

Document technique de l'AMA - TD2004EPO-FR

Numéro du Document :	TD2004EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	D. Catlin G. Nissen-Lie C. Howe J.A. Pascual F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	15 octobre 2004	Exigé pour les analyses réalisées après le :	15 janvier 2005

HARMONISATION DE LA METHODE D'IDENTIFICATION DES ÉPOÉTINES ALFA ET BETA (rEPO) ET DE LA DARBÉPOÉTINE ALFA (NESP) PAR ISOELECTROFOCALISATION DOUBLE BLOT ET DETECTION CHIMILUMINESCENTE

Les critères énoncés ci-après ont été fixés pour permettre une harmonisation dans la réalisation des tests urinaires de l'EPO et le rendu des résultats qui en découlent pour l'ensemble des Laboratoires.

Il est demandé à tous les Laboratoires d'appliquer ces critères dans l'exécution de routine du test urinaire de l'EPO.

Dans ce document, l'érythropoïétine et ses analogues sont indiqués comme suit :

rEPO : érythropoïétines recombinantes incluant époétine α et β

uEPO : érythropoïétine endogène trouvée dans l'urine.

Endogène : secrétée naturellement, par les tissus propres au sportif.

NESP : érythropoïétine hyperglycosylée, darbepoetine α

La méthode originale a été décrite par F. Lasne et al. dans *Analytical Biochemistry* 311 (2002) 119-126.

Description de la méthode

Le test urinaire de l'EPO doit être exécuté selon la méthode suivante :

1) Préparation de l'échantillon :

La préparation de l'échantillon consiste en une technique de pré-concentration partiellement sélective par ultrafiltration centrifuge et lavage avec une solution tampon. Il est essentiel d'empêcher la dégradation de l'EPO durant ce processus de concentration.

Note : Bien qu'il soit possible d'utiliser d'autres techniques de concentration, tout changement dans la préparation de l'échantillon peut affecter la répartition des isoformes et en conséquence exigera une validation appropriée par le Laboratoire.

2) isoélectrofocalisation(IEF):

La focalisation isoélectrique est réalisée dans un gradient de pH compatible avec le point isoélectrique (pI) de l'EPO urinaire naturelle et de ses analogues recombinants (c'est-à-dire habituellement dans un gradient de pH de 2 à 6). Le gradient du pH est élaboré en utilisant des ampholytes porteurs et l'IEF est réalisée dans des conditions dénaturantes (environ 7M urée).

3) Double blot:

Après séparation par IEF, on suit une procédure de double blot. Lors du premier blot, les protéines sont transférées du gel sur une première membrane PVDF qui est ensuite incubée avec un anticorps monoclonal anti-EPO humaine (mAb) (clone AE7A5, fournisseur recommandé : R&D Systems). Lors du second blot, la liaison du mAb à

Document technique de l'AMA - TD2004EPO-FR

Numéro du Document :	TD2004EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	D. Catlin G. Nissen-Lie C. Howe J.A. Pascual F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	15 octobre 2004	Exigé pour les analyses réalisées après le :	15 janvier 2005

l'EPO est rompue par action d'un pH acide et le mAb libéré est transféré sur une seconde membrane PVDF au moyen d'un champ électrique.

Note: La méthode s'appuie sur la spécificité particulière de l'anticorps monoclonal avec lequel elle a été développée (clone AE7A5). Cet anticorps est considéré comme un réactif critique et ne doit pas être changé. Comme la méthode s'appuie sur une séparation par isoélectrofocalisation avant détection immunologique, l'usage d'un seul anticorps primaire est considéré comme scientifiquement acceptable. En conséquence, les clauses 5.2.4.3 (2^e phrase) et 5.2.4.3.1.3 du Standard international de l'AMA pour les laboratoires ne s'appliquent pas à ce test précis.

