

# Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

## HARMONISATION DE L'ANALYSE ET DES RAPPORTS DES AGENTS STIMULANTS DE L'ERYTHROPOIESE (ASE) PAR DES TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE.

### 1.0 Introduction

Le présent document a été établi afin d'harmoniser la détection et le rapport des érythropoïétines recombinantes (c'est-à-dire des époétines) et de leurs analogues (par ex. darbépoétine, pegserpoétine, péginésatide, EPO-Fc) par les laboratoires lorsque l'analyse se base sur des techniques d'électrophorèse. Lorsque d'autres techniques sont disponibles (par ex. ELISA, LC/MS), il est également fait référence aux documents techniques applicables.

Tous les laboratoires sont tenus d'appliquer ces critères lorsqu'ils procèdent par routine à des analyses en vue d'identifier les substances mentionnées.

Le présent document utilise les abréviations, acronymes et marques déposées suivants:

**ASE:** agents stimulants de l'érythropoïèse dont la structure est apparentée à l'EPO (par ex. NESP, CERA, EPO-Fc) ou non (par ex. péginésatide).

**CERA:** (Mircera<sup>®</sup>, Roche): activateur permanent du récepteur de l'érythropoïétine, analogue de l'érythropoïétine connu sous sa dénomination commune internationale (DCI) de pegserpoétine, un dérivé pégylé de l'époétine- $\beta$ .

**EPO:** érythropoïétine.

**EPO-Fc:** protéine de fusion de l'EPO avec la région Fc (fragment, cristallisable) de chaîne lourde de l'immunoglobuline humaine.

**bEPO:** érythropoïétine endogène (secrétée naturellement par les tissus du sportif lui-même) et trouvée dans le sang (sérum ou plasma).

**rEPO:** érythropoïétine recombinante. Ces substances pharmaceutiques sont connues par leur DCI sous le nom de « époétine ». Les différentes préparations sont identifiées par une lettre grecque, par ex. époétine- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$ , - $\delta$ . D'autres préparations (par ex. génériques ou copies) appelées collectivement « biosimilaires de la rEPO » peuvent avoir des profils d'isoformes différents qui ne correspondent pas exactement à ceux déjà référencés.

**uEPO:** érythropoïétine endogène (secrétée naturellement par les tissus du sportif lui-même) telle qu'excrétée dans l'urine.

**IEF:** focalisation isoélectrique.

**NESP** (par ex. Aranesp<sup>®</sup>, Amgen): nouvelle protéine stimulant l'érythropoïèse, analogue de l'érythropoïétine connue sous sa DCI de darbépoétine- $\alpha$  (dEPO).

**Péginésatide:** (Omontys<sup>®</sup>, Affymax Inc.): peptide homodimérique pégylé sans relation structurale avec l'EPO.

**SAR-PAGE:** électrophorèse sur gel de polyacrylamide du sodium *N*-lauroylsarcosinate ('sarcosyl').

# Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

**SDS-PAGE:** électrophorèse sur gel de polyacrylamide du dodécylsulfate de sodium.

## 2.0 Analyse

Le laboratoire doit utiliser des méthodes qui sont validées et adaptées au but consistant à détecter l'administration des ASE dans l'urine ou dans le plasma/sérum.

### 2.1 Méthodes d'électrophorèse

La stratégie d'analyse à suivre pour utiliser les techniques d'électrophorèse, résumée au tableau 1, est la suivante:

#### 2.1.1 Procédure d'analyse initiale

- Dans le cas de l'analyse pour les ASE ayant une structure apparentée à l'EPO (par ex. rEPO, NESP, CERA, EPO-Fc), le laboratoire doit appliquer la méthode IEF [1] et/ou SAR-PAGE [2, 3] après enrichissement pour l'EPO et/ou ses analogues soit par des méthodes non spécifiques (par ex. ultrafiltration [1], précipitation sélective de protéines [4]), soit par des méthodes d'immunopurification<sup>1</sup> [5-10].
- Le laboratoire doit démontrer lors de la validation de la méthode que la méthodologie d'enrichissement utilisée ne modifie pas les profils d'isoformes IEF ni le comportement SDS/SAR-PAGE de l'EPO endogène et des ASE analysés.
- Dans le cas de l'analyse pour le péginésatide, le laboratoire doit appliquer la méthode SDS-PAGE ou SAR-PAGE [11].

#### 2.1.2 Procédure de confirmation

La procédure de confirmation dépend de la rEPO ou de l'analogue présumé découvert et de la méthodologie employée pour la procédure d'analyse initiale.

- L'immunopurification<sup>1</sup> de toutes les parties aliquotes de l'échantillon doit être effectuée avant les analyses de confirmation de l'échantillon par des méthodes d'électrophorèse [5-10].

