

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 15 Avril 2014
Par M. Ridouan BENAISA

Directeur de thèse : Dr Madjid TAGZIRT

**MIRCERA[®] : INDICATIONS THERAPEUTIQUES, UTILISATION
FRAUDULEUSE EN MILIEU SPORTIF ET METHODES DE DETECTION.**

Membres du jury :

Président : Madame GRAS Hélène, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur(s) : Monsieur TAGZIRT Madjid, Maître de Conférences, Laboratoire d'Hématologie, Faculté de Pharmacie de Lille

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur NEGGAZ Mehdi, Pharmacien d'officine



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Patrick PELAYO
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Monique CAPRON
Professeur Salem KACET
Madame Stéphanie DAMAREY
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Edouard DANJOU

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Damien CUNY
Assesseurs : Mme Nadine ROGER
Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs : Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique

M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
<hr/>			
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
<hr/>			
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie

Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie

M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille 2
Droit et Santé

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans
les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

Remerciements

Je remercie en premier lieu mes parents, mes frères et sœurs Hayat, Nadir, Najoua et Assia et l'ensemble de ma famille restée à mes côtés et qui m'a soutenu depuis la 1^{ère} année...

Je tiens à remercier le Dr Madjid TAGZIRT, pour son intérêt, son encadrement et son implication dans ce travail de thèse.

Je remercie également Madame GRAS qui a accepté de présider le jury de thèse.

Merci à Mehdi, Docteur en Pharmacie en tant que membre du jury.

Mariam, merci à toi...

Mes amis : Seb, Amér, Oliver, Arnaud, Akram, Imane, Ouss, Nassira et tous celles et ceux que j'ai oublié de citer...

Je n'oublie pas Madame Joseline NGALESAMY et son équipe qui me forment pour le stage de 6^e année.

«Çok teşekkürler» Yilmaz ÇAPAN, à Ankara, l'ensemble de l'équipe ILKO, ainsi que l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées pendant mon séjour en Turquie et que je n'oublierai jamais...

Les maîtres de stages qui m'ont énormément appris pendant mon cursus : Eric FOULON, J-M FOIRET, Grégoire MOINS et l'ensemble de l'équipe FASONUT qui m'a initié les bases de l'industrie pharmaceutique.

Merci à Monsieur Daniel VION, ancien Doyen de la Faculté de Pharmacie à qui je dois beaucoup pour en être arrivé là où j'en suis aujourd'hui...

Ainsi que les Profs qui ont répondu à l'ensemble des questions que je leur ai posé pendant ce long et douloureux séjour passé à la fac....

Table des matières

Listes des abréviations.....	12
Liste des figures	13
Introduction.....	16
1. Généralités	17
1.1. Erythropoïèse.....	17
1.1.1. Définition	17
1.1.2. Lignée érythrocytaire	17
1.1.3. Les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythropoiesis)	18
1.1.4. Les CFU-E (Colony Forming Unit-Erythropoiesis)	18
1.1.5. Les précurseurs érythropoïétiques	18
1.2. Hémoglobine (Hb) et anémie	20
1.2.1. L'hémogramme	21
1.2.1.1. Analyses quantitatives	21
1.2.1.2. Analyses qualitatives	21
1.2.1.3. Numération des réticulocytes	22
1.3. Régulation de l'érythropoïèse	22
1.3.1. Régulation positive	22
1.3.2. Régulation négative	24
1.4. L'Erythropoïétine (EPO).....	25
1.5. Rôle du facteur de transcription HIF	27
1.5.1. Description	27
1.5.2. Mécanisme de régulation de la production d'EPO par HIF dans les conditions normales d'oxygène	28
1.5.3. Mécanisme de régulation de la production d'EPO par HIF en condition d'hypoxie	29
1.6. Synthèse de l'EPO	29
1.6.1. Synthèse rénale	29
1.6.2. Synthèse hépatique	29
1.6.3. Autres sites de synthèse	29
1.7. Récepteurs de l'érythropoïèse	30
1.7.1. Le récepteur à l'EPO (EPO-R)	30
1.7.2. Le récepteur à la transferrine (TfR2)	30
1.7.3. Le MPL	31
1.7.4. Affinité de l'EPO pour son récepteur	32
2. L'Insuffisance Rénale Chronique (IRC).....	33
2.1. Physiologie rénale	33
2.2. Définition de l'IRC.....	35

2.3.	Les conséquences.....	36
2.4.	Les facteurs de risque.....	36
3.	Les différentes EPO recombinantes.....	37
3.1.	Historique	37
3.2.	Les différentes EPO recombinantes humaines.....	38
3.2.1.	L'EPO α	39
3.2.2.	L'EPO β	40
3.2.3.	La Darbepoétine α	40
3.2.4.	L'Epoïétine δ	41
3.2.5.	Récapitulatif des Agents Stimulants l'Erythropoïèse (ASE).....	42
3.3.	Modifications chimiques des EPO.....	42
3.3.1.	L'intérêt de la glycosylation.....	42
3.3.2.	L'intérêt de la pégylation.....	42
3.4.	Mircera®	44
3.4.1.	Présentation de Mircera®	44
3.4.2.	Mécanisme d'action.....	45
3.4.3.	Les études de sécurité et d'efficacité	45
a.	Les études précliniques <i>in vitro</i>	45
b.	Les études précliniques <i>in vivo</i>	46
c.	Les études de Phase I.....	46
d.	Les études de Phase II.....	46
e.	Les études de Phase III.....	47
f.	Les études de correction de l'anémie et traitement d'entretien.....	47
g.	Les études de tolérance.....	50
3.4.4.	Le service médical rendu (SMR)	51
3.4.5.	L'amélioration du service médical rendu.....	52
3.5.	Composition.....	53
3.6.	Posologies et mode d'administration.....	53
3.7.	Effets indésirables.....	54
3.8.	Mise en garde et précaution d'emploi	55
3.9.	Interactions médicamenteuses	55
3.10.	Contre-indications	55
3.11.	Pharmacocinétique.....	56
3.12.	Absorption et biodisponibilité.....	56
3.12.1.	La voie sous-cutanée.....	56

3.12.2. La voie intraveineuse	56
3.12.3. Distribution et élimination	56
4. Effets recherchés en milieu sportif.....	58
4.1 Impact de l'EPO sur les muscles	58
4.2. Rappels d'anatomie et de physiologie musculaire	58
4.3 Description de l'apport bénéfique d'O ₂ aux muscles à partir d'EPO endogènes et recombinantes	61
4.3.2. L'importance du volume en dioxygène (VO ₂)	63
4.3.3. L'impact de l'EPO sur l'EPO-R musculaire	64
4.4. Cas d'utilisation de Mircera dans le milieu sportif.....	64
4.4.1. Tour de France 2008.....	64
4.4.2. Tour d'Italie 2008	65
4.4.3. Jeux olympiques de Pékin de 2008	66
4.4.4. Coupe d'Europe de Football 2008.....	67
5. Les risques induits par des injections d'EPO recombinantes.....	68
6. Stratégies antidopage et techniques de détection	72
6.1. Introduction et historique	72
6.2. Protocole à suivre.....	72
6.3. Démarches à suivre.....	73
6.4. Spectrométrie de masse (MS)	73
6.4.1. Définition	73
6.4.2. Principe de la détection	74
6.5. EPO WGA MAIIA	76
6.5.1. Principe	76
6.5.2. Protocole	76
6.5.3. Identification de la rhuEPO	77
6.6. L'électrophorèse	79
6.7. IEF –PAGE	80
6.7.1. Principe	80
6.7.2. Protocole	81
6.8. SDS-PAGE	82
6.8.1. Description	82
6.8.2. 2D-Electrophoresis	83
6.9. Sarcosyl-PAGE	84
7. Place de l'Industrie Pharmaceutique dans la lutte contre le dopage.....	92
7.1. Historique de la lutte contre le dopage	92

7.2. AMGEN.....	94
7.3. Roche.....	94
7.4. GLAXO-SMITH-KLINE (GSK).....	94
7.5. IFPMA.....	95
7.6. Conference internationale de l'industrie pharmaceutique et la lutte contre le dopage..	96
BIBLIOGRAPHIE.....	99
Annexes.....	108
ANNEXE 1 : Etudes réalisées lors des essais cliniques de Mircera®.....	108
ANNEXE 2 : WADA Technical Document- TDEPO2013.....	109
ANNEXE 3: WADA document method MAIIA.....	112
ANNEXE 4 : WADA Technical Document : Passeport Biologique de l'Athlète.....	117

Listes des abréviations

Ac Anti EPO= Anticorps anti EPO
AFLD=Agence Française de Lutte contre le Dopage
AMM=Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM=Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ASMR=Amélioration du Service Médical Rendu
BFU-E= Burst Forming Unit Erythropoiesis
CCMH= Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobines,
CFU-E= Colony Forming Unit Erythropoiesis
CFU-GEMM = Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Megacaryocyte/
Macrophage
CEPS= Comité Economique des Produits de Santé
CERA=Continuous Erythropoietin Receptor Activator
CHO=Cell Hamster Ovarian
CHUV= Centre Hospitalier Université du Vaudois
Clcr=Clairance à la Créatine
DFG=Débit de Filtration Glomérulaire
DPO=Darbépoïétine alpha
EER = Epuration ExtraRénale
ELISA= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA=European Medicine Agency
EPO=Erythropoïétine
EPO-R=Récepteur à l'EPO
FGR= Filtration Glomérulaire Rénale
G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor
HAS=Haute Autorité de Santé
Hb=Hémoglobine, en anglais HGB=Hémoglobine
HIF=Hypoxia Inducible Factor
IEF= IsoElectric Focalisation
IPFMA= International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations
IRC=Insuffisance Rénale Chronique
IRT=Insuffisance Rénale Chronique Terminale
LNDD=Laboratoire National de Dépistage du Dopage
LOCOG= London Organising Committee of the Olympic Games and paralympic
games
MAIIA= Membrane Assisted Isoform ImmunoAssay
PBA= Passeport Biologique de l'Athlète
Page=PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
RBC =Red Blood Cells
RET#= Numération des réticulocytes
RET%=Pourcentage de réticulocytes
RhuEPO= Recombinant Human Erythropoetin
SAR-Page= Sarcosyl-Page
TCMH= Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobines, en anglais MCH=
TPO = thrombopoïétine
TfR=Récepteur à la transferrine
UEFA= Union Européenne de Football Association
UKAD= United Kingdom AntiDoping
UNESCO= United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
VGM=Volume Globulaire Moyen
WADA= World AntiDoping Agency

Liste des figures

Figure 1 : Erythropoïèse chez l'Homme, (D'après Elliott et al, 2008)

Figure 2. Structure quaternaire de l'hémoglobine (à gauche), structure de l'hème et courbe de saturation de l'hémoglobine (à droite).

