

# **Modifications de l'expression de gènes : un nouvel outil de détection d'agents de stimulation de l'Erythropoïèse (ESAs) dans la lutte antidopage ?**

**Docteur David PIQUEMAL**  
**Société Skuld-Tech**

Nous avons développé une plate-forme d'identification de biomarqueurs via le transcriptome et l'étude de l'expression des gènes d'une cellule (transcriptome), leur identification et leur quantification précise. Cet outil permet d'identifier de manière exhaustive l'ensemble des gènes impliqués dans chaque situation physiopathologique et nous permet de caractériser les biomarqueurs spécifiques de toute condition physiopathologique ou tout organisme.

Dans le cadre de notre étude, une méthode de dépistage dite « indirecte », c'est-à-dire basée sur la recherche des effets des composés et non plus sur leur identification, semble aujourd'hui être une solution pour suspecter, sinon détecter, la prise de produits de courte demi-vie et celle de composés similaires inconnus. En effet, l'érythropoïétine est une hormone connue un facteur de croissance des précurseurs des globules rouges dans la moelle osseuse (stimulation de l'érythropoïèse) et comme provoquant une augmentation du nombre de globules rouges dans le sang.

De ce constat, la goutte de sang s'avère être le tissu idéal dans la mesure des effets indirects de l'hormone, naturelle ou synthétique, sur les nombreuses cellules qui composent le sang. Comme nous le verrons par la suite, le choix du sang total et non pas de cellules isolées est une option voulue. En effet, de l'étape du prélèvement sanguin sur un individu à l'extraction des ARN messagers (ARNm) qui composent cet échantillon, il faut limiter le facteur « erreurs humaines » en limitant le nombre de manipulations.

Enfin, cette option permet de se rapprocher de l'outil final de terrain (trousse de diagnostic) qui doit être facile d'utilisation avec un minimum d'équipements requis. Mais comment mesurer ces effets ?

Pour ce faire, nous avons recours à deux catégories d'outils : le SAGE, qui permet une analyse sérielle de ces gènes, ainsi que la PCR en temps réel, permettant d'obtenir un très haut débit en termes d'individus validés. Nous entendons partir du plus grand nombre de gènes possibles afin d'identifier ceux directement impliqués dans la prise d'EPO.

Le SAGE s'appuie sur une technologie développée à la fin des années 1990, il permet d'obtenir une analyse globale, un instantané de la cellule observée. L'ensemble des gènes présents est représenté sous forme de tableaux permettant de dégager une signature ayant l'aspect d'une courte séquence, largement suffisante pour identifier un ARN messager. De très nombreux indicatifs sont également fournis, ce qui nécessite un gros travail de bioinformatique. Tout ceci permet d'obtenir des marqueurs putatifs tout en favorisant la compréhension des mécanismes d'absorption de l'EPO par un individu.

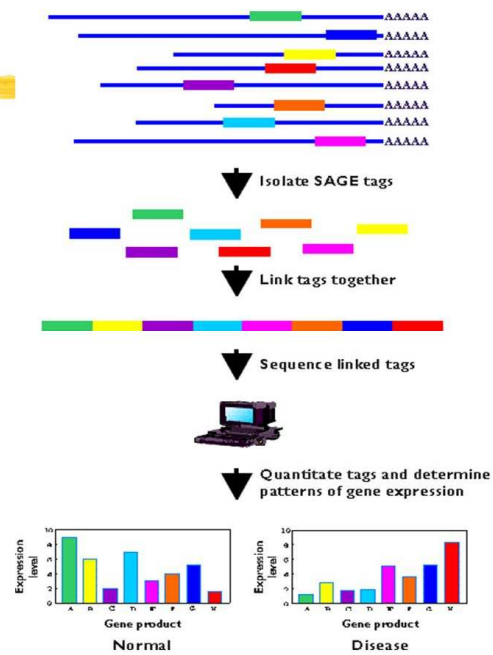
## Les outils : le SAGE

cADN Synthèse de l'ADN complémentaire et enzymes digestives pour générer des séquences courtes

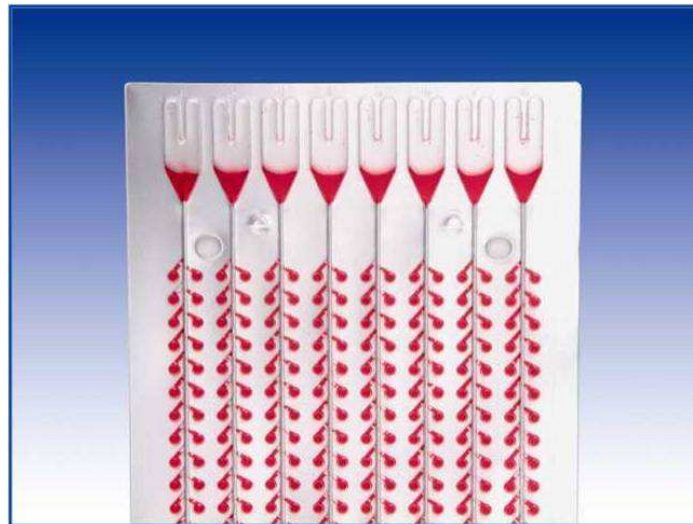
Formation de concatémère et séquençage massif

