

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

HARMONISATION DE LA METHODE D'IDENTIFICATION DES ERYTHROPOIETINES RECOMBINANTES (c'est-à-dire DES EPOETINES) ET DE LEURS ANALOGUES (par exemple LA DARBEPOETINE ET LA METHOXYPOLYETHYLENE GLYCOL-EPOETINE BETA).

1. Introduction

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

Il est exigé de tous les Laboratoires qu'ils appliquent ces critères dans l'exécution de routine des tests ayant pour but d'identifier les dites substances.

Dans ce document, l'érythropoïétine et ses analogues sont indiqués avec les abréviations, acronymes et marques suivants :

EPO : érythropoïétine

rEPO : érythropoïétine recombinante. Ces substances pharmaceutiques sont connues sous le nom d'«époétine», qui est leur dénomination commune internationale (DCI). Les différentes préparations sont identifiées par une lettre grecque, comme par exemple l'époétine alpha, beta, omega, delta, etc. D'autres préparations (par exemple les produits génériques) connues collectivement sous le nom de « biosimilaires ou de copies de la rEPO » peuvent avoir des profils d'isoformes qui ne correspondent pas exactement à ceux des substances déjà citées.

uEPO : érythropoïétine endogène (secrétée naturellement, par les tissus propres au sportif) trouvée dans l'urine.

NESP (Aranesp^{MD}, Amgen) : « Novel erythropoietin stimulating protein », l'analogue de l'érythropoïétine dont la DCI est la darbépoétine alpha.

CERA (Mircera^{MD}, Roche) : « Continuous Erythropoietin Receptor Activator », l'analogue de l'érythropoïétine dont la DCI est la méthoxypolyéthylène glycol-époétine bêta, un dérivé pégylé de l'époétine bêta.

2. Description de la méthode

La méthode originale d'isoélectrofocalisation (IEF) pour l'analyse de l'EPO a été décrite par F. Lasne et al.(1).

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

2.1 Exécution du test par IEF :

2.1.1 Préparation de l'Échantillon :

La préparation de l'Échantillon peut consister (par exemple pour l'urine) en une technique de pré-concentration partiellement sélective par ultrafiltration centrifuge et lavage avec une solution tampon. Alternativement ou en plus, une purification par immunoaffinité ou autre méthode* est également acceptable pour une partie du procédé de préparation de l'échantillon (par exemple en particulier pour l'analyse du plasma ou du sérum) (2,3).

**Note : Bien qu'il soit possible d'utiliser d'autres techniques de pré-concentration ou de purification, toute autre méthode exigera une validation appropriée par le Laboratoire.*

2.1.2 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 (par exemple approximativement 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 7 M urée).

2.1.3 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 de fluorure de polyvinylidène (PVDF) qui est ensuite incubée avec un anticorps monoclonal anti-EPO humaine (mAb) (clone AE7A5) qui reconnaît l'EPO. Lors du second blot, l'interaction entre le mAb et l'EPO est rompue par action d'un pH acide et le mAb libéré est transféré sur une seconde membrane PVDF.

Note: La méthode s'appuie sur la spécificité et l'affinité particulières de l'anticorps monoclonal avec lequel elle a été développée (clone AE7A5, fournisseur recommandé : R&D Systems de Minneapolis, USA). 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, cette méthode prévaudra sur toute autre exigence du SIL ou de tout autre Document Technique, y compris la 3^e phrase de la clause 5.2.4.3 (« Les Procédures de confirmation doivent être autant ou plus sélectives/discriminantes que les Procédures d'analyse initiale. ») du Standard international pour les Laboratoires (version 6.0) du Code mondial antidopage, qui ne s'applique pas à ce test précis.

