

SEED Hématologie



Lutte contre le dopage et rôle des paramètres associés aux réticulocytes

Performances athlétiques

La forme physique et les performances athlétiques, en particulier dans les disciplines d'endurance, reposent sur une gestion musculaire appropriée. Les cellules musculaires ont besoin d'oxygène pour fonctionner. Un apport insuffisant en oxygène peut limiter leurs performances. L'entraînement ne vise pas seulement à acquérir une belle technique en limitant la perte d'énergie et à augmenter la masse musculaire. Son but est aussi de fournir aux muscles un apport optimal en oxygène.

Il existe plusieurs façons d'y parvenir :

- L'entraînement cardiovasculaire afin d'augmenter l'assimilation maximale d'oxygène, en agissant, par exemple, sur le débit cardiaque qui contribue à mieux alimenter en sang les muscles en exercice.
- Assurer un apport suffisant en fer à l'organisme pour favoriser une érythropoïèse optimale.
- S'entraîner au-delà de 1 800 m d'altitude optimise le nombre de globules rouges (GR) dans le but de fournir suffisamment d'oxygène aux cellules musculaires.

Impact de l'entraînement en altitude sur l'organisme

Lorsque l'altitude est élevée, la pression atmosphérique est plus basse qu'au niveau de la mer. Cela signifie que l'oxygène entre dans les poumons à une moindre pression, donc qu'une plus faible quantité d'oxygène est disponible pour charger les GR. Vivre et s'entraîner dans ces conditions implique que l'organisme dispose d'une moins grande quantité d'oxygène. Cette hypoxie est détectée par les reins et l'organisme libère de l'érythropoïétine (EPO) en conséquence afin d'accélérer l'érythropoïèse, donc d'augmenter le nombre de GR et la teneur en hémoglobine [1]. De cette façon, le manque d'oxygène est compensé progressivement par une hausse de la capacité de transport, ce qui assure à nouveau un apport suffisant en oxygène dans les muscles. De retour à une altitude normale, cette érythrocytose aboutit à une disponibilité accrue en oxygène pour les muscles. Ces derniers produisent ainsi de meilleures performances, ce qui est un avantage en compétition, mais peut aussi booster les performances à l'entraînement. Après retour à une altitude normale, l'organisme régule progressivement son érythropoïèse à la baisse, ce qui se traduit par une diminution des réticulocytes.

Entraînement artificiel en altitude et dopage sanguin

L'entraînement en altitude a pour effet global d'augmenter le nombre de GR, donc la capacité de transport d'oxygène, ce qui aboutit à de meilleures performances sportives. Élaborer un plan d'entraînement, en particulier dans le contexte d'une compétition, contribue à améliorer les performances. Réduire artificiellement l'apport en oxygène en modifiant la composition de l'air respiré, par exemple durant le sommeil ou l'entraînement, peut provoquer des effets identiques à ceux obtenus en s'entraînant réellement en altitude [2]. Ce procédé est connu sous le nom « d'entraînement artificiel en altitude ».

Il existe une autre méthode utilisée depuis les années 1980 pour améliorer la capacité de transport en oxygène : le dopage sanguin [3–6]. Le nombre de GR est augmenté à court terme par une transfusion de sang autologue (comme une auto-transfusion) [7] ou par la prise de substances dont les effets sont identiques à ceux de l'érythropoïétine [7–10]. Cette dernière méthode est également connue sous le nom de « dopage à l'EPO » ou « dopage avec des substances de type EPO ».

Le dopage à l'EPO correspond à l'usage abusif d'une substance recombinante identique à l'érythropoïétine humaine (rhEPO) ou dont les effets sont équivalents. En prenant cette substance, les athlètes attendent des effets positifs comparables, voire supérieurs, à ceux produits par un entraînement en altitude [5]. L'érythropoïèse est stimulée par la prise de substances de type EPO, ce qui aboutit à la disponibilité d'un plus grand nombre de réticulocytes, donc à plus de GR [11].

