

L'arsenic et le contrôle antidopage des chevaux

Par : Marie-Agnes Popot¹, Benoit Loup¹, Pascal Maciejewski¹, Pierre Remy¹, Patrice Garcia¹, Yves Bonnaire¹, Ludovic Bailly-Chouriberry¹, Geneviève Feuillade², Virginie Pallier², Laurence Wimel³, Arnaud Duluard⁴, Paul Marie Gadot⁵, Hélène Bourguignon⁶

1 Laboratoire des Courses Hippiques (LCH), 15 rue de paradis, 91370 Verrières le Buisson France.

2 Université de Limoges, Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE), ENSIL, 16 rue Atlantis, 87068 Limoges Cedex France.

3 Station Expérimentale des Haras, La Valade, 19370 Chamberet

4 Le Trot, 7 rue d'Astorg, 75008 Paris

5 France Galop, 46 place Abel Gance 92655 Boulogne Cedex

6 Fédération Nationale des Courses Hippiques (FNCH), 29 rue de Lisbonne 75008 Paris

L'arsenic fait partie des substances testées dans le cadre du contrôle antidopage. Cependant, sa présence en quantité variable dans l'environnement induit une variabilité importante de sa concentration urinaire chez les animaux. Etat des lieux des connaissances et travaux en cours.

Contexte

Historiquement utilisé chez le cheval comme tonique, malgré ses propriétés toxiques, l'arsenic est une substance prohibée au regard des codes des courses du trot et du galop. Cependant, il est naturellement présent dans l'environnement, et son contrôle est basé sur un seuil international de concentration en arsenic urinaire fixé à 300 µg/L. Après sa mise en place pour les courses françaises, le suivi des concentrations urinaires en arsenic a montré que la moyenne des concentrations chez les trotteurs français (≈ 39 µg/L, $n \approx 28\ 500$) était environ le double de celles des chevaux pur-sang (≈ 18 µg/L, $n \approx 19\ 500$). Par ailleurs des concentrations urinaires élevées et supérieures à la valeur du seuil de concentration de 300 µg/L ont également été quantifiées chez des chevaux non traités de la Station Expérimentale des Haras de Chamberet.

L'arsenic dans l'environnement

En raison de ses propriétés chimiques, l'arsenic de symbole As est considéré comme un élément métalloïde. Sa présence provient d'une part des sources naturelles (dites géogéniques) et d'autre part des sources liées à l'activité humaine (ou anthropogéniques). Dans l'environnement naturel, l'arsenic est présent principalement sous forme inorganique (la plus répandue dans les échantillons d'eaux naturelles) et organique (composés organométalloïdiques). Tous les compartiments : l'air, l'eau, les sols ainsi que les organismes vivants en contiennent. Les sources naturelles de l'arsenic sont réparties de façon hétérogène et concentrée dans certaines zones constituant des

anomalies géochimiques avec présence d'arsenic en grande quantité. Ces zones sont bien identifiées en Europe (figure 1a) et en France (figure 1b) (Tarvainen et coll, 2013). Les concentrations en arsenic dans le sol sont généralement plus élevées dans le sud de l'Europe que dans le nord. En France, l'anomalie observée dans la chaîne des volcans d'Auvergne s'étend jusque dans la région de la station expérimentale de Chamberet.