2.1.4 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

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte G. Gmeiner F. Lasne	J.A. Pascual C. Reichel M. Saugy	Approuvé par : Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

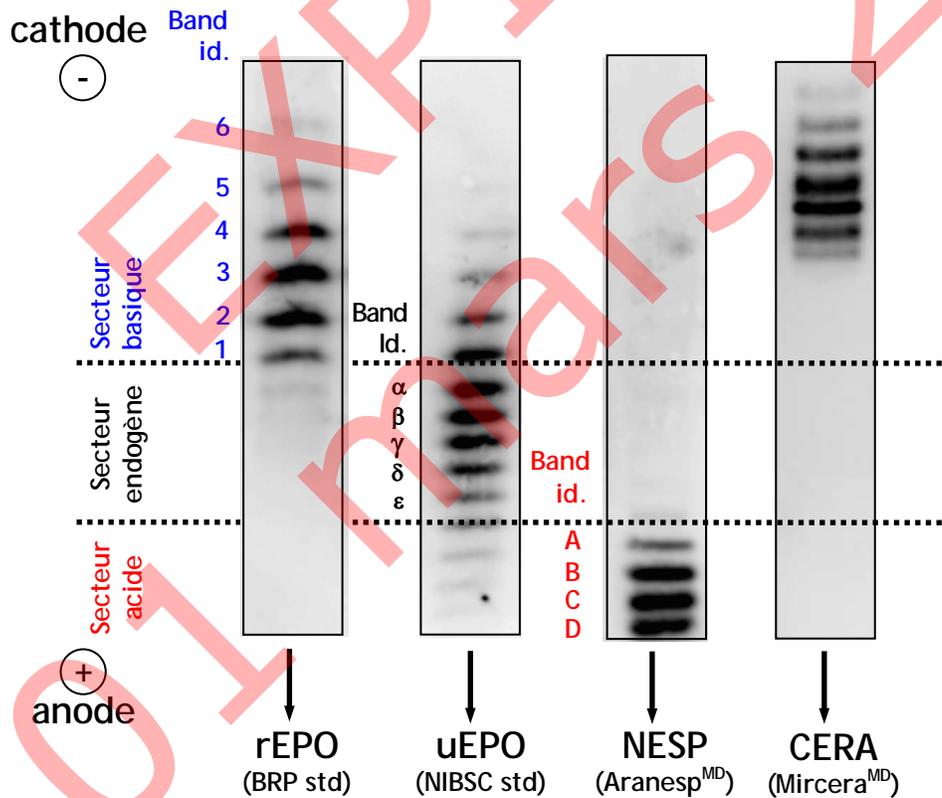
image qui cartographie la position originale et la quantité de l'EPO dans le gel après la séparation IEF.

Cette séquence est généralement composée de :

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

3. Evaluation et interprétation des résultats

Les résultats de la Procédure de confirmation doivent respecter les critères de qualité, d'identification et de stabilité décrits ci-après. La Figure 1 montre une illustration d'un résultat de test avec la définition des fenêtres d'identifications pour chaque piste ainsi que 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 – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

Figure 1. Image des fenêtres d'identifications des pistes obtenue par révélation chimiluminescente et correspondant à l'analyse de la rEPO, de la CERA, de la NESP et de l'uEPO.

Les secteurs basique et acide sont définis, comme décrits, par la position des bandes correspondant à la préparation de rEPO de référence biologique (BRP) de la pharmacopée européenne (mélange équimolaire d'époétines alpha et beta) et à la NESP ; le secteur endogène est défini, par exclusion, entre les deux secteurs précédents. Dans la figure, l'uEPO (Préparation internationale de référence, IRP, de l'institut national des standards et contrôles biologiques NIBSC, du Royaume-Uni) constitue un exemple du secteur endogène. Les bandes des rEPO, uEPO et NESP dans les secteurs basique et acide, respectivement, sont identifiées par des chiffres et des lettres. La CERA a un profil différent avec quelques bandes situées approximativement au même endroit que celles de la rEPO et d'autres bandes interposées parmi celles de la rEPO. Cette répartition des bandes identifie spécifiquement la CERA.

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

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

3.1 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, CERA ou NESP.

- 1.- Taches, bavures, zones de bruit de fond excessif ou signal absent 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 des bandes correspondantes dans l'échantillon du sportif.

