



Programme mondial antidopage

LIGNES DIRECTRICES
ANALYSE DES
BIOMARQUEURS DE
L'HORMONE DE
CROISSANCE HUMAINE
(hGH)

destinée aux analyses de
contrôle du dopage

Version 2.0

Avril 2016

TABLE DES MATIERES

1. Objectif	3
2. Champ d'application	3
3. Présentation de la méthode	3
3.1 Principe de la méthode	4
4. Exigences de l'essai	5
4.1 Procédure pré-analytique de l'essai	6
4.2 Procédure analytique de l'essai	9
4.2.1 Stratégie d'analyses	10
5. Rapport et interprétation des résultats	11
5.1 Interprétation des résultats de l'analyse	11
5.1.1 Résultat d'analyse anormal (RAAP) présumé	13
5.1.2 Résultat d'analyse anormal (RAA)	14
5.1.3 Résultat atypique (RA)	14
5.2 Rapport des résultats d'analyses	15
6. Incertitude de la mesure de l'essai	16
6.1 Incertitude type composée (u_c)	16
6.2 Niveaux maximaux d' u_c	17
6.3 Incertitude élargie ($U_{95\%}$)	17
6.4 Vérification de l'incertitude de la mesure	18
7. Définitions	18
7.1 Termes définis dans le Code	18
7.2 Termes définis dans le SIL	19
7.3 Termes définis dans le standard international pour les contrôles et les enquêtes (SICE)	20
8. Bibliographie	20
Bibliographie détaillée décrivant l'analyse des biomarqueurs de la hGH	23

1. Objectif

La présente ligne directrice a été mise au point en vue de garantir une approche harmonisée de l'application de l'analyse des biomarqueurs GH-2000 destinée à détecter le dopage à l'hormone de croissance humaine (hGH) dans le sport. Elle donne des instructions relatives à la procédure de préparation pré-analytique de l'échantillon, à la réalisation de l'analyse et à l'interprétation de ses résultats.

2. Champ d'application

La présente ligne directrice suit les règles établies par les *standards internationaux de l'Agence mondiale antidopage (AMA)* pour les laboratoires (SIL) [1] et par les documents techniques correspondants concernant l'analyse des *échantillons* sanguins. Ces exigences restent pleinement applicables et doivent être respectées. La présente ligne directrice contient des recommandations supplémentaires destinées à faciliter la mise en œuvre des procédures d'analyse propres à la détection de la hGH par l'analyse des biomarqueurs.

3. Présentation de la méthode

L'analyse des biomarqueurs de la hGH implique de mesurer deux *marqueurs* sensibles à la hGH, à savoir le facteur I de croissance analogue à l'insuline (IGF-I) et le propeptide N-terminal du collagène de type III (P-III-NP), qui sont présents dans le sérum. La bibliographie qui figure à la fin du présent document dresse la liste des principales publications produites durant l'élaboration et la validation de la méthode. Ces mesures sont combinées à des formules de fonction discriminantes propres à chaque sexe qui améliorent la sensibilité et la spécificité de l'analyse sur la base d'un score (score GH-2000) [2] afin de détecter l'utilisation abusive de la hGH par comparaison avec une analyse à *marqueur* unique. L'analyse des biomarqueurs de la hGH peut également servir à détecter les sécrétagogues de la GH et l'utilisation abusive de l'IGF-I dans le sport [3, 4].

Une série d'études d'administration de la (r)hGH recombinante, contrôlées par placebo et réalisées en Europe (centres principaux au Royaume-Uni et en Allemagne) et en Australie a montré que tant l'IGF-I que le P-III-NP augmentent substantiellement à l'issue de l'administration de rhGH d'une manière proportionnelle à la dose [2, 5-11]. Ces *marqueurs* ont été évalués pour plusieurs facteurs confondants susceptibles d'influer sur les résultats des fonctions discriminantes, y compris l'âge, le sexe [2], l'origine ethnique [12], l'exercice [8, 9], les variations à l'intérieur d'une journée et d'un jour à l'autre, les variations

intra-individuelles [13], les lésions osseuses et des tissus mous [14], la discipline sportive et la morphologie (physique) [15-17].

A l'exception du sexe et de l'âge, aucun autre facteur n'affecte substantiellement les résultats de la fonction discriminante de la hGH.

Les formules de la fonction discriminante de la GH-2000 sont sexospécifiques, sur la base du logarithme naturel des concentrations de sérum de l'IGF-I et du P-III-NP (requis pour normaliser la répartition des données) et incluent un ajustement pour refléter le déclin des concentrations de la hGH et du *marqueur* en fonction de l'âge [2].

3.1 Principe de la méthode

L'analyse des biomarqueurs de la hGH repose sur la mesure de l'IGF-I et du P-III-NP par des immunoessais ou des approches basées sur la spectrométrie de masse (MS) [18].

Pour effectuer l'analyse, on utilise un couplage d'essais formé par un essai IGF-I et un essai P-III-NP pour la procédure d'analyse initiale, alors qu'il convient d'utiliser deux couplages d'essais IGF-I/P-III-NP différents pour les procédures de confirmation (voir tableau 2 ci-après). Un couplage d'essais IGF-I/P-III-NP peut être le même que celui utilisé dans la procédure d'analyse initiale. Il est recommandé que l'essai par chromatographie liquide (LC) couplé à la MS en tandem (LC-MS/MS) ou par LC-MS à haute résolution (LC-HRMS) pour l'IGF-I soit appliqué dans la mesure du possible dans le cadre de la procédure de confirmation. Les résultats de chaque couplage d'essais servent ensuite à calculer le score GH-2000.

Les essais actuellement utilisés sont les suivants:

Essais IGF-I

1) Essai Immunotech A15729 IGF-I IRMA (Immunotech SAS, Marseille, France)

L'essai Immunotech est un essai immunoradiométrique (IRMA) à deux sites en phase solide qui utilise deux anticorps monoclonaux préparés pour deux sites antigéniques différents de la molécule IGF-I. Le premier est enduit sur une phase solide et le second est radiomarké avec ^{125}I . L'IGF-I est séparée des IGFBP par acidification et l'IGF-II excédentaire est ajouté pour empêcher une nouvelle interférence avec l'essai venant des IGFBP. L'essai Immunotech est calibré à l'aide de la norme IGF-I IRP 87/518 de l'OMS.

2) Essai IDS-iSYS IGF-I (Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, Royaume-Uni).

L'essai iSYS IGF-I est un immunoessai automatisé chimioluminescent sandwich (CLIA). Les échantillons sont incubés avec une solution acide pour dissocier l'IGF-I des IGFBP. Une partie, jointe au tampon de neutralisation contenant l'IGF-II excédentaire pour prévenir la ré-agrégation avec les IGFBP, un anticorps monoclonal anti-IGF-I biotinylé dirigé contre le terminal N, et un anticorps monoclonal anti-IGF-I marqué à l'acridinium sont incubés. Des particules magnétiques marquées à la streptavidine sont ensuite ajoutées et, après une étape d'incubation supplémentaire,

ces particules magnétiques sont capturées à l'aide d'un aimant. Après une étape de lavage et l'ajout de réactifs déclencheurs, la lumière émise par le marquage d'acridinium est directement proportionnelle à la concentration d'IGF-I dans l'échantillon initial [19]. L'essai iSYS IGF-I est calibré selon la nouvelle norme IRP 02/254 d'IGF-I recombinant de l'OMS.

3) Essai IGF-I par LC-MS/MS ou LC-HRMS [18].