##### 2.1.2.1 *rEPO*

---

<sup>1</sup> Pour l'immunopurification, on utilisera un/ou des anticorps autres que celui utilisé pour l'immunoblotting.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

- Quelle que soit la procédure d'analyse initiale utilisée (IEF et/ou SAR-PAGE), la procédure de confirmation des rEPO doit être effectuée par SDS-PAGE [12, 13] ou SAR-PAGE [2, 3] sur une/des nouvelle(s) partie(s) aliquote(s) de l'*échantillon* « A ».
- SAR-PAGE peut être appliquée à la fois pour la procédure d'analyse initiale et pour la procédure de confirmation.

### **2.1.2.2 NESP**

- Quelle que soit la procédure d'analyse initiale utilisée (IEF ou SAR-PAGE), pour la procédure de confirmation de NESP, le laboratoire peut choisir d'appliquer IEF ou SDS-PAGE ou SAR-PAGE sur la ou les nouvelle(s) partie(s) aliquote(s) de l'*échantillon* « A ». À sa libre appréciation, le laboratoire peut également utiliser une combinaison de la méthode IEF avec soit SDS-PAGE soit SAR-PAGE.
- La même méthode (IEF ou SAR-PAGE) peut être appliquée à la fois pour la procédure d'analyse initiale et pour la procédure de confirmation.

### **2.1.2.3 CERA**

- Quelle que soit la procédure d'analyse initiale utilisée (IEF ou SAR-PAGE), pour la procédure de confirmation de CERA, le laboratoire peut choisir d'appliquer IEF ou SAR-PAGE ou, à la libre appréciation du laboratoire, une combinaison de ces méthodes sur la ou les nouvelle(s) partie(s) aliquote(s) de l'*échantillon* « A ».
- La même méthode (IEF ou SAR-PAGE) peut être appliquée à la fois pour la procédure d'analyse initiale et pour la procédure de confirmation.

### **2.1.2.4 EPO-Fc**

- Pour la procédure de confirmation de l'EPO-Fc, le laboratoire peut choisir d'appliquer SDS-PAGE ou SAR-PAGE sur la ou les nouvelle(s) partie(s) aliquote(s) de l'*échantillon* « A ».
- SAR-PAGE peut être appliquée à la fois pour la procédure d'analyse initiale et pour la procédure de confirmation.

### **2.1.2.5 Péginésatide**

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

- Quelle que soit la procédure d'analyse initiale utilisée, pour la procédure de confirmation du péginésatide, le laboratoire peut choisir d'appliquer SDS-PAGE ou SAR-PAGE.
- La même méthode (SDS-PAGE ou SAR-PAGE) peut être appliquée à la fois pour la procédure d'analyse initiale et pour la procédure de confirmation.

**Tableau 1.** Analyse des ASE dans l'urine et le sang (sérum/plasma) par des techniques d'électrophorèse.

Procédure d'analyse initiale		Procédure de confirmation
Méthode	Résultat d'analyse suspect	Méthode
IEF et/ou SAR-PAGE	rEPO	SDS-PAGE ou SAR-PAGE
	NESP	IEF ou SDS-PAGE ou SAR-PAGE
	CERA	IEF ou SAR-PAGE
SAR-PAGE	EPO-Fc	SDS-PAGE ou SAR-PAGE
SDS-PAGE ou SAR-PAGE	Péginésatide	SDS-PAGE ou SAR-PAGE

### 2.2 Autres méthodes (non-électrophorétiques)

- Pour la procédure d'analyse initiale des ASE ayant une structure non apparentée à l'EPO (par ex. péginésatide), le laboratoire peut appliquer, lorsqu'elles sont disponibles, des méthodes de détection propres à chaque substance (par ex. immunoessais) [11].
- Pour la procédure de confirmation d'ASE spécifiques (notamment péginésatide, EPO-Fc), le laboratoire peut également appliquer, à sa libre appréciation, des méthodes de détection propres à chaque substance (par ex. immunoessais), en sus des techniques d'électrophorèse décrites dans le présent Document technique, à titre de preuve scientifique supplémentaire pour parvenir à une conclusion définitive [11, 14].
- Dans tous les cas, lorsqu'une méthode basée sur la spectrométrie de masse (SM) est disponible [15-17], elle peut être utilisée pour la procédure d'analyse initiale, pour la procédure de confirmation ou pour les deux. Dans ce cas, les critères d'identification décrits dans le Document technique en vigueur relatif aux critères d'identification des essais qualitatifs, TD IDCR [18], doivent être satisfaits.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

### **3.0 Description des méthodes électrophorétiques**

#### 3.1 Analyse par isoélectrofocalisation (IEF) [1]

##### **3.1.1 Préparation de l'échantillon**

- Pour la procédure d'analyse initiale, il est possible d'employer toute méthode validée capable de concentrer l'EPO et/ou ses analogues (par ex. ultrafiltration [1], précipitation sélective des protéines [4], immunopurification<sup>1</sup> [5-10]).
- Pour les procédures de confirmation, l'immunopurification<sup>1</sup> de l'échantillon est requise avant l'application de la méthode IEF [5-10].