3.2 Critères d'identification

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, NESP ou CERA.

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

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

3.2.1 EPOETINE ALPHA ET BETA

1. Dans le secteur basique (défini dans la Figure 1) il doit y avoir au moins 3 bandes consécutives acceptables numérotées « 1 », « 2 », et « 3 » dans la préparation de référence correspondante.
2. Les 2 bandes les plus intenses mesurées par densitométrie doivent être dans le secteur basique, doivent être consécutives et doivent être les bandes « 1 » et « 2 » ou « 2 » et « 3 ».
3. Chacune des deux bandes les plus intenses du secteur basique doit être plus intense (approximativement deux fois ou plus) que n'importe quelle bande du secteur endogène, d'après une mesure par densitométrie.

ou

Des preuves supplémentaires, telles que celles décrites dans la section 3.2.5 ci-dessous, doivent être obtenues pour confirmer la présence d'une EPO produite de façon exogène.

3.2.2. AUTRES EPOETINES

1. Dans le secteur basique (défini dans la Figure 1) il doit y avoir au moins 3 bandes consécutives acceptables.
2. Les 2 bandes les plus intenses mesurées par densitométrie dans le secteur basique doivent être consécutives.
3. La somme des intensités de toutes les bandes dans le secteur basique doit représenter approximativement 85% ou plus de l'intensité totale des bandes dans la fenêtre d'identification de la piste de l'échantillon.

ou

Des preuves supplémentaires, telles que celles décrites dans la section 3.2.5 ci-dessous, doivent être obtenues pour confirmer la présence d'une EPO produite de façon exogène.

3.2.3 DARBEPOETINE ALPHA (NESP)

1. Dans le secteur acide (défini dans la Figure 1) il doit y avoir au moins 3 bandes consécutives et acceptables, assignées « B », « C » et « D » dans la préparation de référence correspondante.
2. La bande la plus intense mesurée par densitométrie doit être la « C » ou la « D ».
3. Les deux bandes « C » ou « D » doivent être plus intenses que la bande « B ».

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

3.2.4 METHOXYPOLETHYLENE GLYCOL-EPOETIN BETA (CERA)

Dans le secteur basique, il doit y avoir au moins 4 bandes consécutives correspondant à la substance de référence CERA.

3.2.5 PREUVES SUPPLEMENTAIRES

Quand le profil n'est pas consistant avec un profil endogène typique (tel qu'illustré par le standard de référence uEPO NIBSC) mais quand il ne respecte

pas les stricts critères définis dans la section de 3.2.1 à 3.2.4 ci-dessus, cela peut être dû à d'autres biosimilaires de la rEPO (4, 5) ou à une combinaison de substances. Ainsi les bandes les plus intenses peuvent être autres que les « 1 », « 2 » ou « 3 » ou il peut y avoir une bande intense dans le secteur endogène (par exemple l'époétine delta - DYNEPO^{MD}) (6), ou cela peut être un profil atypique (déplacé vers le secteur basique)(7), etc. Dans de tels cas, des preuves scientifiques supplémentaires peuvent être nécessaires pour arriver à une conclusion finale. L'application d'une procédure électrophorétique de type SDS-PAGE ou équivalente où la séparation des protéines s'appuie sur un principe différent (c'est-à-dire masse moléculaire apparente ou volume hydrodynamique) peut être utilisée pour compléter la méthode IEF dans le but d'aider à confirmer l'origine exogène ou endogène du résultat (7, 8).

Le SDS-PAGE est une technique bien établie qui ne requiert aucune description spécifique supplémentaire. Toutefois, il est bon de noter que pour cette méthode, une étape de purification par immunoaffinité est nécessaire au cours de la préparation de l'échantillon. La séparation électrophorétique peut être combinée avec un blot simple ou double et avec une détection par chimiluminescence (comme pour la méthode IEF). Le comportement de chaque substance (bande) lors de la migration, c'est-à-dire la position et la forme des bandes (largeur, focalisées ou plus diffuses) peuvent servir à confirmer l'identité et/ou l'origine exogène d'une substance. Il est possible de s'appuyer sur le centroïde ou les bords de la bande qui définissent sa largeur pour s'assurer que la position de la bande diffère de celle de l'EPO endogène analysée en parallèle, comme l'illustre la figure 2.