Il s'agit d'une approche de bas en haut basée sur la quantification des peptides dérivés de la digestion de l'IGF-I par la trypsine. Les échantillons de sérum sont incubés avec une solution acide en présence d'IGF-II excédentaire et d'IGF-I étiqueté ^{15}N en tant que standard interne. Les protéines sont précipitées avec de l'acétonitrile. Après réduction et alkylation du surnageant séché, la solution est enzymatiquement hydrolysée à la trypsine. Deux peptides correspondant aux acides aminés 1-21 (T1) et 22-36 (T2) de l'IGF-I sont séparés par LC et mesurés par MS/MS ou HRMS.

Essais P-III-NP

1) Orion UniQ™ P-III-NP RIA (Orion Diagnostica, Espoo, Finlande)

L'Orion UniQ™ P-III-NP RIA est un radio-immunoessai compétitif basé sur la formation d'un complexe entre les anticorps polyclonaux de lapin anti-P-III-NP en phase solide et le P-III-NP dans des échantillons de sérum en compétition avec le P-III-NP ^{125}I -marqué. Un volume d'échantillon de 100 μL est utilisé.

2) Essai Siemens ADVIA Centaur P-III-NP [(Siemens Healthcare Laboratory Diagnostics, Camberley, Royaume-Uni)] [20]

L'essai Siemens ADVIA Centaur P-III-NP est un immunoessai automatisé chimioluminescent sandwich à deux sites. Il utilise deux anticorps monoclonaux de souris: le premier est un anticorps anti-P-III-NP marqué à l'ester d'acridinium. Le second est un anticorps anti-P-III-NP marqué à la biotine. La phase solide contient des particules paramagnétiques enduites de streptavidine et au cours de la réaction, la lumière émise par le marquage à l'acridinium est directement proportionnelle à la concentration de P-III-NP dans l'échantillon. L'essai Siemens P-III-NP est calibré par le fabricant selon un standard dérivé du P-III-NP bovin.

4. Exigences de l'essai

Avant de mettre en œuvre l'analyse des biomarqueurs dans une analyse de routine du *contrôle du dopage*, le laboratoire doit remplir les exigences suivantes:

- Valider la performance des essais sur place, y compris par exemple la détermination de la limite de quantification (LQ) de l'essai, la répétabilité (s_r), la précision intermédiaire (s_w) et le biais.
- Les valeurs d'acceptation des paramètres de la performance de l'essai applicables aux déterminations séparées des concentrations d'IGF-I et de P-III-NP sont indiquées au tableau 1 ci-après.

- En outre, le laboratoire doit déterminer l'incertitude de la mesure (IM) de l'essai à partir des données de validation du laboratoire. L'incertitude type composée (u_c) ne doit pas dépasser une valeur maximale d' $u_{c_Max} = 0.50$ pour l'un ou l'autre des couplages d'essais, exprimée en tant qu'écart-types (ET) et appliquée aux scores GH-2000 à des valeurs proches des limites de décision (LD) correspondantes décrites à la section 7 ci-après.
- Faire preuve de la volonté de mettre en œuvre l'essai par le biais de données de validation des analyses et/ou une participation réussie à au moins un programme éducatif externe d'évaluation de la qualité (EQAS) approuvé par l'AMA ou à une étude collaborative inter-laboratoires. En cas de déficiences identifiées, des mesures correctrices appropriées doivent être documentées et appliquées.
- Obtenir l'accréditation ISO/IEC-17025 de la part d'un organisme d'accréditation compétent pour l'inclusion de l'analyse des biomarqueurs de la hGH dans le périmètre d'accréditation du laboratoire.

Tableau 1: Critères d'acceptation de certains paramètres de la performance de l'essai.

Paramètre de validation	Immunoessais	LC-MS/MS ^a
s_r (écart-type relatif à l'intérieur de l'essai, ETR %)	$\leq 10\%$	$\leq 10\%$
s_w (ETR entre essais %)	$\leq 20\%$	$\leq 15\%$
LQ^b IGF-I P-III-NP	≤ 50 ng/mL ≤ 1 ng/mL	≤ 50 ng/mL N/A

- ^a appliquée à la moyenne des concentrations mesurées des deux peptides T1 et T2.
- ^b la LQ est définie comme la plus faible concentration répondant aux critères spécifiés pour le s_r et le s_w de l'essai.

4.1 Procédure pré-analytique de l'essai

À réception des *échantillons* « A » et « B » au laboratoire, les étapes suivantes doivent être suivies:

- Vérifier que les *échantillons* sanguins ont été recueillis dans des tubes contenant un gel séparateur de sérum polymérique inerte et un facteur d'activation de la coagulation (tubes BD Vacutainer® SST™-II Plus, ref. UE 367955; tubes BD Vacutainer® SST™-II Plus *Advance*, ref. UE 367954) conformément aux lignes directrices de l'AMA pour le prélèvement des *échantillons* sanguins [21]. Ces *échantillons* sanguins devraient avoir été

conservés dans un état réfrigéré (non congelé) après leur prélèvement et durant leur transport au laboratoire¹.

- À titre alternatif, les *échantillons* peuvent être reçus au laboratoire en tant qu'*échantillons* de sérum congelés ou réfrigérés, suite à la coagulation et à la centrifugation du sang et à la séparation de la fraction de sérum sur le lieu du prélèvement de l'*échantillon*.
- Aucun *échantillon* remis au laboratoire en tant que plasma ne sera accepté aux fins de l'analyse de la hGH avec les essais actuels. Dans le même sens, les autorités de prélèvement des échantillons reçoivent les lignes directrices pour le prélèvement des *échantillons* de sang pour l'analyse de la hGH, qui stipulent que la matrice d'analyse est le sérum [21]. Le laboratoire doit notifier l'autorité de contrôle et demander conseil auprès d'elle quant au rejet et à l'analyse d'échantillons pour lesquels des irrégularités sont constatées (conformément au SIL 6.2.2.4). Dans les cas où le prélèvement de l'*échantillon* porte sur la mauvaise matrice (à identifier au niveau de la gestion des résultats), les résultats d'une telle analyse de l'*échantillon* ne seront pas pris en considération.
- Vérifier le statut de l'*échantillon* (par ex. preuve d'hémolyse) et l'intégrité des tubes de prélèvement (par ex. preuve de rupture du gel de séparation). Le laboratoire doit noter tout état inhabituel de l'*échantillon*, enregistrer cet état et l'inclure dans le rapport d'analyse destiné à l'autorité de contrôle.
- Pour les *échantillons* reçus en tant que sang complet dans des tubes SSTTM-II ou des tubes SSTTM-II Plus Advance:

Echantillon « A »

- Centrifuger l'*échantillon* « A » pendant 10 à 15 minutes à 1300-1500 g dès que possible après la réception.
- La fraction de sérum séparée entière venant de l'*échantillon* « A » devrait être transférée à un autre tube ou aliquotée dans de nouveaux flacons, qui seront dûment étiquetés pour assurer la documentation de la chaîne de possession interne du laboratoire. Une partie aliquotée devrait servir à la procédure d'analyse initiale. La ou les partie(s) aliquotée(s) restantes de l'*échantillon* « A » non utilisée(s) pour la procédure d'analyse initiale doi(ven)t être entreposée(s) congelée(s)² jusqu'à la procédure de confirmation du « A », si nécessaire.

¹ De précédentes études ont montré que les concentrations d'IGF-I et de P-III-NP restent stables si l'*échantillon* reste réfrigéré pendant un maximum de 5 jours [22].

² Pour l'entreposage des parties aliquotées surgelées, il convient d'utiliser des flacons à fermeture hermétique (pour un stockage optimal, des cryovials à joint torique d'étanchéité sont recommandés), et les conditions recommandées sont les suivantes:

- Pour un stockage de courte durée (jusqu'à trois mois) à environ -20 °C;
- Pour des périodes plus longues (plus de trois mois), congeler à environ -20 °C et transférer à environ -70 à -80 °C.