Analyse bioinformatique

Identification de gènes et analyse de profils des gènes



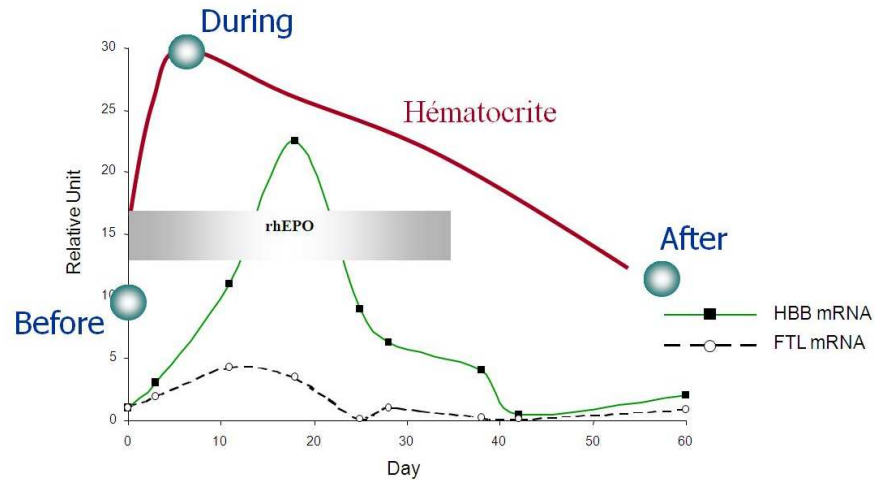
La PCR en temps réel ne nécessite qu'une quantité minimum de sang (moins de 2 ml). Le système est entièrement automatisé ce qui permet de traiter un nombre d'individus compris entre 20 et 50 par jour.



TaqMan® Low Density Arrays

L'étude a été initiée en 2004 et a d'abord porté sur l'Aranesp (Darbepoetin alfa, AMGEN). 14 individus s'étaient vus prélever 2,5 ml de sang chacun, nos trois points critiques ont porté sur l'avant, le pendant et l'après prise d'EPO sur une période de 60 jours.

## ■ Approche expérimentale

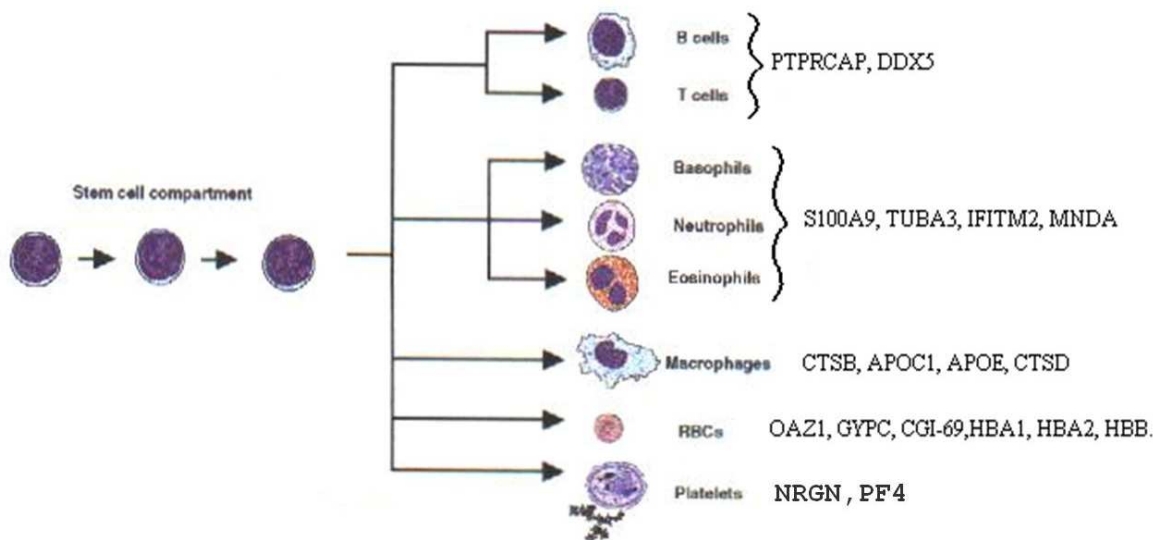


ARANESP : R&D

Au total, près de 20 000 gènes ont été analysés avant d'être identifiés et classifiés. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes régulés. A ce stade, la biostatistique nous a permis de sélectionner des gènes avec des profils similaires. Lors d'une troisième phase, nous avons procédé à des comparatifs sur d'autres résultats figurant dans d'autres bases de données.