La figure 2 montre un exemple du comportement sur SDS-PAGE de différentes rEPOs ainsi que de l'uEPO, de la NESP et de la CERA.

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte G. Gmeiner F. Lasne	J.A. Pascual C. Reichel M. Saugy	Approuvé par : Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

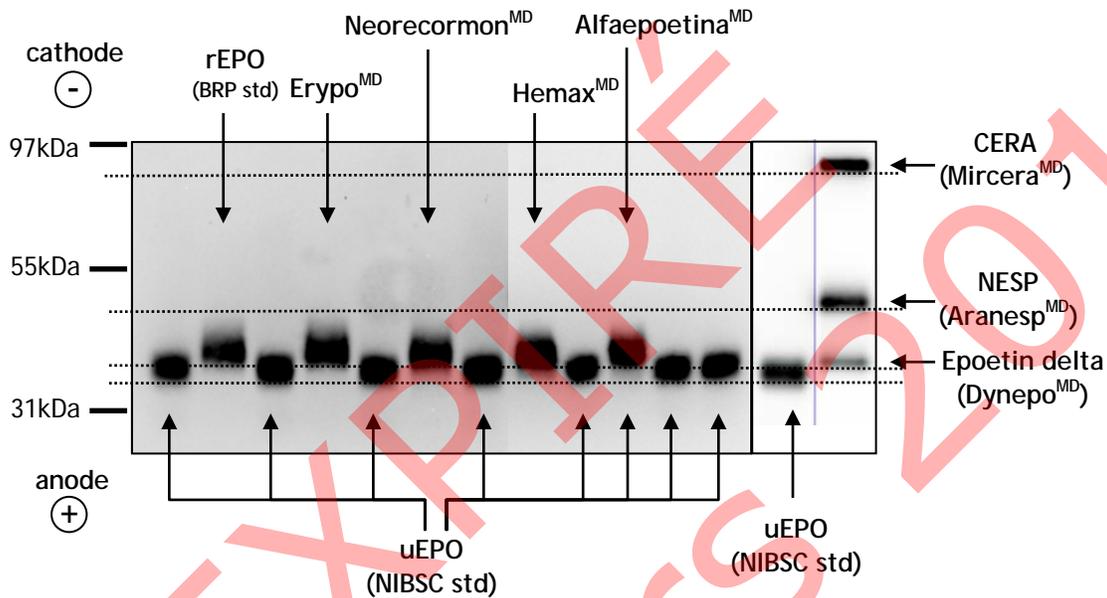


Figure 2. Image d'une analyse par SDS-PAGE d'EPO urinaire endogène (uEPO), de préparations de rEPO disponibles dans le commerce, ainsi que de la NESP et de la CERA.

3.3. Critères de stabilité (applicables seulement aux Échantillons d'urine)

Après que les critères d'identification ci-dessus ont été appliqués, si un Échantillon est soupçonné de produire un Résultat d'analyse anormal, la phase de confirmation devra également établir la stabilité du profil constaté ou bien que l'instabilité n'a pas causé le Résultat d'analyse anormal. Etant 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 (9).

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

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

Réactifs :

Pepstatine A : 1mg/mL dans méthanol
Complete^{MD} (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
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^{MD}
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^{MD}
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 Tween-80
Appliquer au gel IEF

Les critères pour démontrer la stabilité sont :

1. Avec la méthode décrite ci-dessus, aucun déplacement significatif de la position des bandes ne doit être observé dans la piste « test de stabilité » et aucune bande nouvelle ne doit apparaître, par comparaison avec la piste du standard contenant ces mêmes références, et
2. La répartition des bandes les plus intenses doit être semblable dans la Procédure d'analyse initiale « A », la Procédure de confirmation « A » (et la Procédure de confirmation « B » s'il y a lieu).