- Pour la procédure d'analyse initiale, les parties aliquotes de l'*échantillon* « A » peuvent être analysées immédiatement après l'aliquotage ou être entreposées à environ 4 °C pendant un maximum de 24h avant l'analyse (dans un délai maximal de 5 jours à compter du prélèvement de l'*échantillon*). À titre alternatif, les parties aliquotes de l'*échantillon* « A » doivent être congelées² jusqu'à l'analyse.

Echantillon « B »

- Centrifuger l'*échantillon* « B » pendant 10 à 15 minutes à 1300-1500g dès que possible après la réception. La totalité de la fraction de sérum séparée de l'*échantillon* « B » devrait être conservée dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* SST™-II ou SST™-II Plus Advance et congelée par étapes (réfrigération avant congélation) conformément aux instructions du fabricant du tube³ jusqu'à l'analyse, si nécessaire.

- Une fois que l'*échantillon* « B » est décongelé et ouvert (conformément au SIL 6.2.4.2.2), une partie aliquote de l'*échantillon* « B » sera utilisée pour la procédure de confirmation du « B ». Le reste du sérum de l'*échantillon* « B » devrait être transféré dans un nouveau tube/flacon et sera scellé devant le *sportif* ou son représentant ou un témoin indépendant désigné par le laboratoire à l'aide d'une méthode évidente et inviolable et congelé² jusqu'à analyse additionnelle, si nécessaire.

- Pour les *échantillons* reçus en tant qu'*échantillons* de sérum séparés:
 - a) *Echantillons* reçus en tant que fractions de sérum congelées distinctes:
 - Ces *échantillons* devraient rester congelés² jusqu'à l'analyse.
 - Une fois décongelés, une partie aliquote de l'*échantillon* « A » doit être prise pour être utilisée pour la procédure d'analyse initiale. Cette partie aliquote de l'*échantillon* « A » peut être entreposée à environ 4°C si la procédure d'analyse initiale est programmée pour avoir lieu dans les 24h suivant la décongélation. Le reste de la fraction de sérum de l'*échantillon* « A » peut être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* ou aliquoté dans de nouveaux flacons qui doivent être dûment étiquetés pour garantir la documentation de la chaîne de

La décongélation de l'*échantillon* en vue de son analyse ne doit pas se faire sous eau chaude ou par toute procédure similaire susceptible de porter la température de l'*échantillon* au-dessus de la température ambiante. La décongélation pendant une nuit à environ 4°C est recommandée.

³ Placer le tube dans une boîte isolante spécifique avant de le transférer dans un congélateur à – 20°C. Pour préserver l'intégrité du gel de séparation, permettre à la congélation de prendre pendant au moins 2 heures avant de déplacer ou de transférer les tubes congelés. Le déplacement des tubes avant que le gel de séparation ne soit congelé et stable peut provoquer une contamination du sérum par du matériel cellulaire.

possession interne du laboratoire, et être entreposés congelés² jusqu'à la procédure de confirmation du « A », si nécessaire.

- Une fois que l'*échantillon* « B » est décongelé et ouvert (conformément au SIL 6.2.4.2.2), une partie aliquote de l'*échantillon* « B » doit être utilisée pour la procédure de confirmation du « B ». Le reste du sérum de l'*échantillon* « B » doit être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* et être scellé devant le *sportif* ou son représentant ou un témoin indépendant désigné par le laboratoire à l'aide d'une méthode inviolable évidente et être congelé² jusqu'à analyse additionnelle, si nécessaire.

b) *Echantillons* reçus en tant que fractions de sérum réfrigérées distinctes:

- Prendre une partie aliquote de l'*échantillon* « A » dès que possible après la réception. Pour la procédure d'analyse initiale, des parties aliquotes de l'*échantillon* « A » peuvent être analysées immédiatement après l'aliquotage ou être entreposées à environ 4°C pendant un maximum de 24h avant l'analyse (dans un délai maximal de 5 jours à compter du prélèvement de l'*échantillon*). À titre alternatif, les parties aliquotes de l'*échantillon* « A » doivent être congelées² jusqu'à l'analyse.

- Le reste de l'*échantillon* « A » non utilisé pour la procédure d'analyse initiale peut être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* ou être aliquoté dans de nouveaux flacons, qui doivent être dûment étiquetés pour garantir la documentation de la chaîne de possession interne du laboratoire, et être entreposés congelés² jusqu'à la procédure de confirmation du « A », si nécessaire.

- Pour les *échantillons* « B », congeler² les *échantillons* dès que possible après réception et les décongeler avant analyse. Une fois que l'*échantillon* « B » est décongelé et ouvert (conformément au SIL 6.2.4.2.2), une partie aliquote de l'*échantillon* « B » doit être utilisée pour la procédure de confirmation du « B ». Le reste du sérum de l'*échantillon* « B » doit être conservé dans le tube de prélèvement de l'*échantillon* et doit être re-scellé devant le *sportif* ou son représentant ou un témoin indépendant désigné par le laboratoire à l'aide d'une méthode évidente et inviolable, et être entreposé congelé² jusqu'à analyse additionnelle, si nécessaire.

4.2 Procédure d'analyse de l'essai

- Pour réaliser la procédure d'analyse de l'essai ou des essais, se reporter à la procédure d'analyse décrite dans la pochette explicative fournie avec les essais d'analyse et les procédures standard du laboratoire.
- En cas de contradiction entre la pochette explicative fournie avec les essais et les procédures opérationnelles standard du laboratoire, ou entre la pochette

explicative et les présentes lignes directrices, ce dernier document prime dans tous les cas.

4.2.1 Stratégie d'analyse

- Un couplage d'essais (par ex. Immunotech IGF-I + Orion P-III-NP) devrait être utilisé pour la procédure d'analyse initiale (tableau 2).
- Dans le cas d'un premier résultat d'analyse anormal présumé (RAAP), deux couplages d'essais différents seront utilisés pour la procédure de confirmation de l'échantillon « A » (tableau 2) à l'aide de trois nouvelles parties aliquotes de l'échantillon « A » d'origine⁴. Un des couplages d'essais peut être le même que celui utilisé pour la procédure d'analyse initiale.
- Pour la procédure de confirmation du « B », les deux couplages d'essais utilisés durant la confirmation de l'échantillon « A » doivent être appliqués à trois parties aliquotes prises dans l'échantillon « B » d'origine⁵. Le laboratoire doit se plier aux exigences du SIL 6.2.4.2.2.1 pour la réalisation de l'analyse de confirmation de l'échantillon « B ».
- Il est possible d'appliquer comme analyse unique pour la quantification IGF-I soit l'essai LC-MS/MS, soit l'essai LC-HRMS IGF-I (en d'autres termes, l'un ou l'autre essai peut être utilisé pour la procédure d'analyse initiale, et peut également être combiné à deux essais P-III-NP différents pour la ou les procédure(s) de confirmation.
- Pour les procédures de confirmation « A » et « B », trois parties aliquotes de l'échantillon doivent être mesurées, sauf si le volume de l'échantillon est limité, auquel cas on peut utiliser un nombre maximum de répliques plus faible.
- Conformément aux dispositions 6.2.4.2.1.4 et 6.2.4.2.2.8 du SIL, le laboratoire doit avoir une politique pour définir les circonstances où la procédure de confirmation d'un échantillon « A » ou « B » devrait être répétée (par ex. valeur à l'intérieur de l'essai $s_r > 10\%$).
- Il est recommandé que les laboratoires mettent en œuvre des échantillons de contrôle de qualité (QC) internes bien caractérisés et stables qui ne soient pas soumis à variations selon les lots d'essais, pour que les analyses puissent être effectuées dans des conditions d'essais différentes (lots d'essais différents, analystes différents, etc.). Suite à la préparation /réception par le laboratoire, tout le matériel QC devrait être aliquoté et entreposé congelé (de préférence à -80 °C pour un stockage de longue durée) jusqu'à son utilisation.