Historique du dopage par substances de type EPO

L'EPO humaine recombinante est devenue disponible en Europe dans les années 1980 et son usage a été interdit dans le sport au début des années 1990. Pour faire respecter cette interdiction,

il fallait prouver l'usage abusif de substances de type EPO. Dans les années 1990 pourtant, il n'existait pas vraiment de méthode de détection directe [12]. Encore aujourd'hui, détecter l'EPO dans les urines reste relativement chronophage et coûteux [9, 13] pour les laboratoires. Ses effets sur l'amélioration des performances se poursuivent après excrétion de la substance. C'est pourquoi une méthode de détection indirecte du dopage par des substances de type EPO a été mise au point. Elle s'est appuyée sur certains paramètres sanguins et leur évolution dans le temps (à court et long terme) depuis le début des années 2000. La fondation de l'Agence mondiale antidopage (AMA) et l'instauration du passeport biologique de l'athlète (PBA) en 2009 ont permis d'améliorer nettement cette procédure (voir Fig. 1) [14].

Agence mondiale antidopage (AMA)

L'été 1988 a été marqué par un grand nombre de cas de dopage dans le cyclisme. Le Comité International Olympique a pris l'initiative de créer une autorité indépendante destinée à lutter contre le dopage. L'AMA a ainsi vu le jour en 1999, financée à parts égales par les fédérations sportives et les gouvernements du monde entier. Sa plus grande réalisation est l'élaboration et le suivi du Code mondial antidopage. Ce document harmonise et normalise tous les efforts de lutte contre le dopage consentis dans toutes les disciplines sportives et dans tous les pays. C'est pour assurer efficacement le respect du Code mondial antidopage que l'AMA a établi le Passeport biologique de l'athlète en 2009.

Vous trouverez d'autres informations sur l'AMA, l'historique de sa fondation et ses missions actuelles sur son [site internet officiel](#).

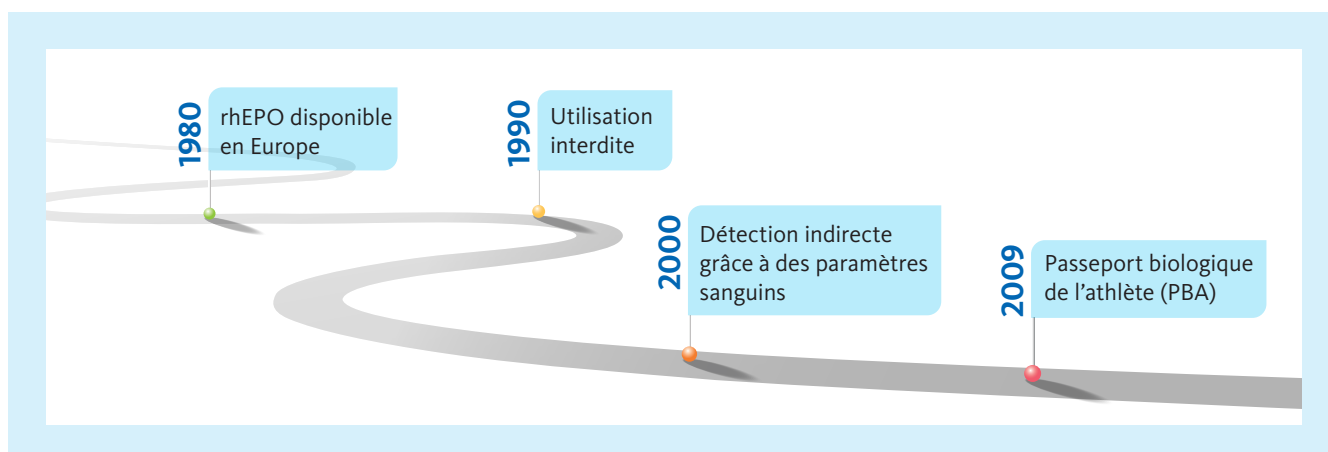


Fig. 1 Historique du dopage par des substances de type EPO

Détection du dopage sanguin

Depuis que le dopage sanguin existe, il est très difficile d'en établir la preuve, car l'EPO endogène et l'EPO recombinante ne présentent que très peu de différences [12–13, 15]. Il existe par ailleurs des substances qui potentialisent indirectement le taux ou l'effet de l'EPO endogène. C'est le cas par exemple des stabilisateurs du facteur inductible par hypoxie (HIF) qui provoquent une transcription accrue de l'EPO naturelle [16]. Les stabilisateurs de HIF sont interdits au même titre que l'utilisation de rhEPO, mais les détecter demande beaucoup d'efforts par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse [10]. Bien que la détection de substances de type EPO soit possible aujourd'hui dans les urines par des méthodes chronophages et coûteuses par Western blot [13], l'effet (c'est-à-dire l'augmentation du nombre de GR) peut se prolonger même lorsque la substance est excrétée ou dégradée. Malgré cela, les athlètes sont régulièrement reconnus coupables de dopage sanguin. Comment cela est-il possible ?

