



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25615

To cite this version:

Meuly, Astrid . *Pharmacocinétique du diazépam chez le cheval dans le cadre de la lutte anti-dopage*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 114 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ANNEE 2019 THESE : 2019 – TOU 3 – 4030

PHARMACOCINETIQUE DU DIAZEPAM CHEZ LE CHEVAL DANS LE CADRE DE LA LUTTE ANTI-DOPAGE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MEULY Astrid

Née, le 05 novembre 1993 à Annecy (74)

Directeur de thèse : Mme Aude FERRAN

JURY

PRESIDENT :

Mme Bettina COUDERC

Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Aude FERRAN

Mme Séverine BOULLIER

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par Intérim : Monsieur Frédéric BOUSQUET

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1^{re} CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. DUCOS Alain, *Zootechne*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Herve, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
- M. MAILLARD Renaud, *Pathologie des Ruminants*
- M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
- M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*

- Mme DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
- Mme MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*
- Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
- M. RABOISSON Didier, *Productions animales (ruminants)*
- M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
- Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme BOUHSIRA Emilie, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
- M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
- Mme DANIELS Héléne, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme DAVID Laure, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme DEVIERS Alexandra, *Anatomie-Imagerie*
- M. DOUET Jean-Yves, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme FERRAN Aude, *Physiologie*
- Mme LALLEMAND Elodie, *Chirurgie des Equidés*
- Mme LAVOUE Rachel, *Médecine Interne*
- M. LE LOC'H Guillaume, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme MILA Hanna, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme PAUL Mathilde, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. VERGNE Timothée, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
- Mme WARET-SZKUTA Agnès, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- Mme BORDE DORE Laura, *Médecine interne des équidés*
- M. GIANSETTO Thomas, *Chirurgie*
- M. JOLIVET Franck, *Médecine interne*
- Mme LECRU Line, *Dermatologie*
- M. LEYNAUD Vincent, *Médecine interne*
- Mme ROBIN Marie-Claire, *Ophthalmologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme BLONDEL Margaux, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. CARTIAUX Benjamin, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. COMBARROS-GARCIA Daniel, *Dermatologie vétérinaire*
- M. GAIDE Nicolas, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. JOUSSERAND Nicolas, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. LESUEUR Jérémy, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

REMERCIEMENTS

À ma présidente de thèse,

Madame la Professeure Bettina COUDERC

De l'université Toulouse III Paul Sabatier,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

À ma Directrice de thèse,

Madame la Maître de conférences Aude FERRAN

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour avoir accepté de m'encadrer dans ce travail avec beaucoup de bienveillance et de disponibilité,

Veillez accepter l'expression de ma sincère gratitude.

À mon assessseure de thèse,

Madame la Professeure Séverine BOULLIER

Pour m'avoir fait l'honneur de participer au jugement de ma thèse,

Sincères remerciements.

A mon invité d'honneur,

Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour avoir été à l'origine de ce projet,

Veillez recevoir le témoignage de ma gratitude et de mon respect les plus profonds.

Aux instigateurs de cette thèse

I. Schenk, S. Guddat, M. Machnik, H. Röttgen et M. Thevis de l'Institute of Biochemistry Center for Preventive Doping Research et M. Düe et H. Lagershausen de la Fédération Équestre Allemande,

Pour avoir porté et mené à bout ce projet,

Veillez recevoir ma profonde reconnaissance et mes hommages respectueux.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : La lutte contre le dopage, vers un contrôle des médicaments raisonné chez le cheval.....	13
I. Origines et définition du mot dopage	13
1.1. Naissance du dopage chez le cheval.....	13
1.2. Premières définitions.....	13
1.3. Définitions récentes.....	15
II. Le dopage et son évolution récente	17
2.1. Pourquoi avoir recours au dopage chez le cheval ?	17
2.1.1. Amélioration des performances	17
2.1.2. Réduction du stress.....	17
2.1.3. Masquage d'une douleur	18
2.2. La vague du dopage aux alcaloïdes	18
2.3. Évolution de l'arsenal pharmaceutique du dopeur.....	19
2.4. Les différentes catégories de médication	20
III. La lutte anti-dopage dans les sports équestres	22
3.1. Pourquoi lutter contre le dopage ?.....	22
3.2. Les débuts de la lutte anti-dopage	23
3.3. Les différentes structures et réglementations de la lutte anti-dopage	24
3.3.1. Dans les courses hippiques.....	25
3.3.2. Dans les sports équestres	26
3.4. La nouvelle approche européenne : le contrôle des médicaments.....	27
3.4.1. Les catégories de substances	28
3.4.2. Contrôle de l'exposition vs contrôle des médicaments.....	30
3.5. Déroulement des analyses anti-dopage	34
3.5.1. Prélèvements	34
3.5.2. Analyses	35

IV. Le diazépam : caractéristiques, propriétés et dopage	37
4.1. Caractéristiques chimiques du diazépam	37
4.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	38
4.2.1. Absorption.....	38
4.2.2. Distribution	38
4.2.3. Métabolisme et Elimination.....	38
4.3. Propriétés pharmacodynamiques.....	40
4.3.1. Mécanisme d'action.....	41
4.3.2. Utilisation clinique chez les chevaux.....	42
4.3.3. Précautions	43
4.3.4. Effets indésirables	43

DEUXIEME PARTIE : Etude expérimentale des cinétiques d'élimination plasmatique et urinaire et détermination du temps de détection du diazépam : matériel et méthode..... 45

I. Matériel.....	46
1.1. Molécule test	46
1.2. Produits chimiques.....	46
1.3. Animaux.....	46
1.3.1. Caractéristiques	46
1.3.2. Environnement et mode de vie	47
II. Méthode.....	49
2.1. Plan expérimental	49
2.2. Prélèvements.....	50
2.2.1. Plasma	50
2.2.2. Urine	51
2.3. Analyses des prélèvements	51
2.3.1. Préparations des échantillons.....	51
2.3.2. Analyse LC-MS/MS	52
2.3.3. Validation de la méthode	52
2.4. Analyse des données pharmacocinétiques	53
2.4.1. Détermination du temps de détection	53
2.4.2. Détermination du temps de retrait	54

TROISIEME PARTIE : Résultats	57
I. Validation du plan expérimental.....	57
1.1. Administration du produit	57
1.1.1. Validation du volume injecté.....	57
1.1.2. Effets cliniques et temps d'injection.....	58
1.1.3. Vérification des heures de prélèvements.....	59
II. Validation de la méthode d'analyse	60
III. Concentrations de diazépam et de ses principaux métabolites dans le plasma	62
3.1. Cinétique des concentrations plasmatiques de diazépam	62
3.2. Cinétique des concentrations plasmatiques du témazépam	64
3.3. Cinétique des concentrations plasmatiques de l'oxazépam	65
3.4. Cinétique des concentrations plasmatiques du nordiazépam.....	67
3.5. Conclusion sur les cinétiques des concentrations plasmatiques du diazépam et de ses métabolites	69
IV. Concentrations de diazépam et de ses principaux métabolites dans les urines.....	75
4.1. Cinétique des concentrations urinaires de diazépam	75
4.2. Cinétique des concentrations urinaires du témazépam.....	76
4.3. Cinétique des concentrations urinaires de l'oxazépam	77
4.4. Cinétique des concentrations urinaires du nordiazépam	78
4.5. Conclusion sur les cinétiques des concentrations urinaires du diazépam et de ses métabolites.....	79
V. Calcul du temps de detection et de retrait du diazépam.....	84
5.1. Temps de détection plasmatique	84
5.2. Temps de détection urinaire	86
5.3. Temps de retrait.....	86
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	89
I. Effets cliniques du diazépam	90
II. Suivi des concentrations	92
III. Diazépam et facteurs individuels	94

3.1. L'âge	94
3.2. La race	94
3.3. L'état d'embonpoint.....	95
IV. Temps de detection et de retrait	96
4.1. Les hypothèses de la méthode Toutain	96
4.2. Mise en garde.....	97
CONCLUSION	101
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXES	109

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Campagne FFE 2008 de sensibilisation au dopage (dépliant FFE, 2008)	23
Figure 2 : Résumé des différentes catégories de substances selon la FEI	30
Figure 3 : Formule chimique du diazépam	37
Figure 4 : Métabolisation du diazépam et de ses 3 principes actifs	39
Figure 5 : Mécanisme d'action des benzodiazépines	41
Figure 6 : Morphologies de Kepresh (gauche) et Touareg (droite), été 2017	95

TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques individuelles des six chevaux de l'étude	48
Tableau 2 : Volume de Valium® 10mg/2mL à administrer par cheval	49
Tableau 3 : Validation du poids de la formulation à injecter par cheval	57
Tableau 4 : Effets cliniques et temps d'injection pour 6 chevaux	58
Tableau 5 : Récapitulatif des informations principales concernant les cinétiques des concentrations plasmatiques du diazépam et de ses principaux métabolites	70
Tableau 6 : Temps de demi-vie (h) du diazépam et de ses métabolites par cheval	71
Tableau 7 : Récapitulatif des informations principales concernant les cinétiques des concentrations urinaires du diazépam et de ses principaux métabolites	80
Tableau 8 : Temps de détection du diazépam dans le plasma selon les limites de détection	84
Tableau 9 : Valeurs de lambda z et d'intercept par cheval	85
Tableau 10 : Temps de détection du diazépam dans le plasma observés et calculés selon les limites de détection	85
Tableau 11 : Temps de détection du diazépam dans les urines selon les limites de détection	86
Tableau 12 : Temps de retrait du diazépam dans le plasma, calculés selon l'EPC calculé et EPC=70ng/mL	87
Tableau 13 : Comparaison des temps de détection du diazépam selon la dose administrée	97

GRAPHIQUES

Graphique 1 : Illustration de paramètres rentrant en jeu dans le calcul du DT	53
Graphique 2 : Concentrations plasmatiques de diazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	63
Graphique 3 : Concentrations plasmatiques moyennes de diazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	63
Graphique 4 : Concentrations plasmatiques de témazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	64
Graphique 5 : Concentrations plasmatiques moyennes de témazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	65
Graphique 6 : Concentrations plasmatiques d'oxazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	66
Graphique 7 : Concentrations plasmatiques moyennes d'oxazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	66
Graphique 8 : Concentrations plasmatiques de nordiazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	68
Graphique 9 : Concentrations plasmatiques moyennes de nordiazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	68
Graphique 10 : Concentrations plasmatiques moyennes du diazépam et des ses principaux métabolites chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg	69
Graphique 11 : Concentrations plasmatiques chez Kepresh après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	71
Graphique 12 : Concentrations plasmatiques chez Touareg après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	72
Graphique 13 : Concentrations plasmatiques chez Alep après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	72
Graphique 14 : Concentrations plasmatiques chez Sweet après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	73
Graphique 15 : Concentrations plasmatiques chez Leridano après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	73

Graphique 16 : Concentrations plasmatiques chez Nobel après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg.....	74
Graphique 17 : Concentration urinaire de diazépam chez 6 chevaux suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg	76
Graphique 18 : Concentrations urinaires d'oxazépam chez 6 chevaux suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg	78
Graphique 19 : Concentrations urinaires chez Kepresh suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg.....	81
Graphique 20 : Concentrations urinaires chez Touareg suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg.....	81
Graphique 21 : Concentrations urinaires chez Alep suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg.....	82
Graphique 22 : Concentrations urinaires chez Sweet suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg.....	82
Graphique 23 : Concentrations urinaires chez Leridano suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg.....	83
Graphique 24 : Concentrations urinaires chez Nobel suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg.....	83

ANNEXES

Annexe 1 : Heure de prélèvement réelle du plasma post administration pour les 6 chevaux.	109
Annexe 2 : Heure de prélèvement réelle de l'urine post administration pour les 6 chevaux.	110
Annexe 3 : Extraits de la liste des substances contrôlées de la FEI au 30/11/2018	112
Annexe 4 : Extraits de la liste des substances interdites de la FEI au 30/11/2018 .	114

LISTE DES ABREVIATIONS

AFLD : Agence Française de Lutte contre le Dopage

DE50 : Dose efficace à 50%

EADCMR : Equine Anti-Doping Controlled Medication Rules

ENVL : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

EHSLC : European Horserace Scientific Liaison Committee

EPC : Effective plasma concentration

FEI : Fédération Equestre Internationale

FFE : Fédération Française d'Equitation

FNCH /F : Fédération Nationale des Courses Hippiques/Françaises

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

JO : Jeux Olympiques

IBC : Institute of Biochemistry Center for Preventive Doping Research

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IPC : Irrelevant drug plasma concentration

IUC : Irrelevant drug urine concentration

LCH : Laboratoire pour les Cours Hippiques

LC – MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

SF : Facteur de sécurité

SNC : Système nerveux central

INTRODUCTION

Le monde des courses hippiques génère près de 10 milliards d'euros par an en France dont 7 millions sont alloués au budget du Laboratoire pour les Courses Hippiques (LCH). Ainsi, en 2017 près de 30.000 échantillons prélevés en France ont été analysés au LCH (pour 67 cas positifs) contre 10.000 prélèvements pour l'ensemble des athlètes français, tous sports confondus [1]. Les chevaux sont des athlètes susceptibles d'une part, de recevoir des traitements médicaux préventifs ou curatifs et d'autre part d'être dopés afin d'augmenter leurs performances sportives.

Alors que l'hippisme se targue d'être le sport le plus contrôlé et que les résultats semblent encourageants (0.2% de positifs en courses sur le territoire français contre 3% à l'étranger), les sanctions continuent de tomber. L'entraîneur normand Fabrice Souloy a vu son interdiction d'entraîner prolongée cette année suite au scandale du cobalt lorsque 5 de ses chevaux ont été contrôlés positifs en 2016 sur des grands prix en Suède et en Norvège [2].

La lutte contre le dopage est une course perpétuelle contre les tricheurs et le développement de nouvelles molécules. Aux Jeux Olympiques (JO) de Pékin, parmi les 5 contrôles positifs chez les chevaux, 3 concernaient la capsacine, un analgésique sur la liste des produits interdits, pour lequel un test venait d'être mis au point. Cependant, à mesure que les chimistes développent de nouveaux tests ou que de nouveaux seuils sont établis, les molécules deviennent obsolètes. Ce cercle infernal est coûteux et chronophage.

La réglementation européenne prévoit seulement 3 catégories de substances autorisées (les anti-parasitaires, les anti-infectieux, et les vaccins), toutes les autres substances sont prohibées. La réglementation différencie les substances interdites, comme les anabolisants, qui ne doivent jamais être présents dans l'organisme (contrôle de l'exposition) et les substances contrôlées d'intérêt thérapeutique dont on cherche juste à éviter les effets thérapeutiques (contrôle des médications). Par exemple, la phénylbutazone peut être détectée durant 3 semaines alors que ses effets sont d'environ 24h après une seule administration par voie intraveineuse.

Dans le cadre de l'approche européenne du contrôle des médicaments, les laboratoires cherchent désormais à établir des seuils pour les substances contrôlées faisant partie de l'arsenal thérapeutique classique chez le cheval, mais qui sont interdites en courses et compétitions.

L'objectif de notre travail de thèse est de présenter cette nouvelle approche et de l'appliquer à une molécule thérapeutique utilisée en médecine vétérinaire, notamment en anesthésie, le diazépam.

Les tranquillisants sont des molécules dopantes de choix depuis les années 1950. Les effets myorelaxants et anxiolytiques du diazépam se révèlent intéressants lors de transports, courses ou compétitions et cette molécule peut être détournée de son utilisation thérapeutique pour du dopage. Ainsi, nous cherchons à caractériser la pharmacocinétique du diazépam chez le cheval afin de proposer des seuils de détection dans le cadre du contrôle anti-dopage.

Dans un premier temps, nous reprenons l'historique de la lutte contre le dopage, son évolution, son intérêt et les méthodes actuelles de dépistage. Dans un second temps, nous allons nous intéresser aux caractéristiques du diazépam, ses caractéristiques pharmacocinétiques actuellement connues, ses actions biologiques et son utilisation.

Pour finir, nous nous intéresserons à la partie expérimentale en commençant par une description du protocole et des méthodes d'analyse avant de continuer avec la présentation et la discussion des résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE : La lutte contre le dopage, vers un contrôle des médicaments raisonné chez le cheval.

I. ORIGINES ET DEFINITION DU MOT DOPAGE

1.1. Naissance du dopage chez le cheval

De tout temps, les hommes ont cherché à améliorer les performances de leurs animaux, à des fins d'abord guerrières, puis sportives et de contrebande. En effet, dans la mythologie grecque, on raconte que Diomède, fils d'Ares, donnait de la chair humaine à ses juments afin qu'elles soient imbattables [3]. Par ailleurs, dès la Rome antique, les conducteurs de chars stimulaient leurs chevaux en leur donnant de l'hydromel. Au XIXème siècle, les hippiatres recommandaient de donner des graines d'anis, du miel ou de la sandaraque. A la même époque, des contrebandiers de la frontière franco-belge administraient à leurs chevaux du thé ou du café fort, agrémenté d'alcool, pour les rendre plus rapides et plus endurants lors de poursuites [4].

Enfin l'idée de dopage mal intentionné lors de courses hippiques a également germé tôt dans l'esprit des fraudeurs qui avaient mis au point des moyens physiques pour influencer les résultats tels que placer des cailloux sous la selle, utiliser des dispositifs électriques ou appliquer des vésicants entre les cuisses des chevaux [3].

1.2. Premières définitions

Les premières définitions du dopage apparurent au début du XXème siècle, sous le terme anglo-saxon « doping » et concernaient essentiellement l'administration de stimulants. Elles se limitaient à l'utilisation d'alcaloïdes et de leurs dérivés, ou d'excitants au sens large. Avec ces définitions toutes les molécules aux effets sédatifs utilisées aux fins de calmer un cheval avant une compétition étaient donc oubliées [5].

De même, l'emploi de substances entre les courses, tels que les « anciens » excitants ou les traitements prodigués par un vétérinaire à des doses thérapeutiques, était simplement considéré comme une préparation « normale » du cheval [3].

Par la suite, les définitions ont évolué parallèlement aux méthodes et substances employées mais également avec la prise en compte de l'éthique sportive et du bien-être animal. Lors du premier Colloque Européen consacré au doping, à Uriage en 1963, la notion de doping fut étendue à « l'utilisation de substances et de tous moyens destinés à augmenter artificiellement le rendement en vue ou à l'occasion de la compétition et qui peut porter préjudice à l'éthique sportive et à l'intégrité physique et psychique de l'athlète » [6]. La Fédération Internationale Médicosportive à Tokyo en 1964 a défini lors de la Conférence Internationale sur le doping, le dopage comme « l'administration ou l'utilisation par un athlète de toute substance étrangère au corps ou de toute substance physiologique prise en quantité anormale ou par une voie d'administration anormale avec l'intention d'augmenter de manière artificielle et injuste ses performances en compétition » [3].

La plus grosse révolution depuis fut la mise en place du concept de « substance prohibée » qui rend illicite le fait de faire courir un cheval ayant reçu un produit inscrit sur une liste donnée de substances interdites, quelle que soit la voie d'administration ou la dose reçue. En effet, jusque-là, les accusés justifiaient l'utilisation de certains médicaments en argumentant que les quantités n'étaient pas suffisantes pour avoir un effet sur le cheval et que le produit ne pouvait donc pas être considéré comme pharmacologiquement actif. La Conférence Internationale à Rome en mars 1977 officialisa cette définition lors de l'adoption d'un agrément international par l'ensemble des délégués : « aucun cheval déclaré partant, aux termes de l'article 39 bis, ne doit receler dans ses tissus, fluides corporels ou excréments, aucune substance ou métabolite de cette substance qui soit une substance interdite telle que définie à l'article 2, paragraphe XX, ou aucune substance dont l'origine ne peut être rattachée à la nourriture normale et habituelle ». La liste des substances interdites fut donc dressée avec vocation à évoluer [6].

1.3. Définitions récentes

Le dictionnaire Larousse 2016, définit le dopage comme le « fait d'administrer, d'inciter à l'usage, de faciliter l'utilisation, en vue d'une compétition sportive, de substances ou de procédés de nature à accroître artificiellement les capacités physiques d'une personne ou d'un animal ou à masquer leur emploi en vue d'un contrôle ». Ce terme reprend donc dans la pensée collective une volonté de frauder et une notion négative d'utilisation de produit non justifié. Cependant de nos jours, la seule preuve objective correspond le plus souvent à la détection de molécules pouvant être utilisés à des fins thérapeutiques, on reprend désormais plus facilement le terme de « contrôle des médicaments ».

Le problème reste qu'il n'existe toujours pas de définition universelle, et même au sein d'un même pays, les définitions varient selon l'organisme organisateur, en voici quelques exemples.

- ❖ Code des courses françaises, article 198 : « Aucun cheval ne doit faire l'objet de l'administration d'une substance figurant dans la liste (...) Ce cheval ne doit pas non plus receler dans ses tissus, fluides corporels ou excréments, ou dans toute partie de son corps, un métabolite ou un isomère de l'une des substances ci-dessus, ou l'un des métabolites de cet isomère. Ce cheval ne doit, en outre, pas receler dans ses tissus, fluides corporels ou excréments, ou dans toute partie de son corps, une autre substance prohibée dont la présence ne peut être justifiée par l'administration de soins prescrits par une ordonnance » [7].
- ❖ Sports équestres, règlement des compétitions de la Fédération Française d'Equitation (FFE) article 1.4 : « Il est interdit d'administrer ou d'appliquer aux animaux, au cours des compétitions et manifestations sportives ou en vue d'y participer, des substances ou procédés de nature à modifier artificiellement leurs capacités ou à masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété » [8].
- ❖ Sports équestres, règlement anti-dopage, Fédération Equestre Internationale (FEI), article 1, « Le dopage est défini comme le fait de violer une ou plusieurs des règles anti-dopage comme établi de l'article 2.1 à l'article 2.8 :
- 2.1 la présence d'une substance prohibée et/ou d'un de ses métabolites ou

marqueurs dans un échantillon. (...)

- 2.2 Utilisation ou tentative d'utilisation d'une substance prohibée ou d'une méthode prohibée (...)
- 2.3 S'échapper, refuser ou faillir à se présenter au prélèvement d'échantillons (...)
- 2.4 Falsification ou tentative de falsification de n'importe quel aspect du contrôle
- 2.5 Administration ou tentative d'administration d'une substance prohibée
- 2.6 Possession d'une substance prohibée ou d'une méthode prohibée
- 2.7 Trafic ou tentative de trafic d'une substance prohibée ou d'une méthode prohibée
- 2.8 Complicité (...) » [9]

Notons que dans ce dernier règlement, l'intention de dopage et toute son organisation est également condamnée incluant la possession, la complicité et le trafic. Différents niveaux sont donc envisagés, avec à l'échelle individuelle, le cavalier, son cheval, la compétition concernée et, à plus grande échelle, l'esprit sportif et la filière équine.

II. LE DOPAGE ET SON EVOLUTION RECENTE

2.1. Pourquoi avoir recours au dopage chez le cheval ?

Le milieu équin, et notamment les courses hippiques, brasse des sommes d'argent phénoménales. Les compétitions sont de plus en plus diffusées et soutenues par le grand public. Les sportifs subissent la pression des médias, sponsors, entraîneurs et supporters qui attendent toujours plus de résultats. De plus, les calendriers sont de plus en plus chargés et les évènements sportifs s'enchaînent mettant à l'épreuve la résistance des chevaux. La solution de facilité pour accroître le nombre de victoires et les gains reste alors d'avoir recours à des moyens de dopage.

La condition physique d'un cheval s'évalue par sa capacité à fournir des efforts, plus ou moins intenses et fréquents, et par sa résistance à effectuer ces efforts dans le temps. Cela conditionne son épuisement et donc son pronostic sportif qui dans ce milieu implique aussi son pronostic économique.

De manière générale, le recours au dopage permet d'améliorer les capacités physiques et psychiques des chevaux et donc leurs résultats [10].

2.1.1. Amélioration des performances

L'utilisation de substances dopantes peut par exemple permettre d'augmenter les capacités physiques d'un cheval via l'augmentation de ses capacités cardiaques ou respiratoires, ce qui a pour effet d'apporter une meilleure oxygénation des muscles et ainsi de meilleures performances.

2.1.2. Réduction du stress

Le cheval est un animal avec un instinct de proie. Il est donc très sensible à son environnement et au stress. Une compétition implique en général un transport, un nouvel environnement, un grand nombre de congénères inconnus, une foule bruyante

et une privation de sommeil. Tous ces stimuli sont perçus par l'animal et plus ou moins bien gérés selon ses qualités psychiques intrinsèques, sa sensibilité et son accoutumance. Ils peuvent entraîner de l'appréhension, de l'agitation, de l'anxiété voire de l'agressivité, de la frustration et de la confusion. Cela affecte donc la disponibilité et la concentration du cheval et détériore ses performances. Les cavaliers ayant recours à des substances tranquillisantes recherchent ainsi la pleine attention et l'écoute de leur monture.

2.1.3. Masquage d'une douleur

La douleur, même sous-jacente, est l'une des premières causes de stress et de contre-performance. Elle est le plus souvent liée à la locomotion chez les équidés. Or, toute gêne à ce niveau aura un impact sur l'efficacité, la vivacité et la coordination des mouvements affectant fortement les performances sportives. Pour contrecarrer cela, le recours aux antalgiques ou analgésiques peut atténuer ou faire disparaître ces douleurs et restaurer les capacités sportives initiales de l'animal.

2.2. La vague du dopage aux alcaloïdes

Le véritable développement du dopage date du XIX^{ème} siècle avec l'apparition des alcaloïdes sur les champs de courses. Aux États-Unis en 1890, des entraîneurs de chevaux commencèrent à utiliser des alcaloïdes comme agents dopants. En parallèle, les courses de chevaux pur-sang et les paris hippiques, mettant en jeu d'importantes sommes d'argent, explosèrent et contribuèrent à l'expansion de cette pratique. Elle fut rapidement introduite sur tous les champs de course d'Europe occidentale, tout d'abord en Angleterre en 1896, puis en France et en Russie en 1901 et enfin en Autriche et en Allemagne. Beaucoup de turfistes attribuaient au « doping », les succès des écuries d'Outre-Atlantique. Les alcaloïdes les plus utilisés, purs ou associés, étaient la strychnine, la cocaïne et la caféine. Ces composés étaient considérés comme des stimulants fiables, efficaces et rapides. L'atropine, l'aconitine, la vératrine, l'hyoscine, la digitaline ou l'héroïne étaient également employées. Ils s'injectaient en général par voie sous-cutanée ou intramusculaire, dans l'encolure sous

la crinière. Le problème était qu'il pouvait rester des effets secondaires au point d'injection telles qu'un prurit, une sudation ou de la chaleur. De plus, sur des chevaux boiteux, des injections intra-articulaires de cocaïne ou des frictions cutanées à base de cocaïne et de térébenthine étaient réalisées [5],[11],[12].

La principale difficulté était de trouver une dose suffisante pour assurer un effet maximum sans pour autant que la fraude soit trop visible. Il n'y avait pas de dose fixe car il existait de grandes variations selon le cheval, sa sensibilité individuelle et la voie d'administration utilisée. De plus, tout dépendait de l'effet recherché : un effet brusque et immédiat avec une injection unique quelques minutes avant la course ou un effet plus lent et progressif avec une administration régulière à des doses dégressives quelques jours avant la course [3].

Vers 1930, on estimait qu'aux États-Unis, la moitié des chevaux étaient dopés. De nombreux propriétaires, entraîneurs ou lads, furent arrêtés par le Narcotic Bureau, suite à l'emploi de divers « cocktails » de médicaments contenant des stupéfiants (héroïne, cocaïne) [11].

2.3. Évolution de l'arsenal pharmaceutique du doper

Le dopage connut une certaine trêve, avant de se renforcer pendant et après la Seconde Guerre Mondiale. En effet, les amphétamines, composés synthétiques dérivés de l'adrénaline furent beaucoup utilisées par les soldats en raison de leur propriété stimulante, réduisant la fatigue. Ces composés eurent un vif succès comme agents dopants car ils étaient faciles d'emploi (administration par voie orale) et n'étaient pas encore détectés lors des contrôles.