⁴ Les laboratoires qui n'ont pas la capacité d'analyse permettant de réaliser la procédure de confirmation avec un couplage d'essai supplémentaire feront, après consultation de l'autorité de contrôle compétente, expédier l'échantillon à un autre laboratoire disposant de cette capacité et qui procèdera à l'analyse.

Ces échantillons QC⁵ devraient être:

- **QC_{low}**: sérum obtenu d'individu(s) en bonne santé, présentant une valeur ≤ 200 ng/mL d'IGF-I et < 5 ng/mL de P-III-NP.
- **QC_{high}**: sérum obtenu d'études d'administration de la hGH ou d'une autre source appropriée et établie comme contenant des concentrations ≥ 500 ng/mL d'IGF-I et ≥ 10 ng/mL de P-III-NP.
- La répétabilité (s_r) et la précision intermédiaire (s_w) de l'essai seront évaluées par l'analyse de chaque échantillon QC en triple exemplaire en 5 à 6 occasions distinctes.
- Avec chaque nouveau lot de réactifs (c.à.d. nouveau numéro de lot), les étapes d'évaluation suivantes devraient être réalisées avant d'accepter le nouveau lot:
 - Chacun des échantillons QC sera déterminé au moins trois fois dès qu'un nouveau lot de réactifs est obtenu. Le nombre de répétitions par détermination sera celui stipulé par les fabricants de l'essai. Les QC peuvent être mesurés dans un seul essai ou sur une gamme d'essais. Si, pour un QC quelconque, la différence entre la concentration moyenne pour le nouveau lot et celle pour le lot précédent est supérieure à 20%, l'investigation du nouveau lot sera requise.
 - Pour détecter les changements mineurs mais systématiques au fil du temps, il est recommandé de contrôler la performance d'un nouveau lot de réactifs, par exemple par un diagramme/tableau cumulatif (CUSUM) établi pour chaque QC, sur la base de la différence entre la ou les moyenne(s) pour le nouveau lot et la ou les valeur(s) initiale(s). En cas d'utilisation du CUSUM, le résultat devrait être évalué à l'aide des procédures usuelles telles que détaillées sur le site <http://itl.nist.gov/div898/handbook/pmc/section3/pmc323.htm>.

5. Rapport et interprétation des résultats

5.1 Interprétation des résultats de l'analyse

Pour déterminer la conformité du résultat de l'analyse, le laboratoire doit comparer le score GH-2000 de l'*échantillon* (arrondi à deux chiffres après la virgule) avec les LD sexospécifiques correspondantes établies pour les couplages d'essais [23].

- Les valeurs de LD sont indiquées au tableau 2 ci-après ⁶.

⁵ Quatre échantillons QC peuvent également être utilisés, du moment qu'ils contiennent de l'IGF-I et du P-III-NP aux concentrations nécessaires (par ex. QC_{IGF-L_{low}}, QC_{IGF-L_{high}}, QC_{P_{III}NP_{low}} et QC_{P_{III}NP_{high}}).

⁶ Les valeurs de LD spécifiées ci-dessus ont été obtenues grâce à l'analyse des *échantillons* de sportifs traités dans les conditions de *contrôle du dopage* pour le prélèvement, le transport, le stockage et l'analyse des *échantillons* [23]. Les valeurs de LD établies définissent une

- L'IM des essais a déjà été considérée et incorporée dans l'estimation statistique basée sur la population de référence de la LD⁷ [24, 25]. C'est pourquoi l'IM d'essai ne doit pas être ajoutée pour la déclaration d'un *résultat d'analyse anormal* ou d'un *résultat atypique*.

Le score GH-2000 pour l'*échantillon* est calculé à l'aide des formules de fonction discriminante suivantes:

Score GH-2000 pour les hommes:

$$-6.586 + 2.905 * \ln(P-III-NP) + 2.100 * \ln(IGF-I) - 101.737 / \text{âge}$$

Score GH-2000 pour les femmes:

$$-8.459 + 2.454 * \ln(P-III-NP) + 2.195 * \ln(IGF-I) - 73.666 / \text{âge}$$

où $\ln(P-III-NP)$ et $\ln(IGF-I)$ sont les logarithmes naturels (ln) des valeurs de concentration moyenne obtenues à partir des répétitions mesurées de la partie aliquote de l'*échantillon* et où l'âge est arrondi à l'année inférieure la plus proche⁸.

spécificité d'analyse composée (entre les deux couplages d'essais utilisés pour la procédure de confirmation) d'au moins 99,99%. Ces valeurs de LD sont des valeurs conservatrices qui seront périodiquement précisées au fur et à mesure que davantage de données seront accumulées à partir d'études normatives et de tests de *contrôle du dopage* effectués par des laboratoires accrédités par l'*AMA*.

⁷Selon le document technique de l'*AMA* sur les limites de décision pour la quantification confirmatoire des substances à seuil (TDDL) [24], la règle de décision applicable aux essais pour lesquels la/les valeur(s) de seuil a/ont été établie(s) sur la base de statistiques de la population de référence incorpore déjà une bande de garde qui reflète l'incertitude des mesures fournies par le/les essai(s). C'est pourquoi la zone des valeurs d'analyse considérées comme conformes (négatives) ou non (*RAA*) par cette règle de décision serait définie par la valeur de seuil elle-même, qui constitue la LD.

⁸ Pour le calcul des scores GH-2000, les logarithmes naturels (ln) des concentrations moyennes de l'IGF-I et de la P-III-NP doivent être exprimés à 3 chiffres après la virgule. Cependant, pour les décisions de conformité (comparaison avec les LD des couplages d'essais et sexospécifiques), le score GH-2000 qui en découle doit être arrondi à deux chiffres après la virgule.

Tableau 2. Couplages d'essais possibles pour la procédure d'analyse initiale et la ou les procédure(s) de confirmation et limites de décision sexospécifiques applicables.

Sexe	Couplage d'essais (IGF-I + P-III-NP)	<u>LD1</u>
Hommes	LC-MS/MS ou LC-HRMS + Orion	9,70
	LC-MS/MS ou LC-HRMS + Siemens Advia Centaur	11,34
	IDS-Sys + Orion	9,00
	IDS-Sys + Siemens Advia Centaur	10,61
	ImmunoTech + Orion	9,98
	ImmunoTech + Siemens Advia Centaur	11,53
Femmes	LC-MS/MS ou LC-HRMS + Orion	8,56
	LC-MS/MS ou LC-HRMS + Siemens Advia Centaur	10,13
	IDS-Sys + Orion	7,79
	IDS-Sys + Siemens Advia Centaur	9,35
	ImmunoTech + Orion	8,62
	ImmunoTech + Siemens Advia Centaur	10,10

5.1.1 Résultat d'analyse anormal présumé (RAAP)

- La procédure d'analyse initiale produit un résultat d'analyse anormal présumé pour l'échantillon « A » si le score GH-2000 correspondant (arrondi à deux chiffres après la virgule) dépasse la LD sexospécifique préétablie (tableau 2) pour le couplage d'essais utilisé pour la procédure de dépistage.
- Si la méthode LC-MS/MS ou LC-HRMS est utilisée pour la quantification IGF-I au cours de la procédure d'analyse initiale, le résultat de l'analyse sera considéré comme un RAAP si le score GH-2000, calculé sur la base de la concentration IGF-I déterminée à partir de la quantification du peptide de diagnostic T1 ou T2 (tableau 3) dépasse la LD sexospécifique applicable au couplage d'essais utilisé (tableau 2).