##### **3.1.2 Séparation électrophorétique**

- L'IEF est effectuée dans une plage de pH compatible avec les points isoélectriques (pI) de l'EPO naturelle et de ses analogues recombinants. L'IEF est effectuée dans des conditions dénaturantes (environ 7M d'urée).

##### **3.1.3 Immunoblotting**

- Après séparation IEF, la procédure double-blotting est obligatoire.
- Le clone AE7A5 de souris monoclonal anti-EPO humaine est l'anticorps recommandé en priorité pour cette étape. Cependant, à la libre appréciation du laboratoire, il est possible d'utiliser d'autres anticorps anti-EPO humaine présentant des caractéristiques de spécificité et de sensibilité similaires (par ex. le clone 9G8A de souris monoclonal anti-EPO humaine).

##### **3.1.4 Détection**

- Les schémas isoélectriques de l'EPO sont révélés par l'utilisation d'un système de détection sensible approprié (par ex. système chimioluminescent amplifié). Le signal obtenu par densitométrie doit être quantifiable afin de déterminer les intensités relatives des différentes isoformes d'un schéma d'EPO.

#### 3.2 Analyses SDS-PAGE et SAR-PAGE [2, 3, 11-14]

##### **3.2.1 Préparation de l'échantillon**

- Pour la procédure d'analyse initiale, il est possible de recourir à toute méthode validée capable de concentrer l'EPO et/ou ses analogues (par ex. l'immunopurification<sup>1</sup> [5-10]).
- Pour les procédures de confirmation, l'immunopurification<sup>1</sup> de l'échantillon est requise avant l'application de SDS-PAGE ou de SAR-PAGE.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

### 3.2.2 Séparation électrophorétique

- Pour la séparation des ASE apparentés à l'EPO, il est recommandé d'utiliser des gels d'acrylamide à 10% (%T). Pour les molécules plus petites (par ex. péginésatide), des gels à gradient 4-12% ont également été utilisés avec succès.
- Pour SAR-PAGE, le SDS dans les *échantillons* et les tampons de migration est remplacé par du *N*-lauroylsarcosinate de sodium.

### 3.2.3 Immunoblotting

- Pour la procédure d'analyse initiale d'échantillons d'urine et de sérum/plasma, il est possible d'appliquer le single- ou le double-blotting après la séparation électrophorétique, conformément à la validation de méthode appropriée du laboratoire.
- Pour la procédure de confirmation des *échantillons* d'urine, le double-blotting est recommandé. Toutefois, un single-blotting peut être appliqué à la libre appréciation du laboratoire, compte tenu des résultats de la procédure d'analyse initiale (par ex. présence de réactivité croisée, faible teneur en EPO) et des conditions d'analyse (par ex. volume d'*échantillon* suffisant).
- Pour la procédure de confirmation des *échantillons* sérum/plasma, le double-blotting est obligatoire.
- L'anticorps recommandé en priorité à cette étape pour les ASE apparentés à l'EPO est le clone d'anticorps AE7A5 de souris monoclonal anti-EPO humaine. Toutefois, à la libre appréciation du laboratoire, il est possible d'utiliser d'autres anticorps anti-EPO humaine présentant des caractéristiques de spécificité et de sensibilité similaires (par ex. le clone 9G8A de souris monoclonal anti-EPO humaine).
- Pour le péginésatide, un anticorps contre la partie peptidique de la substance doit être utilisé (par ex. clone 11F9, Affymax Inc.)

### 3.2.4 Détection

- Les schémas électrophorétiques des ASE sont révélés par l'utilisation d'un système de détection sensible approprié (par ex. système chimioluminescent amplifié).

## 4.0 Évaluation et interprétation des résultats

### 4.1 Critères d'acceptation

Les critères d'acceptation pour les procédures IEF et SDS-PAGE ou SAR-PAGE définissent les exigences qu'une image doit remplir pour permettre l'application des critères d'identification afin d'établir la présence des ASE.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