Vers 1950, les premiers tranquillisants furent élaborés, fournissant aux fraudeurs un arsenal chimique capable de modifier les fonctions nerveuses. Les cavaliers s'en servaient pour réduire la nervosité et accroître la docilité de leurs chevaux [11].

Dans les années qui suivirent, certains entraîneurs ont innové en utilisant des hormones pour leur effet anabolisant telle que la testostérone, des médicaments agissant sur le système nerveux tels que les barbituriques ou les anesthésiques, des anti-inflammatoires comme la phénylbutazone, des antibiotiques tels que les bêtalactamines ou les aminosides pour leur effets neuropsychiques secondaires, ainsi que des vitamines.

Ainsi en 1948, on estimait disposer de 20 fois plus de produits pharmaceutiques qu'avant la Seconde Guerre Mondiale ; le nombre de produits dopants avait donc certainement augmenté dans les mêmes proportions [3].

2.4. Les différentes catégories de médication

En 1982, Thomas Tobin a établi 7 catégories de médication selon leur objectif d'utilisation :

- **La médication pour gagner**

À action aiguë, de courte durée, en utilisant des stimulants tels que les amphétamines, la cocaïne, les narcotiques (morphine, apomorphine...)

À action chronique, en petites quantités mais de façon répétée sur plusieurs semaines, par administration de vitamines ou de stéroïdes anabolisants.

- **La médication pour perdre**

Tranquillisants, sédatifs ou « dépresseurs » administrés à fortes doses. Cette médication est rare, également illégale, et le plus souvent due à une malveillance de la part d'un autre concurrent.

- **La médication pour restaurer les performances habituelles**

Utilisée pour dissimuler un phénomène douloureux, notamment pour les problèmes locomoteurs. Les produits utilisés sont des AINS (phénylbutazone, kétoprofène, flunixin, etc.), des corticoïdes administrés par voie intra-articulaire pour contrôler les douleurs articulaires, des anesthésiques locaux pour bloquer la sensibilité nerveuse ou articulaire (lidocaïne, benzocaïne, etc.), des fluides et des électrolytes.

- **Le dopage accidentel**

Ce type de dopage a deux origines possibles :

- Une alimentation contenant des produits interdits (contaminants accidentels comme l'œillette (contenant de la morphine) dans les céréales).
- Un résidu de traitement lorsqu'un délai suffisant entre l'administration d'un médicament et la compétition n'a pas été respecté.

- **La médication pour masquer d'autres substances**

Certains composés tels que la dipyronne, le polyéthylène glycol ou la thiamine peuvent interférer avec la détection d'autres produits non autorisés.

- **Les modificateurs de la diurèse pour « diluer » d'autres substances**

Les diurétiques (furosémide, acide éthacrynique, hydrochlorthiaside...) diminuent la concentration urinaire en substances dopantes, rendant leur détection plus difficile. De même, les inhibiteurs de la sécrétion tubulaire (probénécide) modifient la cinétique d'excrétion urinaire de certains composés.

- **Les dopages divers**

D'autres pratiques telles que des transfusions sanguines, l'administration d'érythropoïétine, de bicarbonates, d'antibiotiques ou la névrotomie palmaire et digitée qui supprime la perception de douleur provenant du pied peuvent également être rencontrées [13].

III. LA LUTTE ANTI-DOPAGE DANS LES SPORTS EQUESTRES

3.1. Pourquoi lutter contre le dopage ?

La lutte contre le dopage repose sur des exigences morales établies par la société. En 1973, les Services des Haras se sont inquiétés des conséquences du dopage sur l'image et l'avenir des sports équestres en France.

En effet, la société a très rapidement fait la différence entre les activités sociales ou professionnelles et les activités sportives. Un professionnel qui prend un traitement pour pouvoir travailler, bénéficie d'une image positive alors que le sportif est perçu comme un tricheur ; le compétiteur doit être irréprochable.

Outre l'image négative du dopage, d'autres arguments de poids rentrent en compte et justifient les moyens de lutte mis en place. L'utilisation de substances dopantes influençant les résultats en compétition, est perçue comme un moyen de tricherie et ainsi un moyen de tromper le public et les parieurs. Les enjeux des courses, notamment économiques, ont donc rapidement imposé de protéger les intérêts du parieur. La survie de l'industrie des courses hippiques dépend de l'intégrité des courses et de la confiance du public. [14]

Dans le même esprit, les résultats obtenus en courses ont une incidence directe sur la sélection des chevaux. C'est pourquoi la volonté de préserver une compétition saine s'est imposée. Faire gagner des chevaux médiocres dopés c'est courir le risque qu'ils soient sélectionnés à tort comme reproducteurs, et à l'inverse perdre le potentiel d'un cheval non dopé de qualité quoique perdant [15].

Enfin les deux derniers axes, non des moindres, mais ayant moins d'impact économique, sont le bien-être animal et l'éthique. La protection de la santé des sportifs, cavaliers et chevaux est devenue une des finalités du contrôle anti-dopage. Lors de la vague de dopages aux alcaloïdes, les chutes étaient de plus en plus fréquentes et des cas de mort subite étaient rapportés. En effet, ces substances ont

de lourdes répercussions sur l'organisme des chevaux, notamment sur les fonctions digestives et cardiaques qui, perturbées, finissaient par s'épuiser peu à peu. Des ruptures de gros vaisseaux, des épuisements intenses ou de véritables intoxications aux alcaloïdes ont pu être mises en causes dans les cas de mort subite [3]. Désormais des campagnes anti-dopage et de sensibilisation, telle celle de la FFE en 2008 (figure 1), sont fréquemment menées dans le but d'informer les sportifs et de les mettre en garde contre les risques liés au dopage.



Figure 1 : Campagne FFE 2008 de sensibilisation au dopage (dépliant FFE, 2008)

Les programmes anti-dopage ont pour but d'assurer la transparence afin de rassurer le grand public, mais aussi de garantir le respect du bien-être animal. Tout traitement dispensé à un cheval doit l'être de manière transparente et ne doit, en aucun cas, permettre le maintien à l'entraînement de chevaux présentant des pathologies incompatibles avec l'effort physique demandé [15].

3.2. Les débuts de la lutte anti-dopage

Suite à ces nombreux abus, des mesures répressives furent mises en place dès 1903. En France, en 1904, une circulaire ministérielle interdit l'administration d'excitants aux chevaux dans les courses militaires. Cependant, la chimie analytique ne s'était pas encore penchée sur les méthodes de détection, la lutte était alors vaine et les tricheurs continuaient de ruser. Ainsi en 1910, à la demande du Jockey-Club, le

chimiste russe Bukowski mit au point une méthode de détection des alcaloïdes dans la salive. Le Professeur Fraenkel à Vienne, puis le Professeur Kauffman à l'École nationale vétérinaire d'Alfort en 1912, poursuivirent ses recherches et, dès 1912, les prélèvements devinrent systématiques en France [12],[14],[15].

En 1932, malgré la moindre importance des contrôles aux Etats-Unis, le premier laboratoire spécialisé dans les contrôles anti-dopage fut inauguré en Floride, suivi par le Canada, deux ans plus tard [18]. L'évolution des pratiques de dopage ainsi que l'apparition de nouvelles molécules chimiques actives à de très faibles concentrations, ont obligé les analystes à se doter de moyens de contrôle plus performants et plus sensibles. Ces contrôles sont réellement devenus efficaces dans les années 1960 grâce à l'évolution des méthodes analytiques et de l'instrumentation [19].

C'est suite à l'inquiétude du Service des Haras qu'en 1973, le Professeur Lorgue et ses collaborateurs de la Chaire de Pharmacie et Toxicologie de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon, s'attelèrent à la mise au point de techniques de détection des agents dopants chez le cheval de sport. Ainsi, en 1987, une unité de contrôle anti-dopage fut créée conjointement par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et l'ENVL, le Laboratoire de Recherches sur le cheval de Sport [11].

3.3. Les différentes structures et réglementations de la lutte anti-dopage

Concernant les moyens et les orientations de la lutte anti-dopage, le monde du cheval se divise en en deux philosophies selon qu'elle concernant les sports équestres ou les courses hippiques. L'approche réglementaire dans le monde des sports équestres est inspirée de celle utilisée dans le monde du sport humain. En revanche, le monde des courses est régi par des codes (« le code des courses ») qui varient selon les courses de trot et de galop. Cependant, les contrôles mis en jeu restent similaires bien que les échelles soient complètement différentes et que certaines molécules ou seuils varient.

3.3.1. Dans les courses hippiques

❖ Au niveau national (FNCH)

En France, la lutte contre le dopage dans les courses hippiques repose sur des principes stricts et rigoureux qui proscrivent la possibilité de concourir sous médication : « tout est interdit sauf ce qui ne l'est pas ».

La Fédération Nationale des Courses Hippiques, FNCH, chapeaute les sociétés mères des courses de trot, (Société d'Encouragement à l'élevage du Cheval Français, aussi appelée LeTROT) et de galop (France Galop). Ces deux sociétés obéissent à la réglementation inscrite dans le code des courses et éditent leurs propres textes. De plus, les Ministères de l'Agriculture et de l'Intérieur exercent un tutorat partagé sur la FNCH et veillent à l'homogénéité des dispositions votées par les comités des deux disciplines et leurs accords sont indispensables pour l'entrée en vigueur de ces dispositions.

Le contrôle des médications est donc une organisation importante qui fait désormais partie intégrante du monde des courses. En effet, la quasi-totalité des courses est contrôlée. Pour les réunions Premium, les gagnants sont prélevés systématiquement, ainsi qu'un second cheval pris au hasard. Les cinq premiers des courses supports de paris Tiercé-Quarté-Quinté+ et plusieurs chevaux dans les courses de groupe le sont également. Pour les autres réunions, ce sont les commissaires des courses qui jugent la régularité des épreuves et désignent les chevaux à prélever. Ils demandent aussi des contrôles sur les chevaux ayant des performances ou des contreperformances inattendues. En 2018, 99.8% des réunions hippiques organisées en France ont été contrôlées soit 18 203 courses et 25 525 prélèvements. 21 051 prélèvements en dehors des courses ont été également réalisés sur des chevaux à l'entraînement, en épreuve de qualification ou en sortie provisoire [7], [20],[1].

❖ Au niveau international

Différentes instances internationales composées d'experts et de responsables des courses se réunissent régulièrement pour harmoniser les règles, partager les connaissances et les découvertes respectives. De nombreux pays se sont inspirés du cadre juridique français même si certains ont, aujourd'hui encore, une philosophie nettement plus permissive avec des systèmes majoritairement quantitatifs, dans lesquels on admet la possibilité de concourir sous médication dans certains cas (USA, Australie par exemple). L'exemple le plus marquant est la large utilisation du furosémide sur les galopeurs aux Etats-Unis avant et après les courses, alors que c'est une substance contrôlée en France et en Europe [21].

L'organisation qui constitue une référence est l'EHSCL (European Horserace Scientific Liaison Committee), formée en 1992 par les commissaires de France, d'Angleterre et d'Irlande suite au besoin d'harmoniser les techniques et d'encourager la coopération des chercheurs. Les autorités hippiques d'Allemagne, d'Italie et de Scandinavie ont ensuite rejoint les rangs du EHSCL, qui est devenu en 2008 une organisation indépendante [22].

3.3.2. Dans les sports équestres

La principale différence tient dans le manque de moyens. Les enjeux sportifs sont tout aussi importants, mais les enjeux financiers le sont beaucoup moins, mis à part lors de grandes manifestations, où l'image du sport est de plus en plus exposée. Chaque instance nationale et internationale a mis en place son propre programme de contrôle, en essayant de le rendre le plus efficace et dissuasif possible.

❖ Au niveau national

La FFE, est en charge des compétitions nationales. Les décisions en matière de dopage sont imposées par les lois définies conjointement par le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, par le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire et par le Ministère des

Sports et ce avec l'avis de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD). Les classes pharmacologiques de produits interdits sont citées dans l'arrêté du 2 mai 2011 relatif aux substances et aux procédés mentionnés à l'article L. 241-2 du code du sport. Elles sont complétées par la liste de substances et méthodes interdites par l'Agence mondiale anti-dopage [23],[24].

❖ Au niveau international

La FEI est l'unique autorité contrôlant les événements équestres internationaux (dressage et para-dressage, saut d'obstacles, concours complet, attelage et para-attelage, endurance, voltige et reining). La réglementation actuelle, Equine Anti-Doping Controlled Medication Rules, EADCMR, a été mise en application en 2010. En effet, suite aux nombreux cas de dopage aux Jeux Olympiques de 2008, une commission a été fondée en 2008. Elle répondait également à la demande de nombreux cavaliers quant à des règles plus claires concernant le dopage et les substances médicamenteuses [25].

Les EADCMR sont divisées en deux sections : les règles anti-dopage équin (Equine Anti-Doping Rules) qui concernent les substances interdites et les règles sur le contrôle des médicaments équines (Equine controlled medication rules) qui concernent les substances contrôlées [9].

3.4. La nouvelle approche européenne : le contrôle des médicaments

Il s'agit de trouver l'équilibre entre le bien-être des chevaux et l'intégrité du sport. Désormais, les structures officielles ne parlent plus de contrôle anti-dopage mais de contrôle des médicaments. Cette évolution sémantique souligne l'importance de distinguer le contrôle des substances totalement interdites de celui concernant des médicaments légitimement utilisés pour traiter un cheval malade. Pour comprendre ces subtilités, il nous faut détailler les définitions des nouvelles catégories de substances, simplifiées dans la figure 2 [26].

3.4.1. Les catégories de substances

❖ Les substances prohibées

Le terme de substances prohibées regroupe les substances interdites et les substances contrôlées. Il est à noter que toutes les autres substances ayant une structure chimique ou un effet biologique similaire à ces molécules sont également interdites. Ce complément permet de prendre en compte d'éventuelles nouvelles molécules, ainsi que des molécules qui auraient pu être oubliées dans la liste [9].

✓ *Les substances interdites*

Une substance interdite est une substance que l'on ne devrait jamais trouver dans l'organisme d'un cheval. Les molécules interdites sont considérées comme ayant une action propre à modifier les performances du cheval au cours d'un effort. Il est interdit d'utiliser ces substances, à l'entraînement, pour les courses ou avant et pendant une compétition. Cela concerne des classes pharmacologiques entières notamment les substances anabolisantes, les hormones peptidiques et facteurs de croissance et assimilés, les hormones et modulateurs métaboliques. La liste des substances interdites est similaire quelle que soit l'organisation bien que la forme varie. Par exemple, la FEI a rédigé depuis 2010, une liste non exhaustive reprenant les principales molécules concernées. Cette liste est consultable sur le site de la FEI et remise à jour annuellement (dernière mise à jour le 30 novembre 2018).

✓ *Les substances contrôlées*

Les substances contrôlées font partie de l'arsenal thérapeutique classique chez le cheval, mais sont tout de même interdites lors de courses ou de compétitions puisqu'elles ont vocation à soigner un animal malade, et qu'un animal sous traitement n'a pas sa place dans une compétition ou un entraînement. Le cheval peut de nouveau concourir lorsque les effets résiduels de ses traitements ont disparu. L'évolution aussi bien des molécules disponibles que des méthodes de chimie analytiques impose de réviser chaque année cette liste. De la même façon, il existe des listes de substances contrôlées ou « controlled medication substances » propres à chaque organisation. La

liste 2018 des substances contrôlées par la FEI, disponible sur le site de la FEI, comprend 244 molécules au 30 novembre 2018.

❖ Autres substances.

✓ *Les substances spécifiées ou à seuil.*

Récemment l'introduction du concept de « substances spécifiées » définit une substance qui permet, sous des conditions définies, de justifier la réduction d'une sanction lorsque le contrôle de l'athlète quant à cette substance est positif. La sous-classification à titre de substance « spécifiée » ou « non spécifiée » vise à reconnaître qu'il est possible qu'une substance se retrouve dans le corps d'un sportif par inadvertance, ce qui accorde au tribunal une certaine souplesse pour déterminer la sanction. Elles ne doivent pas être considérées comme moins importantes ou moins dangereuses que d'autres substances prohibées (c'est-à-dire interdites ou contrôlées) [6],[15].

Les Commissaires des Sociétés Mères des courses se sont accordés sur des Seuils Internationaux définis par les analystes et les vétérinaires officiels pour ces substances prohibées mais présentes dans l'environnement de l'animal. Pour ces substances spécifiées, les substances présentes à des concentrations inférieures aux seuils ne donnent pas lieu à poursuite. Cette liste est consultable sur le site de la FEI et de la FEE, et varie légèrement de celle de l'ARCI. En revanche, le célèbre entraîneur Fabrice Souloy a été condamné en 2017 en raison de prélèvements positifs au Cobalt, qui aurait des effets comparables à ceux de l'érythropoïétine, trouvé dans des proportions bien supérieures au seuil autorisé (jusqu'à 15 fois supérieures) chez cinq chevaux dont le vainqueur et le troisième du Grand prix d'Oslo 2016 [2].

✓ Les substances exclues de la liste des substances prohibées :

Certains des médicaments ne sont jamais recherchés car ils sont considérés comme ne possédant pas de propriétés qui seraient de nature à remettre en cause l'équité sportive. Notamment :

« - Substances anti-parasitaires strictes à l'exception du *levamisole* en raison de ses propriétés immunostimulantes.

- Substances anti-infectieuses strictes à l'exception des mélanges contenant d'autres substances (anti- inflammatoires ou anesthésiques locaux).
- Vaccins » [7].

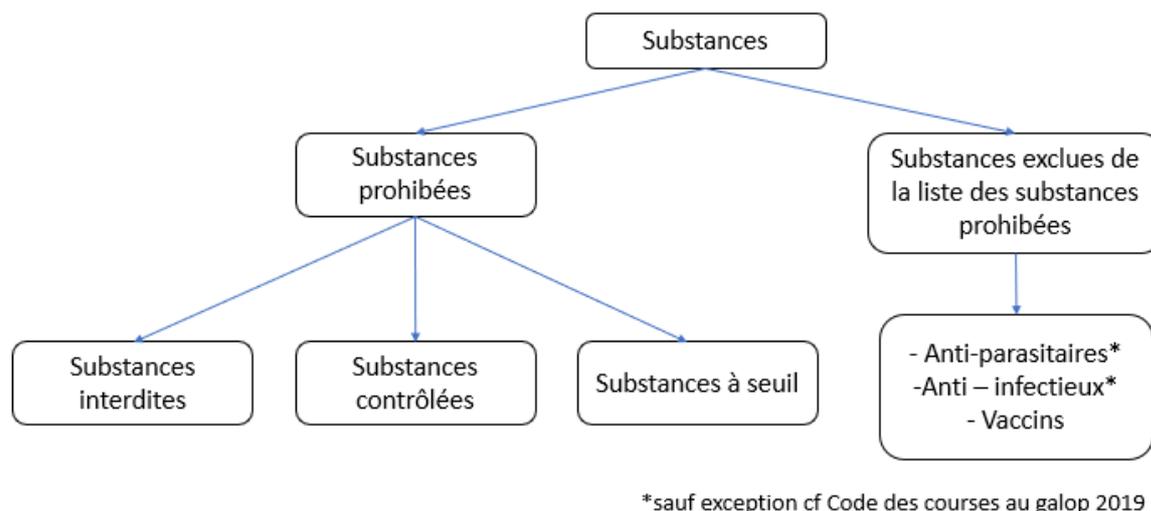


Figure 2 : Résumé des différentes catégories de substances selon la FEI

3.4.2. Contrôle de l'exposition vs contrôle des médicaments

❖ Le principe

Ces deux approches (contrôle de l'exposition et contrôle des médicaments) ont permis d'adopter une distinction simple. Dans le contrôle de l'exposition, il s'agit uniquement de détecter l'absence ou la présence des substances interdites. Les objectifs sont donc relativement simples puisqu'il s'agit de détecter avec les moyens les plus performants possibles et sur les prélèvements disponibles (sang, urine, fèces, poils...) toutes traces de substances illicites. Ainsi le seul facteur limitant sera dans ce cas, la performance des techniques analytiques. Les laboratoires sont incités à améliorer leur niveau de détection pour tracer ces molécules en quantités infimes. Cette approche est donc binaire, présence ou absence, et n'appelle pas à un jugement biologique et scientifique quant à la signification des concentrations mesurées. Quel

que soit le niveau des concentrations retrouvées, lors de la confirmation par la contre-expertise, le dopage est avéré.

En revanche, dans le contrôle des médicaments, ce n'est pas la seule présence d'une substance médicamenteuse qui est à rechercher mais sa présence à une concentration encore active lors des épreuves ou à l'entraînement. Ce sont les effets pharmacodynamiques d'un traitement qui sont condamnés, pour toutes les raisons d'équité sportive et de bien-être animal citées plus haut. Or il est exclu de pouvoir rechercher cliniquement ces effets résiduels. Ces effets sont donc évalués indirectement à partir de mesures des concentrations plasmatiques ou urinaires des molécules d'intérêt thérapeutique. Cette nouvelle approche se base sur une démonstration par Toutain et Lassourd (2002) : pour les médicaments ayant des effets systémiques, il existe une relation quantitative et causale entre les concentrations plasmatiques et les effets. Autrement dit, les concentrations plasmatiques gouvernent les effets. Dans cette approche, la grande différence avec le contrôle de l'exposition repose sur la nécessité d'un jugement biologique sur la signification des concentrations mesurées. En effet, avec les équipements de plus en plus performants, il est possible de détecter des concentrations résiduelles infimes qui n'ont plus d'effets cliniques résiduels [27].

❖ Les limites de cette approche

Depuis la mise en place de l'approche « contrôle des médicaments », certains cavaliers contournent la règle en utilisant des « cocktails » de plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens différents, à des doses faibles, de façon à ce que leurs concentrations individuelles soient jugées comme insuffisantes pour produire un effet, mais qu'ils soient tout de même efficaces grâce à leur action cumulative. Cela montre les effets pervers d'établir une concentration maximale autorisée [28].

De même, cette approche concerne les substances administrées par voie systémique obéissant à la séquence dose/exposition/effet. Or pour les administrations locales (par infiltration, par inhalation...) la relation univoque entre l'exposition plasmatique ou urinaire et les effets n'est plus garantie. Dans cette

situation, l'exposition plasmatique n'est plus qu'un marqueur indirect de l'administration mais elle n'est plus la variable explicative des effets. Par exemple, une injection intra-articulaire d'une faible dose d'anti-inflammatoire stéroïdien aura un effet local net, alors que la concentration circulante sera plus faible qu'avec une injection par voie générale d'une dose plus importante pour l'obtention d'un effet comparable [26], [28].

❖ Obtention des concentrations maximales autorisées

Il existe deux façons de calculer des concentrations maximales autorisées à partir des données scientifiques et d'une analyse de risque.

La méthode développée par Toutain et Lassourd en 2002 consiste en une approche pharmacodynamique générale et non expérimentale pour la détermination de l'IPC (*irrelevant drug plasma concentration*) et de l'IUC (*irrelevant drug urine concentration*). L'IPC et l'IUC correspondent aux concentrations plasmatiques et urinaires pour lesquelles il est possible d'affirmer qu'il n'y a pas d'effet résiduel et cela, sur aucun cheval. Ces concentrations sont calculées via des données de la littérature, en général issues de méta-analyses. La clairance plasmatique publiée permet de transformer une dose donnée, en général celle de l'autorisation de mise sur le marché, en une EPC (*effective plasma concentration*), c'est-à-dire la concentration plasmatique efficace. Celle-ci est ensuite traduite en IPC en utilisant un facteur de sécurité. L'IPC peut être obtenue à partir de l'IUC si le rapport entre les concentrations urinaires et plasmatiques est relativement constant et connu. Cette méthode permet d'estimer un temps de détection pour n'importe quelle substance ayant une clairance définie, avec une approche PK/PD non expérimentale [27], [29].

Or le temps de détection d'une substance dans des échantillons biologiques dépend de plusieurs facteurs, notamment du type de traitement (formulation, voie d'administration, dose, fréquence d'administration), du type d'échantillon (urine, sang, crins), de la sensibilité de la méthode de détection employée ou de la variabilité pharmacocinétique individuelle [14]. Ainsi cette méthode impose un facteur de sécurité (SF) important dans le calcul du temps de détection. La valeur de 500 pour le SF a été

choisie dans la publication originale de Toutain et Lassourd. En pratique, le SF doit prendre en compte deux éléments : il doit transformer une concentration plasmatique active en une concentration plasmatique inactive (facteur fixé à 50) et il doit également tenir compte des variabilités inter- et intra-individuelles existant sur les paramètres pharmacocinétiques (les clairances) et pharmacodynamiques (c'est-à-dire de la susceptibilité des chevaux à répondre à des concentrations plasmatiques plus ou moins élevées). Pour fixer le facteur à 50, il a été considéré que les posologies recommandées actuellement en thérapeutique étaient des doses efficaces à 50% (DE50), c'est-à-dire permettant d'atteindre 50 % de l'effet maximum possible pour un médicament. En postulant que la dose usuelle correspond à une dose efficace à 50% (DE50) et que la relation dose/effet était de type Emax, en divisant la DE50 par 50 on obtient une DE2, c'est-à-dire une dose qui ne permet d'obtenir que 2% de l'effet maximal possible de la substance ce qui correspond pratiquement à une dose sans effet biologique. Pour tenir compte des variabilités inter-individuelles, il est classique de prendre pour chaque facteur de variation, une valeur de 3. En tenant compte simultanément des deux principales sources de variabilité (pharmacocinétique et pharmacodynamique), cela donne $3 \times 3 = 9$ arrondi à 10.

Ce facteur de sécurité, peut être modulé pour tenir compte des niveaux d'exigence des autorités, de la demande sociétale etc. Cela signifie que ce n'est pas uniquement une valeur à détermination scientifique. C'est ainsi que la fixation de SF à l'infini revient à fixer l'IPC à des valeurs infiniment petites et pratiquement, à contrôler l'exposition et donc à autoriser des concentrations relativement élevées ce qui va à l'encontre du principe du contrôle des médicaments [26], [27].

Ainsi, une autre façon d'appréhender un temps de détection est une approche expérimentale en injectant aux doses recommandées la substance d'intérêt à des chevaux sur lesquels un suivi des concentrations plasmatique et urinaire est effectué. Les cinétiques obtenues permettent d'extrapoler un temps de détection avec un facteur de sécurité bien moindre et donc un temps plus précis.

3.5. Déroulement des analyses anti-dopage

3.5.1. Prélèvements

Ils se déroulent dans un box réservé au contrôle anti-dopage c'est-à-dire un box sans mangeoire, propre et fraîchement paillé situé dans un endroit assez calme au sein de l'espace où séjournent les chevaux pendant la compétition. À sa sortie de piste, le cavalier est directement informé qu'il doit soumettre son cheval à un prélèvement. Il dispose alors d'un délai de trente minutes pour effectuer le pansage de son cheval hors d'un box (pour éviter qu'il urine) sous la surveillance d'un membre de l'équipe de prélèvement. À l'arrivée du cheval, accompagné par une personne responsable, au lieu de prélèvement, le signalement du cheval est vérifié par le vétérinaire. Le signalement par transpondeur électronique est désormais obligatoire.

Dans un souci d'harmonisation des procédures un kit complet de prélèvement est mis à disposition par le laboratoire d'analyse qui réalisera la première expertise de l'échantillon. Le matériel de prélèvement est chimiquement neutre, à usage unique et conditionné dans des sachets plastiques thermo soudés. De plus, le laboratoire fournit un collecteur d'urine qui n'est pas contenu dans le kit mais est scellé dans un sachet plastique [21].

❖ Le prélèvement d'urine

De nos jours, l'urine est toujours le fluide biologique le plus demandé. Effectivement, le recueil est facile et sans risque et les volumes récupérés sont très satisfaisants. Le recueil doit s'effectuer lors d'une miction naturelle et volontaire sans sondage ni ponction, ni utilisation de diurétiques. En outre, l'urine est un milieu où le principe actif et/ou ses métabolites sont souvent en fortes concentrations [19].

Une quantité optimale d'au moins 120 mL d'urine est recueillie par le vétérinaire à l'aide du collecteur, puis immédiatement transvasée dans deux récipients contenus dans le kit de prélèvement.