Figure 3: Régulation positive de l'érythropoïèse

Figure 4 : Synergie d'action entre EPO et SCF pour la survie cellulaire

Figure 5: Régulation négative de l'érythropoïèse et mécanismes d'activation des caspases via Fas

Figure 6 : Structure primaire (à gauche) (Camus et al 2002) et structure tridimensionnelle de l'EPO (à droite)

Figure 7 : Activation de la synthèse d'EPO endogène en fonction des variations en pression en oxygène

Figure 8 : Activation de la synthèse d'EPO via le facteur de transcription HIF dans les conditions d'hypoxie.

Figure 9 : Activation de la synthèse en EPO suite à l'activation de EPO-R

Figure 10 : Représentation anatomique du rein

Figure 11 : Anatomie d'un néphron

Figure 12 : Glycosylation des résidus Asparagine (Asn) et Serine (Ser) sur une chaîne protéique d'EPO

Figure 13: Représentation quaternaire de l'EPO α (D'après Girard et al, 2012)

Figure 14 : Comparaison de la liaison à EPO-R de l'EPO recombinante (A) et Darbépoïétine. α (B) avec la mise en évidence des acides sialiques

Figure 15: Historique des ASE depuis leur mise sur le marché.

Figure 16 : Structure primaire de la molécule MIRCERA (en gras, les acides aminés glycosylés)

Figure 17: Comparaison de la taille d'une glycoprotéine type Mircera (à droite) avec une érythropoïétine endogène (à gauche)

Figure 18: Circuit des démarches à suivre en vue de l'obtention d'une AMM

Figure 19: Les demi-vies des différents d'Agents stimulant l'érythropoïèse.

Figure 20: Activité de l'EPO dans divers tissu

Figure 21 : Représentation anatomique d'une coupe de muscle et sa liaison à l'os.

Figure 22: Cycle de Krebs, étape indispensable dans le développement musculaire

Figure 23: Activation de la chaîne respiratoire mitochondriale à partir du cycle de Krebs

Figure 24: Données montrant la relation entre l'élévation du taux d'hémoglobine en fonction de la V_{O2} chez 94 sujets sains âgés de 7 à 30 ans

Figure 25 Article de presse concernant un athlète inculpé lors du Tour de France 2008

Figure 26 Article de presse concernant des athlètes inculpés lors des Jeux Olympiques de 2008

Figure 27: Différentes méthodes de détection directe de l'EPO par IEF, SDS et SAR-PAGE (à gauche) (Reichel C et al 2011) et procédure de confirmation (à droite).

Figure 28: les étapes à suivre à l'intérieur d'un spectromètre de masse.

Figure 29: Comparaison des séquences d'acides amines de l'EPO endogène de cheval (eEPO), l'EPO endogène humaine (hEPO) et la Darbépoïétine alpha.

Figure 30 : Comparaison spectrométrique d'un échantillon plasmatique provenant d'un plasma contrôle (à gauche) et d'un plasma positif pour le Mircera (à droite)

Figure 31: Protocole schématisé de la méthode MAIIA. D'après Maria Lönnberg et al, 2012).

Figure 32: Intensité de la bandelette marquée par un anticorps anti-EPO en fonction de la concentration en EPO (ng/mL) selon la méthode EPO WGA MAIIA (Maria Lönnberg et al, 2012).

Figure 33: Comparaison des profils PMI de l'EPO endogène à 3 autres ASE (Mircera, NeoRecormon, Aranesp) en fonction de la concentration en GlcNAc

Figure 34 : Résultats obtenus des différentes EPO après fixation sur la bandelette grâce à l'affinité d'un anticorps par chromatographie

Figure 35: Principe de l'électrophorèse

Figure 36: Représentation à l'échelle moléculaire du polyacrylamide

Figure 37 : Profils des ASE sur support IEF Page

Figure 38 : Représentation moléculaire du sodium dodecyl sulfate

Figure 39: Image d'une SDS PAGE d'uEPO, de rhuEPO α et β , ainsi que NESP et CERA

Figure 40: Comparaison des profils de migration électrophorétique des EPO recombinantes (Mircera, NESP et Dynepo) en présence de SDS (A, B, C) et Sarcosyl (D, E, F) en Western-Blot (A, D) et après coloration au bleu de Coomassie R-250 (BE).

Figure 41 Western-Blot des EPO recombinantes en présence de Sarcosyl

Figure 42 : Profil des différentes EPO dont Mircera de J0 à J11 sur Sar-Page

Figure 43 : Principe simplifié d'un test ELISA sur support solide.

Figure 44: Evolution des concentrations sériques (ng/mL) de Mircera (CERA, ng/ml) en fonction du temps (en jours) chez 6 patients ayant reçu une injection de 200 μ g de Mircera par voie sous-cutanée (S₁, S₂ et S₃) ou par voie intraveineuse (S₄, S₅ et S₆).

Figure 45: Représentation du passeport hématologique de l'athlète suivant le réseau Bayésien

Figure 46: Evolution de la masse en hémoglobine (HGB) de deux sportifs détectés négatif (gauche) ou positif (droite) au Mircera

Listes des tableaux

Tableau 1 Numération formule sanguine (Adulte)

Tableau 2 : Description des différentes études en traitement d'entretien en Phase III des essais cliniques

Tableau 3 : Résultats des différentes études en traitement d'entretien en Phase III des essais cliniques

Tableau 4 : Doses initiales d'administration de Mircera en fonction des quantités précédemment administrés

Introduction

L'Erythropoïétine (EPO) est une hormone naturellement produite à 90% par le rein et 10% par le foie chez l'adulte. Elle est synthétisée lorsque la pression artérielle en oxygène (PaO₂) diminue induisant ainsi la stimulation de l'érythropoïèse, c'est-à-dire la production des érythrocytes (globules rouges ou hématies) dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques indifférenciées.

Les patients qui présentent une insuffisance rénale chronique (IRC) voient leur synthèse en EPO diminuée, provoquant une carence en EPO et de fait une anémie normocytaire normochrome, le plus souvent arégénérative.

Au cours de ces vingt dernières années, d'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés permettant aujourd'hui de disposer d'EPO de 3^{ème} et 4^{ème} génération. Leur utilisation réduit ainsi les risques liés à la transfusion.

La CERA (Continuous Erythropoetin Receptor Activator) est une EPO de 3^{ème} génération commercialisée sous le nom de Mircera[®] par ROCHE, laboratoire d'industrie pharmaceutique Suisse. En France, Mircera est indiqué dans le traitement de l'anémie liée à l'IRC.

La stimulation de l'érythropoïèse, via les EPO de synthèses, permet aux érythrocytes d'assurer le transport de l'oxygène vers les tissus. Ces effets ont été exploités à des fins de dopage par certains sportifs de haut niveau.

Des techniques de dosages de plus en plus sophistiquées permettent de déceler l'utilisation de ces produits au niveau sanguin et urinaire. Roche développe aux côtés de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD), une méthode particulièrement efficace, permettant de détecter Mircera chez les sportifs l'ayant détourné de son usage thérapeutique.

Dans ce mémoire, intitulé « Mircera[®] : indications thérapeutiques, utilisation frauduleuse en milieu sportif et méthode de détectations », nous rappellerons dans un premier temps la définition de l'érythropoïèse, le rôle de l'EPO avant d'aborder l'IRC. Nous détaillerons ensuite les différentes EPO recombinantes avant de nous consacrer à l'étude plus approfondie de Mircera. Nous verrons enfin son utilisation frauduleuse en milieu sportif, ses conséquences et les techniques de détectations permettant de déceler Mircera. Enfin, nous discuterons de la place de l'industrie pharmaceutique dans la lutte contre le dopage sportif.

1. Généralités

1.1. Erythropoïèse

1.1.1. Définition

L'érythropoïèse est un processus physiologique défini par l'ensemble des étapes qui concourent à la formation des érythrocytes (globules rouges ou hématies) à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ce processus, à la fois complexe et finement régulé, a lieu au niveau de la moelle osseuse. L'érythropoïèse permet d'adapter la production des globules rouges aux besoins en oxygène des tissus périphériques.

L'EPO est l'hormone principale régulant la production des globules rouges. La production d'EPO doit être constante et suffisante : elle ne doit pas être excessive, au risque d'aboutir à une forme de polyglobulie (nombre de globules rouges supérieur à la norme), et induire une viscosité sanguine ; elle ne doit pas être insuffisante, au risque de provoquer une anémie (diminution du taux d'hémoglobine en dessous des valeurs physiologiques) (Elliott et al, 2008, Duthilleul et al, 2013).

1.1.2. Lignée érythrocytaire

C'est à partir du 5^{ème} mois du développement embryonnaire que débute chez l'Homme, l'hématopoïèse médullaire siège de l'érythropoïèse définitive.

Les globules rouges émanent d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) pluripotente qui va s'engager dans une voie de différenciation myéloïde à partir d'un progéniteur mixte appelé CFU-GEMM (pour *Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Megacaryocyte/ Macrophage*).

Ces progéniteurs vont s'engager dans une phase d'engagement (*commitment*). Non reconnaissables morphologiquement, ils sont capables de former *in vitro* des colonies en présence de facteurs de croissances. Plus les progéniteurs sont précoces, plus ils vont former de colonies mixtes.

Les CFU-GEMM vont ensuite se différencier vers un progéniteur restreint dans la voie érythrocytaire, les BFU-E (pour *Burst Forming Unit Erythropoiesis*, (Duthilleul et al, 2013)).