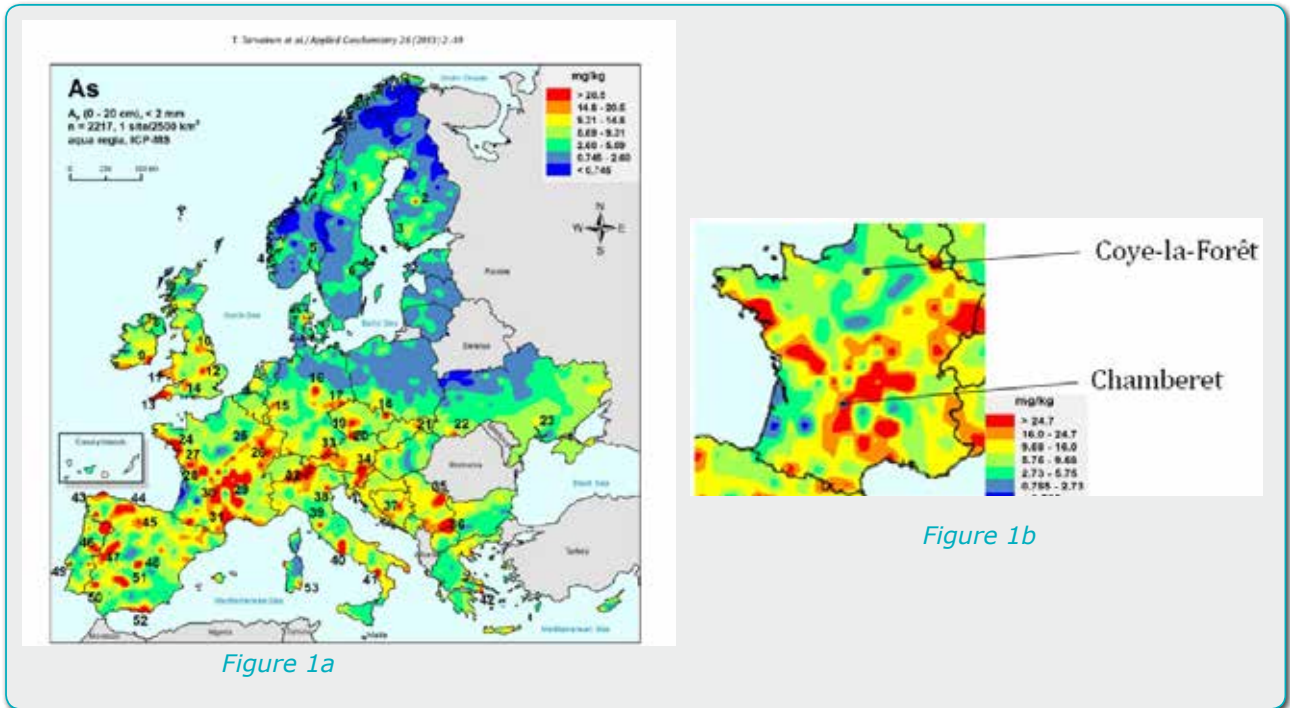


Figure 1 : Anomalies géochimiques de l'arsenic en Europe (Tarvainen et coll, 2013) ; 1b : Anomalies géochimiques de l'arsenic en France d'après Tarvainen et coll, (2013) et localisation des chevaux non traités suivis dans cette étude.

Des phénomènes naturels tels que l'érosion des roches et les précipitations conduisent à une redistribution de l'arsenic vers les compartiments aquatiques et atmosphériques participant au cycle biogéochimique. Les bactéries jouent un rôle déterminant dans la mobilité de l'arsenic (As) dans l'environnement surtout dans le sol (Figure 2) où l'arsenic est présent sous forme inorganique et peut subir différentes réactions de biotransformation.

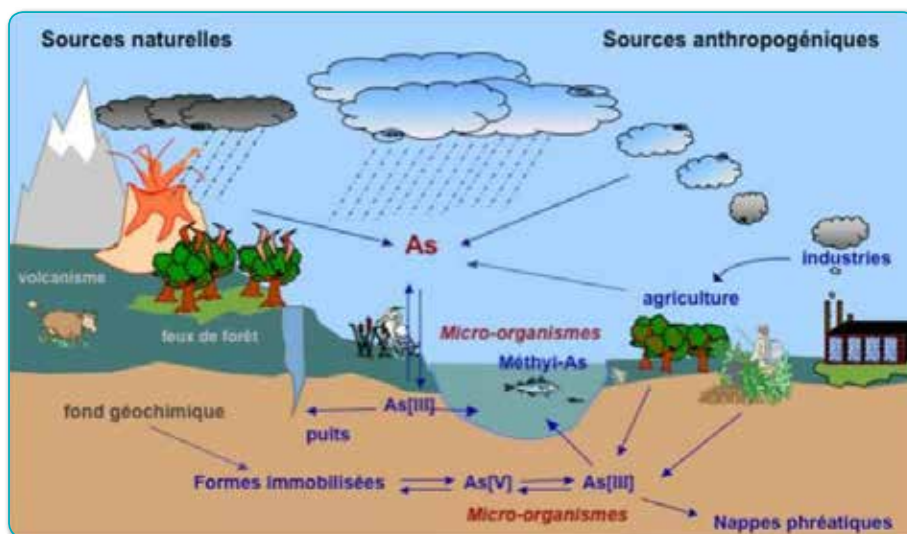


Figure 2 / Cycle biogéochimique de l'arsenic (Leufroy 2012, à partir de Mukhopadhyay et coll. 2002).