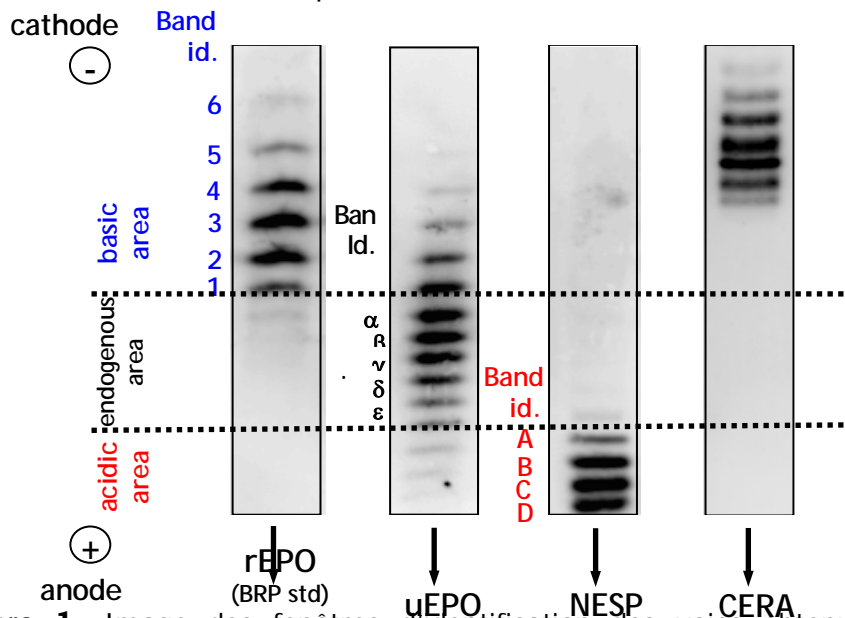
Les taches, macules, zones d'arrière-plan excessif ou absences de signal dans une voie qui entravent de manière significative l'application des critères d'identification entraînent l'invalidation de la ligne.

### 4.2 Critères d'identification

Les critères d'identification décrits dans le présent document sont appliqués aux procédures de confirmation. Toutefois, des recommandations sont données à titre de lignes directrices pour les critères à appliquer à la procédure d'analyse initiale lors de l'évaluation des résultats IEF pour les rEPO.

#### 4.2.1 Procédure IEF

La **fig. 1** montre une illustration du résultat d'une analyse IEF<sup>2</sup>. Les fenêtres d'identification pour chaque voie électrophorétique ainsi que les zones basiques, endogènes et acides sont définies. Les bandes des préparations utilisées comme référence sont identifiées par des chiffres et des lettres.



**Figure 1.** Image des fenêtres d'identification des voies obtenues par le système d'acquisition par chimioluminescence correspondant à l'analyse de rEPO, CERA, NESP, et uEPO<sup>3</sup>.

Les zones basiques et acides sont définies, comme décrit, par la position des bandes correspondant à la préparation biologique de référence rEPO (PBR) de la

<sup>2</sup> Ce sont des exemples de standards de différents analogues de l'EPO par analyse IEF; dans un échantillon réel, la présence d'uEPO endogène peut également être détectée.

<sup>3</sup> D'autres préparations d'uEPO ou de bEPO peuvent être utilisées à titre de référence pour l'EPO endogène.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

Pharmacopée européenne (mélange équimolaire d'époétine- $\alpha$  et - $\beta$ ) ou aux époétines- $\alpha$  ou - $\beta$  et NESP pur; par exclusion, la zone endogène est définie entre les deux. À la **fig. 1**, la zone endogène est exemplifiée par l'uEPO (préparation internationale de référence, PRI, du National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Royaume-Uni<sup>3</sup>).

Les bandes de rEPO, uEPO et NESP respectivement dans les zones basiques, endogènes et acides, sont identifiées par des chiffres et des lettres comme indiqué. Le CERA présente un schéma différent avec certaines bandes à peu près co-localisées avec celles définies par la rEPO et d'autres intercalées avec les bandes rEPO. Ce schéma de bandes identifie spécifiquement le CERA.

### 4.2.1.1 rEPO

Lorsque l'on applique la méthode IEF à la procédure d'analyse initiale pour les rEPO, les critères suivants sont recommandés pour envisager un résultat d'analyse suspect pour les rEPO:

#### a) Échantillons d'urine

- Dans la zone basique (**fig. 1**), il doit y avoir au moins 3 bandes consécutives acceptables.
- Les deux bandes les plus intenses mesurées par densitométrie doivent se trouver dans la zone basique.

#### b) Échantillons de sang (sérum/plasma)

- L'intensité des deux bandes les plus intenses doit être approximativement deux fois supérieure, ou plus, à toute autre bande de la zone endogène. Le laboratoire peut également déterminer un résultat d'analyse suspect pour la rEPO si, à son avis, le profil IEF s'écarte de celui de la bEPO.

### 4.2.1.2 NESP et CERA

L'image doit répondre aux critères d'identification suivants pour envisager un résultat d'analyse anormal correspondant à la présence de NESP ou de CERA.