En 2004, l'EPO était considérée comme la cible quasi-unique des réticulocytes. Depuis, nous avons découvert que l'EPO n'était pas uniquement ciblée sur la production de réticulocytes. Nous nous interrogeons également sur la confusion éventuelle sur les gènes induits par un état inflammatoire. Un important travail de comparaison nous a ainsi permis d'identifier le fait que l'impact de l'EPO ne se limitait pas à la production des réticulocytes, l'effet se révélant *in fine* très large.

## ■ L'EPO et l'hématopoïèse

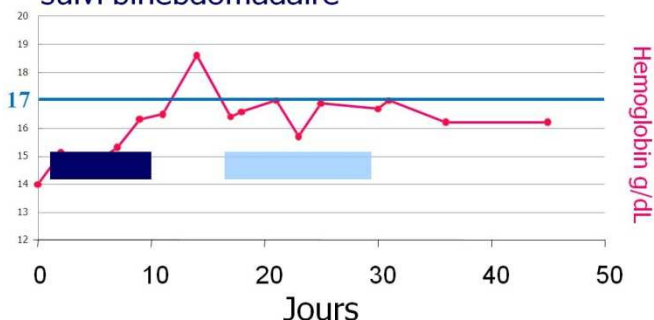


ARANESP : résultats

De ce fait, ces premiers résultats nous ont amenés à sortir du strict cadre de la lutte antidopage pour entrer de plain-pied dans un champ plus sanitaire sur l'effet général de la prise d'EPO. Une deuxième étude, destinée à valider ces premières analyses, est intervenue à compter de 2006. Il s'agissait cette fois-ci de rechercher les effets d'une famille de molécules et non d'une molécule spécifique comme dans le cadre de l'étude précédente. En nous appuyant sur l'Epex (Epoétine alpha, JANSSEN-CILAG), nous avons introduit un test supplémentaire en nous focalisant sur des micro-doses. L'étude s'est malheureusement cantonnée à 2 individus qui se sont vus injecter de fortes doses sur une période de 10 jours avant, à l'issue d'une période intermédiaire, de se voir injecter des faibles doses.