Pendant la formation des GR dans la moelle osseuse, les érythroblastes se transforment en réticulocytes qui entrent dans la circulation sanguine périphérique.

En dégradant le réticulum endoplasmique et l'ARN correspondant, les réticulocytes se transforment en GR matures en l'espace de quatre jours. Ils demeurent dans la moelle osseuse pendant trois jours, avant de poursuivre leur maturation dans la circulation sanguine périphérique [17] le jour suivant et ainsi devenir des GR matures. L'usage abusif de substances de type EPO entraîne la formation d'un plus grand nombre de réticulocytes qui sont libérés dans le sang. La proportion de ces cellules augmente par rapport au nombre total de GR. C'est précisément cette augmentation qui peut être mesurée avec un analyseur d'hématologie automatisé disponible dans le commerce.

Le paramètre RET% indique le taux de réticulocytes par rapport aux GR. RET# indique la numération absolue de réticulocytes. La fluorocytométrie en flux permet de classer les réticulocytes en trois stades de maturation, en plus de leur mesure conventionnelle. Ces stades sont définis d'après la teneur en ARN des réticulocytes, dont la mesure sur l'analyseur se traduit par l'intensité de la fluorescence. Il est ainsi possible d'obtenir des paramètres en plus, tels que la fraction des réticulocytes immatures (IRF) (voir Fig. 2) [17].

Une augmentation inhabituellement importante de RET% fournit une preuve indirecte de l'utilisation de substances interdites ayant des effets similaires à ceux de l'EPO [18].

Tout agent stimulant l'érythropoïèse produit des signes classiques de dopage, dont la stimulation des réticulocytes. Cela est suivi d'une augmentation des taux d'hémoglobine et une baisse du RET% en réponse aux taux d'hémoglobine artificiellement élevés [19].

Tableau 1 Présentation des valeurs soumises pour chaque mesure du module hématologique du PBA

Variable sanguine	Unité	
Hémoglobine	Hb	g/dL
Hématocrite	Ht	%
Fraction des réticulocytes immatures	IRF	%
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	TCMH	pg
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine	CCMH	g/dL
Volume globulaire moyen	VGM	fL
Score OFF	-	-
Plaquettes	PLT	10 ³ /μL
Indice de répartition des globules rouges	IDR-SD	fL
Globules rouges	GR	10 ⁶ /μL
Réticulocytes – en valeur absolue	RET	10 ⁶ /μL
Pourcentage de réticulocytes	RET%	%
Globules blancs	GB	10 ³ /μL

Le contrôle des modifications de ces paramètres entre dans le cadre du PBA (voir encadré). Les organisations antidopage nationales mettent en place un plan de test spécial destiné à contrôler 12 paramètres sanguins par athlète au sein de leur juridiction locale [14, 18]. Les athlètes doivent se soumettre régulièrement à des prélèvements d'échantillons de sang et les valeurs mesurées sont enregistrées dans le PBA (voir Tableau 1). Ces procédures de routine aboutissent à des seuils individualisés, notamment pour le nombre de réticulocytes présents dans le sang. D'autres données sont collectées et observées en parallèle sur des temps longs. Elles sont mises en relation avec tout changement qui se produirait dans les paramètres sanguins. Par exemple, tout entraînement en altitude ou participation des athlètes à une compétition sont enregistrés [20].

Le PBA peut également détecter un prélèvement sanguin pour transfusion ultérieure, indiqué par un taux d'hémoglobine diminué et des valeurs de RET% et d'IRF stimulées. Cette approche a montré son efficacité dans la mise en évidence de transfusions sanguines systématiques [19].

Pour formuler une conclusion définitive sur le dopage, il faut s'assurer que les résultats des mesures obtenus pour les paramètres sanguins ne dépendent pas du laboratoire ni de son personnel, ou encore des conditions de transport telles que la durée ou la température. Cela nécessite aussi un degré élevé de précision de l'analyseur d'hématologie.