5.1.2 Résultat d'analyse anormal (RAA)

- La procédure de confirmation produit un RAA si les scores GH-2000 de l'échantillon (arrondis à deux chiffres après la virgule) dépassent les LD sexospécifiques (tableau 2) établies pour les deux couplages d'essais utilisés pour la procédure de confirmation.
- Si la méthode LC-MS/MS ou LC-HRMS est utilisée pour la quantification IGF-I au cours de la procédure de confirmation, le résultat de l'analyse sera considéré comme un RAA si :
 - les scores GH-2000 calculés sur la base de la concentration IGF-I **moyenne** déterminée à partir de la quantification de T1 et de T2 dépasse les LD sexospécifiques établies au tableau 2 pour les deux couplages d'essais appliqués, et si les concentrations d'IGF-I dérivées de T1 et de T2 ne s'écartent pas de plus de 20% (tableau 3).

5.1.3 Résultat atypique (RA)

- La procédure de confirmation produit un RA si les scores GH-2000 (arrondis à deux chiffres après la virgule) dépassent la LD (tableau 2) pour seulement un des deux couplages d'essais employés pour la procédure de confirmation.
- Si la méthode LC-MS/MS ou LC-HRMS est utilisée pour la quantification IGF-I au cours de la procédure de confirmation, le résultat de l'analyse sera également considéré comme un RA si :
 - les scores GH-2000 calculés sur la base de la concentration IGF-I **moyenne** déterminée à partir de la quantification de T1 et de T2 dépassent les LD sexospécifiques déterminées au tableau 2, MAIS
 - les concentrations IGF-I déterminées à partir de la quantification de T1 et de T2 s'écartent de plus de 20% (tableau 3).
 - Dans de tels cas, le laboratoire répètera l'analyse LC-MS/MS ou LC-HRMS afin de vérifier la différence de concentration de T1 et de T2 de l'IGF-I avant de rapporter le résultat.

Tableau 3. Exemples d'interprétation des résultats d'analyses lors de l'application des méthodes LC-MS/MS ou LC-HRMS pour la quantification de l'IGF-I.

Procédure	$\frac{ T_1 - T_2 }{\text{MEAN}(T_1; T_2)}$	Score GH-2000			Interprétation/ rapport
		IGF-I (T1)	IGF-I (T2)	IGF-I moyenne (T1, T2)	
<u>Procédure d'analyse initiale</u>	N/A	N/A	> LD	N/A	RAAP
		> LD	N/A	N/A	RAAP
<u>Procédure de confirmation</u>	≤ 0,2	> LD	> LD	> LD	RAA
		> LD	< LD	> LD < LD	RAA <i>Négatif</i>
		< LD	> LD	> LD < LD	RAA <i>Négatif</i>
		< LD	< LD	< LD	<i>Négatif</i>
	> 0,2	> LD	> LD	> LD	RA
		> LD	< LD	> LD < LD	RA <i>Négatif</i>
		< LD	> LD	> LD < LD	RA <i>Négatif</i>
		< LD	< LD	< LD	<i>Négatif</i>

5.2 Rapport des résultats d'analyses

- En rapportant un *RAA* ou un *RA*, le rapport d'analyse du laboratoire doit inclure les scores GH-2000 moyens venant de déterminations en triple exemplaire (obtenus durant la procédure de confirmation) exprimés à deux chiffres après la virgule, les valeurs de la LD applicable ainsi que l'incertitude type composée de l'essai (u_c , exprimée comme *ET*) à des valeurs proches de la LD telle que déterminée par le laboratoire.
- En outre, la documentation du laboratoire doit inclure les valeurs de concentration moyennes de l'IGF-I et du P-III-NP venant de déterminations en triple exemplaire (obtenues durant la procédure de confirmation, exprimées au chiffre entier le plus proche pour l'IGF-I et à deux chiffres après la virgule

pour le P-III-NP) et l'équivalent de l'IM élargie à l'intervalle de couverture de 95% ($U_{95\%}$, $k = 2$) pour la valeur du score GH-2000 pour l'échantillon.

Exemple de rapport d'analyse (par ex. pour un échantillon venant d'un sportif de sexe masculin) :

L'analyse de l'échantillon identifié ci-dessus à l'aide de l'analyse des biomarqueurs de la hGH a produit les scores GH-2000 suivants: 10,90 pour la paire d'essais '1' [IDS IGF-I + Centaur P-III-NP] et 9,90 pour la paire d'essais '2' [LC-MS/MS IGF-I + Orion P-III-NP], qui sont supérieurs aux LD correspondantes propres aux hommes de 10,61 et 9,70, respectivement. L'incertitude type composée (u_c) estimée par le laboratoire à des niveaux proches de la LD est de 0,40 pour la paire d'essais '1' et de 0,35 pour la paire d'essais '2'. Cela constitue un *résultat d'analyse anormal* pour la hGH.

6. Incertitude de mesure de l'essai

6.1 Incertitude type composée (u_c)

- A titre général, les laboratoires doivent se reporter au TDDL [24] pour l'estimation de l'IM d'un essai.
- Les laboratoires doivent déterminer l' u_c de chaque essai sur la base de leurs données de validation de l'essai.

L' u_c est un paramètre dynamique qui peut être réduit par une amélioration croissante de la réalisation des essais. L'établissement d'une valeur fiable d' u_c reposerait sur des mesures multiples réalisées sur une longue période, afin de tenir compte de certaines sources d'incertitude (telles que les changements de l'environnement, la performance des instruments, les différents analystes, etc.).

- L'ISO/IEC 17025 recommande que l' u_c soit estimée à l'aide d'une approche cohérente avec les principes décrits dans le Guide ISO/IEC pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) [26].
- Pour l'application à la méthode des marqueurs hGH, l'approche suivante est recommandée pour le calcul du budget de l' u_c :

La valeur de l' u_c , applicable aux scores GH-2000 proches de la LD découlera de l' u_c contributive des essais de composantes (applicable aux logarithmes naturels (ln) des valeurs des concentrations mesurées) en utilisant la loi de propagation de l'incertitude, selon les formules (1)⁹:

(1) Pour les hommes:

$$u_c (\text{score}) = \sqrt{8.44 * u_c^2 [\ln (\text{P-III-P})] + 4.41 * u_c^2 [\ln (\text{IGF-I})]}$$

Pour les femmes:

$$u_c (\text{score}) = \sqrt{6.02 * u_c^2 [\ln (\text{P-III-P})] + 4.82 * u_c^2 [\ln (\text{IGF-I})]}$$

⁹ Dans les formules (1) et (2), l' u_c (résultat) et l' u_c contributive associée aux valeurs des logarithmes naturels des concentrations mesurées devraient être exprimées en tant qu'écart-types (*ET*).

- L' u_c associée aux valeurs des logarithmes naturels (ln) des concentrations déterminées avec les essais IGF-I et P-III-NP doit être estimée à partir de la précision intermédiaire (s_w) et le biais des ln déterminés selon la formule (2)¹².

$$(2) \quad u_c = \sqrt{s_w^2 + u_{bias}^2}$$

- Pour le calcul de l' $u_{c,r}$, on utilisera soit un échantillon QC unique, contenant de l'IGF-I et du P-III-NP dans des concentrations appropriées (par ex. QC_{high}) soit deux échantillons QC distincts contenant de l'IGF-I à ~500-800 ng/mL (par ex. QC_{IGF-I-high}) et du P-III-NP à ~10-20 ng/mL (par ex. QC_{P-III-NP-high})¹⁰. Ces QC devraient être aliquotés et stockés congelés (de préférence à -80°C pour stockage de longue durée) jusqu'à utilisation.
- Les échantillons de QC et quatre ½ dilutions différentes devraient être mesurés en triple exemplaire sur 5-6 jours par au moins 2 analystes différents. Cela garantirait que la s_w soit calculée sur la plage physiologique de concentration des *marqueurs* de la hGH susceptible d'être trouvée dans des échantillons produisant des valeurs de scores GH-2000 proches des LD.
- Le biais sera établi par comparaison avec les moyennes à long terme du laboratoire du ln des valeurs de concentration obtenues par ex. pour les échantillons QC_{low} et QC_{high} avec les valeurs attendues déterminées par le biais d'un cycle EQAS éducatif de l'AMA ou d'une étude collaborative inter-laboratoires. La contribution du biais à l' u_c est exprimée en écart en tant que RMS_{bias} .