1.1.3. Les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythropoiesis)

Les BFU-E forment des colonies de grandes tailles (30.000 à 40.000 cellules). Ils sont représentés par les BFU-E matures et les BFU-E immatures. Leur capacité d'auto-renouvellement est diminuée (80% sont en phase G0) alors que leur capacité proliférative est importante. Elles présentent une faible sensibilité à l'EPO. Les récepteurs de l'EPO (EPO-R) sont en effet peu exprimés à la surface des BFU-E. Leur survie (sauvetage de l'apoptose) et leur prolifération est sous la dépendance de cytokines (IL-3, GM-CSF, SCF) (Duthilleul et al, 2013).

1.1.4. Les CFU-E (Colony Forming Unit-Erythropoiesis)

Les CFU-E dérivent des BFU-E. Ils présentent une capacité d'autorenouvellement (60 à 80% phase Go) et une capacité proliférative réduite.

Leur survie et leur prolifération dépendent de plusieurs cytokines, en particulier l'EPO. Les EPO-R sont présents en nombre plus important à la surface des CFU-E.

Le CFU-E va proliférer et se différencier par étapes successives pour aboutir à la formation de précurseurs de la lignée érythroblastique.

L'engagement des progéniteurs multipotents vers la lignée érythrocytaire semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1 qui permet la régulation positive des promoteurs des gènes érythroïdes comme la glycophorine, l'hémoglobine et le récepteur à l'EPO (Elliott et al, 2008, Duthilleul et al, 2013).

1.1.5. Les précurseurs érythroïétiques

Les précurseurs de la lignée érythroblastique représentent 10 à 30% des cellules médullaires. La durée de l'érythropoïèse est d'environ 5 jours. La synthèse des globules rouges est de $1 \text{ à } 2 \cdot 10^{11}$ cellules par jour.

Sur un frottis médullaires, les érythroblastes sont souvent regroupés en îlot autour d'un macrophage. Ils sont morphologiquement identifiables (proérythroblaste, érythroblaste basophile, érythroblaste polychromatophile, érythroblaste acidophile, réticulocyte, érythroblaste acidophile). Un proérythroblaste donnera 16 globules rouges. La maturation nucléocytoplasmique des précurseurs se caractérise par la diminution de la taille cellulaire ainsi que du rapport nucléo-cytoplasmique.

Les proérythroblastes (0.5 à 2%) vont se différencier successivement en érythroblastes basophiles (2 à 5%), puis en érythroblastes polychromatophiles (6 à 9%), puis en érythroblastes acidophiles (6 à 10%). C'est à ce stade que le noyau est expulsé. Les réticulocytes émanent des érythroblastes acidophiles et ont une taille proche de celles des cellules du dernier stade de maturation, les hématies (7,5 µm),. La numération des réticulocytes permet de définir le caractère régénératif ou arégénératif d'une anémie de type normocytaire normochrome. Ils mûrissent en 24 à 48 heures avant de devenir des hématies matures. Leur durée de vie est d'environ 120 jours (Elliott et al, 2008, Duthilleul et al, 2013).

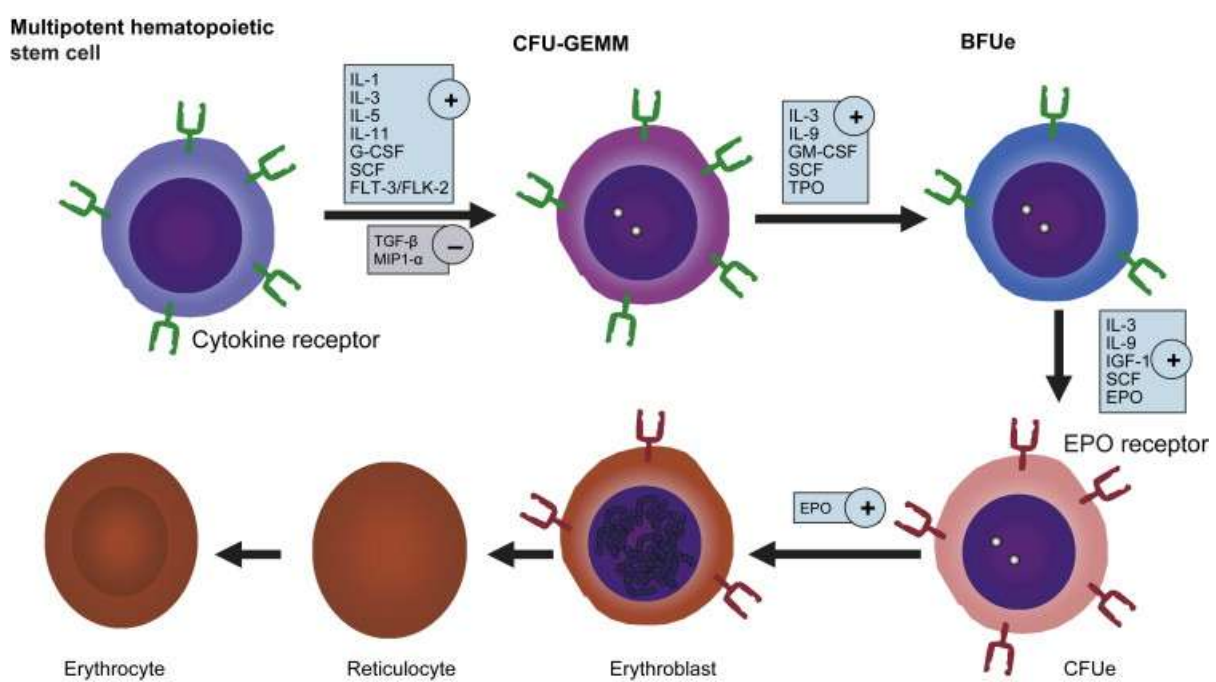


Figure 1 : Erythropoïèse chez l'Homme, (D'après Elliott et al, 2008)

La régulation de l'érythropoïèse est sous la dépendance de cytokine et facteur de croissance. Epo = érythropoïétine; FLK = fetal liver kinase; FLT = fetal liver tyrosine kinase ; G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF = granulocyte macrophage CSF; IL = interleukin; MIP = macrophage inflammatory protein; SCF = stem cell factor; TGF = transforming growth factor; et TPO = thrombopoïétine.

1.2. Hémoglobine (Hb) et anémie

Les hématies contiennent de l'hémoglobine, une protéine de structure quaternaire constituée de quatre chaînes identiques 2 à 2. Deux chaînes α de 141 acides aminés et deux chaînes β de 146 acides aminés.

Chacune des ces chaînes est associée à un groupement porphyrine, l'hème, qui emprisonne un atome de fer à l'état ferreux.

L'oxyhémoglobine représente la forme active de l'hémoglobine dans laquelle le fer est sous forme Fe^{2+} . Lorsque le fer est sous forme Fe^{3+} , il s'agit de la méthémoglobine.

La fonction principale de l'hémoglobine est le transport du dioxygène (O_2) du sang vers les tissus. Sous la forme oxyhémoglobine, la liaison du O_2 à l'hémoglobine est dite allostérique, l'affinité de liaison de l'hémoglobine pour l'oxygène est affectée par la saturation en oxygène de la molécule (chaque monomère fixant une molécule d' O_2). La courbe d'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine se présente sous la forme d'une sigmoïde (figure 2) (Elliott et al, 2008).

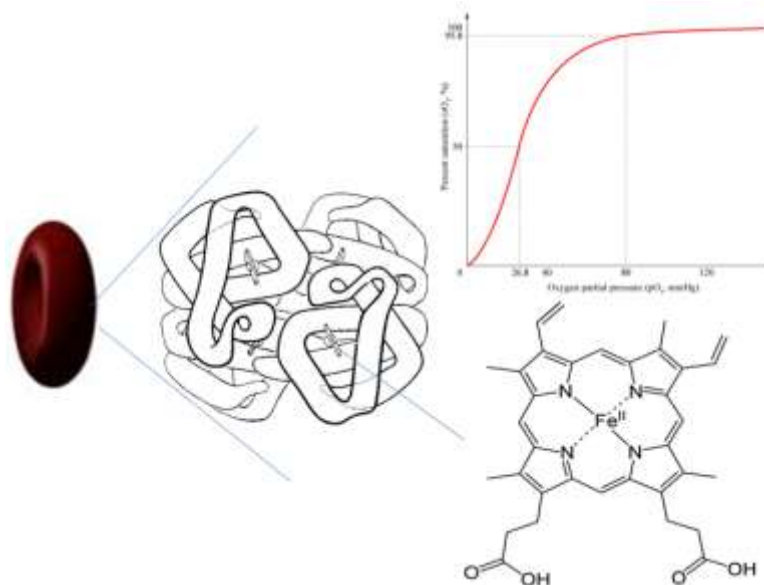


Figure 2. Structure quaternaire de l'hémoglobine (à gauche), structure de l'hème et courbe de saturation de l'hémoglobine (à droite). (Dickerson et al, 1983)

L'anémie constitue la plus fréquente des anomalies en hématologie. Elle se définit par la baisse du taux en hémoglobine au dessous de la limite inférieure de la normalité (après avoir éliminé une fausse anémie par hémodilution). La valeur de l'hémoglobine sanguine varie en fonction du sexe et de l'âge. Chez l'adulte, on

évoque une anémie quand les taux sont <13g/dl chez l'homme et <12g/dl chez la femme.

1.2.1. L'hémogramme

Sur le plan biologique, le diagnostic de l'anémie se fait à partir de l'analyse de l'hémogramme (numération formule sanguine, NFS). Il est réalisé grâce à un prélèvement de sang veineux, sur un tube contenant un anticoagulant (EDTA). Il consiste en une analyse quantitative (automate ou manuelle) des éléments figurés du sang (globules rouges, leucocytes et plaquettes) et un examen morphologiques des cellules au microscope optique (grossissement X1000).