#### NESP:

- Dans la zone acide (**fig. 1**), il doit y avoir au moins 3 bandes consécutives acceptables réparties en « A », « B », « C » ou « D ».
- Au moins une bande dans la « zone acide » doit être plus intense que la dernière bande de la zone endogène (par ex. bande  $\epsilon$  de la **fig. 1**).

**CERA:** Dans la zone basique, il doit y avoir au moins 4 bandes consécutives correspondant à la préparation de CERA utilisée à titre de référence (**fig. 1**).



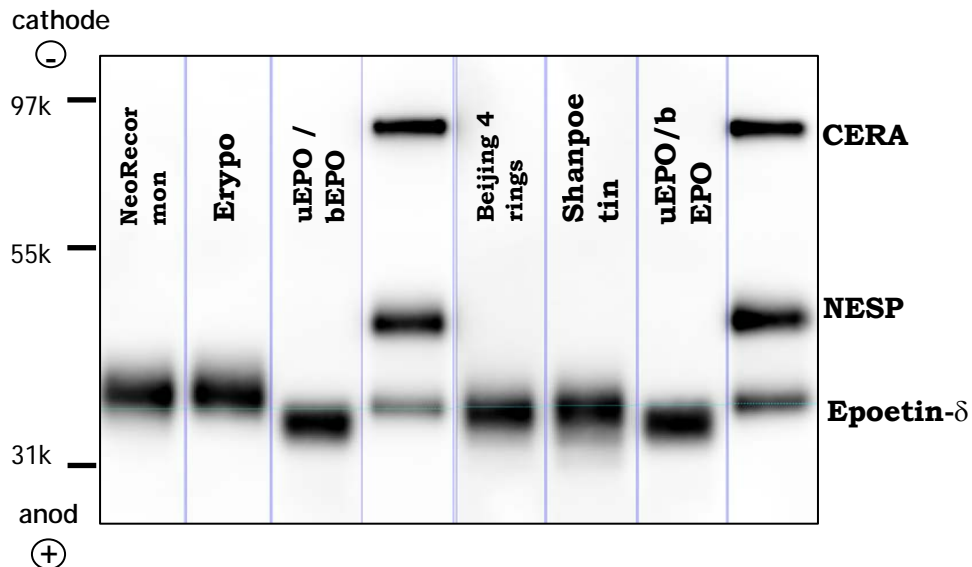
## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

### 4.2.2 Procédure SDS-PAGE ou SAR-PAGE pour les ASE ayant une structure apparentée à l'EPO

Les critères d'identification pour SDS-PAGE et SAR-PAGE sont les mêmes, puisque ces deux méthodes se comportent de façon très similaire, hormis la sensibilité plus élevée de SAR-PAGE pour le CERA.

Les rEPO et les analogues peuvent être distingués de l'EPO endogène (uEPO, bEPO) grâce à leur forme de bande caractéristique et à leur masse moléculaire apparente différente. Le comportement de migration (bande) de chaque rEPO ou analogue, à savoir la position et la forme (largeur, focalisé ou plus diffus), peut servir à confirmer l'identité et /ou l'origine exogène de la substance. Le centroïde ou les limites de la largeur de la bande peuvent être utilisés pour vérifier que sa position et sa forme diffèrent de la position de l'EPO endogène exploitée en parallèle comme illustré à la **fig. 2** (qui illustre le comportement SDS-PAGE de différentes rEPO ainsi que d'uEPO/bEPO, NESP et CERA). Des bandes supplémentaires, correspondant aux chaînes légères et lourdes des anticorps utilisés pour l'immunopurification, peuvent être présentés et n'entravent pas l'interprétation des résultats<sup>4</sup> (par ex. **fig. 5** ci-dessous).



**Figure 2.** Image SDS-PAGE présentant la caractéristique à large bande de certaines préparations époétine- $\alpha$  et - $\beta$  disponibles dans le commerce (NeoRecormon<sup>®</sup>, Erypo<sup>®</sup>, Beijing 4 rings, Shanpoetin<sup>™</sup>). Les positions relatives d'EPO endogène urinaire/sanguine, d'époétine- $\delta$ , de NESP et de CERA sont également indiquées.

<sup>4</sup> De telles bandes d'anticorps découlant du processus de préparation de l'échantillon sont systématiquement présentées dans les *échantillons* et les échantillons témoins.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

Les critères d'identification suivants définissent les exigences que l'image SDS-PAGE ou SAR-PAGE issue de la procédure de confirmation doit remplir pour envisager un *résultat d'analyse anormal* pour la présence de rEPO, NESP, CERA ou EPO-Fc.