4) Détection chimiluminescente:

La position du mAb sur la membrane est révélée au moyen d'une séquence de réactifs se terminant par de la peroxydase. Cette peroxydase permet l'émission de lumière par un substrat chimiluminescent approprié et ainsi l'obtention d'une image qui cartographie la position originale et la quantité de l'EPO dans le gel après la séparation IEF.

Cette séquence est généralement composée de :

Anticorps primaire : mAb anti- EPO humaine - anticorps secondaire : anti-immunoglobulines de souris biotinylé- complexes streptavidine - peroxydase de raifort - substrat chimiluminescent pour peroxydase de raifort.

Test

Conformément au *Standard international de l'AMA* pour les Laboratoires (clause 5.2.4.3.1.1), l'identification présomptive d'un résultat d'analyse anormal par une procédure de dépistage, devrait être confirmée sur une deuxième partie aliquote prélevée sur l'échantillon « A » original.

Evaluation et interprétation des résultats

Les résultats doivent impérativement respecter les critères de qualité, d'identification et de stabilité décrits ci-après. La Figure 1 montre l'exemple d'un résultat de test avec la définition des secteurs basique, endogène et acide. Les bandes (isoformes) des substances de référence sont identifiées par des numéros et des lettres.

Document technique de l'AMA - TD2004EPO-FR

Numéro du Document :	TD2004EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	D. Catlin G. Nissen-Lie C. Howe J.A. Pascual F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	15 octobre 2004	Exigé pour les analyses réalisées après le :	15 janvier 2005

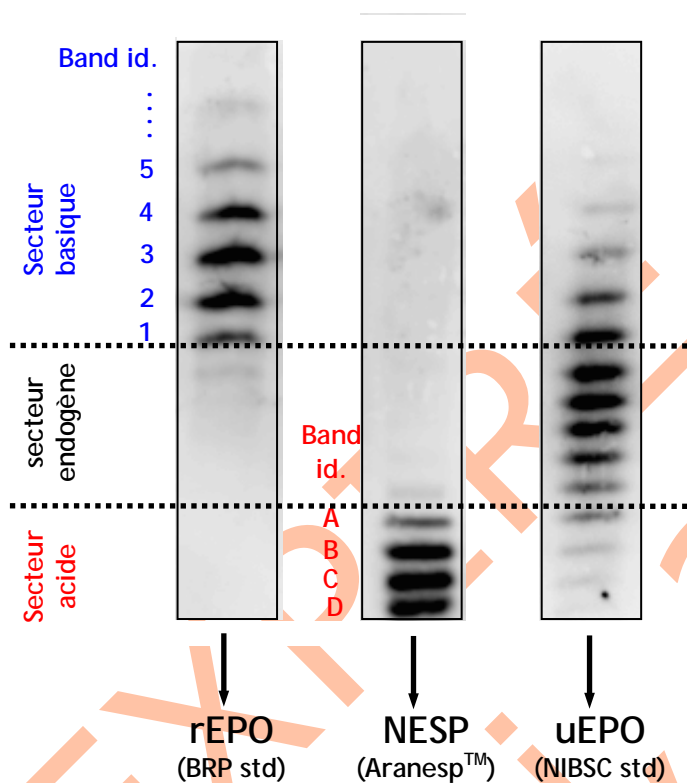


Figure 1. Image obtenue par révélation chimiluminescente et correspondant à l'analyse de la rEPO, de la NESP et de l'EPO urinaire endogène purifiée. Les secteurs basique et acide sont définis par la position des bandes correspondant respectivement à la rEPO (préparation de référence biologique, BRP, de la pharmacopée européenne) et à la NESP (Aranesp™, Amgen) et le secteur endogène est défini, par exclusion, entre les deux secteurs précédents. Pour exemple, cette découpe a été appliquée sur la figure à l'uEPO (Préparation internationale de référence, IRP, de l'institut national des standards et contrôles biologiques, du Royaume-Uni). Les bandes dans les secteurs basique et acide sont identifiées par des chiffres et des lettres.