Tableau 1: Numération formule sanguine (Adulte) (Constantes biologiques adultes, 2009)

Sg Hemoglobine	(H): 130 - 170 g/L (F): 120 - 160 g/L
Sg Erythrocytes	(H): 4,5 - 5,7 T/L (F): 4,2 - 5,2 T/L
Sg Hematocrite	(H): 0, 42 - 0, 54 (42 - 54%) (F): 0, 37 - 0, 47 (37 - 47%)
VGM	80 - 100 fL
CCMH	32 - 35%
TCMH	27 - 32 pg
Sg Réticulocytes	20 - 80 G/L
Polynucléaires neutrophiles	45 à 70% (2 à 7.5 G/L)
Polynucléaires éosinophiles	1 à 3% (0.04 à 0.5 G/L)
Polynucléaires basophiles	0.5% (<0.1 G/L)
Lymphocytes T	20 à 40% (1 à 4 G/L)
Monocytes	3 à 7% (0.2 à 1 G/L)
Plaquettes	150 à 400 G/L

1.2.1.1. Analyses quantitatives

L'analyse quantitative des globules rouges détermine le nombre des différents éléments du sang (globules rouges, globules blancs, plaquettes), le taux d'hémoglobine et l'hématocrite.

1.2.1.2. Analyses qualitatives

L'analyse des constantes érythrocytaires telles que le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la

teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) sont importantes pour diagnostiquer l'étiologie de l'anémie.

VGM = Hématocrite / nombre de globules rouges

Lorsque le VGM est supérieur à 100 fL on parle de macrocytose; s'il est associé à une anémie, celle-ci est qualifiée d'anémie macrocytaire. Un VGM supérieur à 120 fL fait suspecter une mégaloblastose (qui ne peut s'affirmer qu'au myélogramme), en cas d'anémie associée on parle d'anémie mégaloblastique.

Lorsque le VGM est inférieur à 80 fL, on parle de microcytose, et en cas d'anémie associée, on parle d'anémie microcytaire

TCMH=Hémoglobine / Érythrocyte.

Il correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans un érythrocyte. Les normes sont comprises entre 27 et 32 pg.

CCMH=Hémoglobine / Hématocrite

Les normes sont comprises entre 32 et 37%.

Pour la TCMH et la CCMH, un taux inférieur signe une hypochromie, et en cas d'anémie associée on parle d'anémie hypochrome. L'hyperchromie n'est pas physiologique et marque plutôt une erreur de calibration de l'automate de mesure.

1.2.1.3. Numération des réticulocytes

Les réticulocytes sont les précurseurs des hématies. Ils représentent 0.5 à 2% du total des hématies. Dans le cadre d'une anémie, sa numération indique son caractère régénératif (>100 G/L) ou arégénératif (<100 G/L).

1.3. Régulation de l'érythropoïèse

1.3.1. Régulation positive

a. Le SCF (Stem Cell Factor)

Le SCF est un facteur de croissance produit par les cellules stromales de la moelle osseuse. Il agit sur le récepteur c-kit (fonction tyrosine kinase) et induit des signaux intracellulaires, essentiellement de survie et de prolifération sur les progéniteurs érythroïdes (BFU-E et CFU-E). Le SCF agit essentiellement dans les phases précoces de l'érythropoïèse, en synergie avec d'autres facteurs de croissance tels que le GM-CSF et l'IL-3 (Zemati et al, 2003).

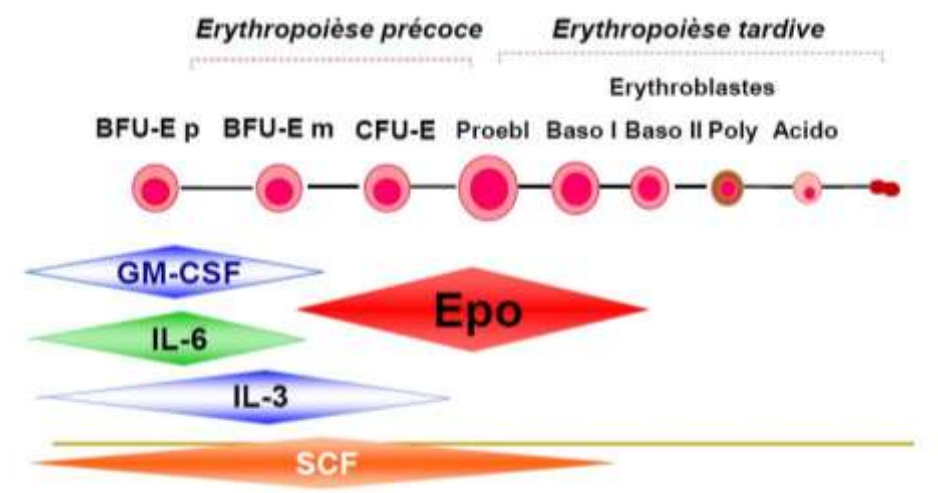


Figure 3: Régulation positive de l'érythropoïèse (Duthilleul et al, 2014)

b. Le système rénine-angiotensine

L'angiotensine II est un facteur de croissance impliqué dans la production de l'EPO. Il agit via un récepteur cellulaire, le récepteur 1 de l'angiotensine (AT-1). Le mécanisme d'induction implique la présence d'EPO et conduit à la voie de transduction JAK-STAT (Jelkmann et al, 2011). L'interaction ligand-récepteur induit une homodimérisation des EPO-R, conduisant au recrutement de protéines JAK2 et à l'autophosphorylation des domaines intracellulaire de l'EPO-R. Ce mécanisme permet la prolifération et la survie des progéniteurs et ce, grâce à PI3K et Map-kinase.

Par la suite, STAT (STAT-5A et STAT-5B) se fixe sur l'EPO-R, qui sera à son tour phosphorylé par JAK-2. STAT-5 phosphorylé va alors s'homodimériser puis migrer vers le noyau et augmenter l'expression des gènes. STAT-5 agit en synergie avec GATA-1 permettant l'augmentation de l'expression de Bcl-xL impliqué dans la survie cellulaire (Zemati et al, 2003).

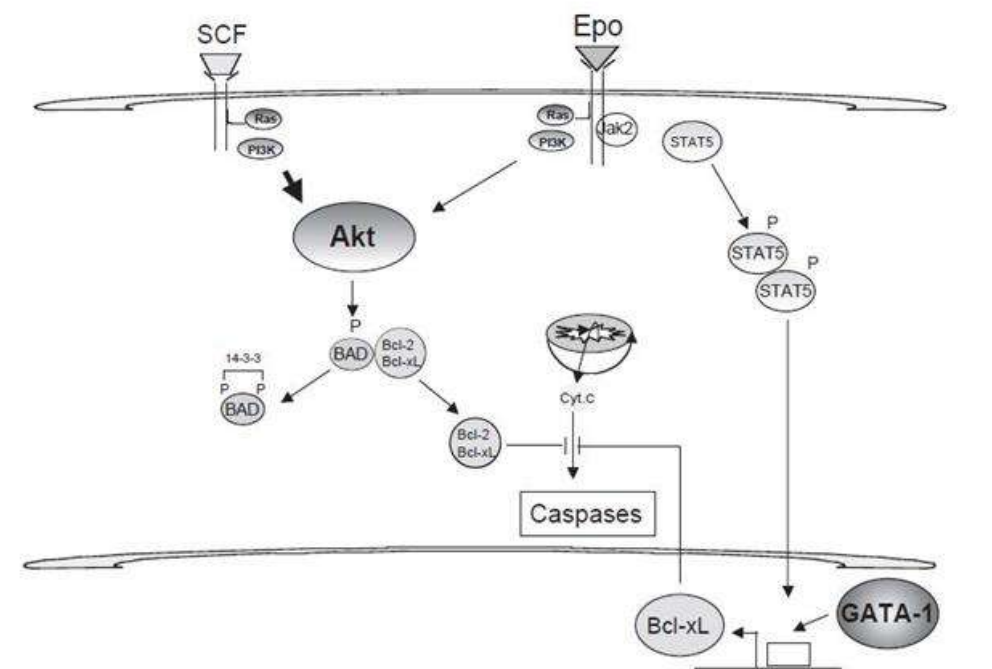


Figure 4 : Synergie d'action entre EPO et SCF pour la survie cellulaire (Zermati et al, 2003).

c. EPO

Le rôle de l'EPO est détaillé dans un chapitre spécifique.

1.3.2. Régulation négative

Afin d'éviter une surproduction de globules rouges, la synthèse d'EPO est régulée négativement via une diminution de ces taux circulants. Les mécanismes de régulation font intervenir des signaux de mort cellulaire programmée (apoptose), tels que Fas et Fas-L. Cette voie permet le recrutement et l'activation des caspases 3, 6, 7, 8 et 9 impliquées dans l'apoptose et le clivage de GATA-1 (Zemati et al, 2001 ; De Maria et al, 1999).

Durant les phases tardives de l'érythropoïèse, l'expression de l'EPO-R peut être régulée négativement empêchant l'action de l'EPO sur la survie cellulaire.

A ce jour, au moins 6 facteurs de transcription GATA situés sur le chromosome 19 ont été identifiés, agissant sur le gène de l'EPO-R.

GATA-1 est indispensable dans les phases tardives de l'érythropoïèse puisqu'elle agit sur la prolifération des progéniteurs et peut interagir avec de nombreux autres

facteurs de transcription (FOG-1, EKLF, TAL-1/SCL, PU.1). De plus, elle est capable de réguler progressivement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. GATA-2 intervient majoritairement dans les phases précoces de l'érythropoïèse. Il a également une activité dans la répression de la différenciation (Noguchi et al, 2008).

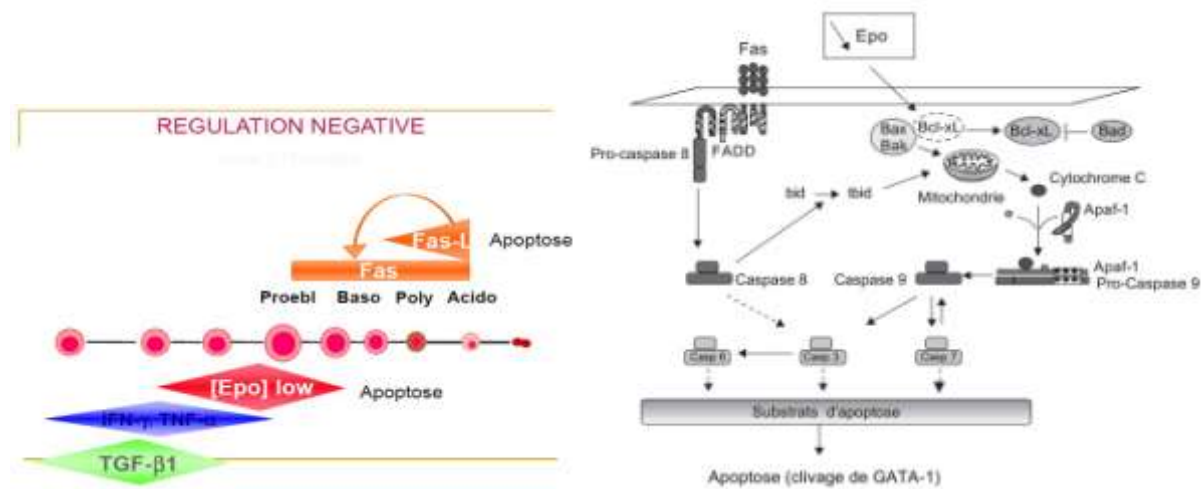


Figure 5: Régulation négative de l'érythropoïèse et mécanismes d'activation des caspases via Fas (Duthilleul et al, 2014 ; Zermati et al, 2003).