Les concentrations en arsenic dans le sol sont très variables. Les concentrations normales sont inférieures à 2 mg/kg (Figure 1a, b), les plantes terrestres comme le rumex et l'herbe concentrent généralement peu l'arsenic (0,2 à 0,4 mg/kg), par contre les mousses et le lichen ont cette capacité. L'arsenic atmosphérique proviendrait essentiellement de l'activité volcanique.

Concernant l'eau, l'arsenic se retrouve principalement dans les lacs, les rivières et l'eau souterraine. Les concentrations en arsenic dans les eaux douces sont normalement de l'ordre 1 à 10 µg/L.

Ces concentrations sont plusieurs milliers de fois plus élevées dans les régions volcaniques, minières, ou contenant des minerais riches.

L'industrie, l'activité minière et l'agriculture constituent les principales sources anthropogéniques. Ces rejets devraient être limités car l'arsenic est de moins en moins utilisé en raison de sa toxicité (interdiction de pesticides arsenicaux, normes environnementales, etc.). Cependant, certaines utilisations de l'arsenic comme celle de bois traité avec l'Arséniate de Cuivre Chromaté (ACC) (décret n°2007-1467) sont autorisées, ce qui est le cas des traverses de chemin de fer traitées à l'ACC et utilisées comme bois de clôture.

Utilisations thérapeutiques et non thérapeutiques de l'arsenic chez l'homme et chez le cheval

Malgré ses propriétés toxiques et cancérigènes sous sa forme minérale, l'arsenic a été considéré comme un médicament pendant plus de 2000 ans. Inscrite à la Pharmacopée de nombreux pays européens, la liqueur de Fowler (arsénite de potassium) était la solution arsenicale la plus employée au 19^{ème} siècle. Sous la forme organique, l'arsenic toxique à forte dose est néanmoins un ultra oligo-élément essentiel à très faible dose.

Comme chez l'Homme, la liqueur de Fowler a longtemps été prescrite, et même encore il y a quelques années, comme stimulant général ou pour activer l'appétit du cheval. Aucune spécialité vétérinaire contenant de l'arsenic n'est plus disponible en France. De nos jours, des médicaments injectables comme le Jurocyl® contenant de l'arsenic sous forme d'arsanilate de sodium sont toujours vendus en Australie pour stimuler l'appétit des chevaux capricieux, ou des chevaux stressés en phase de compétition ou d'entraînement intensif. Ces dérivés de l'arsenic sont des tonifiants prescrits dans les états d'anémie, et d'asthénie, permettant également de redonner beau poil aux chevaux. Du fait de leur effet toxique, leur utilisation à forte dose pour déclasser un cheval concurrent a aussi été mentionnée (Houghton & Maynard, 2010).

Dopage et contrôle antidopage

Intoxication et/ou dopage chez le cheval

Des cas de dopages à l'arsenic ont été rapportés en Angleterre dès le début du 19^{ème} siècle conduisant à la mort de plusieurs chevaux (Houghton & Maynard, 2010). En Australie, dans les années 1930, 90% des chevaux recevaient de l'arsenic dans leur alimentation pour augmenter leur force et améliorer leur santé. «Phar Lap» cheval de course né en Nouvelle Zélande, y est alors devenu très célèbre par son palmarès hors du commun en gains et courses gagnées. Ce cheval est mort dans des circonstances encore mystérieuses à l'âge de 6 ans. L'analyse des crins a confirmé la présence d'arsenic et supporté la thèse du surdosage ([Kempson & Henry, 2010](#)).

Seuil et contrôles

Suite à ces suspicions de dopages et/ou d'empoisonnement, les autorités hippiques avaient demandé qu'un contrôle antidopage de l'arsenic soit mis en place (Houghton & Maynard, 2010). Tout comme certains autres éléments minéraux, l'arsenic rentre dans la liste des substances prohibées par les codes des courses. Etant un contaminant environnemental, sa présence dans tous les échantillons biologiques sanguins et urinaires nécessitait la mise en place d'un seuil de concentration de l'arsenic. A partir d'une base de données (Crone, 1995) obtenue à Hong Kong entre 1983 et 1988 sur 4000 échantillons, un seuil international d'arsenic urinaire de 300 µg/L (au risque 1/10000) a été adopté par la Fédération Internationale des Autorités Hippiques et figure aux codes des courses.

Techniques d'analyse

L'arsenic est contrôlé en routine par ICP/MS : méthode de spectrométrie de masse adaptée à la détection des éléments inorganiques. Le dosage de l'arsenic dans l'urine et le plasma est réalisé après dilution de l'échantillon dans de l'acide nitrique. Cette méthode peut aussi s'appliquer à l'analyse de l'eau. Les matrices solides telles que les aliments, les végétaux et le bois sont aussi analysés par ICP/MS mais une minéralisation préalable est nécessaire.

