité et la quantité d'ARN totaux extraits ont été vérifiées grâce à l'utilisation d'une puce ARN standard sensitivity lue par un analyseur Experion (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

L'ADN complémentaire est produit à partir de 750 ng d'ARN total et réalisé grâce à la mixture iScript Reaction (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Les réactions en chaîne par polymérase en temps réel (RT-qPCR) ont été réalisées avec un appareil master mix SYBR Green (Biorad). Les échantillons ont été amplifiés et quantifiés en temps réels dans le système de détection PCR CFX384 dans les conditions suivantes pour l'expression de la GH : 40 cycles à 95°C pendant une période de 10 secondes puis 40 secondes à 60°C afin de dénaturer l'ADN. Pour la discrimination des produits spécifiques des produits non spécifiques et des amorces dimériques, une courbe de fusion par un gradient croissant de température de 65°C à 92°C avec une pente de 2.5°C/s a été appliquée.

Les échantillons ont ensuite été normalisés avec deux gènes de contrôle. Les résultats ont été analysés avec le logiciel CFX (version 1.1) et la quantification des concentrations d'ARN a été évaluée en calculant le $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Yuan et al. 2006). Les valeurs de $\Delta\Delta C_t$ obtenus par RT-qPCR pour chaque gene ciblés ont été relevés pour chaque échantillon.

MISE AU POINT D'UN NOUVEL OUTIL DE DEPISTAGE DE L'ADMINISTRATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE EQUINE RECOMBINANTE PAR APPROCHE METABOLOMIQUE

L'hormone de croissance est une molécule protéique à activité anabolisante dont les propriétés peuvent être mises à profit pour améliorer les performances sportives des chevaux de courses et accroître la rentabilité de production des animaux d'élevage. Cependant, la législation est très stricte car l'utilisation de cette molécule ou de sa forme recombinante est interdite par le code des courses et les directives européennes en vigueur. Malgré les progrès scientifiques spectaculaires réalisés ces dernières années, le dépistage de l'administration de l'hormone de croissance reste difficile en particulier les premiers jours suivant un traitement. Récemment, de nouvelles méthodes de détection et d'identification visant à améliorer le contrôle de l'emploi illicite de promoteurs de croissance se sont développées. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans ce contexte. Une approche non ciblée, de type métabolomique a été développée afin de mettre en évidence des perturbations métaboliques urinaires et plasmatiques chez des chevaux traités à l'hormone de croissance recombinante équine. Les résultats obtenus par LC-HRMS ont permis de montrer la faisabilité analytique, la pertinence et l'intérêt de cette approche puisque des modèles descriptifs et prédictifs autorisant la discrimination entre des chevaux contrôles et traités à l'hormone de croissance ont pu être établis et validés. Cette méthode est actuellement mis en œuvre et testée au Laboratoire des courses Hippiques. Le développement de ces études métabolomiques en lien avec d'autres techniques « omiques » telles que la transcriptomique, ou la protéomique laisse penser que ces nouvelles stratégies pourront permettre de franchir un cap très significatif dans la lutte du contrôle anti-dopage dans les prochaines années.

Mots clés : hormone de croissance recombinante équine, courses hippiques, métabolomique, spectrométrie de masse haute résolution.

DETECTION OF RECOMBINANT EQUINE GROWTH HORMONE ADMINISTRATION BY A METABOLOMIC APPROACH

The growth hormone is a peptidic molecule with anabolic activity potentially used to improve horse athletic efficiency and to increase the production profitability of farm animals. However, the legislation is very strict and the use of this molecule or its recombinant form is strictly forbidden by the races code and the European directives in force. Despite the numerous scientific progresses achieved recently, the control of growth administration remains difficult. New methods of detection and identification to improve the control of illegal use of growth promoters have recently been developed. The PhD thesis work presented in this manuscript has been conducted in this context. An untargeted approach based on metabolomic study was developed to highlight equine urinary and plasmatic metabolic disruptions induced by the administration of recombinant equine growth hormone. The results obtained by LC-HRMS have demonstrated the analytical feasibility, relevance and usefulness of this approach since descriptive and predictive models able to discriminate non-treated from growth hormone treated horses have been established and validated. This method is currently being assessed in the French laboratory of horse racing. The development of such new metabolomic studies in conjunction with other omic techniques such as transcriptomic or proteomic suggests that these new strategies could improve the anti-doping control in the future.

Key words : recombinant equine growth hormone, horseracing, metabolomic, High-resolution mass spectrometry.

Discipline : CHIMIE ANALYTIQUE

Jury :

Adresses de l'auteur:

- Laboratoire des Courses Hippiques (L.C.H.) - 15, rue de Paradis - 91370 Verrières-le-Buisson, France
- Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) ONIRIS - Route de Gachet BP 50707 – 44307 Nantes, France