1.4. L'Erythropoïétine (EPO)

Les premiers travaux sur l'EPO ont permis de montrer qu'au cours du développement fœtal, l'érythropoïèse et la synthèse d'EPO ont lieu au niveau du foie (Zanjani et al, 1981 et Dame et al, 1998). D'autres travaux ont mis en évidence que cette production ne démarre qu'à la 18^{ème} semaine du développement embryonnaire (Dame et al, 1998 ; Obara et al, 2008 ; Jul et al, 1998 ; Koury et al, 1991). Après la naissance et jusqu'au 18^e mois, lorsque l'hématopoïèse se produit exclusivement dans la moelle osseuse, le rein devient le principal organe producteur d'EPO (Dame et al, 1998, Noguchi et al, 2008). L'EPO jouant un rôle d'hormone, le rein est alors considéré comme une glande (Zermati et al, 2003). Ainsi, chez les patients néphrectomisés, il y a absence de réponse à l'anémie.

La synthèse de l'EPO s'effectue au niveau des fibroblastes du cortex et de la médullaire externe. Ces fibroblastes de l'intersticium répondent de manière différente à la stimulation hypoxique. Leur localisation entre les capillaires péri-tubulaires et ces tubules leur permettent d'être plus sensibles aux variations en oxygène (Maxwell et al 1997). Les fibroblastes de la médullaire interne ne sont pas concernés par cette

production. Les mécanismes responsables de la sensibilité des cellules à l'hypoxie mettent en jeu les facteurs de transcription HIF (*Hypoxia Inducible Factor*).

En plus du rein, le foie adulte est capable de produire de l'EPO, les cellules impliquées étant les hépatocytes et les cellules de Ito.

L'EPO est une glycoprotéine composée de 165 acides aminés sous forme de 4 hélices α reliées par deux ponts-disulfures. Sa masse moléculaire est de 30.4 kDa (Noguchi et al, 2008). Elle est composée de 4 chaînes glycosylées (3 N-glycosylation et 1 O-glycosylation) qui représentent 40% de sa masse moléculaire (Bunn et al 2013) (figure 6).

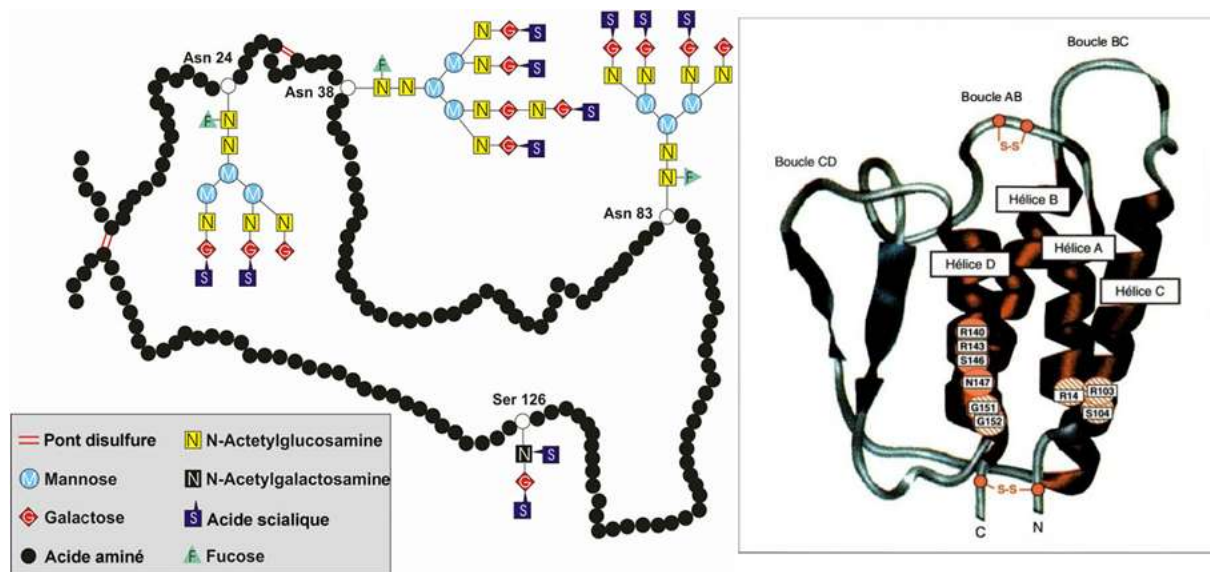


Figure 6 : Structure primaire (à gauche) (Camus et al 2002) et structure tridimensionnelle de l'EPO (à droite) (Lacombe et al, 1995).

L'EPO est le principal facteur de croissance de l'érythropoïèse puisqu'elle intervient dans la prolifération, la différenciation et la survie des progéniteurs de la lignée érythrocytaire. Dans les conditions normales en oxygène, les concentrations en EPO sérique sont de 10 à 25 mU/mL (Lin et al, 1985). Ils permettent de maintenir des taux en hémoglobine à un niveau physiologique (120 à 170 g/L) (Zermati et al 2003). Lorsque l'organisme est en hypoxie ou en anémie, la synthèse en EPO peut augmenter son taux circulant d'un facteur 1000 et stimuler la production des globules rouges.

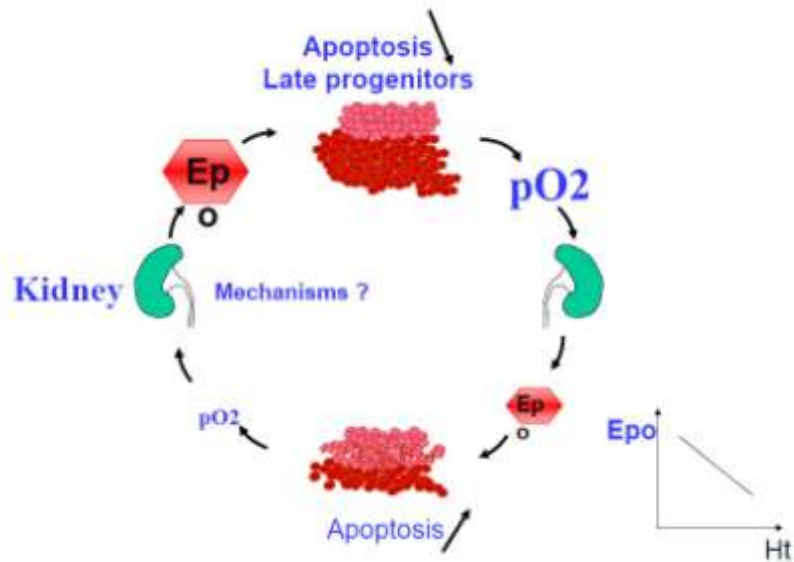


Figure 7 : Activation de la synthèse d'EPO endogène en fonction des variations en pression en oxygène

La demi-vie de l'EPO est assez courte (4 à 7 h). Peu de données sur le métabolisme de l'EPO sont disponibles. Il est probable que la dégradation de l'EPO survienne après clivage enzymatique dans le foie des acides sialiques terminaux des glycanes. Chez le sujet sain, l'élimination de l'EPO s'effectue principalement au niveau hépatique via le récepteur Gal. L'élimination rénale de l'EPO est moins importante (Surindan et al, 2011 ; Bunn et al, 2007 ; Eckardt et al, 1989) et les concentrations en EPO dans les urines sont comprises entre 0 et 3.7 IU/L. Ces taux urinaires peuvent être augmentés chez les cyclistes (entre 7 à 20 IU/L) (Delanghe et al, 2008).

1.5. Rôle du facteur de transcription HIF

1.5.1. Description

Les facteurs de transcription qui activent la transcription du gène de l'EPO dans des conditions d'hypoxie ont été identifiés et purifiés depuis de nombreuses années. Ces facteurs appelés HIF (Hypoxia Inducible Factor) sont capable de lier la région 3' non codante de l'EPO. La molécule HIF est un hétérodimère composé de 2 sous-unités α et β . Trois isoformes (HIF-1, HIF-2, HIF-3) ont été identifiés chez l'Homme. La sous-unité α est inductible par l'oxygène avec une sensibilité différente pour les formes HIF-1 et HIF-2, alors que la sous-unité β est constitutive (Agarwal N, et al, 2008).

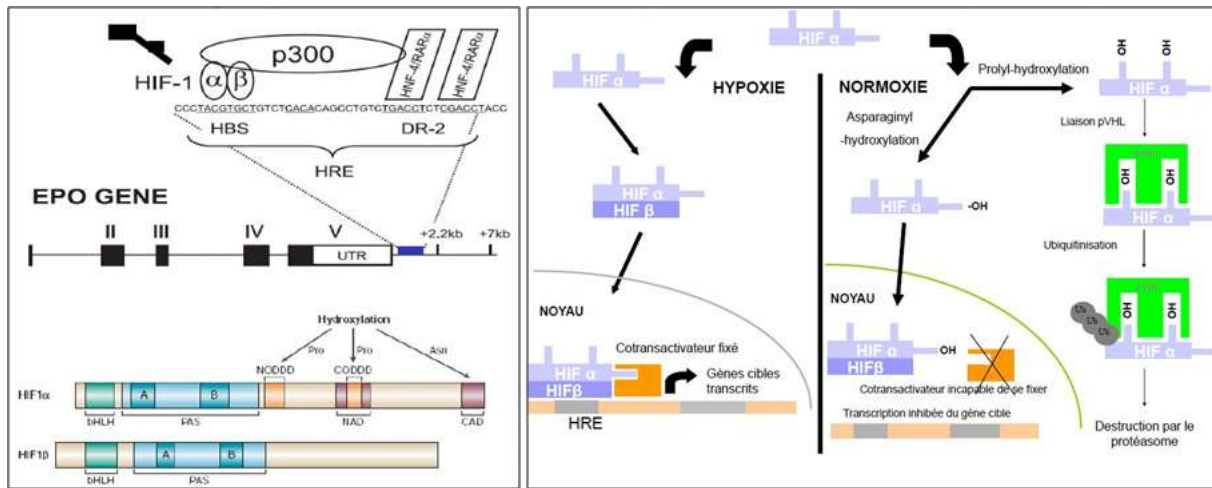


Figure 8 : Activation de la synthèse d'EPO via le facteur de transcription HIF dans les conditions d'hypoxie.