### 4.2.2.1 Détection de bande(s) unique(s)

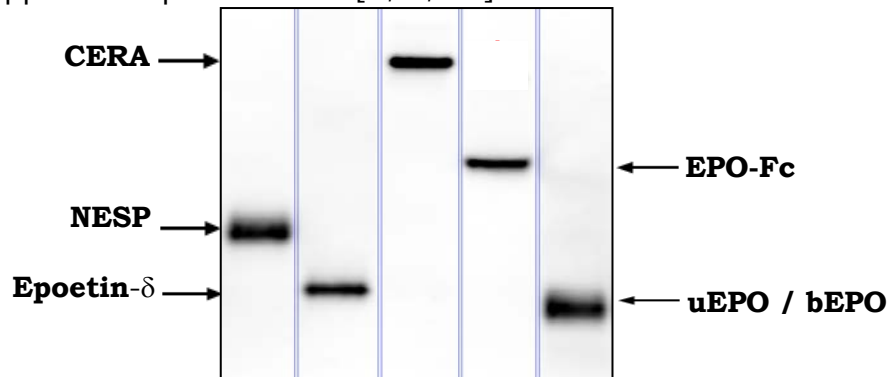
- Il est possible de détecter une bande (par ex. préparations d'époétine- $\alpha$ / $\beta$  et uEPO/bEPO à la **fig. 2**; autres ASE à la **fig. 3**) ou des bandes uniques multiples correspondant à des ASE différents (par ex. époétine- $\delta$ , NESP et CERA à la **fig. 2**).

#### rEPO:

- L'époétine- $\alpha$  et - $\beta$  ainsi que les biosimilaires ont des formes de bande caractéristiques (« large bande ») et une masse moléculaire apparente différente (généralement plus élevée) que l'uEPO/bEPO endogène (**fig. 2**).
- L'époétine- $\delta$  a une forme de bande caractéristique (« bande nette ») et une masse moléculaire apparente plus élevée que l'uEPO/bEPO endogène. En raison de la netteté de sa bande, l'époétine- $\delta$  peut également être différenciée d'autres époétines recombinantes (- $\alpha$  et - $\beta$  ainsi que les biosimilaires) (**fig. 2, 3**).

#### NESP, CERA, EPO-Fc:

- La masse moléculaire apparente du centroïde de la bande correspond à la masse apparente de la préparation NESP, CERA ou EPO-Fc correspondante utilisée à titre de référence. NESP (**fig. 2, 3**), CERA (**fig. 2, 3**) et EPO-Fc (**fig. 3**) peuvent être distingués des EPO endogènes (uEPO, bEPO) ainsi que des rEPO grâce à leurs masses moléculaires apparentes plus élevées [2, 3, 14].



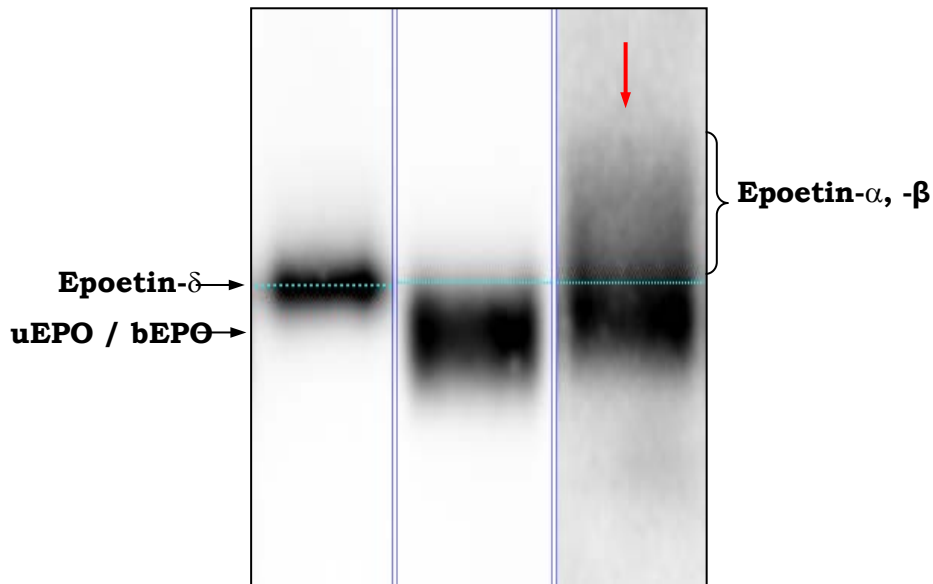
**Figure 3:** Image SAR-PAGE présentant les masses moléculaires apparentes plus élevées de CERA, EPO-Fc, NESP et époétine- $\delta$  par comparaison avec l'uEPO/bEPO endogène.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

### 4.2.2.2 Détection de bande mixte

- Une bande mixte composée d'EPO endogène (uEPO, bEPO) et de rEPO est détectée: la forme de bande ressemble à celle de la rEPO plus tout ou partie de la bande uEPO/bEPO.
- Une zone diffuse ou faible de la bande au-dessus de la bande endogène correspondante est également révélatrice de la présence d'époétine- $\alpha$  et - $\beta$  (**fig. 4**).
- Il est également possible de détecter une combinaison de bande mixte et de bande(s) unique(s) venant d'autres ASE.