6.2 Niveaux maximaux d' u_c

Conformément au TDDL [24], les laboratoires doivent avoir des valeurs d' $u_{c,r}$ applicables aux valeurs proches de la LD pour chaque couplage d'essais, inférieurs ou égaux aux valeurs maximales d' $u_{c,Max}$.

6.3 Incertitude élargie ($U_{95\%}$)

Pour la détermination de l'incertitude élargie $U_{95\%}$, il est possible d'appliquer un facteur de couverture $k=2$ si u_c présente un niveau de fiabilité de 95 %.

$$(3) \quad U_{95\%} = k * u_{c,r} \text{ où } k=2$$

¹⁰ Puisque les résultats GH-2000 dépendent de l'âge du donneur, afin de produire les valeurs pertinentes des résultats GH-2000 (proches des LD), l'âge des donneurs devrait se situer dans l'idéal entre 20 et 40 ans.

6.4 Vérification de l'incertitude de la mesure

Les laboratoires doivent se reporter au TDDL [24] pour la vérification permanente des estimations de l'IM de l'essai.

7. Définitions

7.1 Termes définis dans le Code

AMA: l'Agence mondiale antidopage.

Code: le Code mondial antidopage.

Contrôle: partie du processus global de *contrôle du dopage* comprenant la planification de la répartition des *contrôles*, le prélèvement des *échantillons*, leur manipulation et leur transport au laboratoire.

Contrôle du dopage: toutes les étapes et toutes les procédures allant de la planification de la répartition des *contrôles* jusqu'à la décision finale en appel, y compris toutes les étapes et toutes les procédures intermédiaires, par exemple la transmission d'information sur la localisation, le prélèvement des *échantillons* et leur manipulation, l'analyse de laboratoire, les *AUT*, la gestion des résultats et les audiences.

Echantillon ou *prélèvement*: toute matrice biologique recueillie dans le cadre du *contrôle du dopage*.

Marqueur: composé, ensemble de composés ou variable(s) biologique(s) qui attestent de l'*usage d'une substance interdite* ou d'une *méthode interdite*.

Résultat atypique: rapport d'un laboratoire accrédité ou approuvé par l'*AMA* pour lequel une investigation supplémentaire est requise par le Standard international pour les laboratoires ou les Documents techniques connexes avant qu'un *résultat d'analyse anormal* ne puisse être établi.

Résultat d'analyse anormal: rapport d'un laboratoire accrédité par l'*AMA* ou d'un autre laboratoire approuvé par l'*AMA* qui, en conformité avec le Standard international pour les laboratoires et les Documents techniques connexes, révèle la présence dans un *échantillon* d'une *substance interdite* ou d'un de ses *métabolites* ou *marqueurs* (y compris des quantités élevées de substances endogènes) ou l'*usage d'une méthode interdite*.

Sportif: toute *personne* qui dispute une *compétition* sportive au niveau international (telle que définie par chacune des fédérations internationales) ou au niveau national (telle que définie par chacune des *organisations nationales antidopage*). Une *organisation antidopage* est libre d'appliquer des règles antidopage à un *sportif* qui n'est ni un *sportif de niveau international* ni un *sportif de niveau national*, et ainsi de le faire entrer dans la définition de « sportif ». En ce qui concerne les *sportifs* qui ne sont ni de *niveau international* ni de *niveau national*, une *organisation antidopage* peut choisir de réaliser des *contrôles* limités ou de ne réaliser aucun *contrôle*, de procéder à des analyses d'*échantillons* portant sur un menu plus restreint de *substances interdites*, de ne pas exiger d'informations sur la localisation ou de limiter l'étendue de ces informations, ou de ne pas exiger à l'avance des *AUT*. Cependant, si une violation des règles antidopage prévue à l'article 2.1, 2.3 ou 2.5 est commise par un *sportif* relevant d'une *organisation antidopage* et qui prend part à une *compétition* d'un niveau inférieur au niveau international ou national, les *conséquences* énoncées dans le Code (sauf l'article 14.3.2) doivent être appliquées. Aux fins des articles 2.8 et 2.9 ainsi qu'à des fins d'information et d'éducation antidopage, toute *personne* qui

prend part à une *compétition* sportive et qui relève d'un *signataire*, d'un gouvernement ou d'une autre organisation sportive reconnaissant le *Code* est un *sportif*.

Standard international: standard adopté par l'AMA en appui du *Code*. La conformité à un *standard international* (par opposition à d'autres standards, pratiques ou procédures) suffira pour conclure que les procédures envisagées dans le *standard international* en question sont correctement exécutées. Les *standards internationaux* comprennent les documents techniques publiés conformément à leurs dispositions.

7.2 Termes définis dans le *SIL*

Analyse: couvre les procédés de *contrôle du dopage* impliquant la manipulation de l'*échantillon*, l'*analyse* et le rendu des résultats suivant la réception au laboratoire.

Chaîne de possession interne du laboratoire: séquence, dûment documentée, des *personnes* ayant eu la garde de l'*échantillon* et de toute partie aliquote prélevées aux fins d'analyse.

[*Commentaire: la documentation relative à la chaîne de possession interne se présente généralement sous la forme d'enregistrements écrits indiquant la date, le lieu, la nature de l'action effectuée sur un échantillon ou une partie aliquote d'un échantillon, et le nom de la personne ayant effectué cette action.*]

Documentation du laboratoire: ensemble des documents produits par le laboratoire à l'appui d'un *résultat d'analyse anormal* conformément au Document technique de l'AMA sur la documentation du laboratoire.

Incertitude de la mesure (IM): paramètre associé au résultat d'une mesure qui caractérise la dispersion des valeurs quantitative attribuées à un mesurande.

[*Commentaire: la connaissance de l'IM augmente la confiance en la validité du résultat d'une mesure.*]

Laboratoire(s): laboratoire(s) accrédité(s) par l'AMA appliquant, dans le cadre d'activités antidopage, des méthodes et procédés d'analyse visant à l'obtention de données démontrant la présence, dans des *échantillons* d'urine ou dans d'autres matrices biologiques, de *substances*, *méthodes* ou *marqueurs interdits* par la *Liste des interdictions* ou, le cas échéant, permettant de quantifier une substance à seuil.

Limite de décision: une concentration, qui prend en compte l'incertitude combinée maximale permise, et au-dessus de laquelle un *résultat d'analyse anormal* doit être rapporté.

Partie aliquote: portion de l'*échantillon* de fluide ou tissu biologique (par ex. urine, sang) obtenu du *sportif* et utilisé dans le processus d'analyse.

Précision intermédiaire: variabilité des résultats observée au sein d'un même laboratoire lorsque l'on fait varier un ou plusieurs facteurs (tels que l'heure, l'équipement ou l'opérateur).

Procédure d'analyse initiale: procédure d'analyse visant à identifier les *échantillons* qui pourraient contenir une *substance interdite*, un ou plusieurs *métabolite(s)* d'une *substance interdite*, ou un ou plusieurs *marqueur(s)* indiquant l'*usage* d'une *substance interdite* ou d'une *méthode interdite*, ou la quantité d'une *substance interdite*, de *métabolite(s)* d'une *substance interdite*, ou de *marqueur(s)* indiquant l'*usage* d'une *substance interdite* ou d'une *méthode interdite*.