Des études expérimentales chez le rat ont également mis en évidence 3 isoformes dont les mécanismes d'actions sont différents de ceux observés chez l'homme.

Au niveau rénal, HIF-1 α joue un rôle clé dans la production d'EPO. La stimulation de HIF-1 α est surtout induite dans les cellules tubulaires incluant les cellules proximales en réponse à l'anémie et les cellules du tube collecteur, et s'accompagne également de l'induction de gènes par l'hypoxie comme l'hème oxygénase.

En revanche, HIF-2 α agit surtout dans les cellules péri-tubulaires et fibroblastiques. HIF-2 α voit sa concentration augmenter en condition d'hypoxie, et participe à l'augmentation de l'érythropoïèse ([Ratcliffe et al, 2007](#) ; [Agarwal et al, 2008](#))

1.5.2. Mécanisme de régulation de la production d'EPO par HIF dans les conditions normales d'oxygène

HIF est un facteur de transcription très instable qui doit se lier à VHL (Van Hippel Lindau), un gène suppresseur de tumeurs impliquées dans le cancer du rein à cellules claires, ainsi qu'avec d'autres protéines cytoplasmiques. HIF est d'abord hydroxylé sur les résidus proline grâce à une prolyl-hydroxylase avant de se lier à VHL. Cette interaction entraîne l'ubiquitination de HIF et son ciblage vers le protéosome pour être dégradé.

L'hydroxylation se fait également sur des résidus asparagine qui a pour but d'empêcher toute liaison aux cotransactivateurs ([Ruas et al, 2002](#) ; [Ke et al 2006](#)) indispensable à son activité transcriptionnelle sur le gène de l'EPO, car

l'hydroxylation bloque le recrutement de ce cotransactivateur (Ratcliffe et al, 2007 ; Kapitsinou et al, 2010).

1.5.3. Mécanisme de régulation de la production d'EPO par HIF en condition d'hypoxie

Lorsque la cellule est en hypoxie, il n'y a pas d'hydroxylation des résidus proline et asparagine sur HIF, ce qui empêche la liaison de HIF à VHL. Ainsi, HIF avec ses sous-unités α et β est capable d'entrer dans le noyau et de jouer son rôle de facteur de transcription sur le gène de l'EPO, en compagnie d'autres facteurs comme p300 et CBP, sur le gène 7q22 codant pour l'EPO. La transcription et la traduction via le facteur de transcription HIF permettent ensuite, lorsque les conditions sont réunies, la synthèse d'EPO endogène (Ratcliffe et al, 2007).

1.6. Synthèse de l'EPO

1.6.1. Synthèse rénale

Dans ce contexte, c'est le facteur de transcription HIF-2 qui intervient pour la transcription d'EPO, et ce, en présence de fer (Agarwal et al, 2008 ; Kapitsinou et al, 2010).

1.6.2. Synthèse hépatique

Lorsqu'il y a une carence de HIF-2 au niveau rénal, c'est le foie qui prend le relais. Cet organe n'est cependant pas capable de compenser les carences importantes en EPO chez les patients présentant une IRC (Jelkmann et al, 2011).

1.6.3. Autres sites de synthèse

D'autres organes sont également capable de synthèse l'EPO. Ainsi, le cerveau et plus particulièrement les neurones et les astrocytes ou encore la matrice utérine semblent capable de synthétiser de l'EPO (Sasaki et al, 2003 ; Weidemann et al, 2009).

1.7. Récepteurs de l'érythropoïèse

1.7.1. Le récepteur à l'EPO (EPO-R)

L'érythropoïèse ne peut avoir lieu que si l'EPO est liée à son récepteur, l'EPO-R. C'est un complexe asymétrique transmembranaire de 508 acides aminés (55 à 78 kDa) qui appartient à la superfamille des cytokines (Watowich et al 2011).

Le domaine extracellulaire porte le domaine catalytique. Il comprend 2 domaines immunoglobulin-like (D1 et D2) composés d'une structure β -sandwich contenant 7 brins β . La partie distale du domaine D1 et la partie proximale du domaine D2 sont reliées par une courte charnière. Le domaine D1 est stabilisé par 2 ponts disulfures par l'intermédiaire des 4 résidus cystéines. Le D2 contient un motif conservé WSXWS (Watowich et al, 2011).

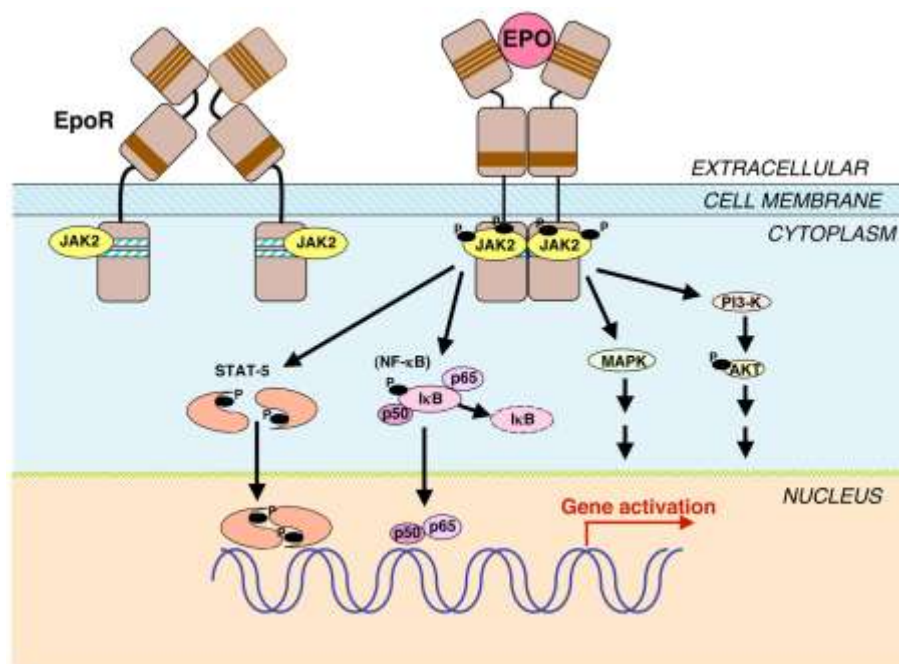


Figure 9 : Activation de la synthèse en EPO suite à l'activation de EPO-R (Noguchi et al, 2011).

1.7.2. Le récepteur à la transferrine (TfR2)

Le récepteur à la transferrine est un marqueur du statut martial évaluant spécifiquement la biodisponibilité du fer et est également un marqueur de l'activité érythropoïétique.

Il existe deux types de récepteurs à la transferrine de structure identique, TfR1 et TfR2, mais exerçant cependant des fonctions différentes. La plupart des cellules de la lignée érythrocytaire internalisent le fer Fe^{2+} via TfR1. Chez les espèces murines, TfR1 s'avère être indispensable dans la mesure où une délétion du gène au récepteur TfR1 est létale.

Une étude sur des cellules humaines érythroleucémiques UT-7 dans lesquelles l'EPO-R y est hautement exprimé, a démontré que TfR2 et EPO-R sont liés de manière covalente. TfR2 est peu présent dans les tissus mais il a un haut niveau d'expression car il a un rôle clé. TfR2 est impliqué dans le métabolisme du fer en régulant la synthèse d'hepcidine hépatique. EPO-R et TfR2 s'expriment synchroniquement pendant la différenciation des progéniteurs érythroïdes. TfR2 est impliqué dans la synthèse d'EPO-R. Il agit sur son transport du réticulum endoplasmique jusque la surface cellulaire. Par ailleurs, la suppression de TfR2 du complexe retarde la différenciation terminale et conduit le patient à une hémochromatose. TfR2 est également impliqué dans l'élévation du niveau d'expression de l'EPO-R (Forejtnikova et al 2010).

1.7.3. Le MPL

Le récepteur de MPL (Myeloproliferative leukemia virus oncogene), un oncogène naturellement traduit dans le rétrovirus murin, présente de fortes analogies de séquences avec l'EPO-R. L'EPO et la thrombopoïétine sont capable de se fixer sur MPL (Souyri et al, 1990). Par ailleurs, il a été montré que le récepteur MPL participait à la survie cellulaire et à la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Très récemment, il a été montré que l'homodimérisation de la composante intracellulaire de MPL (IC-MPL) induit dans des progéniteurs issus de sang de cordon, permet de produire une érythropoïèse très efficace. En effet, l'induction de l'érythropoïèse et la production d'EPO est plus importante à partir de la dimérisation de ic-MPL que via l'EPO-R. La signalisation s'effectue via l'activation de AKT qui augmente la transcription de GATA- 1 et FOXO3, voies de transcription impliquées dans l'inhibition de l'apoptose, la modulation de cycle cellulaire et l'augmentation de la maturation des cellules de la lignée érythrocytaire. Ces résultats ouvrent de nouvelles cibles potentielles d'intérêt thérapeutique pour la production de globules rouges à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (Kim et al, 2014).

1.7.4. Affinité de l'EPO pour son récepteur

L'affinité (Kd) de l'EPO pour son récepteur est de 100 à 200 pM. Cette valeur est suffisante pour maintenir le taux d'hémoglobine à 140 g/L chez le sujet sain (Elliott et al, 2008 ; Bunn et al, 2013).