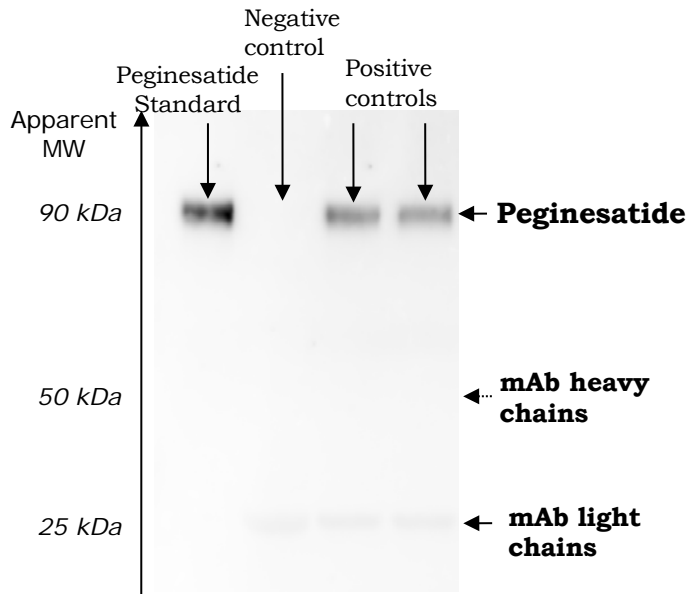
**Figure 4.** Image SDS-PAGE présentant une bande mixte d'EPO endogène et de rEPO (flèche rouge). La zone diffuse de la bande au-dessus de la bande endogène correspondante est également indicative de la présence d'époétine- $\alpha$  et - $\beta$ .

### 4.2.3 SDS-PAGE ou SAR-PAGE pour le péginésatide

La présence de péginésatide dans un *échantillon* est indiquée par une bande dans la position correspondant à cet ASE, comme indiqué par la migration de la préparation utilisée à titre de référence (**fig. 5**). Des bandes supplémentaires correspondant aux chaînes légères et lourdes des anticorps utilisés pour l'immunopurification peuvent être présentes et n'entravent pas l'interprétation des résultats.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014



**Figure 5.** Image de l'identification de péginésatide par SDS-PAGE sur gel BisTris Nu-PAGE 4-12%.

### 5.0 Documentation et rapport

Pour rapporter les résultats sur la base de l'application des méthodes IEF et/ou SDS-PAGE ou SAR-PAGE, le laboratoire doit se plier aux exigences du *Standard international* de l'AMA pour les laboratoires (SIL) et de son Document technique connexe relatif aux documentations de laboratoire (TD LDOC) [19]:

Exigences concernant la procédure d'analyse initiale:

- *Échantillon* (partie aliquote de l'analyse initiale).
- Échantillon témoin négatif <sup>5</sup>.
- Préparation appropriée utilisée comme référence, permettant de définir des zones basiques, acides et endogènes (IEF) ou la masse moléculaire apparente (SDS/PAGE et SAR-PAGE).

Exigences concernant la procédure de confirmation:

- *Échantillon* (partie aliquote de confirmation).

<sup>5</sup> Les échantillons témoins sont des échantillons qui subissent la même procédure d'analyse que l'*échantillon* analysé (par ex. même matrice d'échantillon, même préparation, etc.)

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

- Échantillon témoin négatif <sup>5</sup>.
- Échantillon témoin positif contenant une substance appropriée (par ex. rEPO, NESP, CERA)<sup>5, 6</sup>.
- Préparation appropriée utilisée à titre de référence, permettant de définir des zones basique, acide et endogène (IEF) ou la masse moléculaire apparente (SDS-PAGE, SAR-PAGE).

### 5.1 Fourniture d'un second avis

L'AMA exige qu'un second avis soit fourni par un des experts désignés ci-dessous<sup>7</sup> avant que tout *résultat d'analyse anormal* pour les ASE ne soit signalé à la ou aux autorité(s) de gestion des résultats. Tout second avis fourni doit être versé au dossier du laboratoire dans la documentation du laboratoire.

Les dispositions 3.2 et 6.2 du *Code* permettent d'utiliser les résultats pour établir le profil de dopage par les *sportifs*. Ainsi, même si les résultats de l'analyse à l'EPO sont signalés comme négatifs par un laboratoire sur la base de l'analyse IEF et/ou SDS/SAR-PAGE, les informations contenues dans l'analyse, combinées à d'autres informations (par ex. variables sanguins, profils longitudinaux, témoignages), peuvent rester pertinentes dans un contexte plus général afin d'établir des violations des règles antidopage.