❖ Le prélèvement de sang

Le prélèvement sanguin a été longtemps controversé dans la mesure où il était considéré comme invasif, mais il est désormais de plus en plus utilisé. Son analyse permet, d'une part, de retrouver plus facilement les substances de fort poids moléculaire comme les peptides qui sont très peu éliminés dans les urines et, d'autre part, d'apporter des compléments d'information aux résultats urinaires.

Les mêmes conditions préalables sont requises, c'est-à-dire présence du responsable du cheval et tranquillité de l'animal. Le prélèvement sanguin est réalisable à tout moment par ponction de la veine jugulaire et doit être effectué de façon aseptique par un vétérinaire agréé [19].

3.5.2. Analyses

Tous les prélèvements sont analysés, l'objectif étant de déterminer le profil physicochimique de toutes les molécules présentes dans les échantillons. Cependant, certaines molécules sont spécifiquement recherchées.

L'échantillon reçu subit plusieurs étapes lors des analyses en laboratoires. La première étape correspond à l'extraction et a pour but l'élimination des composants parasites du milieu biologique. Il existe deux techniques, l'extraction liquide-liquide, la plus ancienne, et l'extraction liquide-solide, la plus récente et développée actuellement. La deuxième étape de screening, ou criblage, permet la mise en évidence rapide de la présence d'une substance prohibée. Cette étape est cruciale car elle permet de sélectionner les prélèvements avec un degré de certitude connu et elle doit faire preuve d'une grande sensibilité, c'est-à-dire qu'elle se doit de ne pas générer de faux négatifs, mais peut générer des faux positifs. Les méthodes employées sont

donc sélectionnées en fonction des critères de rapidité, de sécurité, de fiabilité, voire aussi de coût. Les méthodes actuelles utilisent la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou des tests immunologiques de groupe avec utilisation d'anticorps spécifiques de substances.

Enfin, lors d'un résultat positif, une étape de confirmation permet d'apporter avec certitude l'identité, la présence, et voire de la quantité de la ou des substances révélées lors de la phase précédente. Les méthodes de choix sont ici des méthodes de spectrométrie de masse car elles fournissent « une empreinte digitale » de la molécule et leur usage confère une grande fiabilité aux résultats [19].

IV. LE DIAZEPAM : CARACTERISTIQUES, PROPRIETES ET DOPAGE

4.1. Caractéristiques chimiques du diazépam

De formule moléculaire $C_{16}H_{13}ClN_2O$, le diazépam appartient à la famille des benzodiazépines et possède un noyau benzène et un noyau diazépine (figure 3). Les benzodiazépines sont des bases très faibles (le pKa du diazépam est 3.4) et des molécules très lipophiles. Cela pose donc des difficultés de mise en solution pour les voies injectables et l'utilisation d'alcools tel que le propylène glycol comme excipient est nécessaire.

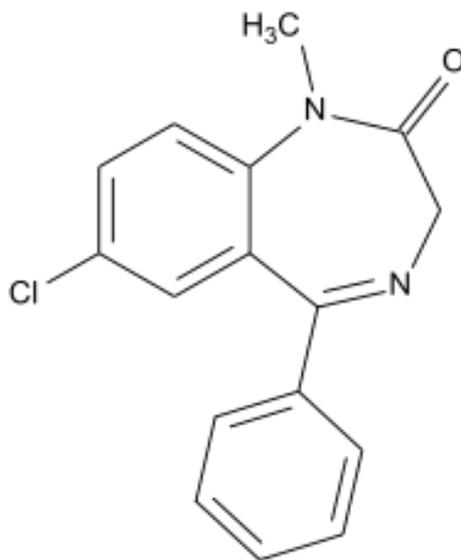


Figure 3 : Formule chimique du diazépam

L'administration de diazépam est possible chez les chiens et chats par administration intranasale, intrarectale ou intraveineuse (Diazépam TVM®). Chez l'homme elle est également possible par voie orale (Valium®). Chez le cheval, en pratique, l'administration hors AMM de Valium® se fait par voie intraveineuse [30].

4.2. Propriétés pharmacocinétiques

La pharmacocinétique est l'étude de l'exposition interne de l'organisme au médicament et de ses relations avec les effets du médicament. L'action de l'organisme sur le médicament administré regroupe plusieurs phases : l'absorption, la distribution, la métabolisation, et l'excrétion des médicaments.

4.2.1. Absorption

Le diazépam est hautement lipophile et est bien absorbé après administration orale, mais il subit un métabolisme hépatique important et rapide (effet de premier passage). Il est donc plus communément administré par voie IV dans la pratique vétérinaire [31].

4.2.2. Distribution

Le diazépam est décrit comme fortement fixé aux protéines plasmatiques et du fait de sa lipophilie s'accumule dans le tissu adipeux. Il a été observé chez l'homme et le chien que l'excellente liposolubilité des benzodiazépines leur permet une bonne distribution au sein de tous les tissus de l'organisme, en particulier dans la substance grise puis dans une seconde phase, dans la substance blanche du système nerveux central. Cette distribution est également excellente dans le foie et dans le tissu adipeux. Ce dernier sert en quelque sorte de tissu de stockage puisque l'animal ayant ingéré du diazépam présente un relargage lent expliquant une demi-vie terminale longue [30].

4.2.3. Métabolisme et Elimination

Les réactions de biotransformations ont pour finalité de rendre un produit plus hydrosoluble et de permettre son élimination dans les urines, la bile et les fèces. Le métabolisme oxydatif du diazépam dans le foie conduit à la formation d'oxazépam par l'intermédiaire soit de N-desméthyldiazépam (nordazépam ou nordiazépam, principal métabolite actif), soit de 3-hydroxydiazépam (témazépam) comme l'illustre la figure 4.

Le diazépam et ses trois métabolites sont pharmacologiquement actifs, avec une demi-vie d'élimination plasmatique pour le nordiazépam de 30 à 150 heures.

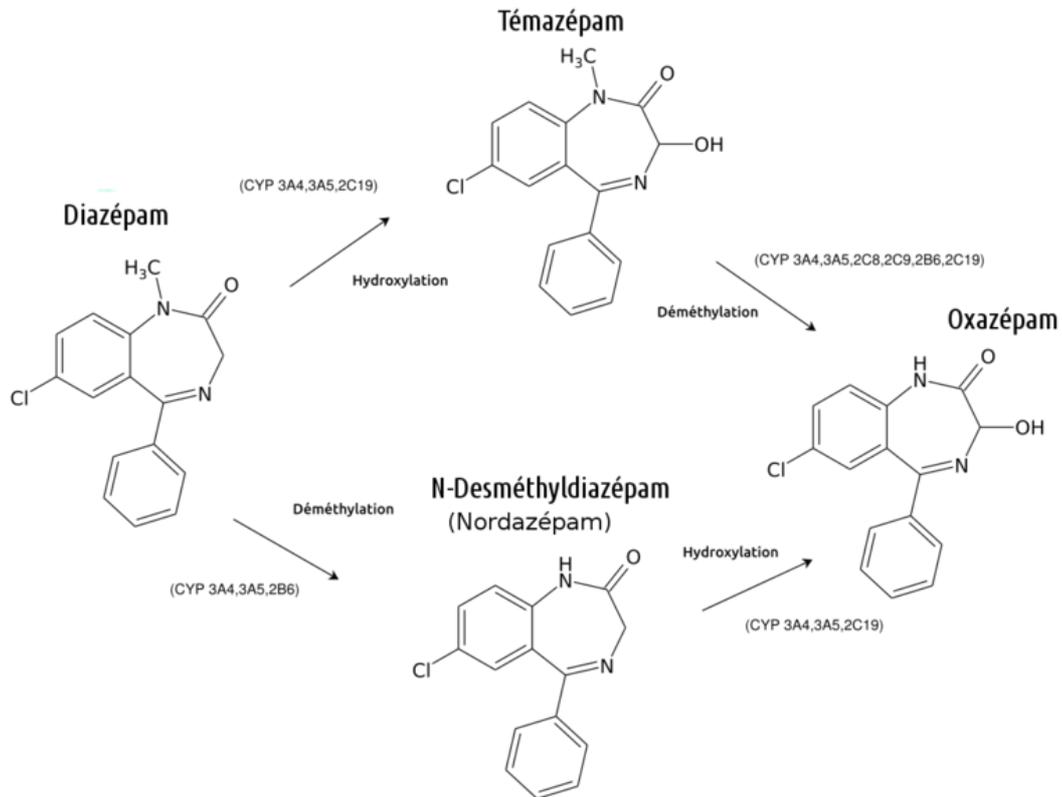


Figure 4 : Métabolisation du diazépam et de ses 3 principes actifs

Ce métabolisme de phase I dépend de nombreuses isoenzymes du cytochrome P450, permettant la déméthylation et l'hydroxylation. Toute molécule ayant une action sur l'activité ou les niveaux d'une ou de plusieurs de ces enzymes est donc susceptible d'agir sur la métabolisation du diazépam, et donc sur ses concentrations plasmatiques et sur celles de ses métabolites, exposant le sujet à un potentiel surdosage, ou à une moindre efficacité du traitement.

Le métabolisme de l'oxazépam semble être plus lent que celui du nordiazépam. La demi-vie de l'oxazépam chez le cheval serait entre 18-28 heures contre 12 heures pour le nordiazépam. La demi-vie du témazépam est plus courte que celle du diazépam. La limite inférieure de détection du diazépam était alors d'environ 2 ng/ml dans le plasma. Cette limite a été abaissée et elle est actuellement de 0,01 ng/mL dans le plasma.

Le diazépam et ses métabolites subissent une étape de glucuronidation qui conduit à l'élimination urinaire de glucuroconjugés. En 2000, le diazépam et ses métabolites pouvaient être détectés chez les chevaux 24 heures dans le plasma et 58 heures dans l'urine, sous forme de glucuronides, après l'administration d'un bolus intraveineux unique de 40 mg. Le nordazépam et l'oxazépam (mais pas le diazépam) sont détectables sous forme libre (non conjugués) dans l'urine du cheval [30], [31].

4.3. Propriétés pharmacodynamiques

La pharmacodynamie est l'étude de l'action du médicament sur l'organisme.

Les benzodiazépines ont été introduites en médecine vétérinaire clinique en tant que tranquillisants mineurs. Il existe plus de 10 benzodiazépines, qui induisent toutes des réponses similaires, même si l'ampleur et la durée de l'effet varient selon les espèces. Les benzodiazépines ont de nombreux effets pharmacologiques, notamment hypnotique, sédatif, anxiolytique, anticonvulsivant et relaxant musculaire squelettique. Elles sont utilisées comme modificateurs comportementaux, anticonvulsivants, adjuvants en neuroleptanalgie, en prémédication et en induction d'anesthésie. Le diazépam en particulier a un rôle établi en anesthésie vétérinaire et est couramment utilisé dans la pratique clinique en tant que tranquillisant, relaxant musculaire, anticonvulsivant et en complément à l'anesthésie intraveineuse chez les poulains et les chevaux adultes [30], [31].

La concentration plasmatique efficace du diazépam associée à l'arrêt des convulsions chez le rat a été estimée approximativement à 70 ng/mL. [33]

Il est important de noter que le nordiazépam est le métabolite le plus actif du diazépam avec une affinité intrinsèque de 0,47 en considérant celle du diazépam à 1. Ainsi on peut considérer que la concentration plasmatique efficace du nordiazépam est d'approximativement 140 ng/mL. [34]

4.3.1. Mécanisme d'action

Comme la plupart des benzodiazépines, le diazépam se fixe aux récepteurs aux benzodiazépines, complexe protéique en relation avec les récepteurs du GABA (acide gamma-aminobutyrique). Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur, ainsi il réduit l'excitabilité du neurone post-synaptique et joue le rôle de "calmant" du système nerveux central. Le site de fixation du diazépam (et autres benzodiazépines) n'est pas présent sur chaque récepteur GABA bien qu'il soit retrouvé en abondance à plusieurs niveaux du système limbique du cerveau ainsi que dans les tissus périphériques comme le rein, le foie, le cœur et les poumons. La fixation du diazépam au récepteur GABA n'entraîne pas directement l'ouverture du canal chlore mais module les effets du GABA comme l'illustre la figure 5 ci-dessous. Ainsi, pour une même quantité de GABA se fixant sur ses récepteurs, on observera un effet inhibiteur plus important [30],[31].

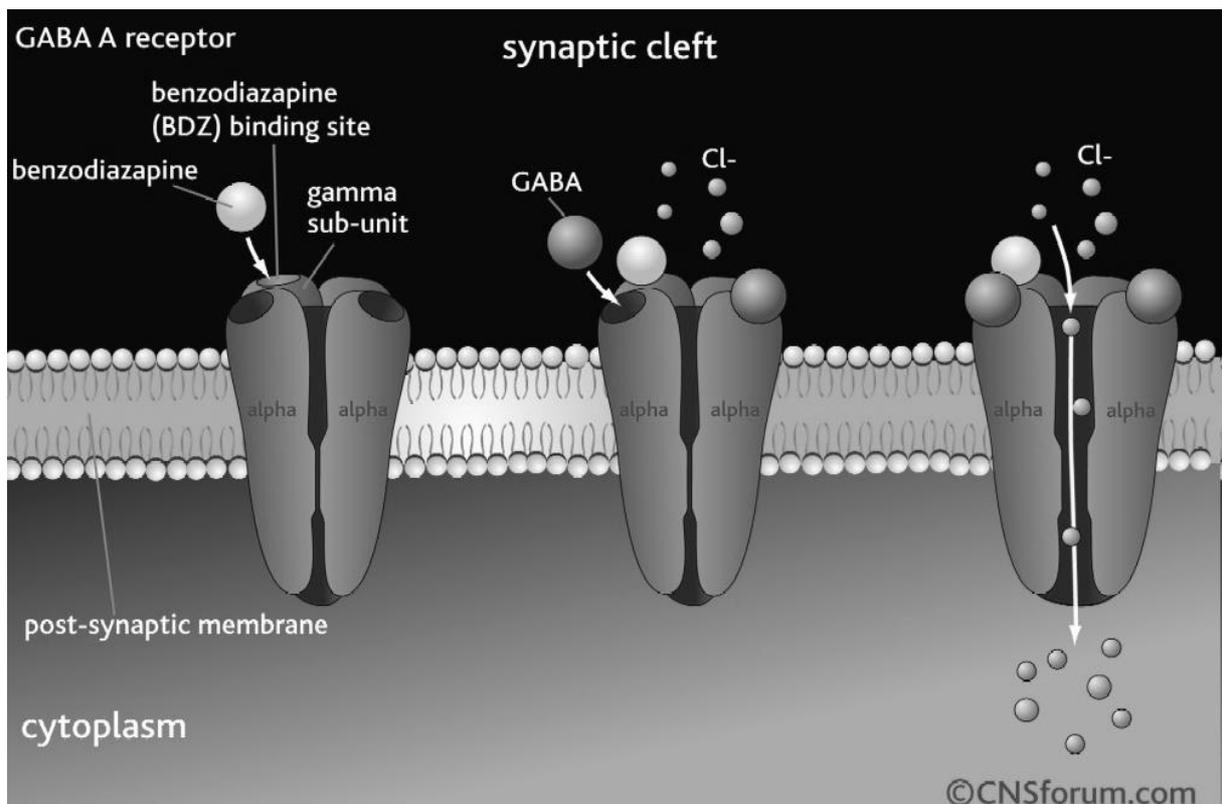


Figure 5 : Mécanisme d'action des benzodiazépines

4.3.2. Utilisation clinique chez les chevaux

L'introduction de la guaifénésine et de la xylazine dans les années 1960 et des benzodiazépines en 1961 a marqué le début d'une nouvelle ère dans le domaine de l'anesthésie par induction chez les chevaux. Ainsi, pendant longtemps, le diazépam est resté le médicament de choix pour la sédation (0.02-0.1 mg/kg chez les chevaux et 0.05-0.1 mg/kg chez les poulains). Actuellement les α -2 agonistes et le butorphanol sont plus utilisés pour la sédation mais le diazépam reste utilisé pour l'induction de l'anesthésie, en association (0.08 mg/kg) avec d'autres agents tel que la kétamine (2.2 mg/kg IV).

En médecine vétérinaire et chez les chevaux en particulier, le diazépam reste le gold standard lors de crises d'épilepsie à la dose de 0.05-0.4 mg/kg chez les poulains et à hauteur de 25 à 50mg chez les adultes. Il permet également d'appivoiser des animaux sauvages ou rétifs par son effet calmant, utile dans la prévention des conflits lors de regroupement d'animaux et lors de longs transports.

Les investigations chez le cheval ont mis en évidence de nombreux avantages au diazépam, dont la réduction de la dose de barbituriques et de gaz anesthésiques requis, une anesthésie et une analgésie prolongée (25-30min) et une diminution de l'hypertonie, de l'activité épileptique et de la salivation associée aux dissociatifs. Il pénètre le système nerveux central plus rapidement que les autres médicaments ou que ses propres métabolites et possède une large marge de sécurité. De plus, le diazépam (dans différentes combinaisons et doses) produit peu de changements significatifs dans les paramètres cardiopulmonaires dont la fréquence cardiaque, le débit cardiaque, la fréquence respiratoire, le pH artériel, les valeurs des gaz sanguin, la pression aortique moyenne ainsi que les pressions moyennes dans l'artère pulmonaire et dans l'auricule droite. De nombreux cliniciens ont rapporté que le diazépam a le potentiel de modifier les effets indésirables d'autres médicaments, tels que les changements cardiovasculaires et/ou les changements dans le système nerveux central (SNC). [30], [31]

4.3.3. Précautions

Le diazépam est à utiliser avec précaution chez les animaux affaiblis, déshydratés, anémiques, obèses ou âgés. De même pour les animaux en état de choc, dans le coma, ou présentant une détresse respiratoire importante.

De plus, ce produit présente plusieurs contre-indications en cas de :

- maladie rénale
- insuffisance hépatique car des risques d'augmentation de la durée d'action et des surdosages sont possibles et des cas d'hépatotoxicité ont été rapportés.
- myasthénie grave
- glaucome à angle fermé
- gestation : dans le premier tiers de gestation, des anomalies congénitales ont été décrites chez l'homme. [35]

4.3.4. Effets indésirables

Lorsque le diazépam est administré seul, le surdosage se limite généralement à une dépression significative du SNC (confusion, coma, réflexes diminués, etc.).

L'administration intraveineuse rapide peut entraîner hypotension, troubles cardiaques et thrombophlébite. Le risque de thrombophlébite après administration intraveineuse peut être minimisé par une injection lente et l'utilisation de produits approuvés pour l'homme (Valium®-Roche) [31]. D'autres effets ont été rapportés, notamment une augmentation de l'appétit, une ataxie, une désorientation, des modifications de l'état de conscience et du comportement. Les effets relaxants musculaires marqués du diazépam peuvent entraîner un décubitus sternal ou latéral à des doses cliniques supérieures à 0.2 mg / kg.

De plus, il existe des interactions médicamenteuses connues dont voici quelques exemples. Le diazépam est un dépresseur du SNC qui peut potentialiser l'action d'autres dépresseurs du SNC comme les barbituriques, tranquillisants, narcotiques, antidépresseurs etc. Le diazépam peut augmenter l'action de la digoxine. Le métabolisme du diazépam peut être ralenti par la cimétidine, l'érythromycine, les

substances azolées (comme l'itraconazole ou le kétoconazole) et l'acide valproïque. La dose de diazépam devrait alors être réduite pour éviter un effet sédatif excessif. La dexaméthasone peut diminuer l'action du diazépam. L'utilisation concomitante à des doses hépatotoxiques d'autres substances doit être évitée. [35]

Le traitement de la toxicité aiguë consiste en la mise en place de mesures systémiques de soutien et, s'il est pris oralement, à enlever et / ou lier le médicament dans l'intestin. En médecine humaine, l'antagoniste des benzodiazépines le flumazénil est largement utilisé pour traiter les surdosages de benzodiazépines ou pour reverser une sédation aux benzodiazépines. [31]

DEUXIEME PARTIE : Etude expérimentale des cinétiques d'élimination plasmatique et urinaire et détermination du temps de détection du diazépam : matériel et méthode.

Cette étude expérimentale a été réalisée grâce à la collaboration de plusieurs équipes. L'unité de recherche INTHERES à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse représentée par PL. Toutain, A. Ferran et D. Broussou, l'Institute of Biochemistry Center for Preventive Doping Research, (IBC) représenté par I. Schenk, S. Guddat, M. Machnik, H. Röttgen et M. Thevis, et la Fédération Équestre Allemande représentée par M. Düe et H. Lagershausen.

L'objectif de l'étude était de caractériser l'élimination du diazépam et de ses métabolites après une injection unique par voie intraveineuse chez le cheval. L'expérimentation a été acceptée par le Ministère de l'Enseignement et de la Recherche sous le numéro APAFIS #10250-2017061615123788.

L'étude pilote a été réalisée par l'IBC en février 2017 et l'étude principale a été réalisée au centre équestre de l'ENVT, sous la direction de S. Boullier de début juillet à mi-août 2017.

I. MATERIEL

1.1. Molécule test

La molécule testée, le diazépam, a été utilisée sous la forme de Valium® 10mg/2mL (Roche, Boulogne Billancourt).

1.2. Produits chimiques

L'acétate d'ammonium, le sodium dihydrogénophosphate monohydraté et l'acétate de sodium ont été obtenus chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acétonitrile (grade analytique), le méthanol, l'acide acétique (Pro analysei) et l'hydrogénophosphate de sodium ont été fournis par VWR Prolabo (Darmstadt, Allemagne). L'Arylsulfatase/ β -glucuronidase issue de *Helix pomatia* (H.P.) a été achetée chez Roche (Mannheim, Allemagne). Des tampons et des solutions ont été réalisés avec de l'eau désionisée (SARTORIUS STEDIM, Biotech, France). Les cartouches OASIS ® HLB SPE (60mg, 3mL) ont été achetées chez Waters (Milford, États-Unis). Les protéases de pancréas bovins, le diazépam, l'oxazépam et le témazépam ont été fournis par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Le nordiazépam provient de LGC (Wesel, Allemagne) et le d5-diazepam a été fourni par Cerilliant (Round Rock, États-Unis). Les solutions mères et les solutions de travail de diazépam et de ses métabolites ont été préparées dans le méthanol.

1.3. Animaux

1.3.1. Caractéristiques

- ◆ **Espèce** : Cheval
- ◆ **Nombre** : 6
- ◆ **Race** : Pur-sang, Pure race espagnole, Cheval de selle d'origines non constatées

- ◆ **Utilisation** : chevaux de sport et de loisir dans un centre équestre, activité modérée (1 à 2h par jour maximum)
- ◆ **Âge** : de 7 à 12 ans
- ◆ **Sexe** : hongre exclusivement afin de faciliter les prélèvements d'urines
- ◆ **Poids** : de 447 à 561 kg
- ◆ **Identification** : réalisée à l'aide de la lecture des transpondeurs électroniques

1.3.2. Environnement et mode de vie

- ◆ **Habitat** : à l'année, les six chevaux de l'étude vivent au pré avec d'autres chevaux. Lors des manipulations, ils restaient en box individuel paillés quotidiennement le temps des prélèvements nécessaires, c'est-à-dire toute la journée pendant les deux premiers jours des manipulations de 7h à 21h, puis de 7h30 à la première miction spontanée (soit de 10min à 6h) les 23 jours suivants.
- ◆ **Régime alimentaire** : les 6 chevaux de l'étude recevaient un aliment complet sous forme de granulés (Purina legend, Pomerac, France) distribués au box à 7h30 les matins de prélèvements avec une ration adaptée à leur travail et leur morphologie. Ils disposaient également de foin à volonté dans leur pré. L'eau potable provenait d'un réseau domestique sans contaminant répertorié. Les chevaux en disposaient à volonté que ce soit au box ou au pré (abreuvoirs automatiques).
- ◆ **Médication** : les 6 chevaux ont été déclarés sains avant le début de l'étude sur la base d'un examen clinique complet, et n'ont reçu aucune médication supplémentaire pendant toute la période expérimentale et au moins 3 mois avant.

Le tableau 1 ci-après récapitule les caractéristiques individuelles des chevaux de l'étude.

Tableau 1 : Caractéristiques individuelles des six chevaux de l'étude

Cheval	Sexe	Race	Age (ans)	Poids (kg)	Habitat	Granulé (kg)
SWEET	Hongre	Pur-sang	12	447	pré de 6 chevaux	3
LERIDANO	Hongre	Pure race espagnole	9	458	pré de 4 chevaux	3
TOUAREG	Hongre	Origines non constatées	10	561	pré de 4 chevaux	0,5
NOBEL	Hongre	Pure race espagnole	12	530	pré de 7 chevaux	3
ALEP	Hongre	Pur-sang	7	487	pré de 4 chevaux	4
KEPRESH	Hongre	Pur-sang	10	512	pré de 3 chevaux	4

II. METHODE

2.1. Plan expérimental

Le plan expérimental avait pour objectif de reproduire le schéma d'un traitement ponctuel avec une administration intraveineuse unique de diazépam suivie de prélèvements pour déterminer les concentrations plasmatiques et urinaires de diazépam et de ces métabolites au cours du temps.

Le nombre de prélèvements a été déterminé par l'*Institute of Biochemistry Center for Preventive Doping Research, (German Sport University Cologne, Am Sportpark Müngersdorf, 50933 Cologne, Germany)* (IBC) suite à une étude préliminaire effectuée sur deux chevaux.

Les six chevaux ont reçu le même jour une injection unique de 0.2 mg/kg de diazépam par voie intraveineuse dans la veine jugulaire droite à l'aide d'un cathéter. Le volume de Valium® correspondant à la dose par cheval, retranscrit dans le tableau 2 ci-dessous, a été administré sur une minute car l'étude préliminaire avait permis de déterminer qu'une injection intraveineuse lente limitait les effets indésirables.

Tableau 2 : Volume de Valium® 10mg/2mL à administrer par cheval

Cheval	Poids (kg)	Volume calculé (mL)	Volume à injecter (mL)
SWEET	447	17,88	18
LERIDANO	458	18,32	18
TOUAREG	561	22,44	23
NOBEL	530	21,20	21
ALEP	487	19,48	20
KEPRESH	512	20,48	21

2.2. Prélèvements

2.2.1. Plasma

- Collecte des prélèvements

Les prélèvements de plasma ont été effectués sur seize jours post administration à H0, H0.08, H0.25, H0.5, H1, H2, H4, H8, H12, H24, H36, H48, H72, H96, H120, H144, H168, H192, H240, H288, H336, H394. Les prises de sang étaient réalisées par deux personnes, une pour tenir l'animal en licol, l'autre pour prélever. Chaque prise de sang s'est faite au Vacutainer® dans des tubes héparinés de 20 mL à la jugulaire gauche. Les prélèvements étaient effectués à heures fixes, sous contrôle de chronomètres homologués, déclenchés au début de l'injection pour chaque cheval. Un prélèvement témoin a également été réalisé cinq jours avant le début de la phase expérimentale.

- Identification et stockage des prélèvements

Pour chaque prélèvement, le tube prélevé était identifié avec le nom du cheval et l'heure de collecte prévue. Il était conservé au frais (4°C) et à l'abri de la lumière, et ce, jusqu'à sa centrifugation (1000g pendant 10 minutes) dans les deux heures suivant la collecte. Le plasma était extrait et conservé dans trois tubes de 1mL étiquetés avec : le nom de l'étude, le nom du cheval, le type de liquide contenu, l'heure de collecte prévue, le numéro d'aliquotage et la température de conservation. Les tubes étaient conservés sur place à -20°C en attendant leur transfert pour analyses vers le laboratoire de l'IBC. Un des tubes était systématiquement conservé au congélateur à -20°C sur le site dans un autre bâtiment pour archivage sur cinq ans.

2.2.2. Urine

- Collecte des prélèvements

Les urines étaient collectées exclusivement par miction spontanée et recueillies dans des sacs plastiques à usage unique. Ceux-ci étaient placés dans des collecteurs urinaires mis en place chaque matin (entre 7h30 et 8h). Le volume d'urine ainsi récolté était réparti en 3 fractions aliquotes de 40mL.