2. L'Insuffisance Rénale Chronique (IRC)

2.1. Physiologie rénale

Les reins sont des organes pairs en forme de haricot, situés au niveau des hanches. La partie concave représente le hile, d'où entrent et sortent les vaisseaux. Chaque rein est vascularisé à partir d'une artère rénale qui naît de l'aorte, au-dessous de l'artère mésentérique supérieure et des artères surrénales moyennes. La topographie du drainage veineux principal du rein correspond à celle de la vascularisation artérielle. Les veines rénales rejoignent la veine cave inférieure. L'innervation se fait par des fibres nerveuses sympathiques (appartenant au système nerveux végétatif) véhiculées par les nerfs rachidiens qui régissent la vasomotricité des artères et induisent la libération de la rénine.

Le rein se compose de deux parties, le sinus situé au centre du rein et la zone périphérique contenant le parenchyme rénal.

Le parenchyme rénal se divise lui-même en 2 zones, le cortex et la medulla.

Les pyramides de Malpighi sont des éléments coniques situées dans la partie médullaire du rein. Ces pyramides sont orientées vers l'intérieur pour former les papilles rénales. Ces papilles rénales convergent vers le bassinet pour former l'uretère. Celui-ci aboutit directement sur la vessie, dans laquelle seront éliminées les substances toxiques.

Le lobe rénal correspond à une portion parenchymateuse comprenant une portion de pyramide de Malpighi. Celui-ci se divise en lobules et contient les unités fonctionnelles du rein appelées néphrons. Il en existe plus d'un million par rein (Luc et al, 2004).

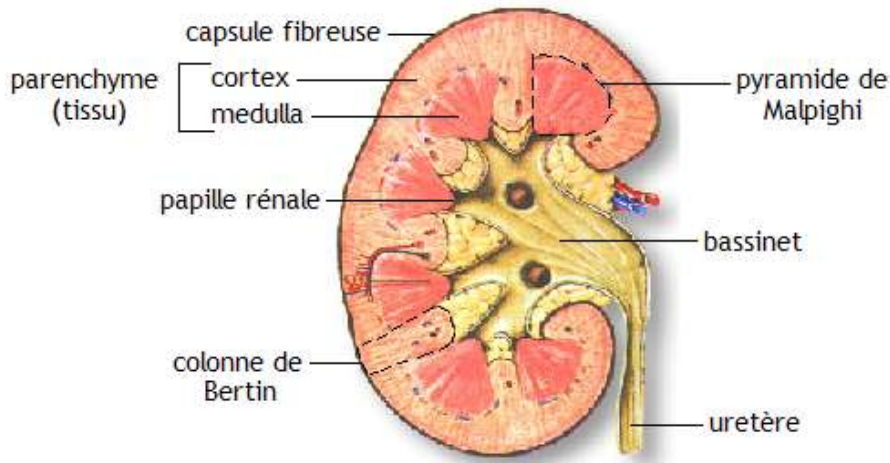


Figure 10 : Représentation anatomique du rein

Le néphron se compose du glomérule rénal, lieu de contact entre les vaisseaux sanguins et le conduit urinaire, et du système tubulaire, composé du tube proximal, hanse de Henlé, tube distal et tube collecteur (Luc et al, 2004).

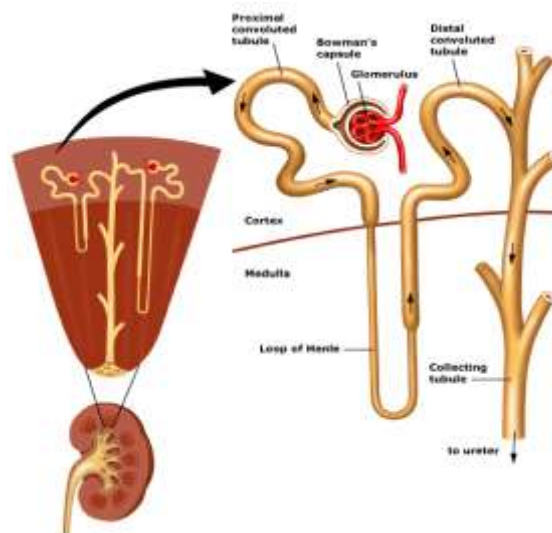


Figure 11 : Anatomie d'un néphron

La fonction physiologique primaire du rein consiste à épurer les substances toxiques pour l'organisme en filtrant le plasma et éliminer dans l'urine les substances issues du foie telles que l'urée et les ions en excès.

L'activité rénale est évaluée par le débit de filtration glomérulaire (DFG) qui correspond au volume de plasma filtré par unité de temps estimé par la clairance à la créatinine sérique. Le calcul se fait à partir des récoltes des urines sur 24 heures.

$$\text{DFG(L/min)} = U \times V / P$$

avec U (mg/L) : concentration urinaire de créatinine, V (L/min) : débit aqueux urinaire, P (mg/L) : concentration plasmatique de créatinine.

Pour un individu sain de taille moyenne, la DFG est de 0.12 L/min (Luc et al, 2004).

Il existe d'autres formules afin d'évaluer l'activité rénale telles que Cockcroft ou MDRD, tenant compte, entre autre, de l'âge, du poids et du sexe.

Formule de Cockcroft

$$Cl_{cr} = [(140-\text{Âge})/[\text{Cr}]] \times (\text{Poids} \times k)$$

Cl_{cr} : estimation de la clairance de la créatinine en ml/min

[Cr]: créatinémie en µmol/l

Âge : âge en année

Poids : masse corporelle en kg

k: coefficient qui vaut 1,23 chez l'homme et 1,04 chez la femme (Luc et al, 2004).

2.2. Définition de l'IRC

L'IRC se définit par une altération lente, progressive et irréversible du nombre de néphrons fonctionnels entraînant l'altération du système de filtration glomérulaire.

Lorsque le DFG atteint la valeur critique <90 mL/min/1.73m² pendant plus de 3 mois, on parle alors d'IRC.

L'IRC se définit en 5 stades en fonction de l'évolution de la détérioration des reins au niveau anatomique et fonctionnelle :

- stade 1 : Maladies rénales chroniques : anomalies biologiques permanentes (protéinurie) et/ou échographiques avec un DFG supérieur à 90 ml/mn.
- stade 2 : Insuffisance rénale latente : créatininémie normale ou sub-normale avec un DFG entre 60 ml/mn et 90 ml/mn.
- stade 3 : Insuffisance rénale patente compensée (DFG compris entre 30 ml/mn et 60 ml/mn).
- stade 4 : Insuffisance rénale sévère (DFG inférieur à 30 ml/mn), avec des symptômes tel que l'anémie. Cela impose la préparation à l'épuration extra-rénale (EER), création d'un abord vasculaire, vaccination HBS...).
- stade 5 : Insuffisance rénale dépendante de l'EER. On parle d'IRC Terminale (IRT) lorsque le débit de filtration glomérulaire est inférieur à 15-10 ml/mn. Cela peut évoluer vers un "coma urémique" (maladie de Bright) (Agence de la Biomédecine, Société de Néphrologie ; 2007).

2.3. Les conséquences

L'IRC entraîne une forte augmentation de la protéinurie, alors que chez le sujet sain, la présence de protéine dans les urines est nulle. Le rein n'est plus capable d'assurer la filtration. Par ailleurs, il existe un risque d'hypertension artérielle (HTA).

En outre, en sachant que 90% de l'EPO est synthétisée par le rein et plus précisément par les cellules endothéliales des capillaires juxta-glomérulaires (Le Creff et al, 2002), ces cellules ne sont plus fonctionnelles et conduisent le patient à une réduction de la synthèse en EPO endogènes, et donc une anémie de type normochrome, normocytaire et arégénérative.

Par conséquent, la production de globules rouges diminue. Ces globules rouges en plus faible quantité transporteront moins d'oxygène vers les tissus et des symptômes tels que l'asthénie ou l'affaiblissement cardiaque apparaissent (Agence Canadienne des Médicaments et des Technologies de Santé, 2008). La moitié des patients aux stades 3 et 4 de l'IRC souffrent d'anémie, d'où la nécessité de prendre rapidement en charge ces patients avec des traitements comme les agents stimulants de l'érythropoïèse (ASE) (Saurabh et al, 2012).

2.4. Les facteurs de risque

Les personnes qui risquent de développer un risque d'IRC sont les personnes diabétiques, les hypertendus, les obèses (masse corporelle > 30kg/m²), les patients souffrants de maladies cardiovasculaires, les personnes âgées de plus de 60 ans, les personnes ayant des membres de leur famille déjà atteints d'IRC, l'uropathie obstructive, certains médicaments néphrotoxiques, et les épisodes d'insuffisance rénale aiguë (Agence de la Biomédecine, Société de Néphrologie ; 2007)

3. Les différentes EPO recombinantes

3.1. Historique

Les premiers travaux sur l'EPO sont liés aux études sur les carences en hémoglobine et plus particulièrement aux anémies liées à l'IRC. Les premières découvertes datent du milieu du XX^e siècle, mais c'est à partir de la fin du XIX^e siècle que l'on s'est réellement intéressé à la stimulation de l'érythropoïèse. En 1890, le physiologiste français François-Gilbert Viault fut le premier à entreprendre des recherches suite à une observation, lors d'un voyage dans la Cordillère des Andes au Pérou, que l'altitude entraînait une montée des globules rouges. En 1906, Carnot et Deflandre, établissent un lien entre l'hypoxie et la prolifération de l'érythropoïèse, et proposent l'existence d'un facteur humoral en réponse à l'anémie. En 1950, Reissmann et al s'intéresse au mécanisme de stimulation de l'érythropoïèse. Mais c'est à partir de 1957, que l'on découvre chez le rat (Jacobsson et al, 1957) et puis chez l'homme (Nathan et al, 1964), l'existence dans le rein d'un agent circulant stimulant l'érythropoïèse.

Ces découvertes poussent Eugène Goldwasser et son équipe à entreprendre des recherches afin d'isoler l'EPO. Il faudra attendre 1977 pour isoler pour la première fois l'EPO dans l'urine de patients atteints d'anémie aplasique. Cette même année, Goldwasser avaient isolés 8 mg d'EPO humaine hautement purifiés (Miyake et al, 1977).