L'évaluation de l'image obtenue est basée sur l'application consécutive des :

- critères d'acceptation
- critères d'identification
- critères de stabilité

Document technique de l'AMA - TD2004EPO-FR

Numéro du Document :	TD2004EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	D. Catlin G. Nissen-Lie C. Howe J.A. Pascual F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	15 octobre 2004	Exigé pour les analyses réalisées après le :	15 janvier 2005

Critères d'acceptation

Les critères d'acceptation définissent les conditions que l'image doit respecter pour permettre l'application des critères d'identification qui garantiront la présence de rEPO ou de NESP.

- 1.- Taches, bavures, zones de bruit de fond excessif ou signal absents dans une piste interférant de manière significative avec l'application des critères d'identification invalideront la piste.
- 2.- La comparaison avec les échantillons de référence devra permettre l'affectation de numéros de bandes ou de lettres aux bandes de l'échantillon du sportif.

Critères d'identification

Lorsque la méthode d'analyse de l'EPO urinaire a été mise au point à l'origine, le critère proposé calculait l'intensité relative des bandes situées dans le secteur basique. Plusieurs cas du TAS font référence à la règle des « bandes basiques à 80% » dans le rendu de leur décision. Des recherches supplémentaires et un surcroît d'expérience ont indiqué que les critères d'identification ci-dessous sont plus sélectifs que la règle des « bandes basiques à 80% » qui dès lors ne devrait plus être utilisée comme critère.

Les critères d'identification suivants définissent les conditions que l'image doit respecter pour qu'on puisse considérer qu'on est bien en présence d'un résultat d'analyse anormal correspondant à la présence de rEPO ou de NESP.

rEPO

- 1.-dans le secteur basique il doit y avoir au moins 3 bandes consécutives acceptables numérotées 1, 2, 3 ou 4 dans la préparation de référence correspondante.
- 2.-les deux bandes les plus intenses mesurées par densitométrie ou évaluées visuellement dans le secteur basique doivent être consécutives et la bande la plus intense doit être la 1, 2 ou 3.
- 3.-les deux bandes les plus intenses du secteur basique doivent être plus intenses que n'importe quelle bande du secteur endogène, que les bandes soient mesurées par densitométrie ou évaluées visuellement.

NESP

- 1.-dans le secteur acide, il doit y avoir 3 bandes consécutives et acceptables, assignées B,C et D dans la préparation de référence correspondante.
- 2.-les bandes les plus intenses doivent être la C ou la D.
- 3.-la bande la plus intense (C ou D) doit être plus intense que n'importe quelle bande du secteur endogène, que les bandes soient mesurées par densitométrie ou évaluées visuellement.

Du rouge de méthyl peut être utilisé dans l'électrophorèse pour faciliter le positionnement et la numérotation des bandes sur le gel.

Document technique de l'AMA - TD2004EPO-FR

Numéro du Document :	TD2004EPO-FR	Version numéro :	1.0
Écrit par :	D. Catlin G. Nissen-Lie C. Howe J.A. Pascual F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	15 octobre 2004	Exigé pour les analyses réalisées après le :	15 janvier 2005

Critères de stabilité

Après que les critères d'identification ci-dessus aient été appliqués, si un échantillon d'urine est soupçonné de produire un *résultat d'analyse anormal* pour la rEPO ou la NESP, la phase de confirmation établira également la stabilité du profil constaté. Étant donné qu'il n'est pas exclu que quelques rares facteurs aient pu interférer avec la stabilité de l'échantillon d'urine et affecter l'interprétation du *résultat d'analyse anormal* pour l'EPO, un test de stabilité doit être réalisé avant de rendre compte de ce *résultat d'analyse anormal* pour l'EPO dans l'urine.