Les prélèvements prévus pour les urines étaient sur vingt-six jours post-administration à environ H0, H1, H2, H4, H8, H12, H24, H36, H48, H72, H96, H120, H144, H192, H240, H288, H336, H384, H432, H480, H528, H576, H624.

Un prélèvement témoin a également été réalisé cinq jours avant le début de la phase expérimentale.

- Identification et stockage des prélèvements

Chacun des trois aliquots stockés était étiqueté avec le nom de la manipulation, le nom du cheval, le type de liquide contenu, l'heure de collecte prévue, le numéro d'aliquotage et la température de conservation. Ils étaient dans un premier temps conservés à 4°C et à l'abri de la lumière, puis dans les 2h suivant la collecte ils étaient stockés à -20°C en attendant leur transfert pour analyses vers le laboratoire de l'IBC. De même, un des trois aliquots était systématiquement conservé à -20°C sur le site dans un autre bâtiment pour archivage sur cinq ans.

2.3. Analyses des prélèvements

2.3.1. Préparations des échantillons

Les aliquots de 1 mL de plasma ou d'urine ont été fortifiés respectivement avec 1 ou 5 ng/mL de l'étalon interne, le d5-diazépam. Pour les échantillons d'urine avec des concentrations attendues supérieures à 30 ng/mL, les aliquots ont été dilués dans de l'eau avant dosage.

L'extraction en phase solide a été effectuée au moyen de cartouches d'OASIS® HLB SPE (60 mg, 3 mL) qui ont été conditionnées avec 1 mL de méthanol et 1 mL d'eau désionisée. Après l'application des échantillons, suivait une étape de lavage avec 1 mL d'un mélange eau/méthanol (90:10, v/v). Les cartouches ont été éluées avec 1 mL de méthanol, selon les recommandations du fabricant. L'éluat méthanoïque a été évaporé à sec au moyen d'un évaporateur rotatif sous vide. Le résidu sec a été reconstitué pour l'analyse dans 100 µL d'un mélange d'acétate d'ammonium (contenant 1% d'acide acétique) et d'acétonitrile (60:40, v/v). Cinq microlitres ont ensuite été injectés dans le système LC-MS/MS (liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry ou chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem).

2.3.2. Analyse LC-MS/MS

Les analyses LC-MS/MS ont été effectuées sur un chromatographe en phase liquide de la série 1260 d'Agilent (Waldbronn, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse triple quadripolaire QTrap (AB Sciex, Darmstadt, Allemagne) équipé d'une interface d'ionisation electrospray (ESI).

2.3.3. Validation de la méthode

Le rendement d'extraction, la linéarité, la précision, l'exactitude, les limites de quantification (LOQ), les limites de détection (LOD) et la stabilité ont été validés.

La LOD a été estimée comme la plus faible concentration qui pouvait être détectée à un rapport signal/bruit ≥ 3 . La LOQ a été postulée comme la plus faible concentration détectable avec un rapport signal/bruit ≥ 9 . Le critère d'acceptation de la LOQ était un coefficient de variation inférieur à 20%.

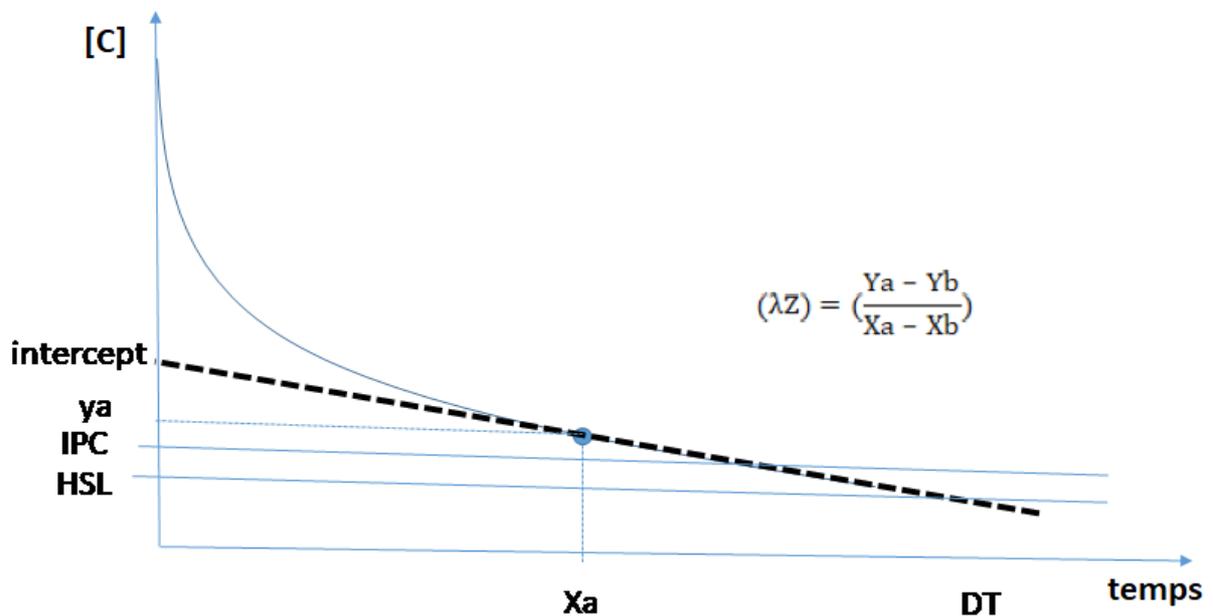
2.4. Analyse des données pharmacocinétiques

Le logiciel WinNonlin® a été utilisé pour l'analyse pharmacocinétique non compartimentale des données.

2.4.1. Détermination du temps de détection

Le temps de détection (DT) est défini comme étant l'intervalle de temps séparant la dernière administration du médicament et le temps pour lequel tous les chevaux étudiés sont considérés comme étant négatifs par les techniques de contrôle de routine.

Le temps de détection peut également être estimé graphiquement ou calculé d'après la méthode Toutain et Lassourd, à partir de la pente d'élimination terminale du diazépam dans le plasma (λZ) donnée par WinNonlin® et une valeur de concentration à un temps donné en fin de cinétique. L'équation 1 et ses différents paramètres sont illustrés sur le graphique 1.



Graphique 1 : Illustration de paramètres rentrant en jeu dans le calcul du DT

$$(\lambda Z) = \left(\frac{Y_a - Y_b}{X_a - X_b} \right) \quad \text{équation 1}$$

Avec λz , la pente terminale de la courbe, Y_a le log de la concentration connue au temps X_a , Y_b le log (LOQ) aussi appelé log(HSL) et X_b le temps de détection (DT).

En appliquant la même équation de la pente entre le temps 0 ($X_a=0$ et $Y_a=\log(\text{intercept})$) et une concentration connue Y_b au temps X_b , les équations 2 et 3 permettant de calculer l'intercept et le temps de détection ont été obtenues

$$\text{intercept} = \exp(X_b \times \lambda Z + \log(Y_b)) \quad \text{équation 2}$$

$$DT = \log\left(\frac{HSL}{\text{intercept}}\right) / (-\lambda Z) \quad \text{équation 3}$$

2.4.2. Détermination du temps de retrait

Le temps de retrait est basé sur les temps de détection publiés. Ce n'est qu'une recommandation du vétérinaire qui fournit un jugement scientifique et doit prendre en compte les paramètres intrinsèques à l'animal. C'est donc un temps estimé pour lequel les concentrations sont inférieures à l'IPC (*Irrelevant Plasma Concentration*).

De la même manière que pour le temps de détection, un temps de retrait a été estimé graphiquement et calculé selon la méthode Toutain et Lassourd.

La valeur d'IPC a été calculée à partir de l'EPC (*effective plasma concentration*), obtenue via l'équation 4 et d'un facteur de sécurité (SF),

$$EPC = \frac{\text{Dose standard} \times F}{\text{Clairance plasmatique}} = \frac{AUC}{24h} \quad \text{équation 4}$$

où Dose standard est la dose d'entretien recommandée, Clairance plasmatique, la clairance plasmatique calculée sur l'intervalle de dosage, généralement 24h et F est la biodisponibilité soit 1 lors d'administration IV.

L'EPC calculée correspond à la concentration moyenne sur 24 h. Or pour le diazépam, la durée d'effets attendue après une dose est de quelques minutes à quelques heures et cette méthode de calcul pourrait ne pas être pertinente. Nous

avons donc pour les calculs du temps de retrait utilisé la valeur de l'EPC obtenue par l'équation 4 et une valeur décrite comme efficace dans la littérature de 70 ng/mL [33].

À partir de l'EPC, l'IPC (Irrelevant Plasma Concentration) a été obtenue via l'équation 5 en divisant l'EPC par un facteur de sécurité (SF), ici fixé à 500.

$$IPC = \frac{EPC}{SF} \quad \text{équation 5}$$

L'estimation du temps de retrait (WT) après une injection IV a finalement été obtenue via l'équation 6

$$WT = 1,44 \times \tau \times \log \frac{\text{intercept}}{IPC} \quad \text{équation 6}$$

Il est important de préciser que ce temps est une indication pour les vétérinaires afin d'estimer la négativation d'un cheval. Il n'est en aucun cas garant de la négativité d'un cheval lors d'un contrôle.

TROISIEME PARTIE : Résultats

I. Validation du plan expérimental

1.1. Administration du produit

1.1.1. Validation du volume injecté

Afin de s'assurer que chaque cheval avait bien reçu la dose attendue, les seringues contenant le Valium® ont été pesées avant et après administration sur une balance homologuée. Après comparaison des poids, nous pouvons affirmer que les chevaux ont bien reçu le volume attendu, comme l'illustre le tableau 3.

De plus, aucun cheval ne présentait de concentrations plasmatiques ou urinaires détectables en diazépam ou en l'un de ses métabolites à T=0.

Tableau 3 : Validation du poids de la formulation à injecter par cheval

Cheval	Volume à injecter (mL)	Poids à injecter (g)	Poids avant administration (g)	Poids après administration (g)	Poids injecté (g)
SWEET	18	18,60	51,4636	32,8658	18,60
LERIDANO	18	18,79	52,0795	33,2906	18,79
TOUAREG	23	23,49	56,9103	33,4223	23,49
NOBEL	21	21,34	54,3281	32,9860	21,34
ALEP	20	20,57	53,4679	32,8989	20,57
KEPRESH	21	21,98	55,5801	32,6010	21,98

1.1.2. Effets cliniques et temps d'injection

Le premier cheval, Sweet, a fortement réagi lors de l'administration du produit par voie intraveineuse lente sur 1 minute. En effet, pendant l'injection il a présenté de l'ataxie et s'est affalé contre le mur du box. Pour éviter ces effets indésirables, il a alors été décidé d'allonger la durée d'injection à 2 minutes dans un premier temps, puis à 3 minutes dans un second temps, les réactions étant encore violentes selon les individus. Elles sont détaillées dans le tableau 4 ci-dessous. Les effets principaux observés chez les 6 chevaux étaient : des tremblements suivis d'ataxie voire de chutes, une hyperesthésie marquée pour 2 chevaux avec des réactions inhabituelles à la voix et à la vue des intervenants. Il est important de noter que les effets indésirables ont été très différents selon les chevaux y compris pour une même durée d'injection.

Tableau 4 : Effets cliniques et temps d'injection pour 6 chevaux

Cheval	Début d'administration (hh :mm)	Fin d'administration (hh :mm)	Temps d'injection (min)	Effets cliniques
SWEET	08 :00	08 :01	1	Chute, reste au sol une minute
LERIDANO	08 :09	08 :11	2	Chute
TOUAREG	08 :17	08 :20	3	Chute, réaction excessive à la stimulation visuelle
NOBEL	08 : 27	08 :30	3	Chute
ALEP	08 :36	08 :39	3	Pas d'effet notable
KEPRESH	08 :47	08 :50	3	Chute dès la fin de l'injection, réaction très violente, hyperesthésie

1.1.3. Vérification des heures de prélèvements

Les heures exactes de prélèvement de plasma post injection étaient retranscrites en parallèle sur un document et sont détaillées en annexe 2. Elles ont été bien respectées avec un écart inférieur à 5%, excepté sur les prélèvements à H0.08 et H0.05 chez 2 chevaux (écarts entre 8 et 25%).

De même, les heures exactes de prélèvement d'urine post-injection étaient retranscrites en parallèle sur un document et sont indiquées en annexe 2. Les mictions étant spontanées, le respect des heures de collectes était indépendant de notre volonté. Sur les 2 premiers jours, chaque miction était récupérée de 7h à 21h, quels que soient l'heure de miction et le cheval. Les jours suivants où il n'y avait qu'un prélèvement à récupérer, seule la première miction était collectée. Passées les premières 48h, les écarts n'excédaient pas 10%, les chevaux se sont habitués au rituel et au fur et à mesure les heures de mictions se rapprochaient de plus en plus de l'heure prévue.

II. Validation de la méthode d'analyse

Le métabolisme du diazépam a été décrit chez les mammifères (humains, chiens, chats ou chevaux) dans de nombreuses publications. Notamment, il a été rapporté une hydroxylation, une déméthylation CYP-dépendante ainsi qu'une glucuronidation au moyen d'uridine diphosphate glucuronosyltransférase [36]–[38]. Ainsi, les méthodes publiées de détection du diazépam dans l'urine comprennent toujours l'hydrolyse des métabolites de phase II et se concentrent sur le diazépam ainsi que sur ses métabolites actifs nordiazépam, oxazépam et témazépam [39],[40]. En ce qui concerne le plasma, Muir et al. ont décrit une liaison protéinique élevée du diazépam qui nécessite une protéolyse avant les autres étapes d'extraction. La purification des échantillons a été réalisée par extraction en phase solide (SPE) [41] et extraction liquide-liquide [42].

Alors que Muir et al. ont appliqué une analyse GC-MS des dérivés de triméthylsilyle arrivant à une LOD de 5 ng / mL de plasma, Oliveira et al. ont obtenu une LOD de 0.3 ng / mL sur un appareil GC-MS QP 5000 sans dérivation [43]. Cependant, la majorité des études récentes concernant le diazépam sont basées sur une analyse LC-MS / MS donnant des LOD faibles avec par exemple 0.1 ng / mL dans l'urine humaine [41]. Nous avons décidé d'utiliser l'hydrolyse des glucuroconjugés dans les urines via une enzyme *Helix pomatia* et la protéolyse des échantillons de plasma via la protéase bovine après SPE suivi d'une analyse LC-MS / MS. Pour la quantification, le d5-diazépam a été ajouté comme étalon interne et la méthode a été validée avec succès pour la quantification en matière de sélectivité, recouvrement, linéarité, précision, exactitude, stabilité, limite de détection (LOD) et quantification (LOQ).

L'identification non ambiguë de diazépam, nordiazépam, oxazépam et témazépam a été montrée. Le recouvrement a été déterminé entre 66.8 et 78.6% dans le plasma et entre 76.9 à 97.6% dans l'urine. La linéarité de tous les analytes a permis l'adaptation d'un modèle linéaire avec un facteur de pondération de $1/x$ et un coefficient de corrélation d'au moins $r=0.994$ dans le plasma et de $r=0.997$ dans l'urine. Néanmoins, la large gamme de concentrations dans l'urine a exigé une dilution au

1/50^{ème} des échantillons avec des concentrations supérieures à 30 ng/mL, de nordiazépam, oxazépam et témazépam pour obtenir la linéarité entre 0.2 à 4000 ng/mL.

Dans le plasma, la LOD a été fixée à 10 pg/mL pour le diazépam, nordiazépam et témazépam et à 20 pg/mL pour l'oxazépam. La LOQ a été fixée à 50 pg/mL pour tous les analytes. Dans l'urine, les LOD et LOQ ont été respectivement fixées à 0.05 et 0.1 ng/ml pour le diazépam, 0.1 et 0.5 ng/mL pour le nordiazépam et 0.2 et 0,5 ng/mL pour l'oxazépam et le témazépam.

Les coefficients de variation de la précision intra- et inter-journalière étaient inférieurs à 16% pour tous les analytes dans le plasma et l'urine. L'exactitude a été calculée entre 90.2 et 117% dans le plasma et entre 90.1 et 111.6% dans l'urine. La stabilité a été vérifiée par six échantillons de plasma et d'urine enrichis et s'est révélée stable pendant 56 jours de stockage à -20 ° C. Ainsi, la méthode a été validée avec succès en matière de sélectivité, de spécificité, de recouvrement, de linéarité, d'exactitude, de précision, de LOD, de LOQ et de stabilité et a été considérée comme étant adaptée à son objectif.

III. Concentrations de diazépam et de ses principaux métabolites dans le plasma

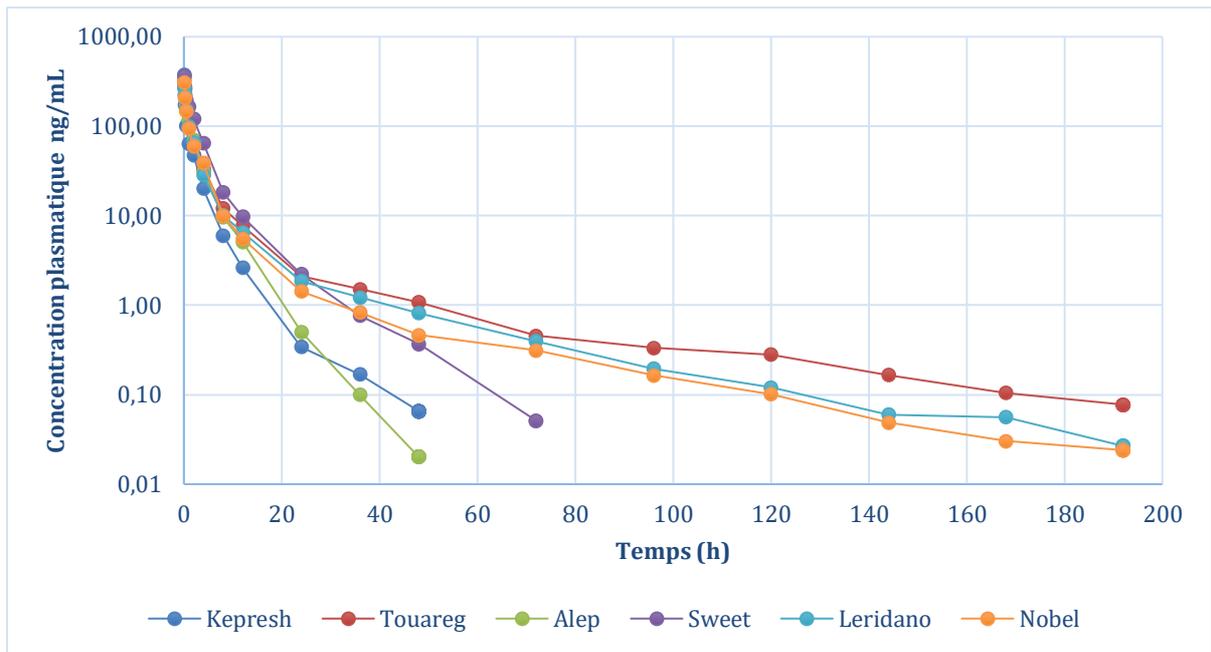
Le logiciel WinNonlin® a été utilisé pour l'analyse pharmacocinétique non compartimentale des données.

Les concentrations plasmatiques du diazépam et de ses principaux métabolites au cours du temps sont représentées pour chaque cheval sur les graphiques 2, 4, 6 et 8. De plus, nous avons calculé la moyenne des concentrations des 6 chevaux pour chaque heure de prélèvement ainsi que leurs écarts-type, représentés sur les graphiques 3, 5, 7 et 9.

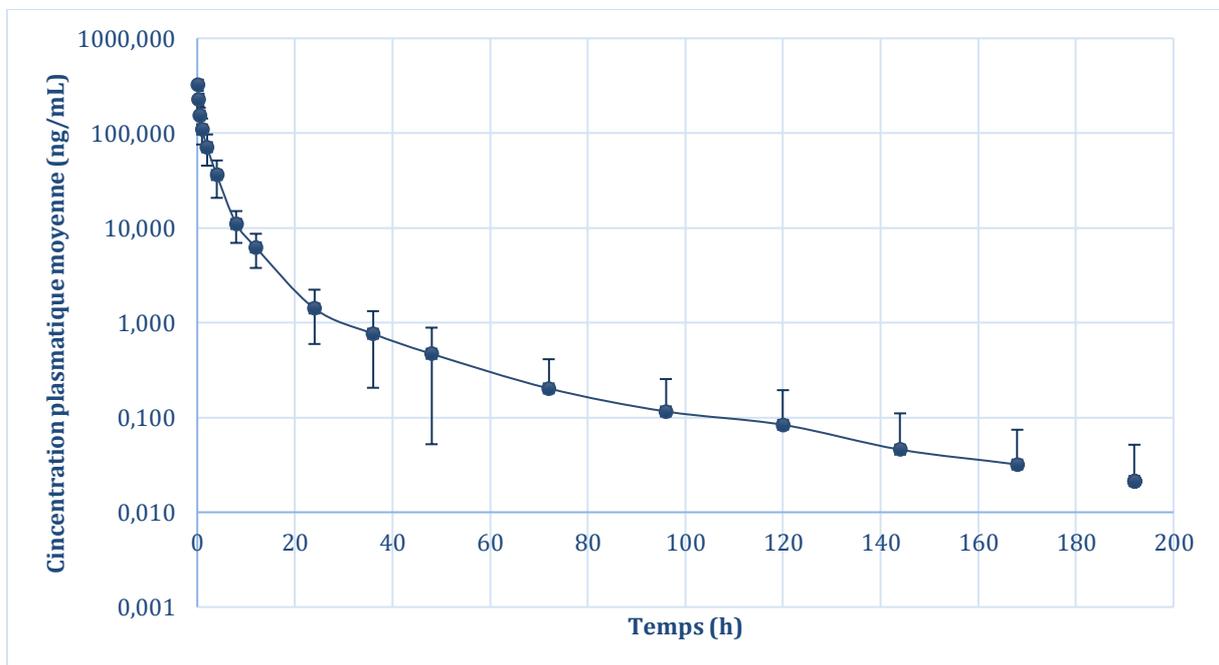
3.1. Cinétique des concentrations plasmatiques de diazépam

Le pic de concentration a été logiquement atteint dès le premier prélèvement 5 minutes après injection intraveineuse (H0.08) (270ng/mL à 379ng/mL, moyenne de 322.67ng/mL). La décroissance des concentrations plasmatiques de diazépam après une administration unique semblait être bi-exponentielle. Le temps de demi-vie d'élimination calculé via WinNonlin® était en moyenne de 12.15h (de 5h à 40h selon les chevaux) et la clairance était en moyenne de 4.05 mL/min/kg (de 1.88 à 12.40 mL/min/kg).

Dès H72, deux chevaux ne présentaient plus une concentration plasmatique de diazépam suffisante pour être détectable et les quatre autres avaient tous des concentrations inférieures à 1ng/mL. Trois chevaux ont eu des concentrations plasmatiques de diazépam suffisantes pour être détectables entre H192 et H240 (entre 8 et 10 jours).



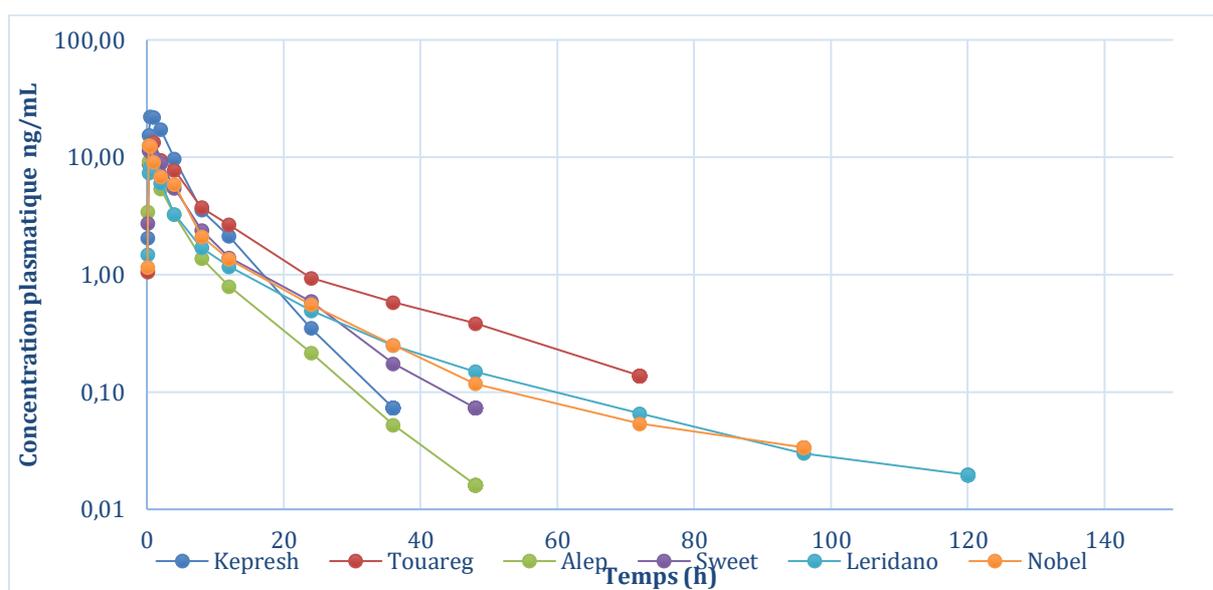
Graphique 2 : Concentrations plasmatiques de diazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



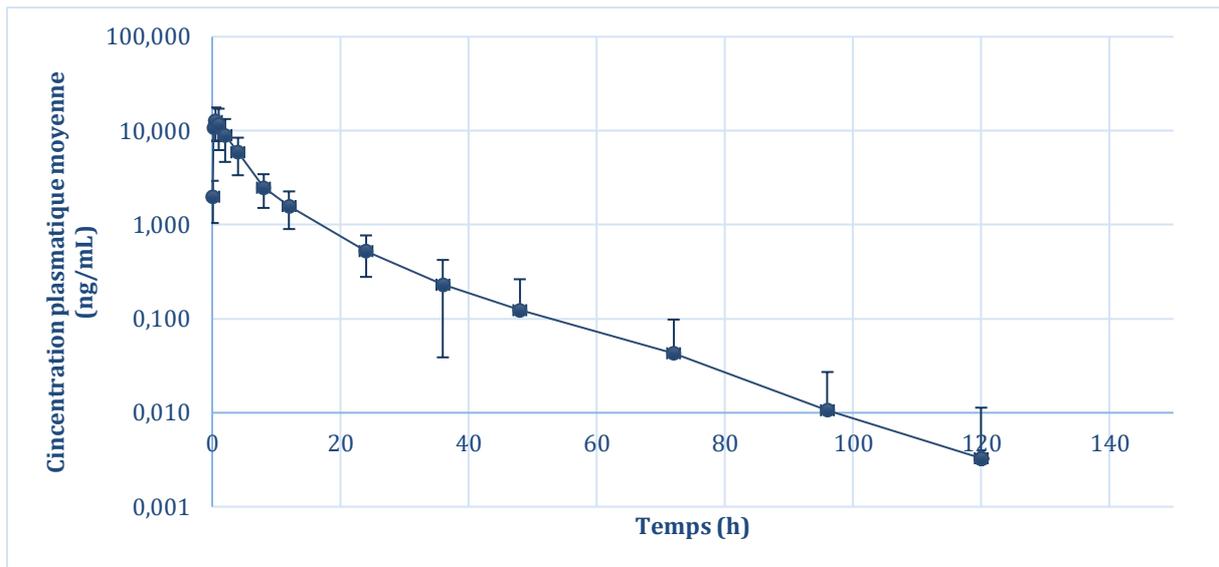
Graphique 3 : Concentrations plasmatiques moyennes de diazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

3.2. Cinétique des concentrations plasmatiques du témazépam

Le témazépam est le métabolite produit et éliminé le plus rapidement. Le pic de concentration – 8.28ng/mL à 22.20 ng/mL – a été atteint entre 0.08h et 2h après injection intraveineuse de diazépam. Le temps de demi-vie d'élimination calculé était en moyenne de 9.56h (de 6.5 à 17.5h). Les six chevaux présentaient une concentration de témazépam inférieure à 1ng/mL après 24h. Le témazépam n'était plus détectable 48h après l'administration pour un individu, et au plus tard 144h (6 jours) après l'administration.