Résultats et études en cours

Concentrations urinaires en arsenic chez les chevaux de courses et les chevaux de sport

Pour environ 50 000 échantillons urinaires analysés de 2013 à 2016 (Figure 3), la moyenne des concentrations mesurées chez les trotteurs (38,9 µg/L) est le double de celle des pur-sang (18,1 µg/L). L'étude de la répartition des concentrations montre que dans le cas des trotteurs, les concentrations en arsenic comprises entre 100 µg/L et 300 µg/L représentent 4,6 % de la population alors que ces mêmes concentrations ne représentent que 0,4 % dans le cas des pur-sang. De plus la moyenne de concentrations obtenues sur 538 échantillons de chevaux de sport Français est de 37,2 µg/L proche de celles des trotteurs.

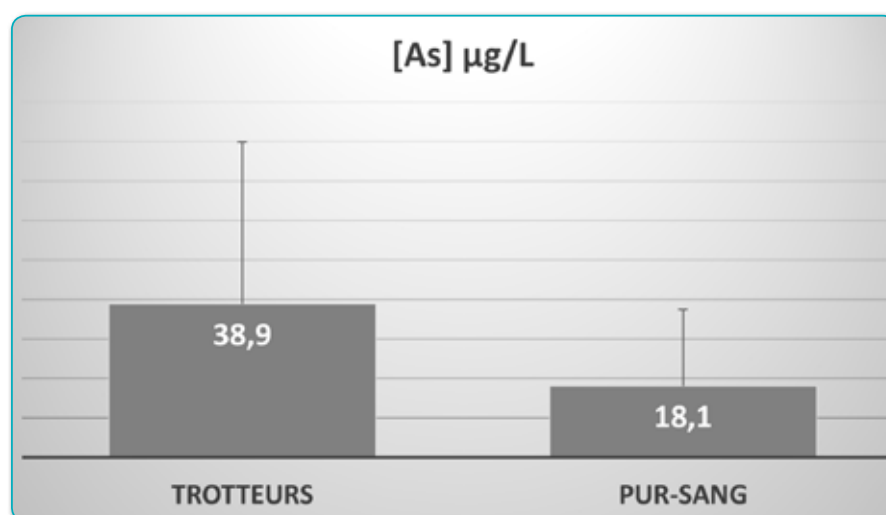


Figure 3 / Histogramme de concentrations en arsenic urinaire chez les trotteurs et les chevaux pur-sang de 2013 à 2016.

Grâce à une collaboration des laboratoires européens de contrôle antidopage des chevaux *via* l'AORC (Association of Official Racing Chemists) 163 échantillons urinaires provenant de 7 pays ont été analysés au LCH. Le seuil dérivé des concentrations d'arsenic de ces échantillons est proche de 300 µg/L (Tableau 1). Ces résultats obtenus sur un petit nombre d'échantillons ne reflètent pas les différences de concentrations d'arsenic dans le sol des différents pays concernés (Tarvainen et coll. 2013) (Figure 1b).

Pays	n	Maximum (µg/L)	Moyenne (µg/L)	Seuil dérivé µg/L	Spécialité
Finlande	20	125	23	331	Trot
Allemagne	20	80	24	273	Trot/galop
Italie	24	32	10	129	Trot
Irlande	24	113	23	334	Galop
Espagne	25	51	23	130	—
Suède	25	82	15	262	Trot
Royaume Uni	25	44	16	111	Galop
Tous les pays	163	125	19	324	Trot/galop

Tableau 1 / Résumé des statistiques d'arsenic urinaire de 163 échantillons urinaires prélevés en 2014 dans 7 pays.

Concentrations urinaires en arsenic chez des chevaux connus non traités provenant de deux sites différents

L'arsenic a aussi été quantifié dans les urines de chevaux non traités de la station expérimentale de Chamberet en Corrèze et au centre d'administration et de prélèvements de Coye la forêt dans l'Oise. La concentration moyenne en arsenic obtenue entre 2015 et 2016 sur 57 échantillons urinaires collectés sur 9 chevaux à Coye la Forêt était de 20,0 µg/L avec un maximum de 60 µg/L ce qui est comparable aux résultats présentés dans le Tableau 1. Au contraire à Chamberet, des concentrations urinaires élevées (> 300 µg/L) ont été souvent observées dans les échantillons collectés en 2015 comme en 2016 et en accord avec les observations précédentes (Popot et coll, 2015) laissant supposer une contamination de l'environnement.