Passeport biologique de l'athlète (PBA)

Le PBA surveille en continu certains paramètres biologiques de l'athlète. Des échantillons de l'athlète sont examinés dans des laboratoires accrédités, à certains intervalles ou à certaines occasions (par ex. durant une phase de compétition), puis les résultats sont enregistrés dans son passeport. Il est ainsi possible de prouver l'usage abusif de substances de type EPO dans le temps.

Il appartient aux organisations antidopage locales d'intégrer le PBA dans leurs propres programmes. L'AMA a joué un rôle majeur dans l'élaboration du PBA. La première version, en décembre 2009, prévoyait déjà l'utilisation de paramètres hématologiques pour établir le profil spécifique de l'athlète et ainsi détecter le dopage sanguin. Le PBA comporte désormais 12 paramètres hématologiques ainsi que le calcul d'un score OFF. Les directives sur le fonctionnement du PBA précisent aussi ce qu'il faut prendre en compte lors du prélèvement des échantillons et la façon de réaliser le transport et l'analyse elle-même [21].

Une fois l'analyse terminée, les valeurs correspondant aux paramètres sanguins sont centralisées et évaluées. Un Système d'administration et de gestion antidopage (ADAMS) est utilisé à cette fin. Le [site Internet de l'AMA](#) décrit ses activités en détail.

Stabilité des paramètres liés aux réticulocytes

Pour qu'une compétition place tous les athlètes sur un pied d'égalité, il faut non seulement que les conditions sportives soient comparables, mais aussi que les contrôles antidopage et les conditions de mesure de chaque laboratoire le soient. Les paramètres doivent rester indépendants des circonstances extérieures. Cela signifie qu'un échantillon analysé dans différents laboratoires, à différents moments de la journée, à différentes températures ambiantes ou sur différents appareils de la même série d'analyseurs doit aboutir quasiment au même résultat, avec la même précision. Parallèlement, les paramètres obtenus en laboratoire doivent rester stables même sous l'effet de facteurs externes tels que la durée de transport ou le stockage.

L'AMA déploie beaucoup d'efforts pour parvenir à une harmonisation entre laboratoires, par exemple en délivrant des accréditations sur la base de conditions qu'elle définit. L'AMA a élaboré le Code mondial antidopage, document qui harmonise les politiques, les dispositions et réglementations antidopage entre organisations sportives et autorités publiques dans le monde, y compris au sujet des procédures de test, du prélèvement d'échantillons aux analyses en laboratoire en passant par le transport [22]. Des études sont également menées pour s'assurer qu'il est possible de corriger une éventuelle différence générale de mesure dans le PBA, par exemple à l'occasion d'un changement de série d'analyseurs [18, 23].

La stabilité biologique des paramètres liés aux réticulocytes (RET#, RET%) a été établie d'après des mesures sur XE-Series et XT-Series dans de nombreuses publications [24-26]. Elle est aussi vérifiée scientifiquement pour XN-Series [25].