Bien qu'il soit reconnu que d'autres réactifs spécifiques puissent être développés et validés par le Laboratoire, la procédure acceptable pour un contrôle de stabilité est la suivante :

Réactifs :

Pepstatine A : 1mg/mL dans méthanol
Complete™ (Roche) : 1 comprimé /2 mL d'eau
Microcon® YM-30 (Millipore), MWCO, 30,000 Da
50 mM d'acétate de sodium pour une solution tampon de pH-5
Polysorbate 80 (Tween-80)
BRP et NESP

Méthode :

Centrifuger 0.6 mL d'urine 10 min, 2700 RCF, 20°C et mettre 0.5 mL de surnageant dans un tube à essai
Ajouter 20 µL de pepstatine A et 5 µL de Complete™
Concentrer jusqu'à environ 30 µL en utilisant le Microcon®
Ajouter 200 µL de solution tampon d'acétate dans le réservoir de l'échantillon et mélanger au vortex avant de procéder à une centrifugation de récupération en phase inversée
Ajuster le volume de l'échantillon récupéré à 0,5 mL avec le tampon acétate
Ajouter 20 µL de pepstatine A et 5 µL de Complete™
Laisser incuber 15± 2 min à température ambiante
Ajouter un mélange de BRP et NESP pour une concentration finale de 1,5 x conc. utilisée dans les pistes de référence de l'IEF
Laisser incuber pendant la nuit à 37°C
Prendre 20 µL, chauffer à 80°C durant 3 minutes
Ajouter du polysorbate 80 (Tween-80)
Appliquer au gel IEF

Les critères de stabilité sont :

1. Aucun déplacement significatif de la position des bandes des substances de référence ne doit être observé dans la piste « test de stabilité », par comparaison avec la piste du standard contenant ces mêmes références.

Document technique de l'AMA - TD2004EPO-FR

Numéro du Document :	TD2004EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	D. Catlin G. Nissen-Lie C. Howe J.A. Pascual F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	15 octobre 2004	Exigé pour les analyses réalisées après le :	15 janvier 2005

2. Le profil de l'échantillon doit, lui-même, être stable c'est à dire que la répartition des bandes les plus intenses doit être semblable dans la procédure de dépistage A et les procédures de confirmation A et B.

Documentation et rendu de résultat

Pour ce test, les informations suivantes sont considérées comme le minimum acceptable des « données de dépistage et de confirmation du test » requises par le Document technique TD2003LDOC du *Standard international de l'AMA* pour les Laboratoires:

Données de dépistage du test :

- Images brutes originales de la révélation chimiluminescente des pistes correspondant :
 - o à l'échantillon (aliquote d'analyse de dépistage)
 - o à l'échantillon de contrôle positif ou un standard contenant la substance soupçonnée ou équivalente (par exemple rEPO ou NESP)
 - o à un échantillon d'urine de contrôle négatif et standard de l'EPO urinaire
- Images traitées, telles que profils de densitométrie et/ou identification des bandes les plus intenses dans l'image originale. Des annotations sur les images traitées doivent expliciter l'application des critères d'identification aux isoformes de l'échantillon.
- Description du résultat sur la base de l'application des différents critères décrits dans le présent document technique.

Données de confirmation du test :

- Images brutes originales de la révélation chimiluminescente des pistes correspondant :
 - o à l'échantillon (aliquote d'analyse de confirmation)
 - o au test de stabilité
 - o à l'échantillon de contrôle positif et un standard contenant la substance soupçonnée ou équivalente (par exemple rEPO ou NESP)
 - o un échantillon d'urine de contrôle négatif et standard d'EPO urinaire (uEPO).
- Images traitées, telles que profils de densitométrie et/ou identification des bandes les plus intenses dans l'image originale. Des annotations sur les images traitées doivent expliciter l'application des critères d'identification aux isoformes de l'échantillon.
- Description du résultat sur la base de l'application des différents critères décrits dans le présent document technique.

Point de vue :

Tout commentaire du Laboratoire jugé nécessaire pour appuyer le résultat d'analyse.