Graphique 4 : Concentrations plasmatiques de témazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

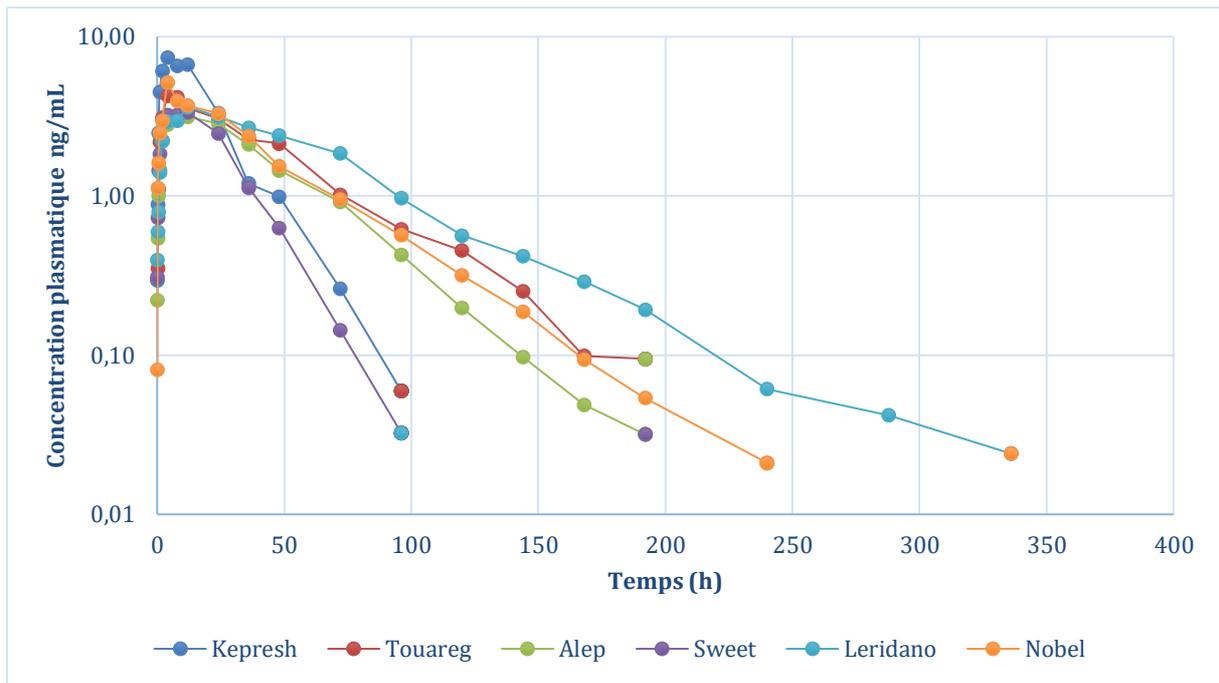


Graphique 5 : Concentrations plasmatiques moyennes de témazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

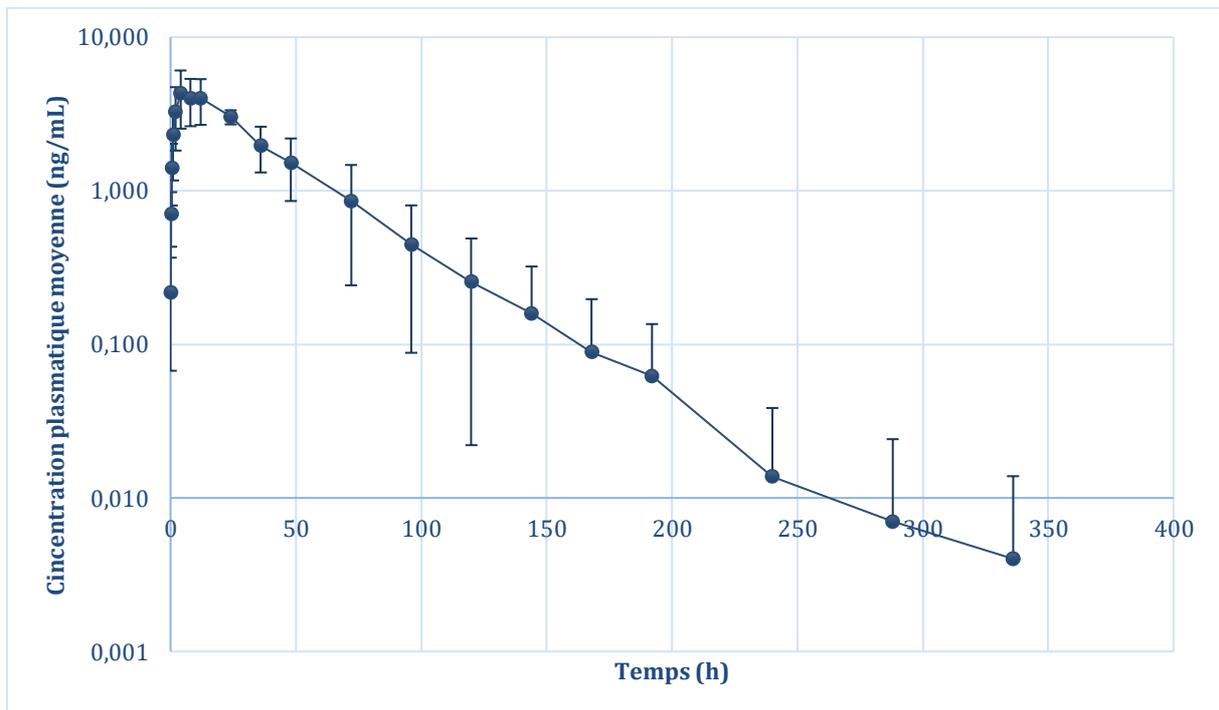
3.3. Cinétique des concentrations plasmatiques de l'oxazépam

L'oxazépam est plus long à être produit après une administration de diazépam que le témazépam. De plus, il présente un pic de concentration - 3.15ng/mL à 7.42 ng/mL- légèrement plus bas que le témazépam et atteint entre 2 et 8h, pour quatre individus et au plus tard entre 8h et 24h, pour deux individus, après injection intraveineuse de diazépam. Le temps de demi-vie d'élimination calculé à partir de ces données était en moyenne de 19.66h (de 11 à 41h).

Après 96h, les 6 chevaux présentaient une concentration inférieure à 1ng/mL. La limite de détection a été atteinte dès 120h pour deux individus. Après 288h, soit 12 jours, l'oxazépam plasmatique était indétectable chez cinq chevaux. Il a fallu 384h après injection de diazépam, soit 16 jours, pour que ce soit le cas chez le dernier individu.



Graphique 6 : Concentrations plasmatiques d'oxazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

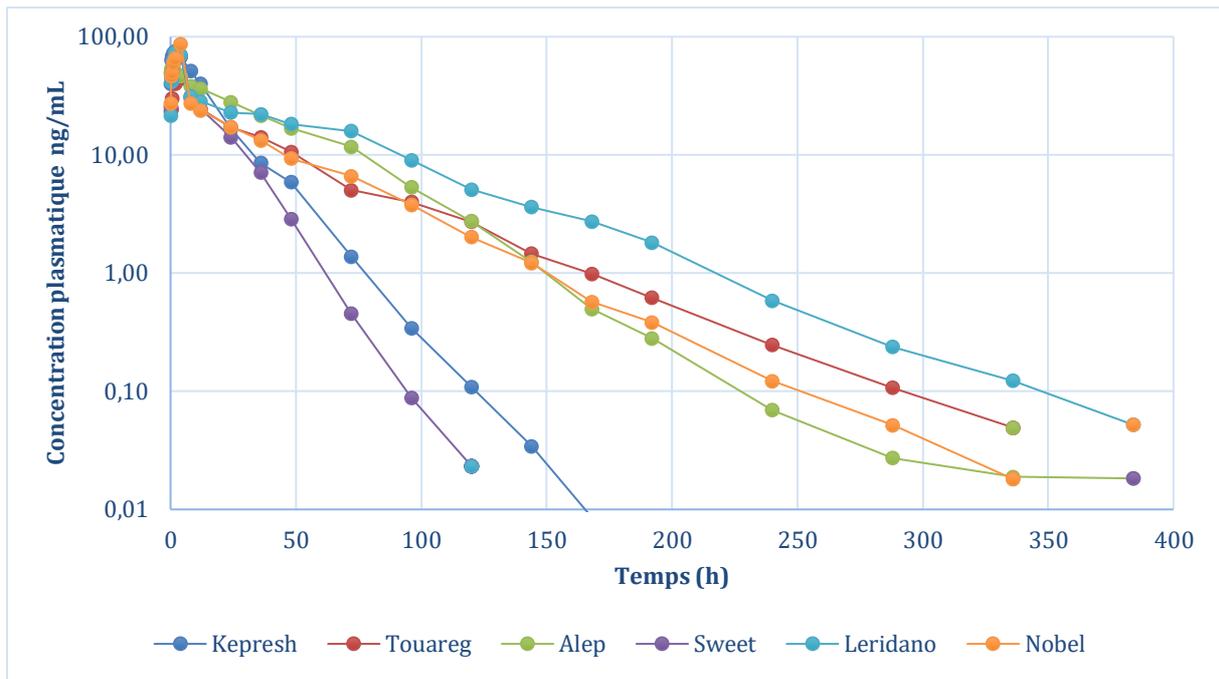


Graphique 7 : Concentrations plasmatiques moyennes d'oxazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

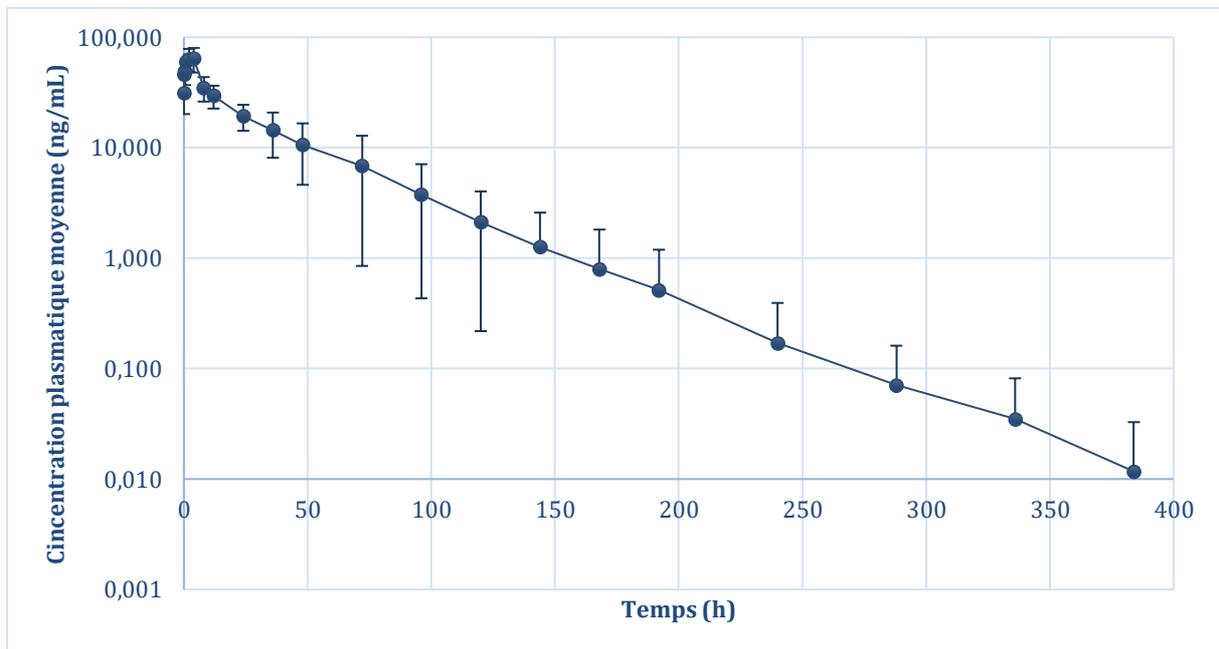
3.4. Cinétique des concentrations plasmatiques du nordiazépam

Le nordiazépam était le métabolite produit en plus grande quantité et présentait le temps d'élimination le plus long. Son pic de concentration – entre 44.40ng/mL et 87.10ng/mL – a été atteint au plus tôt entre 0.5 et 8h après injection intraveineuse de diazépam. Le nordiazépam présentait un temps de demi-vie d'élimination en moyenne de 21.71h (11 à 41h).

Les concentrations plasmatiques étaient inférieures à 1 ng/mL chez les 6 chevaux après 240h (10 jours). Le nordiazépam n'était plus détectable dès 144h pour un individu. En revanche il était encore détectable chez deux individus, Leridano et Alep, après 384h, à des concentrations respectivement de 0.02ng/mL et 0.05ng/mL c'est-à-dire 16 jours post-administration ce qui correspond à la fin de nos prélèvements dans ce protocole. Pour ce qui est de Leridano, la décroissance de la concentration en nordiazépam semblait linéaire et en extrapolant il semblerait qu'après 18 à 19 jours, le nordiazépam serait indétectable. Concernant Alep, la pente de la courbe (très faible) obtenue sur les 3 derniers points ne permet pas d'estimer le temps pour obtenir des concentrations indétectables.



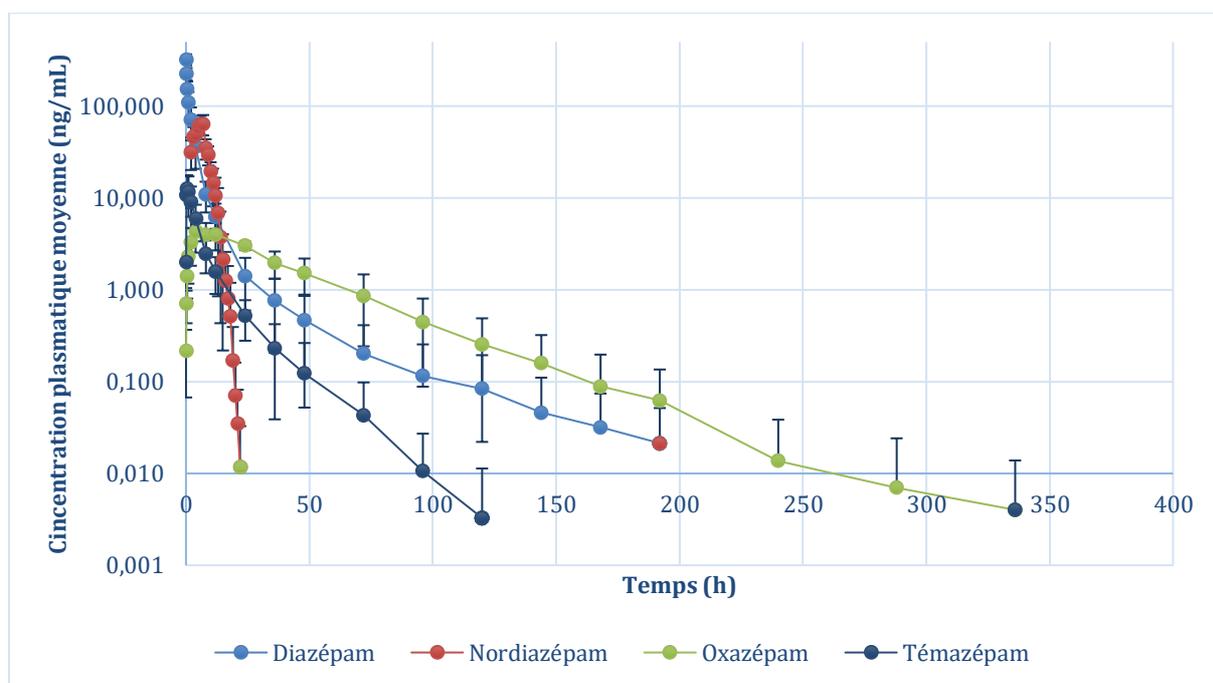
Graphique 8 : Concentrations plasmatiques de nordiazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



Graphique 9 : Concentrations plasmatiques moyennes de nordiazépam chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

3.5. Conclusion sur les cinétiques des concentrations plasmatiques du diazépam et de ses métabolites

A la lumière de ces données, il apparaît que le diazépam n'est détectable dans le sang que pendant 2 à 10 jours après administration de 0.2 mg/kg par voie IV. Ses principaux métabolites sont par contre détectables plus longtemps à l'exception du témazépam. Le métabolite détectable le plus longtemps dans le plasma est le nordiazépam, ici au maximum entre 5 et 16 jours selon les individus. Le graphique 10 combine les concentrations moyennes des 6 chevaux pour chaque temps de prélèvement ainsi que leurs écarts-type, pour chacune des substances.



Graphique 10 : Concentrations plasmatiques moyennes du diazépam et de ses principaux métabolites chez 6 chevaux après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

Le tableau 5 ci-après récapitule les principales informations concernant leur cinétique plasmatique.

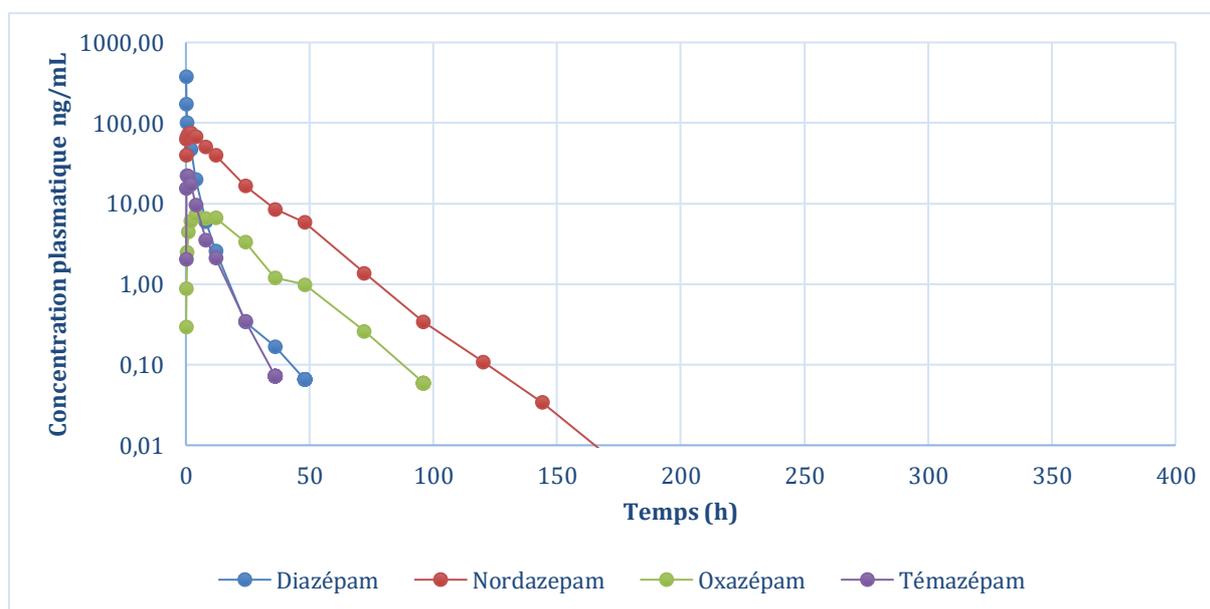
Tableau 5 : Récapitulatif des informations principales concernant les cinétiques des concentrations plasmatiques du diazépam et de ses principaux métabolites

	Diazépam	Témazépam	Oxazépam	Nordiazépam
Temps de demi-vie plasmatique moyen (h)	12,15	9,56	19,66	21,71
Clairance moyenne (ml/min/kg)	4,05	/	/	/
Cmax (intervalle) (ng/mL)	270-380	8,28-22,2	3,15-7,42	44,4-87,1
Tmax (intervalle) (h)	0,08	0,25-1	4-12	1-4
Durée à partir de laquelle toutes les concentrations sont inférieures à 1ng/mL (h)	72	24	96	240

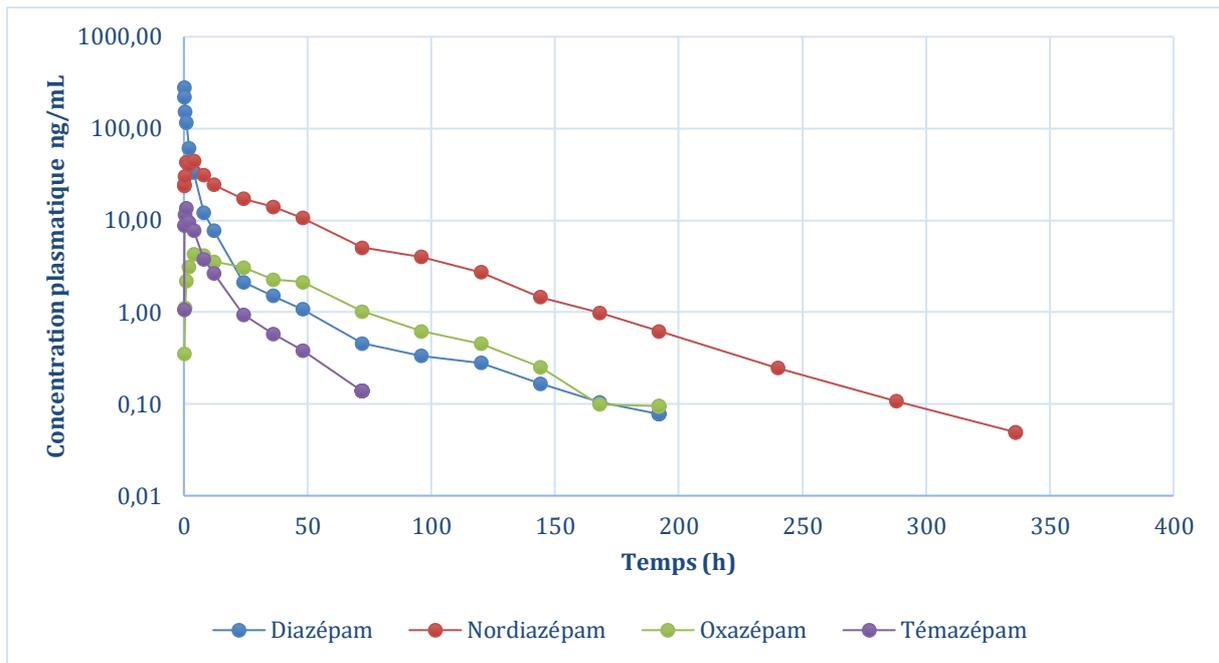
En détaillant les tendances des courbes pour chaque cheval sur les graphiques 11 à 16, il semblerait que deux groupes se détachent : un groupe avec Kepresh et Sweet, et un groupe avec Touareg, Leridano et Nobel. Les deux chevaux du premier groupe semblaient avoir une métabolisation rapide du diazépam et de ses métabolites qui étaient éliminés plus rapidement. Pour les trois chevaux du deuxième groupe, l'élimination était plus lente et les molécules retrouvées plus longtemps dans le plasma. Enfin, le dernier cheval, Alep, semble être un intermédiaire : la décroissance des concentrations de diazépam et de témazépam se rapproche de celle du premier groupe alors que pour le nordiazépam et l'oxazépam le profil de décroissance est plus proche du deuxième groupe. Ces observations sont confirmées par les temps de demi-vie du diazépam et de chacun de ses métabolites pour chaque cheval, présentés dans le tableau 6 ci- après.

Tableau 6 : Temps de demi-vie (h) du diazépam et de ses métabolites par cheval

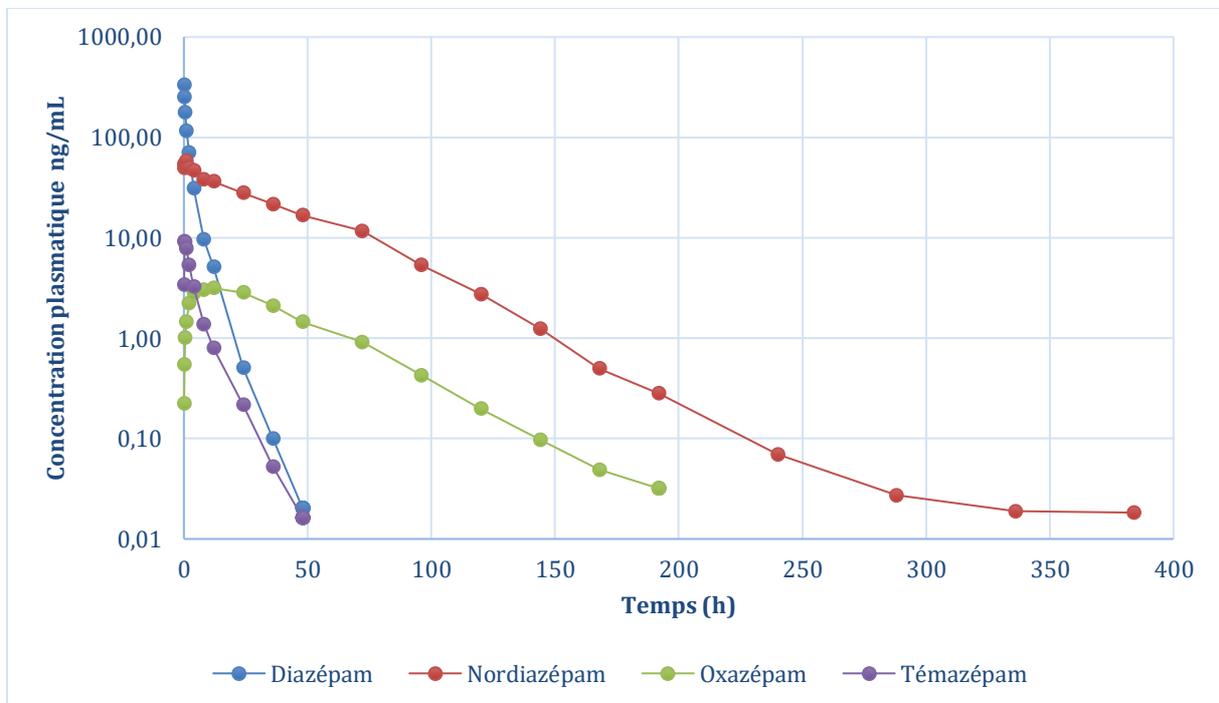
Cheval	T _{1/2} Diazépam	T _{1/2} Témazépam	T _{1/2} Oxazépam	T _{1/2} Nordiazépam
Keprash	10,53	4,90	11,87	14,00
Touareg	39,67	17,54	32,39	41,34
Alep	5,17	6,45	24,94	29,47
Sweet	8,89	7,95	10,93	10,69
Leridano	28,63	22,67	41,05	37,87
Nobel	30,44	24,00	29,36	37,14
Moyenne harmonique	12,15	9,56	19,66	21,71



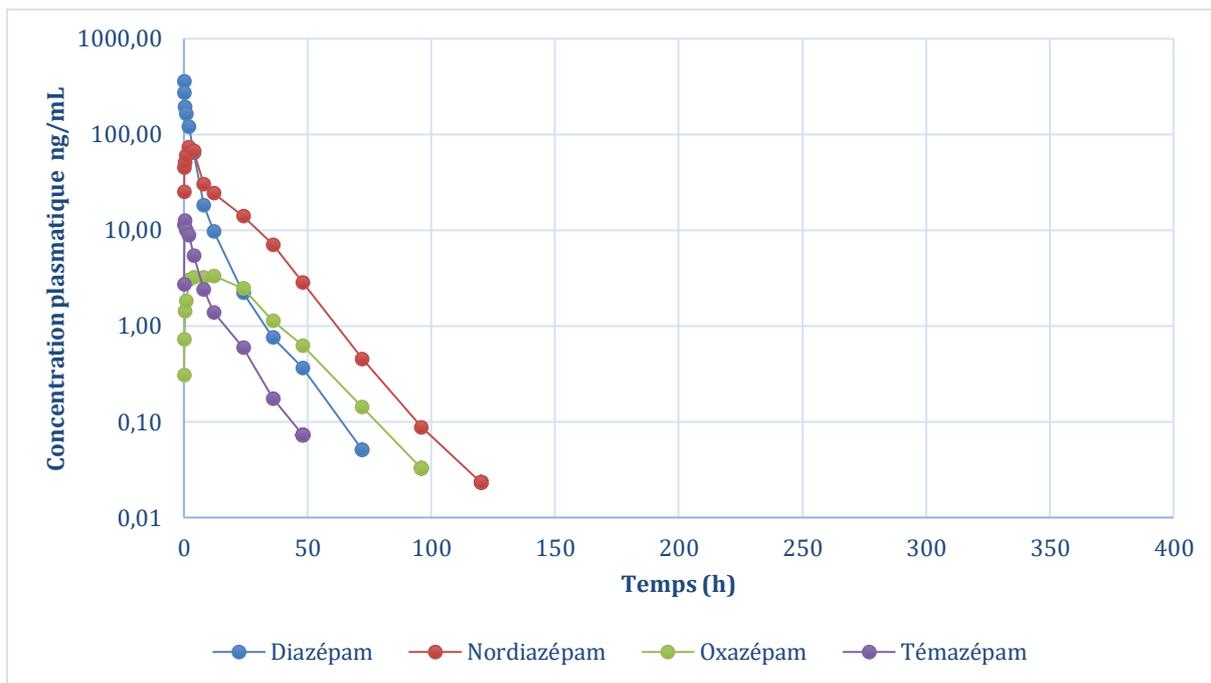
Graphique 11 : Concentrations plasmatiques chez Keprash après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