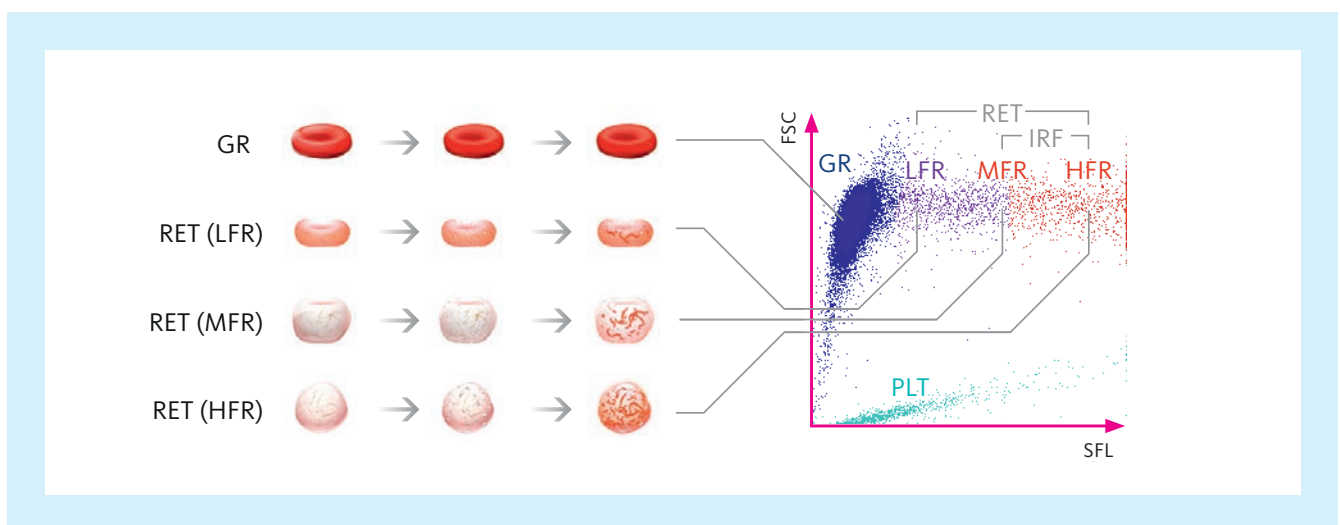


Fig. 2 Scattergramme du canal RET présentant les stades de maturation des réticulocytes : LFR, MFR et HFR



Technologie de mesure du canal RET

L'utilisation de la fluorocytométrie en flux pour le canal RET fournit des informations sur la maturation des réticulocytes, en plus de leur numération absolue (RET#).

Le réactif de lyse commence par perforer les membranes cellulaires, celles-ci restant natives dans une large mesure. Au cours d'une deuxième étape, le fluorochrome marque les acides nucléiques intracellulaires, l'intensité du signal de fluorescence étant directement proportionnelle à la teneur en acide nucléique. La teneur en ARN diminuant au fur et à mesure du processus de maturation des réticulocytes, il est possible de déterminer trois paramètres reflétant ces différents stades. Les réticulocytes émettent un signal de fluorescence plus fort que les érythrocytes matures, qui ne contiennent plus d'ARN, mais nettement plus faible que les leucocytes.

En fonction de l'intensité de la fluorescence, les réticulocytes sont fractionnés en trois catégories représentant différents stades de maturité : LFR (ratio de fluorescence faible), MFR (ratio de fluorescence moyen), HFR (ratio de fluorescence élevé). La fraction des réticulocytes immatures (IRF) reflétant la proportion de réticulocytes immatures se calcule à partir de la somme des MFR et HFR.

Conclusion

Lutter contre le dopage restera à jamais une compétition entre de nouvelles substances et les méthodes qui permettent de les détecter. Néanmoins, grâce aux paramètres liés aux réticulocytes, à l'IRF et à l'hémoglobine, il est possible de déterminer le statut de l'érythropoïèse indépendamment des substances utilisées. La surveillance à court terme et à long terme de ces paramètres constitue une méthode scientifiquement avérée pour détecter le dopage sanguin dans ce contexte.

Parmi les signes classiques d'un dopage sanguin, on retrouve l'augmentation du RET% provoquée par le recours à des agents stimulant l'érythropoïèse, suivie d'une augmentation des concentrations d'Hb et d'une diminution du RET% en réponse aux taux d'Hb artificiellement élevés. Le PBA peut également détecter un prélèvement sanguin en vue d'une transfusion ultérieure, caractérisé par une baisse du taux d'Hb et une augmentation des valeurs du RET% et de l'IRF.

Pour garantir l'équité du contrôle antidopage, les échantillons utilisés pour le PBA ne peuvent être analysés que dans l'un des quelques 30 laboratoires accrédités par l'AMA dans le monde, qui utilisent tous la même technologie d'analyse. Le choix de l'analyseur s'est largement appuyé sur le fait qu'une réduction de la variance analytique a un impact positif sur la sensibilité du PBA, où les analyseurs Sysmex ont démontré la plus faible variance analytique pour la valeur du RET% [19].