■ **Approche expérimentale :**

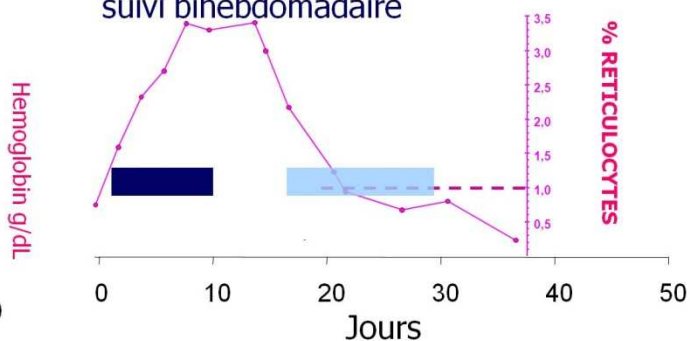
suivi bihebdomadaire



EPREX : R&D

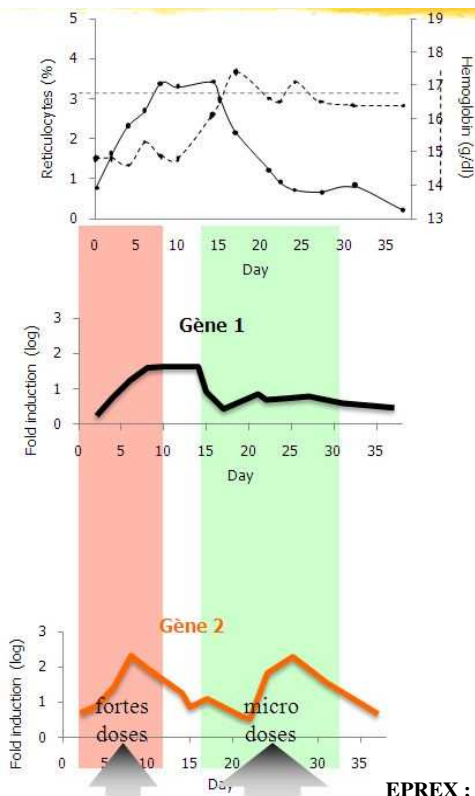
■ **Approche expérimentale :**

suivi bihebdomadaire

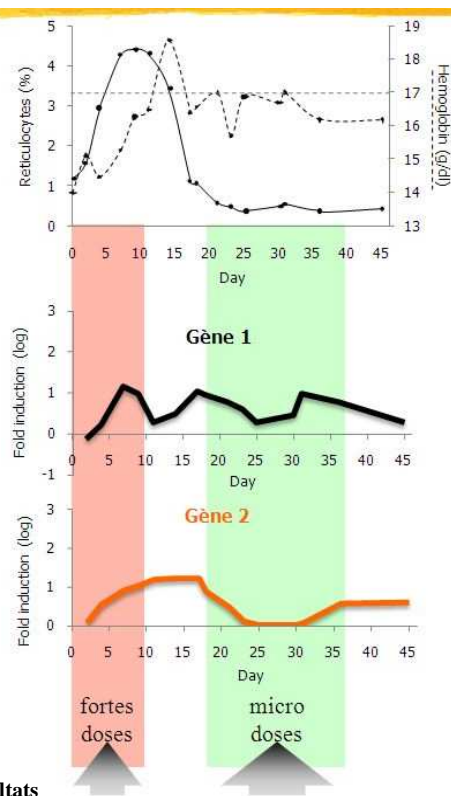


EPREX : R&D

Notre objectif consistait à valider la robustesse des premiers marqueurs que nous avons identifiés face à un individu soumis à des micro-doses. La PCR nous a permis de faire ressortir les résultats suivants : dans les deux cas, il apparaît clairement une induction des gènes pour les fortes doses, suivie d'une phase de régulation et d'une réaction aux faibles doses.



Athlète 1



Athlète 2

EPREX : résultats



## **Docteur Nicolas BARIZIEN, médecin du Centre national de Rugby de Marcoussis**

Pour reprendre les propos du Professeur RIEU, je crois effectivement que nous sommes aujourd'hui face à une grande hypocrisie. Nous cherchons actuellement à développer des méthodes très sophistiquées pour identifier des molécules qu'il serait pourtant très facile de marquer dès leur fabrication. D'un point de vue philosophique, on se situe ici aux limites de la sélection et pas très loin non plus de l'eugénisme. Le sport doit avant tout rester une activité physique épanouissante et non uniquement le résultat de la sélection dès la naissance !

## **Docteur David PIQUEMAL**

L'eugénisme désigne l'amélioration des caractères héréditaires de l'espèce humaine par une intervention délibérée. Ce souhait, qui existe depuis l'antiquité peut se traduire par une politique volontariste d'éradication des caractères jugés handicapants ou de favorisation des caractères jugés bénéfiques.

Dans notre période contemporaine, les progrès du génie génétique ont ouvert de nouvelles possibilités médicales MAIS, le génie génétique (plus communément appelé OGM pour les plantes et animaux) touche des modifications ou de détection sur l'ADN, molécule stable spécifique à chacun de nous et identique dans chacune de nos cellules. Or, nous travaillons sur le transcriptome, produit des gènes, qui varient en fonction de critères extrêmement tels que la nourriture, fatigue, âge, le sexe, etc. et qui nous donne des renseignements du même ordre que celui d'un simple bilan sanguin.

Donc, je vous rassure, aucune sélection n'est envisagée à ce jour !

## **Docteur Nicolas BARIZIEN**

Il n'est pas question de critiquer votre travail, au demeurant fort intéressant. Ceci étant, nous connaissons tous la récupération dont sont victimes des résultats de recherche développée à des fins thérapeutiques.

## **Docteur David PIQUEMAL**

Pour exemple, un bilan sanguin est un ensemble de mesures faites dans le sang. Elles sont choisies par le médecin en fonction du diagnostic envisagé ou des organes à explorer.

Les bilans sanguins courants pratiqués en cas de maladie :

- Le bilan hépatique.
- Le bilan rénal.
- Le bilan des graisses.
- Quand il y a un problème infectieux ou inflammatoire : la numération formule sanguine, la vitesse de sédimentation, l'électrophorèse des protéines.
- En cas d'anémie : la NFS, le dosage du fer sérique, parfois un test de Coombs.  
Comme je l'ai indiqué lors de mon exposé, l'analyse du transcriptome permet de renforcer la qualité et la justesse du bilan sanitaire du sportif.

## **Patrick MAGALOFF**

Dès l'origine, le Professeur MARTI et la société Skuld-Tech se sont focalisés sur la réalisation d'une carte d'identité génétique. Cette orientation devrait permettre d'aboutir à d'importantes avancées en matière de lutte antidopage. Les travaux du Docteur PIQUEMAL se bornent à ce seul horizon.