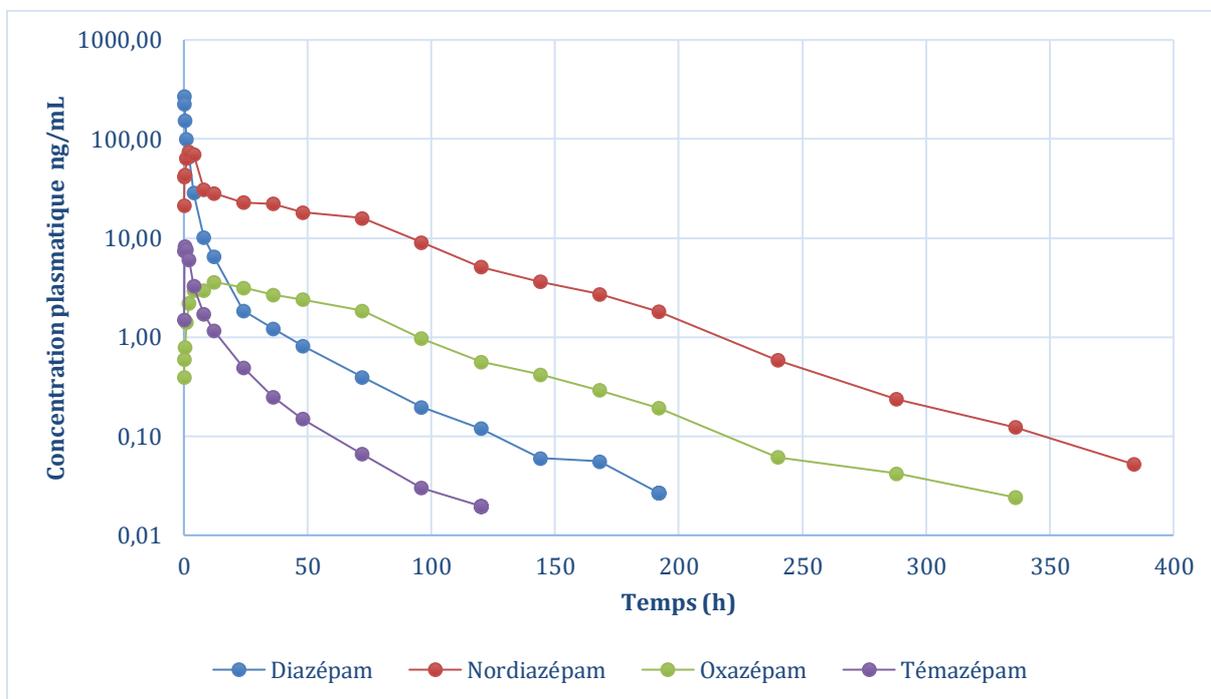
Graphique 12 : Concentrations plasmatiques chez Touareg après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



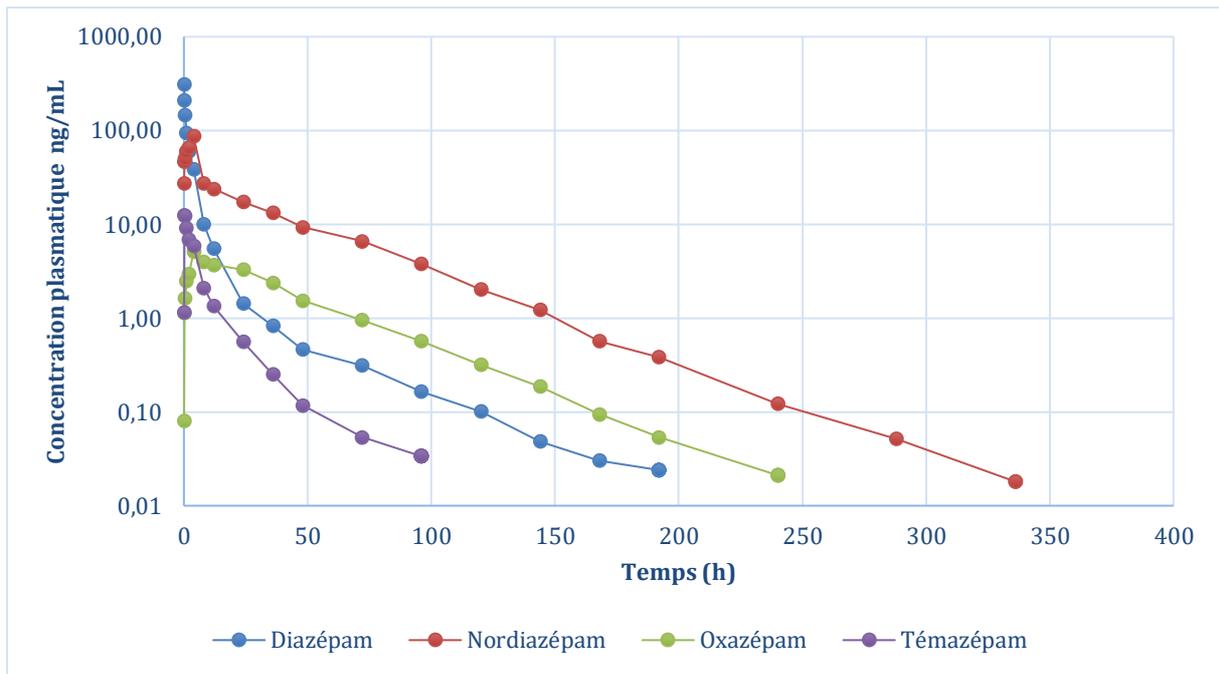
Graphique 13 : Concentrations plasmatiques chez Alep après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



Graphique 14 : Concentrations plasmatiques chez Sweet après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



Graphique 15 : Concentrations plasmatiques chez Leridano après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg



Graphique 16 : Concentrations plasmatiques chez Nobel après une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/2mL à 0,2mg/kg

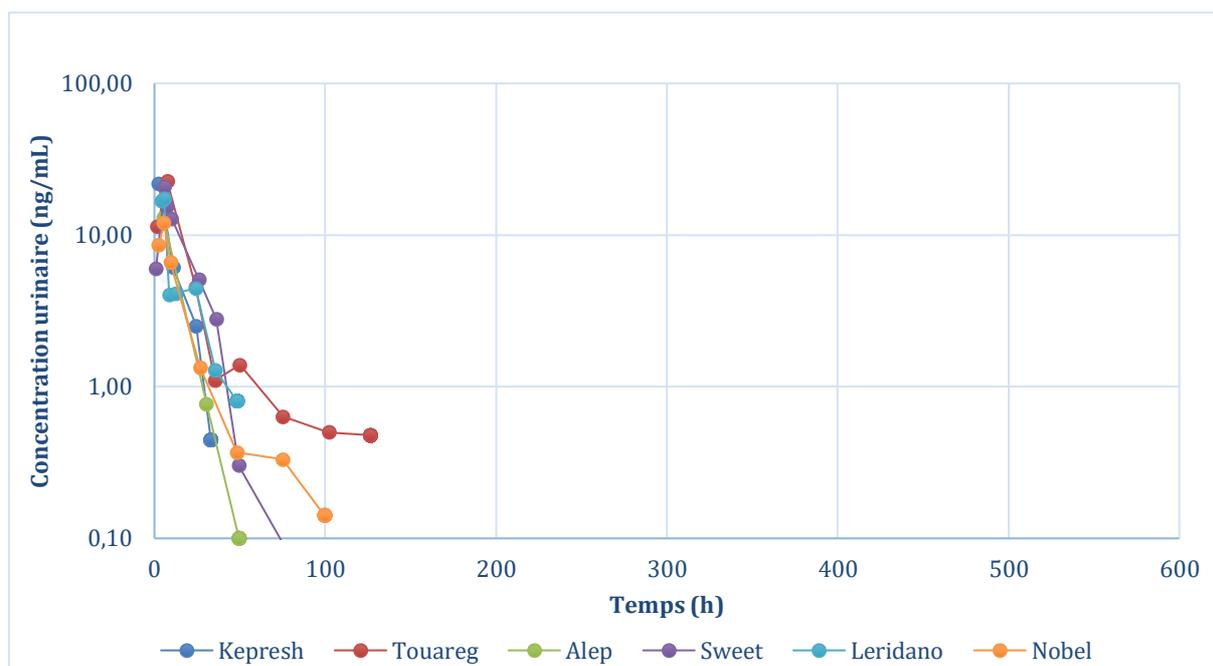
IV. Concentrations de diazépam et de ses principaux métabolites dans les urines

Les cinétiques des concentrations urinaires du diazépam et de ses principaux métabolites des 6 chevaux sont représentées sur les graphiques 17 à 20. Nous rappelons que les heures de prélèvements post-administration de diazépam dépendaient des mictions spontanées et qu'il n'était donc pas envisageable de calculer des moyennes de concentrations.

Il est important de noter que les molécules ont été dosées dans les urines après hydrolyse des glucuronoconjugués. Il est donc impossible de savoir si la molécule a été éliminée sous forme non conjuguée (molécule native) ou conjuguée.

4.1. Cinétique des concentrations urinaires de diazépam

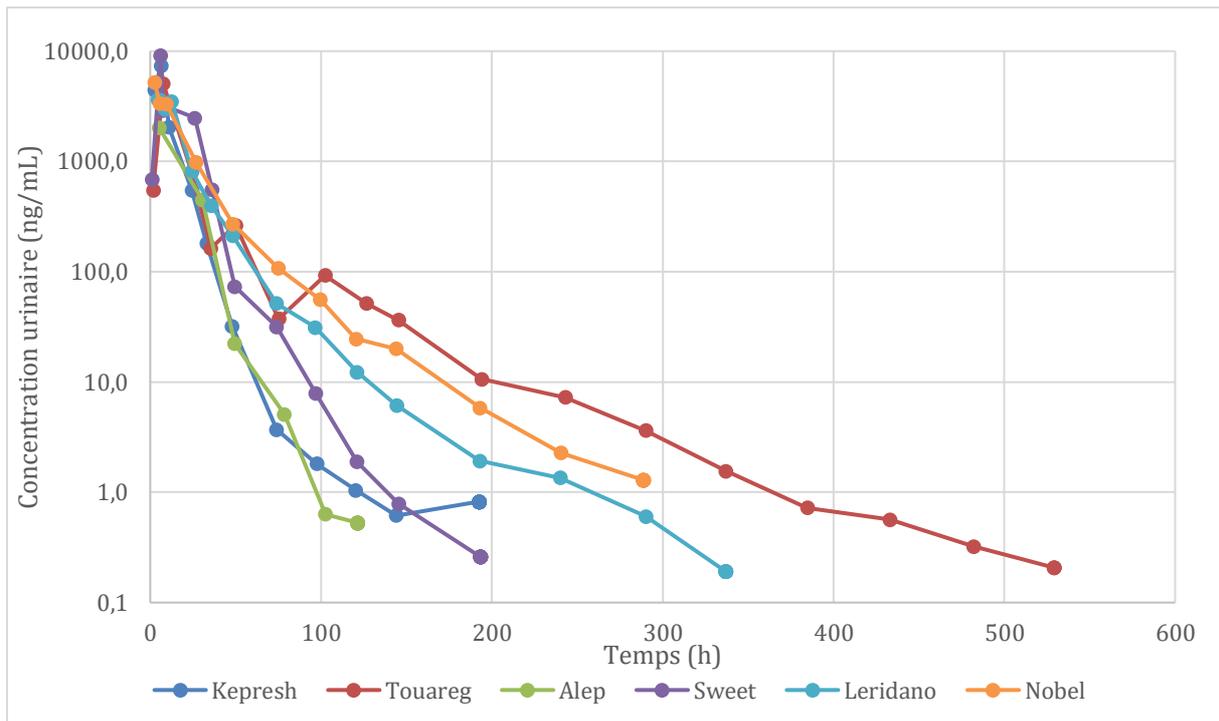
Le diazépam a été retrouvé dans les urines dès la première miction et la concentration maximale, de 12.10ng/mL à 22.60ng/mL était atteinte au plus tard lors de la deuxième miction (7.6h au plus tard ici). Toutes les concentrations étaient inférieures à 10 ng/mL 30h après l'administration de diazépam. Après 48h, le diazépam était indétectable dans l'urine d'un des chevaux. Au plus tard, le diazépam a été détecté jusqu'à 126h chez un autre individu et ne l'était plus au prélèvement à 145h post administration.



Graphique 17 : Concentration urinaire de diazépam chez 6 chevaux suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg

4.2. Cinétique des concentrations urinaires du témazépam

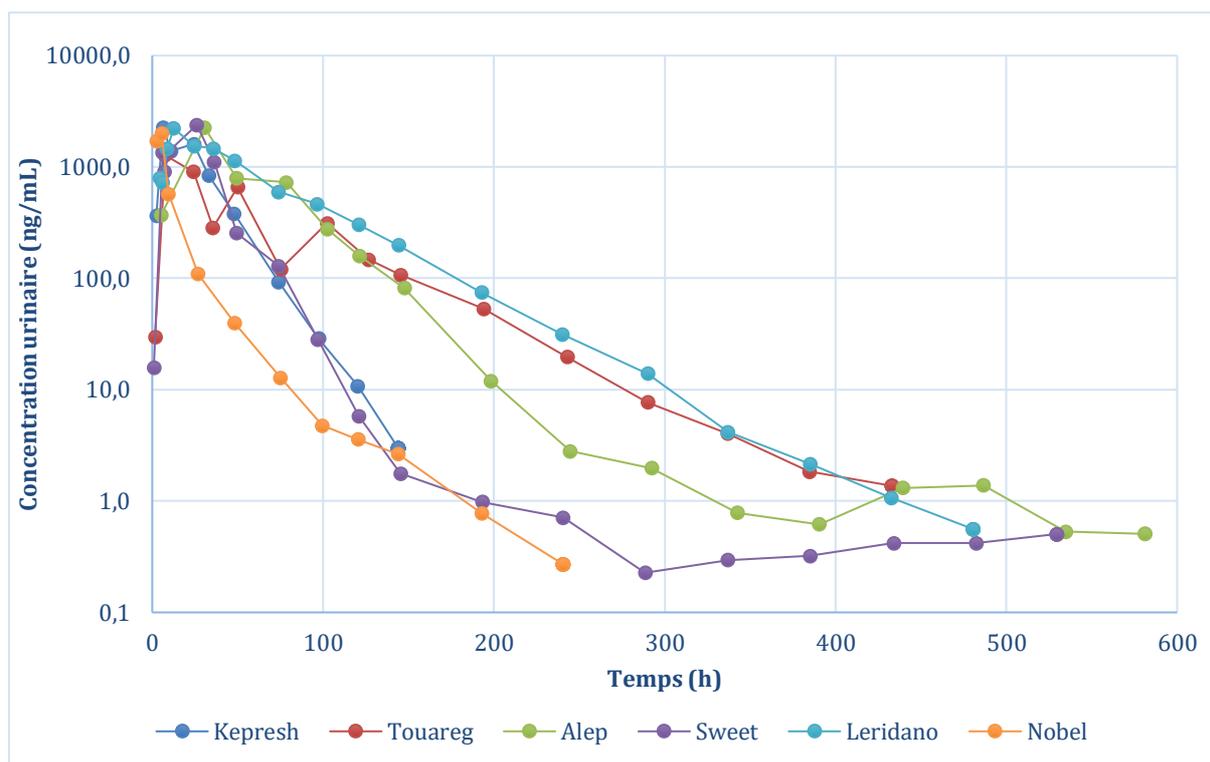
Le témazépam était le métabolite retrouvé en plus grande quantité avec des concentrations maximales variant de 2 100ng/mL à 9 100ng/mL lors de la première ou de la seconde miction selon les chevaux et ce dans un délai maximum de 7.6h. Les six chevaux présentaient des concentrations inférieures à 10 ng/mL après 243h post-administration. Après 385h, cinq chevaux n'avaient plus des concentrations détectables de témazépam, dont un 147.6h après administration. Le dernier cheval, Touareg, n'a plus présenté de concentration détectable à 577.6h post-administration.



Graphique 18 : Concentrations urinaires de témazépam chez 6 chevaux suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg

4.3. Cinétique des concentrations urinaires de l'oxazépam

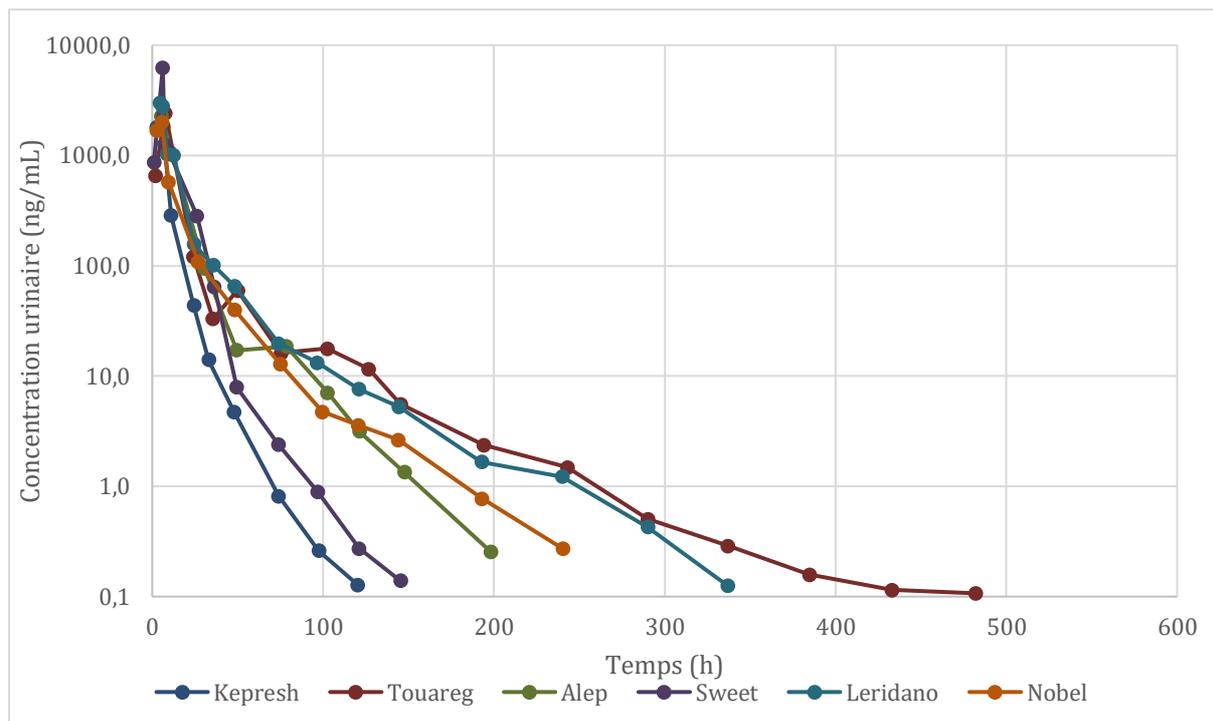
Les six chevaux ont présenté des pics de concentrations, entre 1 270ng/mL et 2 390ng/mL, plus tardifs (jusqu'à 30h post administration) par rapport au diazépam et au témazépam. Parmi les six chevaux, le premier prélèvement présentant une concentration indétectable était à 192.5h post administration et le dernier à 578.3h. L'oxazépam était donc le métabolite détectable le plus longtemps dans l'urine.



Graphique 18 : Concentrations urinaires d'oxazépam chez 6 chevaux suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg

4.4. Cinétique des concentrations urinaires du nordiazépam

Le nordiazépam a été retrouvé rapidement dans les urines après injection intraveineuse de diazépam puisque les pics de concentrations – 1 830 ng/mL à 6 250 ng/mL - correspondaient aux 2 premières mictions dans un délai maximum de 7.6h. La décroissance de ces concentrations a été la plus rapide puisque 145.3h après administration intraveineuse de diazépam les concentrations urinaires en nordiazépam des six chevaux étaient inférieures à 10 ng/mL. Après 385h, cinq chevaux n'avaient plus de concentration détectable de nordiazépam, dont un 144h après administration. Le dernier cheval, Touareg, n'a plus présenté de concentration détectable à 529.3h post administration.



Graphique 20 : Concentration urinaire de nordiazépam chez 6 chevaux suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg

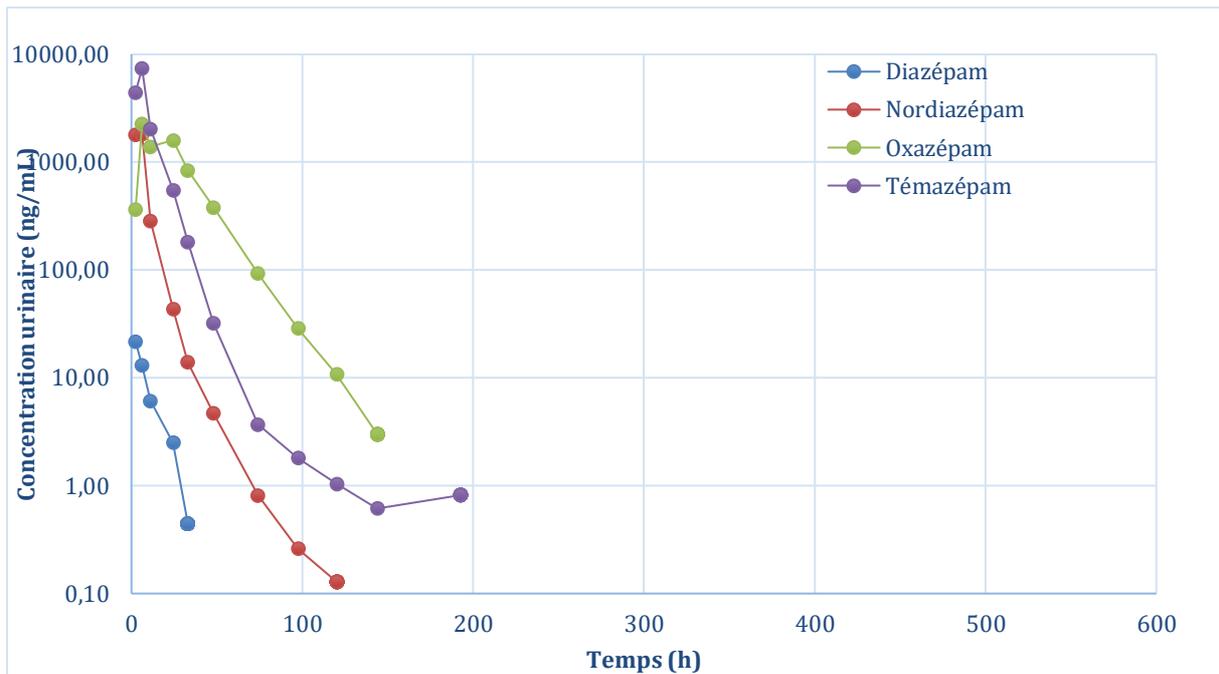
4.5. Conclusion sur les cinétiques des concentrations urinaires du diazépam et de ses métabolites

Les concentrations urinaires de diazépam sont très faibles comparées à celles de ses métabolites (facteur 100 à 500). Les données obtenues semblent indiquer que le diazépam est rapidement métabolisé par hydroxylation et déméthylation et très peu éliminé dans les urines sous forme inchangée ou sous forme glucuronoconjuguée. Ainsi dans le cadre du contrôle des médicaments, le diazépam – qui devient indétectable entre 48 et 145h – ne semble pas être la molécule à rechercher dans les urines. La recherche du témazépam dont la concentration urinaire devient indétectable entre 147.6h et 630h semble plus pertinente. Le tableau 7 ci-après récapitule les principales informations concernant leur cinétique plasmatique

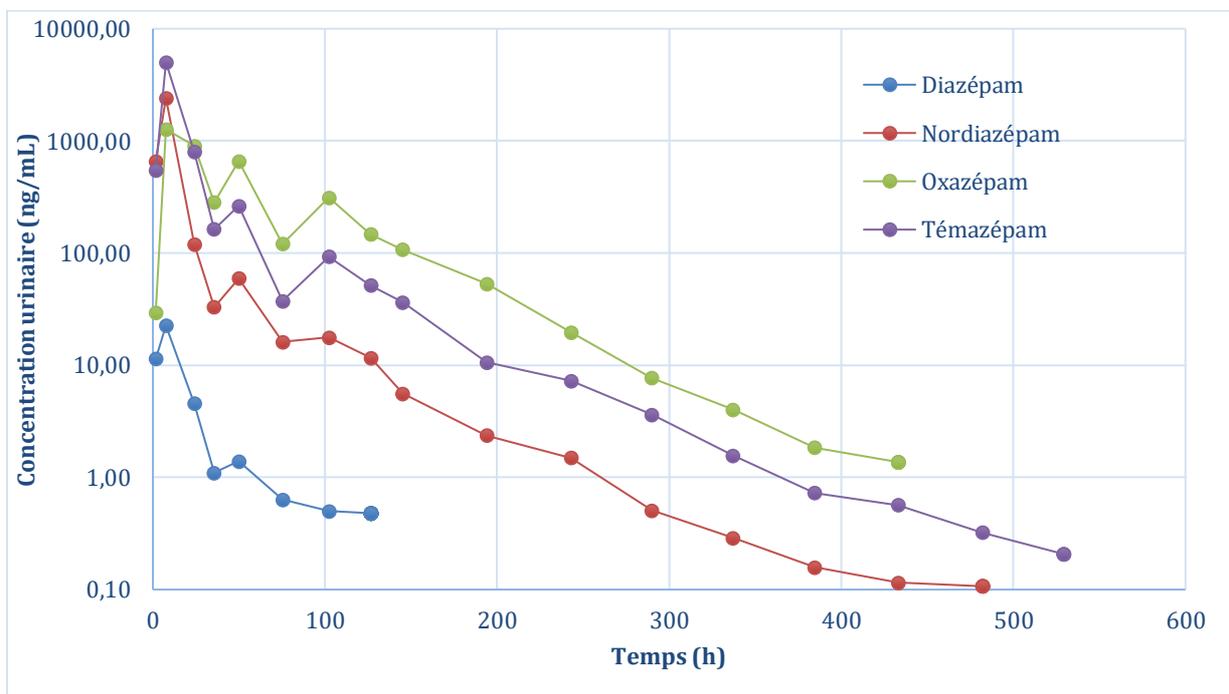
Tableau 7 : Récapitulatif des informations principales concernant les cinétiques des concentrations urinaires du diazépam et de ses principaux métabolites

	Diazépam	Témazépam	Oxazépam	Nordiazépam
Cmax (intervalle) (ng/mL)	12-23	2100-9100	1270-2390	1830-6250
Tmax (intervalle) (h)	2,4-7,6	4,3-7,6	6,3-30,5	4,3-7,6
Durée à partir de laquelle toutes les concentrations sont inférieures à 10ng/mL (h)	30,5	243	337	145,3

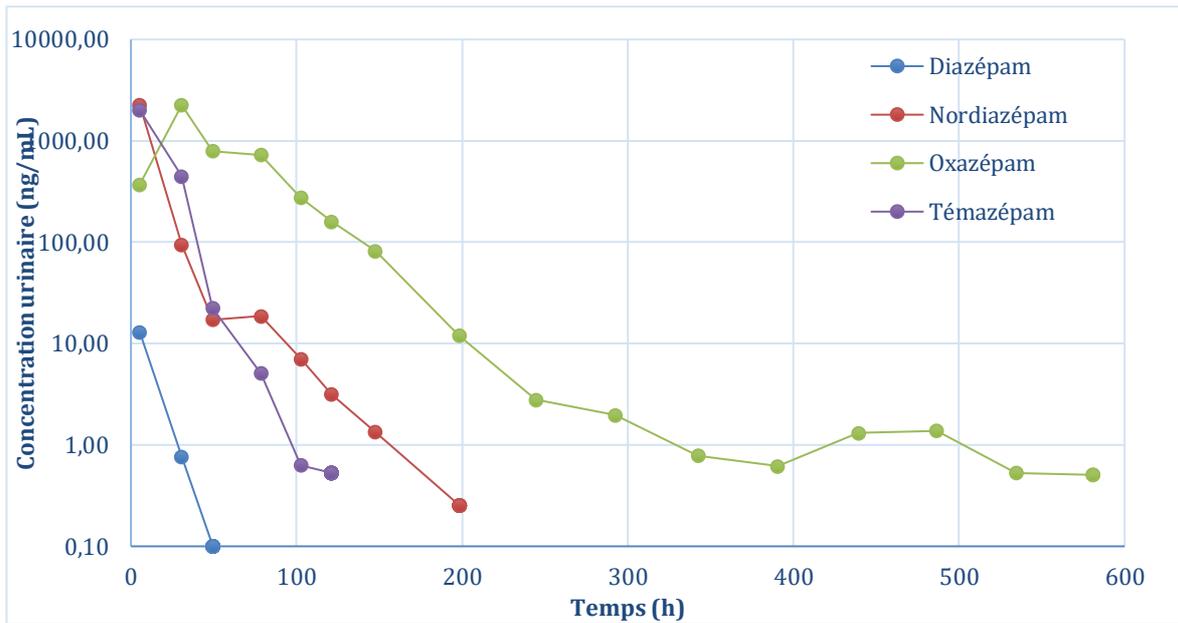
En observant les profils de concentrations de chaque cheval, sur les graphiques 21 à 26, deux groupes semblent ressortir ; le groupe 1 avec Kepresh, Alep et Sweet, et le groupe 2 avec Touareg, Nobel, Leridano. Les chevaux du groupe 1 présentaient une disparition rapide du diazépam dans les urines et des deux métabolites produits directement à partir du diazépam : le nordiazépam et l'oxazépam. À l'inverse les chevaux du groupe 2, présentaient une disparition plus lente du diazépam et de ses métabolites dans les urines.