Bibliographie

- [1] **Richard C et al. (2020):** *Transferrin Receptors in Erythropoiesis.* *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 19; 21(24): 9713–29.
- [2] **Voss SC et al. (2020):** *A novel mixed living high training low intervention and the hematological module of the athlete biological passport.* *Drug Test Anal.* 2020 Mar; 12(3): 323–30.
- [3] **Audran M et al. (1999):** *Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control.* *Med Sci Sports Exerc.* 1999 May; 31(5): 639–45.
- [4] **Connes P et al. (2003):** *Faster oxygen uptake kinetics at the onset of submaximal cycling exercise following 4 weeks recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) treatment.* *Pflügers Arch.* 2003 Nov; 447(2): 231–38.
- [5] **Haile DW et al. (2019):** *Effects of EPO on Blood Parameters and Running Performance in Kenyan Athletes.* *Med Sci Sports Exerc.* 2019 Feb; 51(2): 299–307.
- [6] **Jeppesen JS et al. (2021):** *Immature reticulocytes are sensitive and specific to low-dose erythropoietin treatment at sea level and altitude.* *Drug Test Anal.* 2021 Jul; 13(7): 1331–40.
- [7] **Bejder J et al. (2019):** *Time trial performance is sensitive to low-volume autologous blood Transfusion.* *Med Sci Sports Exerc.* 2019; 51(4): 692–700.
- [8] **Lundby C et al. (2008):** *Does recombinant human Epo increase exercise capacity by means other than augmenting oxygen transport?* *J Appl Physiol (1985).* 2008; 105(2): 581–7.

- [9] **Salamin O et al. (2018):** Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Mar 15; 464: 75–87.
- [10] **Philip M et al. (2021):** Metabolic studies of hypoxia-inducible factor stabilisers IOX2, IOX3 and IOX4 (in vitro) for doping control. *Drug Test Anal.* 2021 Apr; 13(4): 794–816.
- [11] **Sgrò P et al. (2018):** Effects of erythropoietin abuse on exercise performance. *Phys Sportsmed.* 2018 Feb; 46(1): 105–15.
- [12] **Eklblom BT et al. (2000):** Blood boosting and sport. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000 Mar; 14(1): 89–98.
- [13] **Yasuoka Y et al. (2020):** Differentiation of endogenous erythropoietin and exogenous ESAs by Western blotting. *Heliyon.* 2020 Nov 3; 6(11): e05389–94.
- [14] **Mahendru D et al. (2020):** Athlete Biological Passport: Need and Challenges. *Indian J Orthop.* 2020 Jan 31; 54(3): 264–70.
- [15] **Parisotto R et al. (2000):** A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica.* 2000 Jun; 85(6): 564–72.
- [16] **Tomc J et al. (2021):** Molecular Insights into the Oxygen-Sensing Pathway and Erythropoietin Expression Regulation in Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 30; 22(13): 7074–90.
- [17] **SEED Reticulocytes: Sysmex; SEED Haematology – The importance of reticulocyte detection.** (19.8.2021)
- [18] **Naud JF et al. (2019):** Standardization of reticulocyte counts in the athlete biological passport. *Int J Lab Hematol.* 2019 Jun; 41(3): 387–91.
- [19] **Akin R 2021:** Interview of Dr Rein Akin, Scientist at WADA, in 2021 with Sysmex <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/expert-voices/haematology/the-fight-against-doping-in-sports-continues.html> (19.8.2021)
- [20] **ABP 2021:** Athletic Biological Passport operating guidelines. V08, April 2021, <https://www.wada-ama.org/en/resources/athlete-biological-passport/athlete-biological-passport-abp-operating-guidelines>
- [21] **ABP 2021:** <https://www.wada-ama.org/en/athlete-biological-passport;> (13.09.2021)
- [22] **World Anti-Doping Code 2021:** <https://www.wada-ama.org/en/resources/the-code/world-anti-doping-code> (19.08.2021)
- [23] **Daves M et al. (2015):** Sample stability for complete blood cell count using the Sysmex XN haematological analyser. *Blood Transfus.* 2015 Oct; 13(4): 576–82.
- [24] **Robinson N et al. (2011):** Stability and robustness of blood variables in an antidoping context. *Int J Lab Hematol.* 2011 Apr; 33(2): 146–53.
- [25] **Ashenden M et al. (2013):** Stability of athlete passport parameters during extended storage. *Int J Lab Hematol.* 2013 Apr; 35(2): 183–92.
- [26] **Ashenden M et al. (2014):** Stability of athlete blood passport parameters during air freight. *Int J Lab Hematol.* 2014 Oct; 36(5): 505–13.