Etude dans le bois

En Australie en 2014, après la mise en place de la technique ICP/MS dans le laboratoire concerné, des concentrations en arsenic urinaires supérieures à 300 µg/L ont été retrouvées sur plusieurs échantillons de routine. L'enquête a révélé que ces chevaux avaient accès à des paddocks dont le bois des barrières était traité avec l'ACC. Afin de vérifier si ce traitement pouvait être à l'origine de concentrations urinaires supérieures à 300 µg/L, cinq chevaux ont été nourris avec des rations supplémentées avec 100 g de poudre de bois traité. Au vu des résultats de cette étude expérimentale (Bailey et coll, 2017), il semble que le seuil de 300 µg/L pourrait être dépassé par la consommation de bois traité par le cheval. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse en conditions réelles. En France, des contrôles dans le bois ont aussi révélé des concentrations élevées en Arsenic.

Etude de la concentration en arsenic dans les aliments

Les trotteurs et les pur-sang ne partagent pas strictement les mêmes régimes alimentaires. Afin d'évaluer l'apport en arsenic dans l'alimentation, une étude de population a été conduite sur 437 aliments manufacturés et non manufacturés. La plupart des aliments pour chevaux testés présentait des concentrations en arsenic inférieures à 0,5 µg/g. Des concentrations faibles en arsenic ont été trouvées dans l'orge et la paille alors que des concentrations plus élevées ont été observées dans la luzerne avec un échantillon à 4,3 µg/g d'arsenic. Une estimation de l'apport d'arsenic journalier a été établie à partir des concentrations moyennes trouvées dans les aliments étudiés (Tableau 2).

Détermination de l'apport alimentaire journalier en arsenic			
Aliment de la ration quotidienne	Paille	Foin (autre que foin de Luzerne)	Alimentation manufacturée et Luzerne
Concentration moyenne de l'aliment en µg/g	0,05 µg/g	0,09 µg/g	0,49 µg/g
Quantité d'aliment/jour	3 x (4 kg = 4 000 g)		
Apport journalier	200 µg	360 µg	1960 µg
Apport journalier total	2520 µg = 2,5 mg		

Tableau 2 / Détermination de l'apport journalier en arsenic à partir des concentrations moyennes estimées dans les aliments étudiés

D'après les résultats de cette étude, l'alimentation, constituant un apport moyen journalier de 2,52 mg d'arsenic, ne semble pas pouvoir être une source majeure de contamination expliquant les moyennes de concentrations plus élevées chez les trotteurs. En effet d'après Popot et coll, (2017), la plus petite quantité d'arsenic ingéré, susceptible d'entraîner des concentrations urinaires en arsenic supérieures à 300 µg/L est estimée à environ 6,5 mg.

Perspectives et Conclusion

Suite à ces différentes observations, un suivi des concentrations en arsenic est en cours en collaboration avec la Station Expérimentale des Haras de Chamberet et le GRESE (Groupe Recherche Eau Sol Environnement). Dans le but d'établir un lien entre les concentrations urinaires en arsenic et l'environnement du cheval, des urines de plusieurs chevaux sont prélevés régulièrement de même que différents échantillons d'environnement (plantes, eau, sol et bois d'arbre et de clôture) afin de pouvoir déterminer rapidement l'origine de possibles contaminations.

Références

- Bailey SR, et coll, (2017), Proceedings of 21th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (ICRAV), Montevideo. In press.
- Bossy A, et coll (2012). Science of the Total Environment, Aug 15, (432), 257-68
- Crone DL, (1995). Testing for Therapeutics Medications, Environment and Dietary substances in Racing horses, The Maxwell H Gluck Equine Research Centre, Lexington Kentucky, USA, 1995, 63-69.
- Houghton E, Maynard S (2010), Handbook of Experimental Pharmacology 195, 2010, 369
- [Kempson IM](#), [Henry DA](#) (2010) Angew Chem Int Ed Engl. 7; 49 (25):4237-4240.
- Leufroy Axelle (2012) Thèse d'université, AgroParisTech, 2012.
- Mukhopadhyay, R., B. P. et coll. (2002). FEMS Microbiology Reviews 26(3): 311-325.
- Tarvainen T, et coll. (2013). Applied Geochemistry 28: 2-10
- Popot MA et coll. (2015) Proceedings of 20th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (ICRAV), September 2014, Mauritius. P290-294.
- Popot MA et coll. (2017) Proceedings of 21th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (ICRAV), October 2016, Uruguay. In press.