Procédure de confirmation: procédure d'analyse visant à établir la présence ou à mesurer la concentration/le rapport, dans un *échantillon*, d'une ou de plusieurs *substances interdites* spécifiques, d'un ou de plusieurs *métabolite(s)* d'une *substance interdite*, ou d'un ou

plusieurs *marqueur(s)* indiquant l'*usage* d'une *substance interdite* ou d'une *méthode interdite*.

[*Commentaire: une procédure de confirmation pour une substance à seuil donnera également une indication de la concentration/du rapport de la substance interdite supérieur(e) à la limite de décision applicable (telle qu'indiquée dans le Document technique sur les limites de décision).*]

Répétabilité, sr: variabilité des résultats observée au sein d'un laboratoire, sur un court intervalle de temps, avec le même opérateur, le même matériel, etc.

Résultat d'analyse anormal *présumé*: statut du résultat d'analyse d'un *échantillon* qui a donné lieu à un résultat suspect lors de la procédure d'analyse initiale, mais n'a pas encore fait l'objet d'une analyse de confirmation.

Standard international pour les laboratoires (SIL): le *Standard international* applicable aux laboratoires inclus dans le présent document.

Substance à seuil: *substance interdite* exogène ou endogène, *métabolite* exogène ou endogène ou *marqueur* d'une *substance interdite* exogène ou endogène, qui est analysé(e) quantitativement et pour lequel/laquelle un résultat d'analyse (concentration, rapport ou score) supérieur(e) à une limite de décision prédéterminée constitue un *résultat d'analyse anormal*. Les substances à seuil sont identifiées en tant que telles dans le Document technique sur les limites de décision (TD DL).

7.3 Termes définis dans le *Standard international* pour les *contrôles* et les *enquêtes* (SICE)

Autorité de contrôle: organisation qui a autorisé un prélèvement d'*échantillon*, que ce soit (1) une *organisation antidopage* (par ex. le Comité International Olympique ou une autre *organisation responsable de grandes manifestations*, l'AMA, une fédération internationale ou une *organisation nationale antidopage*); ou (2) une autre organisation réalisant des *contrôles* en vertu de l'autorité, et conformément aux règles, de l'*organisation antidopage* (par ex. une fédération nationale qui est membre d'une fédération internationale).

Autorité de prélèvement des échantillons: organisation responsable du prélèvement des *échantillons* conformément aux exigences du *Standard international* pour les *contrôles* et les *enquêtes*, que ce soit (1) l'*autorité de contrôle* elle-même; ou (2) une autre organisation (par exemple un tiers sous-traitant) à qui l'*autorité de contrôle* a délégué ou sous-traité cette responsabilité (étant entendu que, conformément au *Code*, l'*autorité de contrôle* reste toujours responsable en dernier ressort du respect des exigences du *Standard international* pour les *contrôles* et les *enquêtes* en matière de prélèvement des *échantillons*).

8. Bibliographie

1. *Code mondial antidopage, standard international pour les laboratoires* v8.0. Agence mondiale antidopage, Montréal, Canada (2015).
<https://www.wada-ama.org/fr/ressources/laboratoires/standard-international-pour-les-laboratoires-sil>
2. Powrie JK, Bassett EE, Rosen T *et al.* Detection of growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res* **17**(3):220-6 (2007).

3. Guha N1, Erotokritou-Mulligan I, Bartlett C *et al.*. Biochemical markers of insulin-like growth factor-I misuse in athletes: the response of serum IGF-I, procollagen type III amino-terminal propeptide, and the GH-2000 score to the administration of rhIGF-I/rhIGF binding protein-3 complex.. *J Clin Endocrinol Metab.* **99**(6):2259-68 (2014). doi: 10.1210/jc.2013-3897. Publication électronique 25 février 2014.
4. Holt RI, Sonksen PH. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. *Br J Pharmacol* **154**(3):542-56 (2008).
5. Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, McHugh C *et al.* The GH-2004 project: the response of IGF1 and type III pro-collagen to the administration of exogenous GH in non-Caucasian amateur athletes. *Eur J Endocrinol* **163**(1):45-54 (2010).
6. Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE, Kniess A, Sonksen PH, Holt RI. Validation of the growth hormone (GH)-dependent marker method of detecting GH abuse in sport through the use of independent data sets. *Growth Horm IGF Res* **17**(5):416-23 (2007).
7. Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C *et al.* Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(4):1505-12 (2000).
8. Wallace JD, Cuneo RC, Lundberg PA *et al.* Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(1):124-33 (2000).
9. Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R *et al.* Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab* **84**(10):3591-601 (1999).
10. Dall R, Longobardi S, Ehrnborg C *et al.* The effect of four weeks of supraphysiological growth hormone administration on the insulin-like growth factor axis in women and men. GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(11):4193-200 (2000).
11. Nelson AE, Meinhardt U, Hansen JL *et al.* Pharmacodynamics of growth hormone abuse biomarkers and the influence of gender and testosterone: a randomized double-blind placebo-controlled study in young recreational athletes. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(6):2213-22 (2008).
12. Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE *et al.* Influence of ethnicity on IGF-I and procollagen III peptide (P-III-P) in elite athletes and its effect on the ability to detect GH abuse. *Clin Endocrinol (Oxf)* **70**(1):161-8 (2009).
13. Erotokritou-Mulligan I, Bassett E.E., Cowan DA *et al.* The use of growth hormone (GH)-dependent markers in the detection of GH abuse in sport: Physiological intra-individual variation of IGF-I, type 3 pro-collagen (P-III-P) and the GH-2000 detection score. *Clin Endocrinol (Oxf)* **72**(4):520-6 (2010).
14. Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE, Bartlett C, Cowan D *et al.* The effect of sports injury on insulin-like growth factor-I and type 3 procollagen: implications for

- detection of growth hormone abuse in athletes. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(7):2760-3 (2008).
15. Healy ML, Dall R, Gibney J *et al.* Toward the development of a test for growth hormone (GH) abuse: a study of extreme physiological ranges of GH-dependent markers in 813 elite athletes in the postcompetition setting. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2):641-9 (2005).
 16. Nelson AE, Howe CJ, Nguyen TV *et al.* Influence of demographic factors and sport type on growth hormone-responsive markers in elite athletes. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(11):4424-32 (2006).
 17. Healy ML, Gibney J, Pentecost C, *et al.* Endocrine profiles in 693 elite athletes in the postcompetition setting. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **81**(2):294-305 (2014). doi: 10.1111/cen.12445. Publication électronique 2 avril 2014.
 18. Cox HD, Lopes F, Woldemariam GA *et al.* Interlaboratory Agreement of Insulin-like Growth Factor 1 Concentrations Measured by Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **60**:541-548 (2014).
 19. Bidlingmaier M, Friedrich N, Emeny RT *et al.* Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (igf-i) from birth to senescence: results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations. *Clin Endocrinol Metab*. **99**: 1712-21 (2014).
 20. Knudsen CS, Heickendorff L, Nexø E. Measurement of amino terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) employing the ADVIA Centaur platform. Validation, reference interval and comparison to UniQ RIA. *Clin Chem Lab Med* **52**(2): 237-241 (2014).
 21. Programme mondial antidopage. Lignes directrices pour le prélèvement des échantillons sanguins.
[https://www.wada-ama.org/fr/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A190](https://www.wada-ama.org/fr/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A190)
 22. Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, Ridley SA *et al.* A determination of the pre-analytical storage conditions for insulin like growth factor-I and type III procollagen peptide. *Growth Horm IGF Res* **19**(1):43-50 (2009).
 23. Holt RI, Böhning W, Guha N *et al.* The development of decision limits for the GH-2000 detection methodology using additional insulin-like growth factor-I and amino-terminal pro-peptide of type III collagen assays. *Drug Test Anal* 2015 Jan 21. doi: 10.1002/dta.1772. [Publication électronique avant impression]
 24. Document technique de l'AMA TDDL: Limites de décision pour la quantification confirmatoire des substances de seuil (en anglais).
[https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_resource_collections%3A30](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_resource_collections%3A30)
 25. Bassett EE, Erotokritou-Mulligan I. Statistical issues in implementing the marker method. *Growth Horm IGF Res* **19**(4):361-5 (2009).