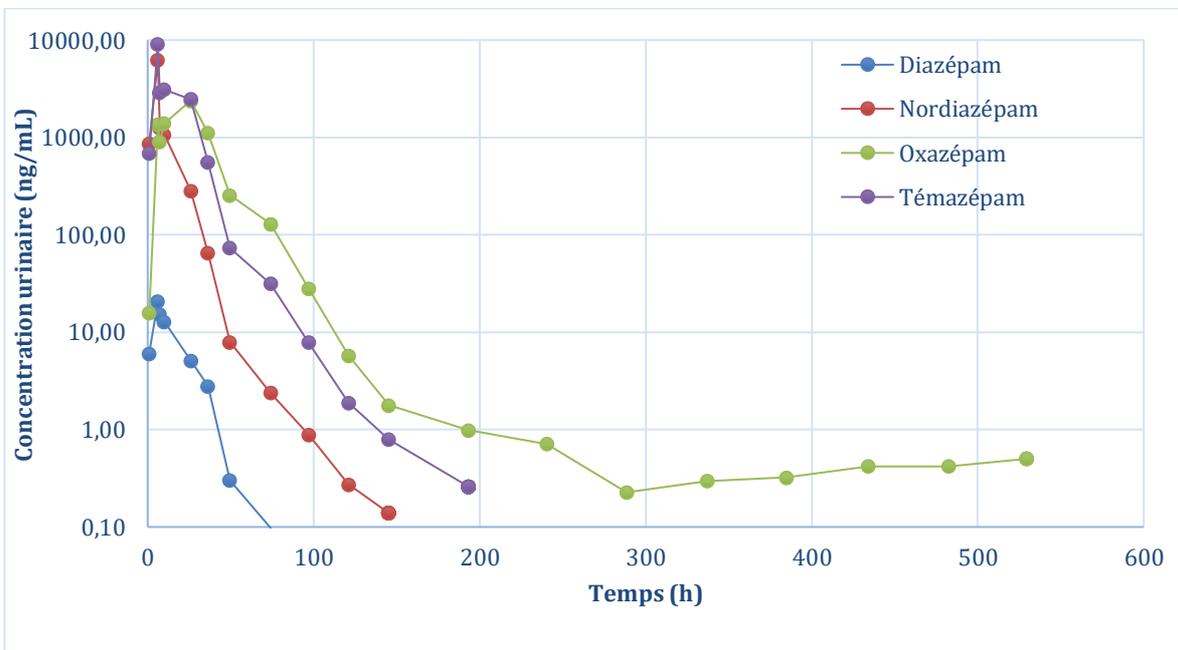
Graphique 19 : Concentrations urinaires chez Kepresh suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg



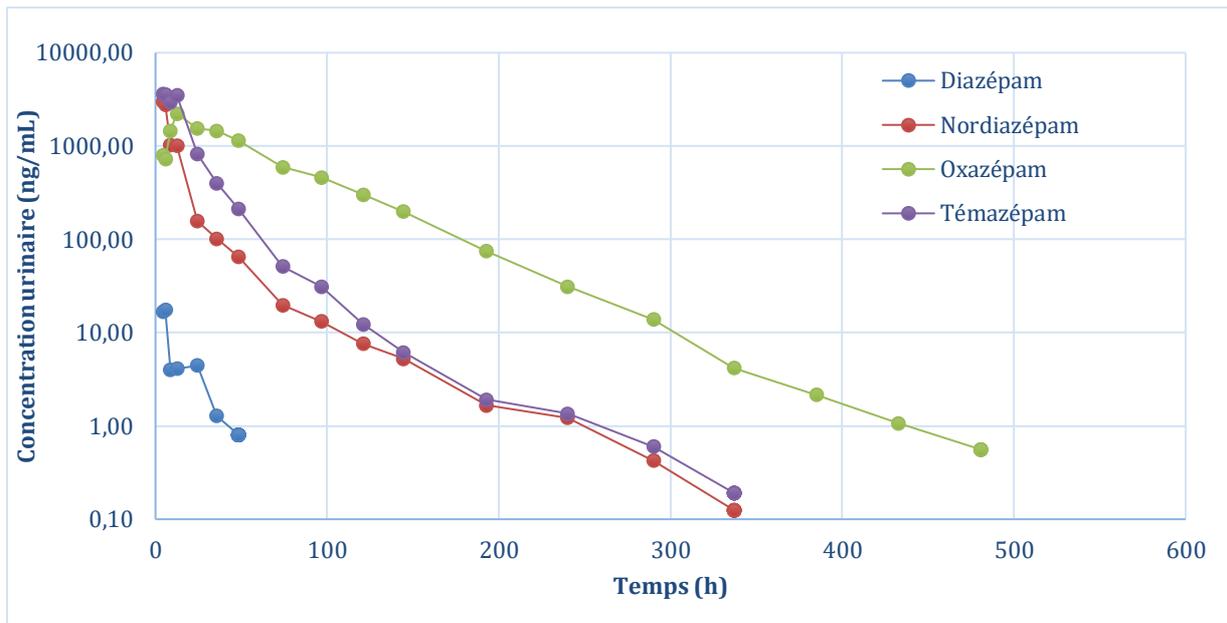
Graphique 20 : Concentrations urinaires chez Touareg suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg



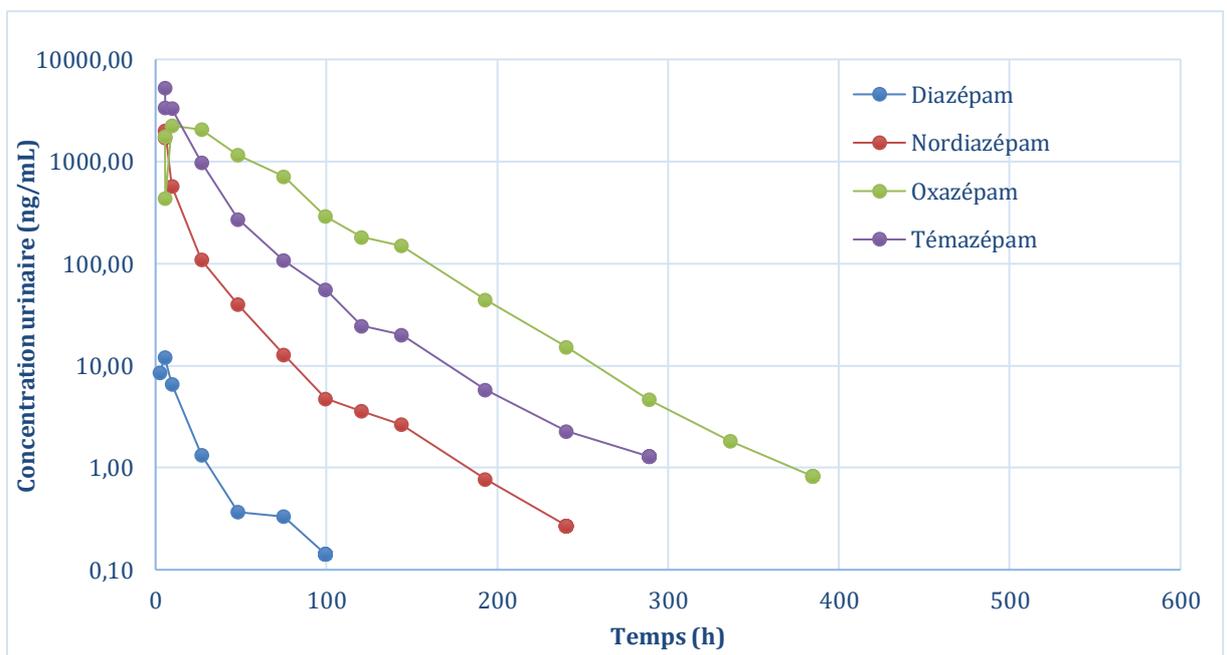
Graphique 21 : Concentrations urinaires chez Alep suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg



Graphique 22 : Concentrations urinaires chez Sweet suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg



Graphique 23 : Concentrations urinaires chez Leridano suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg



Graphique 24 : Concentrations urinaires chez Nobel suite à une administration intraveineuse unique de Valium® 10mg/ml à 0,2mg/kg

V. CALCUL DU TEMPS DE DETECTION ET DE RETRAIT DU DIAZEPAM

5.1. Temps de détection plasmatique

Rappelons que le temps de détection est défini comme étant l'intervalle de temps séparant la dernière administration du médicament et le temps pour lequel tous les chevaux étudiés sont considérés comme étant négatifs.

Les temps de détection déterminés pour différentes limites de détection par simple lecture graphique sont rapportés dans le tableau 8. Notons qu'entre les seuils de détection de 0,01 et 0,05 nous n'avons pas eu de différences de temps de détection car les prélèvements sanguins étaient espacés de 48h.

Tableau 8 : Temps de détection du diazépam dans le plasma selon les limites de détection

Limite de détection (ng/mL)	0,01	0,05	0,1
Temps de détection (h)	240	240	192

Nous avons ensuite déterminé le temps de détection par le calcul de la méthode Toutain et Lassourd présentée plus haut. Le tableau 9 récapitule les paramètres nécessaires au calcul et les temps de détection calculés par cheval sont comparés aux temps observés dans le tableau 10.

Tableau 9 : Valeurs de lambda z et d'intercept par cheval

Cheval	lambda Z (h ⁻¹)	Intercept (ng/mL)
Kepresh	0,07	39,91
Touareg	0,02	55,80
Alep	0,13	6734,63
Sweet	0,08	2033,81
Leridano	0,02	96,40
Nobel	0,02	92,35
MOYENNE	0,03	92,57

Pour les six chevaux, lambda Z était compris entre 0.02 et 0.13 h⁻¹ et l'intercept Tau était compris entre 39.91 et 6734,63 ng/mL.

Tableau 10 : Temps de détection du diazépam dans le plasma observés et calculés selon les limites de détection

Obtention	Observé	Calculé	Observé	Calculé	Observé	Calculé
Cheval	DT (h) avec LOD=0,01		DT (h) avec LOD=0,05		DT (h) avec LOD=0,1	
Kepresh	72,00	54,69	72,00	44,07	48,00	39,50
Touareg	240,00	214,42	240,00	174,42	192,00	157,19
Alep	72,00	43,46	48,00	38,24	36,00	36,00
Sweet	96,00	68,08	72,00	59,12	72,00	55,26
Leridano	240,00	164,58	192,00	135,71	144,00	123,27
Nobel	240,00	174,16	192,00	143,46	120,00	130,24

Ainsi en choisissant la LOD à 0.05ng/ mL, le temps de détection observé a été de 240h soit 10 jours (de 72 à 240 h) sur les six chevaux de l'étude, et le temps de détection calculé était de 174.42h soit 8 jours (de 44.07 à 174.42h). Evidemment, lors d'un contrôle anti-dopage, il faut limiter les faux négatifs donc le temps de détection officiel choisi serait au minimum le plus long des 6 chevaux.

5.2. Temps de détection urinaire

De même nous présentons ici les temps de détection dans les urines pour différentes limites de détection (0.05, 0.1 et 1ng/mL) par simple lecture graphique. Ainsi le temps de détection urinaire du diazépam pour une LOD de 0.5ng/mL était de 102.3h et donc bien inférieur au temps de détection plasmatique ce qui est cohérent avec une élimination du diazépam majoritaire via les métabolites.

Tableau 11 : Temps de détection du diazépam dans les urines selon les limites de détection

Limite de détection (ng/mL)	0,1	0,5	1
Temps de détection (h)	145,3	102,3	75,3

5.3. Temps de retrait

Le tableau 12 ci-après récapitule les différents paramètres nécessaires au calcul du temps de retrait, temps pour lequel les concentrations sont inférieures à l'IPC, ainsi que l'estimation d'un temps de retrait pour différentes valeurs d'EPC.

**Tableau 12 : Temps de retrait du diazépam dans le plasma, calculés selon l'EPC
calculé et EPC=70ng/mL**

Obtention	WinNonLin	Dose/clairance	EPC/500	$1,44 \times \tau \times \log$ (intercept τ /IPC)	$1,44 \times \tau \times \log$ (intercept τ /IPC)
Cheval	Clairance plasmatisque (mL/min/kg)	EPC (ng/mL)	IPC (ng/mL)	WT (h) avec EPC=70ng/mL	WT (h) EPC calculé
Keprash	8096,15	24,70	0,05	37,21	44,07
Touareg	17851,98	11,20	0,02	148,55	194,00
Alep	2707,04	73,88	0,15	34,85	34,67
Sweet	2892,24	69,15	0,14	53,28	53,35
Leridano	14348,60	13,94	0,03	117,02	145,91
Nobel	15521,29	12,89	0,03	123,59	155,81
MOYENNE	5831,97	19,54	0,04	49,33	59,02

Après application du SF de 500, l'EPC calculée à partir des clairances, est en moyenne de 20ng/mL contre 70ng/mL dans la littérature, soit une IPC de 0,04ng/mL en moyenne (de 0,02 à 0,15ng/mL) contre 0,14ng/mL.

Le WT était de 194h soit 8 jours (entre 44.07 et 194h) avec l'EPC calculé contre 148.55 un peu plus de 6 jours (entre 37,21 et 148.55h) avec l'EPC issue de la littérature. Encore une fois, il est important de prendre le WT le plus long afin d'inclure tous les chevaux.

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de déterminer les temps de détection du diazépam dans le plasma et l'urine après une administration intraveineuse unique de 0.02mg/kg de diazépam.

Il a été montré sur les 6 chevaux de l'étude que le temps de détection du diazépam était de 240h pour une LOD de 0.05ng/mL dans le plasma et de 102.3h pour une LOD de 0.5ng/mL dans l'urine.

Le temps de retrait a été estimé à 194h.

Cette étude a confirmé que les principaux métabolites du diazépam produits chez le cheval sont le nordiazépam, le témazépam et l'oxazépam, Cette observation met en évidence une incohérence dans la législation de la FEI. En effet, comme le montre les extraits des listes des substances contrôlées et interdites en annexe 3 et 4, le diazépam et l'oxazépam sont des substances contrôlées, dont l'utilisation thérapeutique est considérée comme thérapeutique chez le cheval alors que le témazépam et le nordiazépam sont considérés comme des substances interdites, c'est-à-dire qui ne doivent jamais être retrouvées dans l'organisme du cheval, ce qui sera inévitablement le cas lors d'utilisation de diazépam.

Concernant la réglementation des courses L'IFHA, International Federation of Horseracing Authorities classe le diazépam, l'oxazépam et le témazépam en classe 3 des substances prohibées, ce que l'on pourrait comparer aux substances contrôlées et ne classe pas le nordiazépam. La FNCH, elle, ne donne pas de liste nominative des substances contrôlées que ce soit pour le trot ou le galop.

I. EFFETS CLINIQUES DU DIAZEPAM

Nous avons observé des effets cliniques indésirables graves lors de l'injection de diazépam à la dose de 0.2mg/kg. Trois chevaux sont en effet tombés lors de l'injection de diazépam sans que l'on puisse juger de leur état de conscience. Cette première observation permet de s'interroger sur l'intérêt et les modalités de dopage avec cette molécule. Elle n'est administrée par IV à cette dose (ou plus) que lors de crises d'épilepsie. Pour une sédation ou une induction, la dose est réduite de moitié. [44] Pour obtenir des effets tranquillisants à long terme, une administration chronique à faible dose paraîtrait donc plus intéressante. Cette différence entre notre étude (IV bolus unique à forte dose) et le potentiel usage dopant (IV bolus répétés à faibles doses) représente une première limite à notre l'étude qui n'a pas exploré l'accumulation à doses répétées.

Après l'observation de ces effets indésirables sur le premier individu, il a été décidé de rallonger le temps d'injection pour les individus suivants à 2 minutes, puis les effets étant encore observés chez un autre cheval, à 3 minutes. Les chronomètres pour la cinétique étaient déclenchés à l'issue de la fin de l'injection. Ainsi, le premier prélèvement réalisé à H0,08 (5 minutes) était à 6 minutes post début d'administration pour certains contre 8 minutes post début d'administration pour d'autres. Or comme nous l'avons vu sur les courbes obtenues, le diazépam présente une distribution très rapide. Ainsi quelques minutes d'écarts jouent une grande différence dans les concentrations du premier prélèvement. En effet, il existait un écart non négligeable de 30% entre les C_{max} du cheval avec la concentration plasmatique la plus basse et celui avec la concentration la plus haute. Cependant, le seul temps de prélèvement après le début de l'injection n'explique pas les différences de C_{max} . Un autre facteur rentre donc en jeu. Les chevaux ayant bien reçu la dose totale prévue, ceci ne peut être mis en cause. La distribution du diazépam est extrêmement rapide après l'administration et il est possible que même en ayant fait le premier prélèvement entre 6 et 8 min, les différences de C_{max} soient dues à des différences de vitesse de distribution.

Compte-tenu des contre-indications relatives à l'utilisation du diazépam, selon les capacités rénales et hépatiques, et bien que tous les animaux de cette étude aient été déclarés sains suite à un examen clinique classique préalablement à l'étude, un bilan hépatique et rénal complet aurait pu être intéressant afin de déterminer si tous les chevaux avaient des capacités d'élimination et de métabolisation similaires. Cependant en pratique, sans signes cliniques évidents, les capacités rénales et hépatiques des chevaux de compétitions ne sont pas évaluées non plus.

II. SUIVI DES CONCENTRATIONS

Hormis ces réflexions sur la concentration maximale, le suivi des concentrations plasmatiques du diazépam était satisfaisant avec le protocole mis en place. Pour analyser la métabolisation du diazépam plus en détail et pouvoir exploiter tous les dosages de métabolites, il aurait fallu administrer chacun des métabolites par IV afin de calculer leur clairance. Ces administrations n'étaient malheureusement pas possibles dans ce protocole compte tenu du temps nécessaire à la conduite des expériences, de la non disponibilité des produits en quantité suffisante et de leur possible toxicité.

Pour les concentrations urinaires, le suivi a été effectué sur des mictions spontanées par conséquent avec des temps de prélèvements post-administration dépendant des chevaux. Il aurait été possible de prélever les chevaux par sondage le premier jour post-administration mais il aurait probablement fallu tranquilliser le cheval ce qui aurait pu interférer avec les résultats de l'étude. Par ailleurs, cette méthode aurait probablement été plus dangereuse pour le manipulateur et aurait été une source d'inconfort pour le cheval. Il est intéressant de remarquer que malgré les mictions spontanées sélectionnées pour cette étude, les écarts entre le temps prévu et le temps réel n'excédaient pas 10% après 48h. Ainsi le suivi de la cinétique d'élimination terminale a probablement été peu impacté par ce mode de récolte des urines.

Notons de plus que les concentrations mesurées ici ne nous permettent en aucun cas de déduire les quantités de produits excrétés puisque le volume des mictions a fortement varié entre les temps de prélèvements et les chevaux. Mesurer le volume d'urine recueilli aurait permis de connaître les quantités et de calculer les vitesses d'élimination dans les urines. Il s'agit d'un écueil majeur du protocole qui a été pensé par rapport aux conditions du contrôle anti-dopage sur le terrain. En pratique, lors des contrôles anti-dopage, les analyses sont effectuées sur un unique prélèvement quel que soit l'état d'hydratation de l'animal. La variabilité liée à ces facteurs dans notre étude, est donc représentative des prélèvements fait sur le terrain.

Nous avons donc travaillé uniquement sur des concentrations dans cette thèse. La diurèse dépend de nombreux facteurs, notamment l'abreuvement, la transpiration et le travail. Il faut donc prendre en compte que les concentrations urinaires obtenues sont fortement dépendantes du comportement et de l'activité de chaque individu. Ainsi il a été remarqué que certaines courbes obtenues présentaient des rebonds. Par exemple, les concentrations en témazépam du cheval Touareg ont présenté à deux reprises des rebonds à H50 et H102.3. Ceci s'explique par le fait que les données obtenues sont des concentrations urinaires et non des quantités excrétées. En effet, les quantités excrétées doivent décroître en fin de cinétique mais pas obligatoirement les concentrations qui dépendent aussi du volume d'urine produit. Ceci est en accord avec l'observation de rebonds pour toutes les molécules au même temps de prélèvement ce qui ne serait pas le cas s'il s'agissait d'erreur analytique.

III. DIAZEPAM ET FACTEURS INDIVIDUELS

3.1. L'âge

Cette étude comprenait des animaux de 7 à 12 ans, donc avec un écart d'âge assez limité. Les chevaux de compétition sont au pic de leur carrière autour de 11 ans mais ils concourent de 4 à 18 ans. En course, les chevaux sont souvent plus jeunes mais sont tout de même adultes avec des capacités d'élimination et de métabolisation probablement similaires.

3.2. La race

Les humains ayant opéré une forte sélection sur l'espèce équine depuis des milliers d'années, des races distinctes sont devenues apparentes. Sans les comparer aux chevaux de trait, il existe de fortes différences au sein même des chevaux de sport, entre un cheval de course et un cheval de dressage. Ces différences morphologiques peuvent notamment avoir un impact sur la distribution (pourcentage de tissus adipeux).

Pour rappel notre étude comprenait, trois chevaux inscrits au stud-book des Pur-sang, et trois chevaux de type sport dont un pure race espagnole, un cheval de sport espagnol et un cheval de selle d'origine non constatée. Le pur-sang est un des plus vieux stud-books remontant à plus de 300 ans notamment avec la volonté de produire des galopeurs. Une particularité de cette race est la faible variation génétique (hétérozygotie moyenne $H = 0.353 \pm 0.065$), en effet 10 juments fondatrices sont à l'origine de 72% de cette lignée et un seul étalon fondateur est responsable de 95% de la lignée. Ainsi le polymorphisme est fortement réduit chez les pur-sang par rapport à d'autres races et l'on peut s'attendre à une plus faible variation du métabolisme. [45], [46] Les groupes de tendances établis plus haut sur les vitesses d'élimination du diazépam et de ses métabolites pourraient correspondre à ce facteur race. En effet, les 3 pur-sang Kepresh, Sweet et Alep semblaient éliminer plus vite le diazépam et ses métabolites. De plus, un autre facteur pouvant également entrer en jeu était l'état d'embonpoint.

3.3. L'état d'embonpoint

Dans notre panel, les chevaux sont au travail en bon état général et relativement musclés. Leur état d'embonpoint n'a pas été mesuré de façon objective, il est cependant évident de façon subjective qu'un des chevaux, Touareg, présentait un état d'embonpoint modéré (561 kg pour 1,51m) comme le témoigne la figure 6. Ainsi nous suspectons fortement que la persistance du diazépam et de ses métabolites chez ce cheval soit liée à ce facteur.



Figure 6 : Morphologies de Kepresh (gauche) et Touareg (droite), été 2017

Dès 1983, Abernethy et al ont mis en évidence l'accumulation de diazépam chez les hommes obèses recevant un bolus de 10mg de diazépam en IV (pour des sujets pesant entre 60 et 90 kilogrammes). Le temps de demi-vie d'élimination était de 32h en moyenne contre 82h chez les sujets obèses. L'augmentation du temps de demi-vie s'expliquait notamment par la forte augmentation du volume de distribution (70L contre 228L). En revanche, la clairance n'était que très peu affectée. Des résultats similaires ont été décrits pour le nordiazépam. [47]

Cette réflexion sur un cas particulier met en évidence la difficulté de mettre en place une limite universelle. Autant la variabilité individuelle dans le domaine des courses de galop semble très limitée avec une majorité de pur-sang, autant entre les disciplines, les chevaux présentent de nombreux facteurs de variations. Cela ressort déjà sur notre panel de chevaux entre les réformés de courses et les chevaux typés dressage ou poney.

IV. TEMPS DE DETECTION ET DE RETRAIT

4.1. Les hypothèses de la méthode Toutain

Le temps de retrait calculé à partir de la méthode de Toutain et Lassourd était de 194h pour les chevaux de l'étude et de 148.55h avec l'EPC de la littérature. Ces temps sont donc plus courts que les temps de détection obtenus de façon expérimentale. Cependant, il convient de remarquer que plusieurs hypothèses discutables ont été faites lors des calculs.

L'EPC calculée selon la méthode Toutain et Lassourd, repose sur l'hypothèse que la substance agit sur 24 h et qu'il est attendu que l'efficacité soit assez constante sur ces 24h. L'exemple cité dans la publication est la phénylbutazone. Or, le diazépam présente une action courte. Lorsqu'il est administré pour l'induction de l'anesthésie, la durée de l'effet attendue est de quelques minutes à quelques dizaines de minutes. Il est donc préférable de nous baser sur la littérature pour la concentration effective qui a été décrite à 70 ng/mL. [33]

De même, dans les critères de la méthode Toutain et Lassourd, la dose choisie pour les expérimentations doit être la plus petite dose recommandée par l'AMM. En pratique, il n'y a pas d'AMM équine pour le diazépam donc pas de dose recommandée. Dans cette étude, la dose administrée a été de 0,2 mg/kg alors que la dose minimale décrite dans la littérature est de 0,02 mg/kg. Dans l'hypothèse que la cinétique du diazépam est linéaire et en appliquant la même méthode nous obtiendrons les valeurs de temps de détection présentées dans le tableau 13 ci-dessous. Les écarts ont été inférieurs à deux jours pour tous les chevaux sauf pour Touareg où le temps de détection serait ramené de 8 à 5 jours.