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

Au cas où un *Échantillon* d'urine suspecté d'avoir un *Résultat d'analyse anormal* montre une instabilité, l'application d'une procédure de SDS-PAGE peut aussi être utilisée pour exclure son impact sur le résultat, ou pour confirmer l'origine exogène de la substance quelle que soit l'instabilité qui a été trouvée.

Cette instabilité n'a pas d'effet significatif sur le comportement en SDS-PAGE de ces substances ou si elle a un effet, il sera de rendre l'échantillon négatif (7).

4. Documentation et rendu de résultat

Pour ce test, les informations suivantes sont considérées comme acceptables comme « données d'analyse initiale et de confirmation » requises par le Document technique TD2009LDOC du *Standard international pour les Laboratoires de l'AMA*:

Données de la Procédure d'analyse initiale :

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

Données de la Procédure de confirmation :

- Images brutes originales de la révélation chimiluminescente des pistes correspondant :
 - o à l'*Échantillon* (aliquote d'analyse de confirmation)
 - o au test de stabilité pour l'urine (ne s'applique pas aux *Échantillons* de plasma ou sérum)
 - o à l'échantillon de contrôle positif (par exemple époétines, darbépoétine, CERA)
 - o un standard contenant la substance soupçonnée ou équivalente

Document technique de l'AMA – TD2009EPO-FR

Numéro du Document :	TD2009EPO-FR	Version numéro :	1.0
Ecrit par :	C. Ayotte J.A. Pascual G. Gmeiner C. Reichel F. Lasne M. Saugy	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'Agence Mondiale Antidopage
Date :	1 ^{er} avril 2009	Date d'entrée en vigueur :	31 mai 2009

- un échantillon d'urine de contrôle négatif
- un standard d'EPO urinaire (uEPO).
- Images traitées, telles que profils de densitométrie et/ou tracé du contour des bandes dans l'image originale. Des annotations sur les images traitées doivent expliciter l'application des critères d'identification à la répartition des isoformes de l'*Échantillon*.
- Description du résultat sur la base de l'application des différents critères décrit dans le présent Document technique.

L'AMA requiert qu'une 2^e opinion soit fournie par l'un des auteurs du présent Document technique avant tout rapport de *Résultat d'analyse anormal* pour la rEPO ou ses analogues à l'autorité ou aux autorités de gestion des résultats. Veuillez noter qu'il est suffisant pour un tel *Résultat d'analyse anormal* de s'appuyer sur une seule 2^e opinion, qui sera ajoutée aux documents du Laboratoire dans la Documentation du laboratoire.

Les dispositions 3.2 et 6.2 du Code permettent d'utiliser des résultats pour établir un profil de dopage par les *Sportifs*. Ainsi, même si les résultats du test pour l'EPO sont rendus comme étant négatifs par un Laboratoire s'appuyant sur des tests par IEF et/ou SDS-PAGE, les renseignements contenus dans l'analyse, combinés avec d'autres renseignements (par exemple paramètres hématologiques, profil longitudinal, témoignages, etc.) peuvent être pertinents dans un contexte plus général pour établir une violation des règles anti-dopage.

5. Références

- (1) F. Lasne et al. *Anal Biochem* 2002; 311: 119–126.
- (2) F. Lasne et al. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 354-357.
- (3) J. Mallorquí et al. *Haematologica* 2008; 93 (2): 313-314.
- (4) H. Schellekens. *Eur J Hosp Pharm* 2004; 3: 43-47.
- (5) S.S. Park et al. *J. Phar, Sci.* 2008 Sep 9.
- (6) V. Belalcazar et al. *Am J Hematol* 2008; 83(9): 755.
- (7) C. Reichel et al. *Drug Test Analysis* 2009; 1: 43-50.
- (8) M. Kohler et al. *Int. J. Sports Med* 2008; 29: 1-6.
- (9) F. Lasne et al. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U, eds. *Recent advances in doping analysis (13)*. Cologne: Sport und Buch Straub, 2005; 297–304.