26. ISO/IEC Guide 98-3: 2008. Evaluation des données de mesure – Guide pour l'incertitude de mesure (GUM) (2008).

<http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>

Bibliographie détaillée décrivant l'analyse des biomarqueurs de la hGH

- Abellan R, Ventura R, Palmi I *et al.* Immunoassays for the measurement of IGF-II, IGFBP-2 and -3, and ICTP as indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. Values in selected population of athletes. *J Pharm Biomed Anal.* **48**(3):844-52 (2008).
- Abellan R, Ventura R, Pichini S *et al.* Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant growth hormone misuse: insulin-like growth factor I and procollagen type III peptide. *Int J Sports Med.* **27**(12):976-83 (2006).
- Abellan R, Ventura R, Pichini S *et al.* Evaluation of immunoassays for the measurement of insulin-like growth factor-I and procollagen type III peptide, indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. *Clin Chem Lab Med.* **43**(1):75-85 (2005).
- Armanini D, Faggian D, Scaroni C, Plebani M. Growth hormone and insulin-like growth factor I in a Sydney Olympic gold medalist. *Br J Sports Med.* **36**(2):148-9 (2002).
- Bassett EE, Erotokritou-Mulligan I. Statistical issues in implementing the marker method. *Growth Horm IGF Res.* **19**(4):361-5 (2009).
- Chung L, Baxter RC. Detection of growth hormone responsive proteins using SELDI-TOF mass spectrometry. *Growth Horm IGF Res.* **19**(4):383-7 (2009).
- Di Luigi L, Rigamonti AE, Agosti F *et al.* Combined evaluation of resting IGFI, N-terminal propeptide of type III procollagen and C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen levels might be useful for detecting inappropriate GH administration in female athletes. *Eur J Endocrinol.* **160**(5):753-8 (2009).
- Di Luigi L, Guidetti L. IGF-I, IGFBP-2, and -3: do they have a role in detecting rhGH abuse in trained men? *Med Sci Sports Exerc.* **34**(8):1270-8 (2002).
- Ding J, List EO, Okada S, Kopchick JJ. Perspective: proteomic approach to detect biomarkers of human growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* **19**(4):399-407 (2009).
- Ehrnborg C, Lange KH, Dall R *et al*; GH-2000 Study Group. The growth hormone /insulin-like growth factor-I axis hormones and bone markers in elite athletes in response to a maximum exercise test. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(1):394-401 (2003).
- Erotokritou-Mulligan I, Eryl Bassett E, Cowan DA *et al.* The use of growth hormone (GH)-dependent markers in the detection of GH abuse in sport: Physiological intra-individual variation of IGF-I, type 3 pro-collagen (P-III-P) and the GH-2000 detection score. *Clin Endocrinol (Oxf).* **72**(4):520-6 (2010).
- Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE, Cowan DA *et al*; GH-2004 group. Influence of ethnicity on IGF-I and procollagen III peptide (P-III-P) in elite athletes and its effect on the ability to detect GH abuse. *Clin Endocrinol (Oxf).* **70**(1):161-8 (2009).

- Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE, Bartlett C *et al*; GH-2004 Group. The effect of sports injury on insulin-like growth factor-I and type 3 procollagen: implications for detection of growth hormone abuse in athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* **93**(7):2760-3 (2008).
- Erotokritou-Mulligan I, Bassett EE, Kniess A, Sonksen PH, Holt RI. Validation of the growth hormone (GH)dependent marker method of detecting GH abuse in sport through the use of independent data sets. *Growth Horm IGF Res.* **17**(5):416-23 (2007).
- Guha N, Erotokritou-Mulligan I, Burford C *et al*. Serum insulin-like growth factor-I and pro-collagen type III N-terminal peptide in adolescent elite athletes: implications for the detection of growth hormone abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**(6):2969-76 (2010).
- Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, McHugh C *et al*. The GH-2004 project: the response of IGF1 and type III pro-collagen to the administration of exogenous GH in non-Caucasian amateur athletes. *Eur J Endocrinol.* **163**(1):45-54 (2010).
- Holt RI, Bassett EE, Erotokritou-Mulligan I, McHugh C *et al*; GH-2004 group. Moving one step closer to catching the GH cheats: The GH-2004 experience. *Growth Horm IGF Res.* **19**(4):346-51 (2009).
- Holt RI, Erotokritou-Mulligan I, Sonksen PH. The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res.* **19**(4):320-6 (2009).
- Kicman AT, Miell JP, Teale JD *et al*. Serum IGF-I and IGF binding proteins 2 and 3 as potential markers of doping with human GH. *Clin Endocrinol (Oxf).* **47**(1):43-50 (1997).
- Kniess A, Ziegler E, Kratzsch J, Thieme D, Muller RK. Potential parameters for the detection of hGH doping. *Anal Bioanal Chem.* **376**(5):696-700 (2003).
- Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C *et al*. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* **85**(4):1505-12 (2000).
- McHugh CM, Park RT, Sonksen PH, Holt RI. Challenges in detecting the abuse of growth hormone in sport. *Clin Chem.* **51**(9):1587-93 (2005).
- Minuto F, Barreca A, Melioli G. Indirect evidence of hormone abuse. Proof of doping? *J Endocrinol Invest.* **26**(9):919-23 (2003).
- Nelson AE, Ho KK. Demographic factors influencing the GH system: Implications for the detection of GH doping in sport. *Growth Horm IGF Res.* **19**(4):327-32 (2009).
- Nelson AE, Howe CJ, Nguyen TV *et al*. Influence of demographic factors and sport type on growth hormone-responsive markers in elite athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* **91**(11):4424-32 (2006).
- Nguyen IV, Nelson AE, Howe CJ *et al*. Within subject variability and analytic imprecision of insulin like growth factor axis and collagen markers: implications for clinical diagnosis and doping tests. *Clin Chem.* **54**(8):1268-76 (2008).
- Pichini S, Ventura R, Palmi R *et al*. Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of growth hormone and insulin misuse: Immunoassay-based measurement in urine samples. *J Pharm Biomed Anal.* **53**(4):1003-10 (2010).

- Powrie JK, Bassett EE, Rosen T *et al*; GH-2000 Project Study Group. Detection of growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res.* **17**(3):220-6 (2007).
- Sartorio A, Jubeau M, Agosti F *et al*. A follow-up of GH dependent biomarkers during a 6-month period of the sporting season of male and female athletes. *J Endocrinol Invest.* **29**(3):237-43 (2006).
- Sartorio A, Agosti F, Marazzi N *et al*. Combined evaluation of resting IGF-I, N-terminal propeptide of type III procollagen (P-III-NP) and Cterminal cross-linked telopeptide of type I collagen (ICTP) levels might be useful for detecting inappropriate GH administration in athletes: a preliminary report. *Clin Endocrinol (Oxf).* **61**(4):487-93 (2004).
- Thevis M, Bredehöft M, Kohler M, Schänzer W. Mass spectrometry-based analysis of IGF-I and hGH. *Handb Exp Pharmacol.* **195**:201-7 (2010).
- Thevis M, Thomas A, Schänzer W. Doping control analysis of selected peptide hormones using LCMS(/MS). *Forensic Sci. Int.* **213**:35-41 (2011)
- Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R *et al*. Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab.* **84**(10):3591-601 (1999).