Tableau 13 : Comparaison des temps de détection du diazépam selon la dose administrée

Cheval	DT (h) dose /10	DT (h) dose réelle	Ecart en jours
Keprash	28,89	44,07	<1
Touareg	117,19	174,42	3
Alep	30,79	38,24	<1
Sweet	46,29	59,12	1
Leridano	94,40	135,71	<2
Nobel	99,54	143,46	<2
MOYENNE	50,90	81,60	<2

Notons que pour fixer un temps de détection sur le diazépam, il faut que les métabolites soient également inactifs à ce temps de détection. Dans cette étude, les concentrations en métabolites étaient toujours inférieures à celles du diazépam. De plus le nordiazépam (métabolite majoritaire) a une affinité intrinsèque de 0.47 en considérant celle du diazépam à 1 et nous avons fait l'hypothèse que sa concentration effective serait approximativement égale à 70 ng/mL multiplié par 1/0.47 c'est-à-dire environ 140ng/mL [33], [34]. Cette concentration n'a jamais été atteinte lors de cette étude (maximum 87 ng/mL) nous avons donc considéré que nous pouvions négliger la présence de métabolites.

4.2. Mise en garde

Enfin, nous attirons l'attention des vétérinaires et des lecteurs sur les points suivants rappelés par l'EHSCL.

Les dispositions des autorités hippiques et équestres en ce qui concerne la détection des substances prohibées engagent la stricte responsabilité de l'entraîneur et la publication de cette information ne change en rien cette disposition. En l'occurrence, le vétérinaire praticien doit exercer son expertise professionnelle lorsqu'il est amené à

donner un avis sur ce sujet.

Les points suivants doivent être clairement exposés :

- ✓ Lors de ces expérimentations, les substances ont été administrées à des chevaux sains, qui n'étaient pas entraînés dans des conditions identiques à celles d'un entraînement professionnel.
- ✓ L'usage de ces substances dans des conditions thérapeutiques sur des chevaux malades serait susceptible d'induire un délai de détection plus long du fait de facteurs tels que des modifications du pH urinaire, des altérations des processus de métabolisme ou d'excrétion.
- ✓ L'effet engendré par différents programmes d'entraînement du cheval, des régimes alimentaires variés et des conditions d'entretien des boxes est susceptible d'entraîner des variations dans les temps d'élimination des substances.
- ✓ Les temps de détection ne sont applicables que dans le respect des formulations des formes galéniques et des posologies décrites dans ce document.

Quelle que soit la voie d'administration, le risque d'ingestion, par le cheval traité, de litière contaminée par les excréta risque d'augmenter significativement et de façon imprévisible le délai de détection des substances administrées. En conséquence un nettoyage « à fond » et régulier du box est indispensable. Les « temps de détection » estimés dans ce document ne sont pas synonymes de « temps d'élimination ». Afin de calculer un délai d'élimination, une marge de sécurité adaptée doit être appliquée au temps de détection. Cette marge de sécurité doit être choisie par le vétérinaire praticien en fonction de son expérience professionnelle en tenant compte des formes galéniques ainsi que des modifications biologiques et pharmacologiques afin de réduire le risque de positivité le jour de la course. Il est du seul ressort du vétérinaire d'exercer son jugement professionnel afin de fournir les renseignements les plus judicieux et les plus adaptés aux circonstances, avant de conseiller un délai préalable à un engagement en compétition. Il convient de rappeler que c'est au moment de la déclaration de partants que le cheval doit avoir éliminé les substances prohibées.

Nous déclinons toute responsabilité quant aux conséquences directes ou indirectes survenues à quiconque utiliserait les informations figurant au présent document ou s'en servirait comme argument à quelque fin que ce soit.

CONCLUSION

Notre étude nous a permis d'établir les cinétiques plasmatiques et urinaires du diazépam et de ses métabolites ainsi que des valeurs de référence pour les données pharmacocinétiques du diazépam chez le cheval. Nous avons notamment pu mettre en évidence la grande variabilité de ses valeurs avec a priori comme facteurs dominants la race et l'état d'embonpoint.

A l'aide de ces données nous avons également pu proposer un temps de détection et un temps de retrait afin d'aider les vétérinaires à conseiller les propriétaires.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Aude FERRAN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Astrid MEULY intitulée « Pharmacocinétique du diazépam chez le cheval dans le cadre de la lutte anti-dopage » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20/06/2019
Docteur Aude FERRAN
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

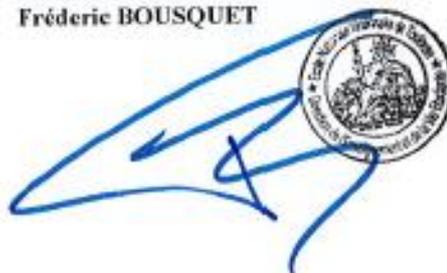


Vu :
Le Président du jury :
Professeur Bettina COUDERC



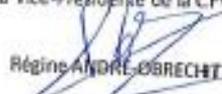
Mme Astrid MEULY
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 20/06/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Laboratoire des Courses Hippiques, "Présentation du bilan de l'année 2018 du contrôle anti-dopage dans les courses hippiques françaises," 2019.
- [2] Lascoux, "Normandie. Chevaux dopés: Fabrice Souloy toujours privé d'entraîner," *Ouest France*, 2018. .
- [3] Giersak F., "Evolution et perspectives du controle antidopage chez le cheval.," 1994.
- [4] Mercier E., "Le dopage chez le cheval de sport.," 1989.
- [5] Main De Boissiere A., "La lutte contre le dopage chez l'athlète équin : étude rétrospective portant sur 703 cas dépistés entre 2007 et 2011 en sports équestres et courses hippiques.," 2013.
- [6] Barboussat C., "Chevaux de course,chevaux de sport et contrôles anti-dopage : situation en 2006.," 2007.
- [7] FRANCE GALOP, "CODE DES COURSES AU GALOP," 2019.
- [8] FEDERATION FRANCAISE D'EQUITATION, "REGLEMENT DES COMPETITIONS FFE DISPOSITIONS GENERALES Applicable au 3 septembre 2018," 2018.
- [9] Fédération Equestre Internationale, "2019 VETERINARY REGULATIONS 14 th Edition 2018, effective 1 January 2019," 2018.
- [10] Kamerling S., "Assessment of Drug Effects on Performance," *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, vol. 9, no. 3, pp. 493–510, Dec. 1993.
- [11] Courtot D. and Jaussaud P., *Le controle antidopage chez le cheval*, INRA. 1990.
- [12] Gastellu J., "Le doping du cheval.," 1968.
- [13] Tobin T., "Medication of performance horses," *Equine Med. Surgery, Am Vet Pub, Inc, St. Barbar. , CA*, vol. 9, no. 3, pp. 158–172, 1989.
- [14] Wong J. and Wan T., "Doping control analyses in horseracing: A clinician's guide.," *Vet. J.*, no. 200, pp. 8–16, 2014.
- [15] Gadot P-M., "Réglementation de la lutte contre le dopage du cheval," *Bull. l'Académie Vétérinaire Française*, no. 158, 2005.
- [16] Dematteo R., "Le dopage chez l'athlète équin, étude spécifique des corticoïdes et étude expérimentale sur l'élimination urinaire d'un corticoïde: le

- DEXADRESON ND.," 2005.
- [17] Rannaud J-M., "Le contrôle antidoping en France.," *Bull. des Sociétés Vétérinaires Prat. Fr.*, vol. 73, pp. 71–79, 1989.
- [18] Catlett J-G., "Tests for drugs in thoroughbreds.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, no. 94, pp. 650–651, 1939.
- [19] Bonnaire Y, "Contrôle des substances prohibées chez le chevaux : aspects techniques et nouvelles perspectives Detection of prohibited substances in horses: technical aspects and new prospects," *Bull. l'Académie Vétérinaire Française*, vol. 158, pp. 47–50, 2004.
- [20] FNCH, "Le contrôle antidopage." [Online]. Available: <http://www.fnch.fr/index.php/controle-des-courses/le-controle-antidopage>. [Accessed: 19-May-2019].
- [21] Lambolez P-E., "Aspect réglementaires et techniques de la lutte contre le dopage dans le milieu équestre: conséquences sur les performances," p. 147, 2011.
- [22] EHSLC, "About Us | EHSLC." .
- [23] Ministère des Sports, "Code du sport - Article L241-2 | Legifrance." .
- [24] "La FFE / Accueil / Sites FFE - Portail FFE," May 2019.
- [25] Muller H., "Clean Sport History."
- [26] Toutain P-L, "Du contrôle anti-dopage aux contrôles des médicaments chez le cheval : l'approche européenne," *Bull. Acad. Vet. Fr.*, no. 1, p. 31, Oct. 2005.
- [27] Toutain and Lassourd, "Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentrations in postcompetition samples for drug control in the horse.," *Equine Vet. J.*, vol. 34, no. 3, pp. 242–9, 2002.
- [28] Bruyas J-F., "Lutte contre le dopage dans les sports hippiques et équestres en France : principes et pratiques.," *Bull. des GTV*, no. 71, pp. 81–89, 2013.
- [29] Toutain P-L, "Contrôle D Exposition Etc," no. 1, pp. 31–40, 2004.
- [30] Riviere J., *Veterinary Pharmacology and Therapeutics 9th edition*. 2009.
- [31] Shini S., "A REVIEW OF DIAZEPAM AND ITS USE IN THE HORSE," *J. Equine Vet. Sci.*, vol. 20, no. 7, pp. 443–449, 2000.
- [32] Shini S., "Kinetics of elimination of diazepam after intravenous injection in horses.," *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, vol. 104, no. 1, pp. 22–5, Jan. 1997.
- [33] Dhir A. and Rogawski M., "Determination of minimal steady-state plasma level

- of diazepam causing seizure threshold elevation in rats.," *Epilepsia*, vol. 59, no. 5, pp. 935–944, 2018.
- [34] Gobbi M., Barone D., Mminit T., and Garattini S., "Diazepam and desmethyldiazepam differ in their affinities and efficacies at 'central' and 'peripheral' benzodiazepine receptors," *J. Pharm. Pharmacol.*, no. 39, pp. 388–391, 1987.
- [35] Med'vet, "Med'Vet - Médicament DIAZEPAM® TVM 5 mg/ml Solution injectable pour chiens et chats." .
- [36] Riss J., Cloyd J., J. Gates, and Collins S., "Benzodiazepines in epilepsy: Pharmacology and pharmacokinetics," *Acta Neurol. Scand.*, vol. 118, no. 2, pp. 69–86, 2008.
- [37] van Beusekom C., van den Heuvel J., Koenderink J., Russel F., and Schrickx J., "Feline hepatic biotransformation of diazepam: Differences between cats and dogs," *Res. Vet. Sci.*, vol. 103, pp. 119–125, 2015.
- [38] Scarth J., Teale P., and Kuuranne T., "Drug metabolism in the horse: A review," *Drug Test. Anal.*, vol. 3, no. 1, pp. 19–53, 2011.
- [39] W. W. Muir, R. A. Sams, R. H. Huffman, and J. S. Noonan, "Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of diazepam in horses.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 43, no. 10, pp. 1756–62, Oct. 1982.
- [40] M. A., Sarkar P., and Leavitt R., "The urinary elimination profiles of diazepam and its metabolites, nordiazepam, temazepam, and oxazepam, in the equine after a 10-mg intramuscular dose," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 23, no. 1, pp. 29–34, 1999.
- [41] Umezawa H. *et al.*, "Determination of diazepam and its metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a hydrophilic polymer column," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, no. 15, pp. 2333–2341, Aug. 2008.
- [42] Laloup M. *et al.*, "Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan® and Valium®," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, no. 7, pp. 1545–1556, 2007.
- [43] Oliveira M., Queiroz M., Carvalho D., Silva S., and Lancas F., "Determination of Diazepam in Human Plasma by Solid-Phase Microextraction and Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry," *Chromatographia*, vol. 62, no. 3–4, pp.

215–219, Aug. 2005.

- [44] Equimed, “Diazepam | Equine drugs and medications.” .
- [45] Cunningham E., Dooley J., Splan R., and Bradley D., “Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses.” *Anim. Genet.*, vol. 32, no. 6, pp. 360–4, Dec. 2001.
- [46] Díaz S., Dulout F., and Peral-García P., “Greater genetic variability in Argentine Creole than in Thoroughbred horses based on serum protein polymorphisms.” *Genet. Mol. Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 261–5, Sep. 2002.
- [47] Abernethy D., Greenblat D., Divoll M., and Shader R., “Prolonged Accumulation of Diazepam in Obesity,” *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 23, no. 8–9, pp. 369–376, 1983.

ANNEXES

PROTOCOL TIME (H)	SWEET		LERIDANO		TOUAREG		NOBEL		ALEP		KEPRESH	
	ACTUAL TIME (H)	ECART (%)										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,08	0,08	0	0,08	0	0,1	25	0,08	0	0,08	0	0,1	25
0,25	0,25	0	0,25	0	0,28	12	0,25	0	0,25	0	0,23	-8
0,5	0,5	0	0,5	0	0,52	4	0,5	0	0,48	-4	0,5	0
1	1	0	0,98	-2	1	0	1,02	2	1	0	1	0
2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
4	4	0	4,02	0,5	4	0	4	0	4	0	4	0
8	8	0	8,02	0,25	8,02	0,25	8	0	8	0	7,98	-0,25
12	12	0	12,02	0,17	12,02	0,17	12	0	12	0	11,92	-0,67
24	24	0	23,98	-0,08	24,02	0,08	24	0	24,02	0,08	23,92	-0,33
36	35,97	-0,08	35,98	-0,06	36,02	0,06	36	0	36,02	0,06	35,92	-0,22
48	47,97	-0,06	47,98	-0,04	48,02	0,04	48	0	48,02	0,04	47,92	-0,17
72	71,97	-0,04	71,98	-0,03	72,02	0,03	72	0	72,02	0,03	71,92	-0,11
96	95,97	-0,03	95,98	-0,02	96,02	0,02	96	0	96,02	0,02	95,92	-0,08
120	119,97	-0,03	120,5	0,42	120,02	0,02	120	0	120,02	0,02	119,92	-0,07
144	143,97	-0,02	143,98	-0,01	144,02	0,01	144	0	144,02	0,01	143,92	-0,06
168	167,98	-0,01	167,98	-0,01	168,02	0,01	168	0	168,02	0,01	167,92	-0,05
192	191,97	-0,02	191,98	-0,01	192,02	0,01	192	0	192,02	0,01	191,92	-0,04
240	239,97	-0,01	239,98	-0,01	240,02	0,01	240	0	240,02	0,01	239,92	-0,03
288	287,97	-0,01	287,98	-0,01	288,02	0,01	288	0	288,02	0,01	287,92	-0,03
336	335,97	-0,01	335,98	-0,01	336,02	0,01	336	0	336,02	0,01	335,92	-0,02
384	383,97	-0,01	383,98	-0,01	384,02	0,01	384	0	384,02	0,01	383,92	-0,02

Annexe 1 : Heure de prélèvement réelle du plasma post administration pour les 6 chevaux.

PROTOCOL TIME (H)	SWEET		LERIDANO		TOUAREG		NOBEL		ALEP		KEPRESH	
	ACTUAL TIME (H)	ECART (%)										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,92	-8	x	x	1,65	65	x	x	x	x	x	x
2	x	x	4,3	115	x	x	2,62	31	x	x	2,42	21
4	6	50	5,8	45	x	x	5,5	37,5	5,33	33,25	6,25	56,25
8	7,2	-10	8,67	8,375	7,6	-5	9,5	18,75	x	x	x	x
12	10,0	-16,7	12,5	4,2	x	x	x	x	x	x	x	x
24	26,0	8,33	24,3	1,25	24,2	0,71	26,8	11,67	29,8	24,17	24,4	1,75
36	36,3	0,83	35,7	-0,92	35,5	-1,39	x	x	x	x	33,0	-8,33
48	49,5	3,13	48,3	0,62	50,0	4,17	48,3	0,52	49,5	3,13	48,0	0,00
72	74,0	2,78	74,0	2,78	75,3	4,58	75,0	4,17	78,5	9,03	74,0	2,78
96	97,0	1,04	96,6	0,62	102,3	6,56	99,5	3,65	102,6	6,87	97,5	1,56
120	121,0	0,83	121,0	0,83	123,6	3,00	120,5	0,42	121,2	1,00	120,3	0,21
144	145,3	0,87	144,3	0,21	145,3	0,87	144,0	0,00	147,6	2,50	144,0	0,00
192	193,3	0,65	192,8	0,39	194,0	1,04	193,0	0,52	198,3	3,28	192,5	0,26
240	240,5	0,21	240,0	0,00	243,0	1,25	240,5	0,21	244,6	1,92	239,0	-0,42
288	288,6	0,21	290,0	0,69	290,0	0,69	288,8	0,26	292,3	1,49	287,3	-0,26
336	337,0	0,30	337,0	0,30	337,0	0,30	336,6	0,18	342,6	1,96	336,0	0,00
384	385,0	0,26	385,0	0,26	384,6	0,16	384,5	0,13	390,5	1,69	383,8	-0,07
432	434,0	0,46	432,6	0,14	433,0	0,23	432,6	0,14	439,3	1,69	432,0	0,00
480	482,5	0,52	480,6	0,13	482,0	0,42	483,5	0,73	486,6	1,38	479,8	-0,05
528	529,6	0,30	529,5	0,28	529,3	0,25	528,3	0,05	534,6	1,25	529,5	0,28
576	578,3	0,39	577,3	0,23	577,6	0,28	577,0	0,17	581,0	0,87	577,0	0,17
624	627,0	0,48	625,3	0,21	624,0	0,00	624,3	0,05	630,6	1,06	624,0	0,00

Annexe 2 : Heure de prélèvement réelle de l'urine post administration pour les 6 chevaux.

2019 Equine Prohibited Substances List CONTROLLED MEDICATION



- Prohibited Substances include any other substance with a similar chemical structure or similar biological effect(s).
- Prohibited Substances that are identified as Specified Substances in the List below should not in any way be considered less important or less dangerous than other Prohibited Substances. Rather, they are simply substances which are more likely to have been ingested by Horses for a purpose other than the enhancement of sport performance, for example, through a contaminated food substance.

Deptropine	Antihistamine with anticholinergic activity
Deracoxib	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Desmethylpyrilamine	Antihistamine
Detomidine	Sedative
Dexamethasone	Corticosteroid
Diazepam	Anxiolytic
Dichloroacetate	Lactanase
Didofenac	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Digoxin	Anti-arrhythmic
Diltiazem	Antihypertensive
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Solvent. Threshold substance: 15 micrograms per millilitre in urine, or 1 microgram per ml in plasma.
Diphenhydramine	Antihistamine
Diphenylpyraline	Antihistamine
Dipyron(Metamizole)	Non-steroidal anti-inflammatory drug
DMSO (Dimethyl Sulphoxide)	Solvent
Dobutamine	Sympathomimetic
Dopamine	Stimulant: Threshold substance controlled by 4 µg/ml in urine for 3-methoxytyramine (<i>New category for 2019</i>)
Dopram	Stimulant (<i>New category for 2019</i>)
Dorzolamide	Carbonic Anhydrase Inhibitor
Doxylamine	Antihistamine
Edrophonium	Angiotensin-converting enzyme inhibitor
Etenac	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Embramine	Antihistamine
Enalapril (Enalaprilat)	Angiotensin-converting enzyme inhibitor
Enalaprilat (Enalapril)	Angiotensin-converting enzyme inhibitor
Estrone	Oestrogen
Ethanol	Sedative and neurolytic
Ethyl Aminobenzoate (Benzocaine)	Local anaesthetic
Felbinac	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Fenoterol	Bronchodilator (<i>New category for 2019</i>)
Fentanyl	Opioid analgesic
Fexofenadine	Antihistamine
Firocoxib	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Flumetasone (Flumetasone)	Corticosteroid
Flumetasone (Flumetasone)	Corticosteroid
Flunixin	Non-steroidal anti-inflammatory drug

2019 Equine Prohibited Substances List CONTROLLED MEDICATION



- Prohibited Substances include any other substance with a similar chemical structure or similar biological effect(s).
- Prohibited Substances that are identified as Specified Substances in the List below should not in any way be considered less important or less dangerous than other Prohibited Substances. Rather, they are simply substances which are more likely to have been ingested by Horses for a purpose other than the enhancement of sport performance, for example, through a contaminated food substance.

Medetomidine	Sedative (<i>New category for 2019</i>)
Medroxyprogesterone	Hormone
Medrylamine	Antihistamine
Meloxicam	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Mepivacaine	Local anaesthetic
Mepyramine (Pyrilamine)	Antihistamine
Metamizole (Dipyrone)	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Metformin	Antidiabetic
Methadone	Opioid analgesic
Methapyrilene	Antihistamine
Methdilazine	Antihistamine
Methocarbamol	Muscle relaxant
Methoxypromazine	Acepromazine Derivative
Methylprednisolone	Corticosteroid
Methylsalicylic acid	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Metoclopramide	Anti-emetic
Midazolam	Anxiolytic
Moexipril	Angiotensin-converting enzyme inhibitor
Morphine (<i>Specified Substance</i>)	Opioid analgesic
Naloxone	Opioid antagonist
Naproxen	Non-steroidal anti-inflammatory drug
N-butyl Scopolamine	Parasympathetic
Neostigmine	Anticholinesterase
Nitroglycerin	Anti-angina
Norepinephrine	Stimulant
Olodaterol	Bronchodilator (<i>Addition for 2019</i>)
Orphenadrine	Antihistamine
Oxazepam	Anxiolytic
Oxyphenbutazone	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Oxytocin	Powerful Hormone
Paracetamol (Acetaminophen)	Analgesic (<i>New category for 2019</i>)
Paraxanthine	Stimulant
Pentoxifylline	Vasodilator
Pergolide	Dopamine agonist
Perindoprilat	Angiotensin-converting enzyme inhibitor
Phenindamine	Antihistamine
Pheniramine	Antihistamine
Phenylbutazone	Non-steroidal anti-inflammatory drug

30 November 2018 - Lausanne, Switzerland

Annexe 3 : Extraits de la liste des substances contrôlées de la FEI au 30/11/2018

2019 Equine Prohibited Substances List - BANNED SUBSTANCES



- Prohibited Substances include any other substance with a similar chemical structure or similar biological effect(s).
- Prohibited Substances that are identified as Specified Substances in the List below should not in any way be considered less important or less dangerous than other Prohibited Substances. Rather, they are simply substances which are more likely to have been ingested by Horses for a purpose other than the enhancement of sport performance, for example, through a contaminated food substance.

Norclostebol	Anabolic
Norcocaine	Cocaine metabolite
Nordiazepam	Tranquilliser
Norethandrolone	Anabolic
Norfenefrine	Stimulant
Norfenfluramine	Stimulant
Norfluoxetine	Fluoxetine metabolite
Normethandrolone	Anabolic
Norpseudoephedrine (Cathine)	Stimulant
Nortestosterone (Nandrolone)	Anabolic
Nortriptyline	Antidepressant
Noscapine	Antitussive
Nylidrin (Buphenine)	Sympathomimetic
Octadecafluoronaphthalene (Perfluorodecalin)	Artificial gas carriers in blood
Octopamine	Stimulant
Olanzapine	Antipsychotic
Olmesartan	Antihypertensive
Olpadronate	Bisphosphonates (<i>Addition for 2019</i>)
Olsalazine	Gut anti-inflammatory
Opi Pramol	Psychoactive
Opromazine	Antipsychotics
Orciprenaline	Bronchodilator
Oripavine (<i>Specified Substance</i>)	Opioid analgesic
Osterine	Selective Androgen Receptor Modulator
Oxabolone	Anabolic
Oxaflumazine	Psychosedative
Oxandrolone	Anabolic
Oxaprozin	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Oxazolam	Anxiolytic
Oxcarbazepine	Anticonvulsant
Oxethazaine	Topical anaesthetic
Oxilofrine (Hydroxyephedrine)	Stimulant

2019 Equine Prohibited Substances List - BANNED

SUBSTANCES

- Prohibited Substances include any other substance with a similar chemical structure or similar biological effect(s).
- Prohibited Substances that are identified as Specified Substances in the List below should not in any way be considered less important or less dangerous than other Prohibited Substances. Rather, they are simply substances which are more likely to have been ingested by Horses for a purpose other than the enhancement of sport performance, for example, through a contaminated food substance.



Sibutramine	Stimulant
Sildenafil	Vasodilator
Sparteine (<i>Specified Substance</i>)	Anti-arrhythmic
Spirolactone	Diuretic
Stanozolol	Anabolic
Stenbolone	Anabolic
Strychnine	Muscular convulsions
Styramate	Anticonvulsant
Sufentanil	Opioid analgesic
Sulforidazine	Antipsychotic
Sulindac	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Sulpiride	Antipsychotic
Sumatriptan	Serotonin agonist - migraine treatment
Synephrine (<i>Specified Substance</i>)	Stimulant
Tamoxifen	Oestrogen receptor modulator
Temazepam	Tranquilliser
Tenoxicam	Pain relief
Tepoxalin	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Terazocin (Terazosin)	Alpha adrenergic blocker
Terazosin (Terazocin)	Alpha adrenergic blocker
Testolactone	Aromatase inhibitor
Testosterone	Anabolic. Threshold substance: 0.02 micrograms free and conjugated testosterone per millilitre in urine from geldings, or 0.055 micrograms free and conjugated testosterone per millilitre in urine from fillies and mares (unless in foal).
Tetrahydrogestrinone (THG)	Anabolic
Thebaine (<i>Specified Substance</i>)	Opioid alkaloid
THG (Tetrahydrogestrinone)	Anabolic
Thiethylperazine	Anti-emetic
Thiopropazate	Antipsychotic
Thiopropazine	Cataleptic
Thioridazine	Antipsychotic

30 November 2018 - Lausanne, Switzerland

Annexe 4 : Extraits de la liste des substances interdites de la FEI au 30/11/2018

Toulouse, 2019

NOM : MEULY

Prénom : Astrid

TITRE : PHARMACOCINETIQUE DU DIAZEPAM CHEZ LE CHEVAL DANS LE CADRE DE LA LUTTE ANTI-DOPAGE

RESUME :

La lutte anti-dopage est un enjeu important dans le milieu des courses hippiques et des sports équestres et cette étude se focalise sur la détection du diazépam chez le cheval. L'objectif était de produire de nouvelles données pharmacocinétiques plasmatiques et urinaires à partir de l'administration unique de 0,2 mg/kg de diazépam par voie intraveineuse à 6 chevaux. Nous avons pu confirmer que, chez le cheval, le diazépam est très peu éliminé dans les urines et qu'au moins 3 de ses métabolites sont retrouvés dans le plasma et les urines pendant plusieurs jours après administration. Pour les 6 chevaux de l'étude et pour une limite de détection de 0,01 ng/mL nous avons identifié un temps maximal de détection de 11 jours. En parallèle, le temps de retrait qui garantirait l'absence d'effet du diazépam a été estimé à 9 jours. Ces valeurs obtenues sur 6 chevaux doivent être considérées comme des indications et non des valeurs de référence, la responsabilité étant toujours attribuée au vétérinaire traitant.

MOTS-CLES : dopage équin, lutte antidopage, diazépam, benzodiazépine, chevaux.

ENGLISH TITLE : **DIAZEPAM PHARMOCOKINETIC IN HORSES AS PART OF DOPING CONTROL**

ABSTRACT :

The fight against doping is an important issue in horse-racing and equestrian sports. This study focuses on the detection of diazepam in horses, with the aim of producing new plasmatic and urinary pharmacokinetic data with a unique IV administration of 0.2mg/kg diazepam on 6 horses. Our data confirm that diazepam is hardly eliminated in urine and that at least 3 of its metabolites are found in plasma and urine several days after administration. For all six horses of this study and considering a limit of detection of 0.01ng/mL, we have identified a maximal time of detection of 11 days. Furthermore, the withdrawal time that would guarantee the absence of diazepam effects has been estimated to be 9 days. The values obtained are informative and should be considered as reference values only. Ultimately, the final analysis must be confirmed by the personal veterinarian.

KEYWORDS: equine doping, anti-doping struggle, diazepam, benzodiazepine, horses.