## 6.0 Références

---

<sup>6</sup> Les échantillons témoins positifs doivent être sélectionnés en fonction des résultats de la procédure d'analyse initiale, qui donne une indication de la substance qui doit être confirmée (par ex. rEPO, NESP, CERA). Toutefois, l'échantillon témoin positif ne doit pas nécessairement correspondre au comportement électrophorétique de l'*échantillon*. Par exemple, différents types de rEPO peuvent avoir des schémas de migration différents sur le gel.

<sup>7</sup> Experts (affiliation à un laboratoire) susceptible de fournir un second avis sur les résultats de laboratoire pour l'EPO:

1. Christiane Ayotte (Montréal)
2. Yvette Dehnes (Oslo)
3. Françoise Lasne (Paris)
4. Nicolas Leuenberger (Lausanne)
5. Laurent Martin (Paris)
6. Jean-François Naud (Montréal)
7. José A. Pascual (Barcelone)
8. Christian Reichel (Seibersdorf)
9. Philipp Reihlen (Cologne)
10. Martial Saugy (Lausanne)

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

1. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem* **311**: 119–126 (2002).
2. Reichel C, Abzieher F, Geisendorfer T. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal* **1**(11-12): 494-504 (2009).
3. Reichel C. SARCOSYL-PAGE: A New Electrophoretic Method for the Separation and Immunological Detection of PEGylated Proteins. *Methods Mol Biol.* **869**: 65-79 (2012).
4. Lasne F, Martin L, Martin JA. A fast preparative method for detection of recombinant erythropoietin in blood samples. *Drug Test Anal.* **2**: 494-495 (2010).
5. Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol* **41**: 354-357 (2007).
6. Mallorquí J, Segura J, de Bolòs C, Gutiérrez-Gallego R, Pascual JA. Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica* **93** (2): 313-314 (2008).
7. Dehnes Y, Lamon S, Lönnberg M. Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns – A powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogous. *JPBA* 53: 1028-1032 (2010).
8. Lönnberg M, Dehnes Y, Drevin M *et al.* Rapid affinity purification of erythropoietin from biological samples using disposable monoliths. *J Chromatogr A.* **1217**(45): 7031-7037 (2010).
9. Mallorquí J, Llop E, de Bolòs C, Gutiérrez-Gallego R, Segura J, Pascual JA. Purification of erythropoietin from human plasma samples using an immunoaffinity well plate. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**(23): 2117-2122 (2010).
10. Reihlen P, Völker-Schänzer E, Majer B, Schänzer W. Easy-to-use IEF compatible immunoaffinity purification of Erythropoietin from urine retentates. *Drug Test Anal* **4**(11): 813-817 (2012).
11. Leuenberger N, Saugy J, Mortensen RB, Schatz PJ, Giraud S, Saugy M. Methods for detection and confirmation of Hematide™/peginesatide in anti-doping samples. *Forensic Sci Int* **213**(1-3): 15-9 (2011).
12. Kohler M, Ayotte C, Desharnais P *et al.* Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med* **29**(1): 1-6 (2008).
13. Reichel C, Kulovics R, Jordan V, Watzinger M, Geisendorfer T. SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control. *Drug Test Anal* **1**(1): 43-50 (2009).
14. Reichel C, Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: Screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug Test Anal* **4**(11): 818-829, 2012.

## Document technique de l'AMA - TD2014EPO-FR

Document n°:	TD2014EPO-FR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe de travail EPO de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	17 mai 2014	Date d'entrée en vigueur:	1 <sup>er</sup> septembre 2014

15. Möller I, Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Synthesis, characterisation, and mass spectrometric detection of a pegylated EPO-mimetic peptide for sports drug testing purposes. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**(15), 2115-2123 (2011).
16. Möller I, Thomas A, Delahaut P, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Mass spectrometric detection of peginesatide in human urine in doping control analysis. *Pharm Biomed Anal.* **70**:512-517 (2012).
17. Reichel C. Differences in sialic acid O-acetylation between human urinary and recombinant erythropoietins: a possible mass spectrometric marker for doping control. *Drug Test Anal.* **5**(11-12):877-889 (2013).
18. Document technique de l'AMA TD IDCR: Critères d'identification pour les essais qualitatifs incorporant la chromatographie sur colonne et la spectrométrie de masse.  
[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical\\_Documents/WADA\\_TD2010IDCRv1.0\\_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays\\_May%2008%202010\\_EN.doc.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf)
19. Document technique de l'AMA TD LDOC: Documentations du laboratoire.  
[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical\\_Documents/WADA\\_TD2009\\_LDOC\\_Laboratory\\_Documentation\\_Packages\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2009_LDOC_Laboratory_Documentation_Packages_EN.pdf)