Le laboratoire de biotechnologie AMGEN s'investit dans la recherche de solutions innovante pour traiter des maladies incurables et décide d'orienter ses recherches vers l'EPO. Au début des années 1980, Jacobs et Lin arrivent pour la première fois à cloner et à exprimer le gène de l'EPO (La rédaction Amgen, 2008).

La première synthèse d'EPO biologiquement active *in vivo* et *in vitro*, a été effectuée sur des cellules ovariennes de hamster à l'aide d'un vecteur navette (Charon 4A) portant le gène de l'EPO (Lin et al, 1985).

Cette découverte a permis d'ouvrir la voie à la synthèse d'une nouvelle famille de médicaments que sont les EPO recombinantes également appelés Agents Stimulant

l'Erythropoïèse (ASE) afin de traiter les patients souffrant de carence en EPO et formes variées d'anémies.

L'utilité médicale de cette molécule est vite reconnue et en 1989, elle est autorisée dans le traitement de l'anémie liée à l'IRC (Skibeli et al, 2001).

En limitant le recours aux transfusions sanguines, elle a permis de supprimer les risques de transmission virale, notamment du sida, des hépatites B et C, et a transformé radicalement le confort de vie des insuffisants rénaux, tout particulièrement celle des dialysés.

3.2. Les différentes EPO recombinantes humaines

L'EPO recombinante humaine (RhuEPO) dérivant de cellules eucaryotes présente une séquence peptidique identique à celle de l'EPO d'origine urinaire.

La masse moléculaire de la partie protéique est de 18.400 Da, avec 4 chaînes de glycosylation : 3 N-glycosylation au niveau des Asparagine 24, 38 et 83, et une O-glycosylation au niveau de la sérine 126 (Casadevall et al, 2012). Elle peut présenter jusque 14 acides sialiques (Mac Dougall et al 2000). La masse moléculaire de la protéine glycosylée est de 30.4 kDa. Les motifs glycosylés, représentent 40% de la masse totale de la glycoprotéine de la molécule, sont nécessaire à l'activité biologique *in vivo* de l'EPO.

Depuis, de nouvelles EPO recombinantes se sont succédées et ont permis de mieux traiter les patients présentant une IRC. Leur nomenclature est basée sur les règles suivantes :

- un préfixe est utilisé pour indiquer des changements dans la séquence peptidique,
- les lettres grecques qui suivent le nom de la molécule sont utilisées pour indiquer des analogies de substance de l'EPO avec une glycosylation modifiée, comme dans le cas de l'EPO α (Girard et al, 2012)

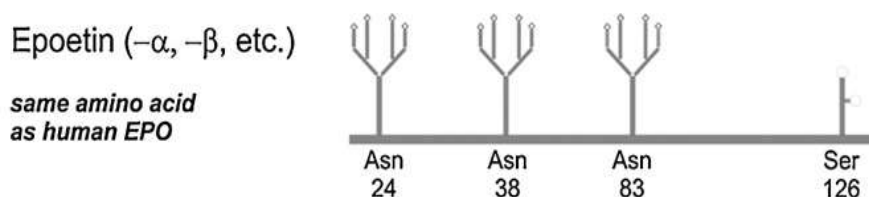


Figure 12 : Glycosylation des résidus Asparagine (Asn) et Serine (Ser) sur une chaîne protéique d'EPO

3.2.1. L'EPO α

L'EPO α a une topologie structurale similaire aux autres membres de la famille des cytokines. Elle est composée de 4 hélices α : A α (résidus 8 à 26) située devant à D α (résidus 137 à 161), et B α de plus petite taille (résidus 56 à 83) situé devant C α (résidus 90 à 112) (Molineux et al, 2003)

Le mode d'administration se fait par injection en sous-cutanée ou en intraveineuse. Cela nécessite des injections fréquentes. La voie intraveineuse est utilisée de préférence chez les patients hémodialysés (Elliott S, et al, 2008).

Après une injection en sous-cutanée, la demi-vie de l'EPO α au niveau plasmatique est d'environ 20h. Dans le cadre des anémies liées à l'IRC, les posologies de l'EPO α sont de 50-100 Unités/kg trois fois par semaine (Agarwal N, et al 2008). EPOGEN® sera commercialisé en 1989 par le laboratoire Amgen et EPREX® en 1990 par le laboratoire Janssen-Cilag.

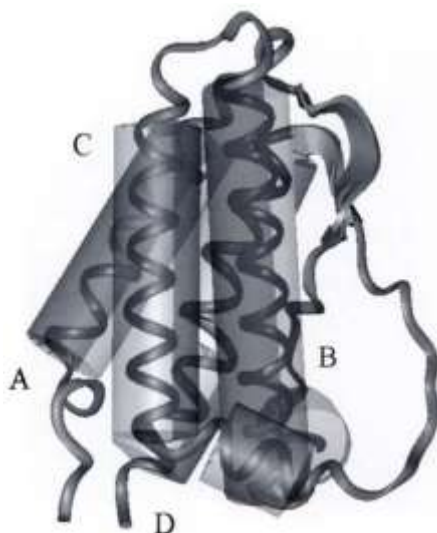


Figure 13: Représentation quaternaire de l'EPO α (Girard et al, 2012).

3.2.2. L'EPO β

De la même façon que l'EPO α , celle-ci est synthétisée à partir des ovaires d'hamsters chinois.

Comparée à l'EPO α , l'EPO β contient une quantité plus élevée d'isoformes basiques (Storring et al 1998) et un nombre d'oligosaccharides tétra-sialylés plus important (environ 46%) (Deicher et Hörl, 2004).

L'EPO β dispose d'une demi-vie plus longue que l'EPO α (24h) après injection en sous-cutané avec une fréquence similaire à celle de l'EPO α (3 fois par semaine) (Agarwal et al 2008). L'EPO β a d'abord été développé et produit en 1990 par Boehringer Ingelheim sous le nom de Recormon. En 1998, Roche rachète Boehringer Mannheim faisant de Roche le numéro 1 mondial de l'industrie du diagnostic (Roche, a, 2012). Suite à son rachat, Recormon a été remplacé par NeoRecormon (Storring et al 1998 ; Casadevall et al 2012).

3.2.3. La Darbépoïétine α

La Darbépoïétine α est une RhuEPO hyperglycosylée. Elle dispose de 5 chaînes N-glycosylées, et 1 chaîne O-glycosylée (Agarwal et al 2008 ; Casadevall et al 2006).

Les nouvelles chaînes glycosylées n'interfèrent pas directement avec l'EPO-R, et ne perturbent ni la structure tertiaire ni la stabilité de la molécule. La partie glycosylée englobe 51% de la glycoprotéine contre 40% pour les autres EPO. La Darbépoïétine α peut contenir jusqu'à 22 résidus d'acide sialique ce qui lui confère une plus grande charge négative. Ainsi, la masse moléculaire de la Darbépoïétine passe de 30.4 kDa à 37 kDa (Elliott S. et al 2003).

L'ensemble de ces modifications ont permis d'allonger la demi-vie de la Darbépoïétine α d'un facteur 3 par rapport aux Epoétine α et β (Casadevall et al 2006).

Après injection en sous-cutané, la demi-vie peut aller jusqu'à 48 heures. Elle a 4.3 fois moins d'affinité à se lier à EPO-R que les précédentes RhuEPO, ce qui offre la possibilité aux patients de ne planifier qu'une seule injection par semaine voir une injection toutes les deux semaines si les patients sont stables cliniquement (Locatelli et al 2011).

La Darbépoïétine α est arrivé sur le marché Européen en 2001 avec Aranesp® issu du laboratoire Amgen (Agence Européenne du Médicament; 2013).

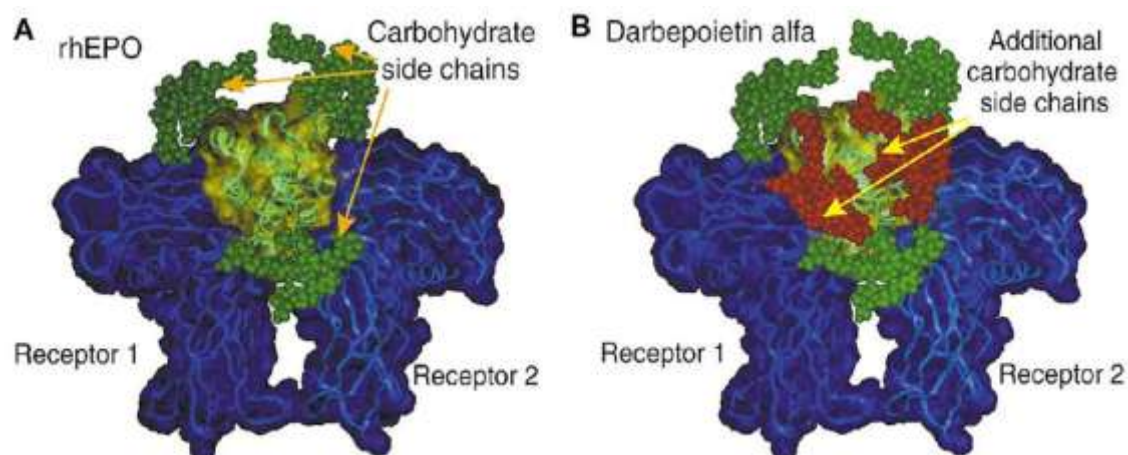


Figure 14 : Comparaison de la liaison à EPO-R de l'EPO recombinante (A) et Darbépoïétine. α (B) avec la mise en évidence des acides sialiques

3.2.4. L'Epoïétine δ

L'Epoïétine δ est arrivé sur le marché Européen en 2002, sous le nom de Dynepo®. Elle est commercialisée par le Laboratoire Shire Pharmaceutical qui a obtenu l'AMM en mars 2002. Le laboratoire Shire Pharmaceutical ne s'estimant pas en mesure de concurrencer un marché déjà bien desservi, décidera finalement de ne plus produire la molécule et de se concentrer sur les thérapies des maladies orphelines (Agence Européenne du Médicament, 2007 ; Haute Autorité de Santé, 2007 ; Pharmaceutiques éditions, 2009).

3.2.5. Récapitulatif des Agents Stimulants l'Erythroïèse (ASE)

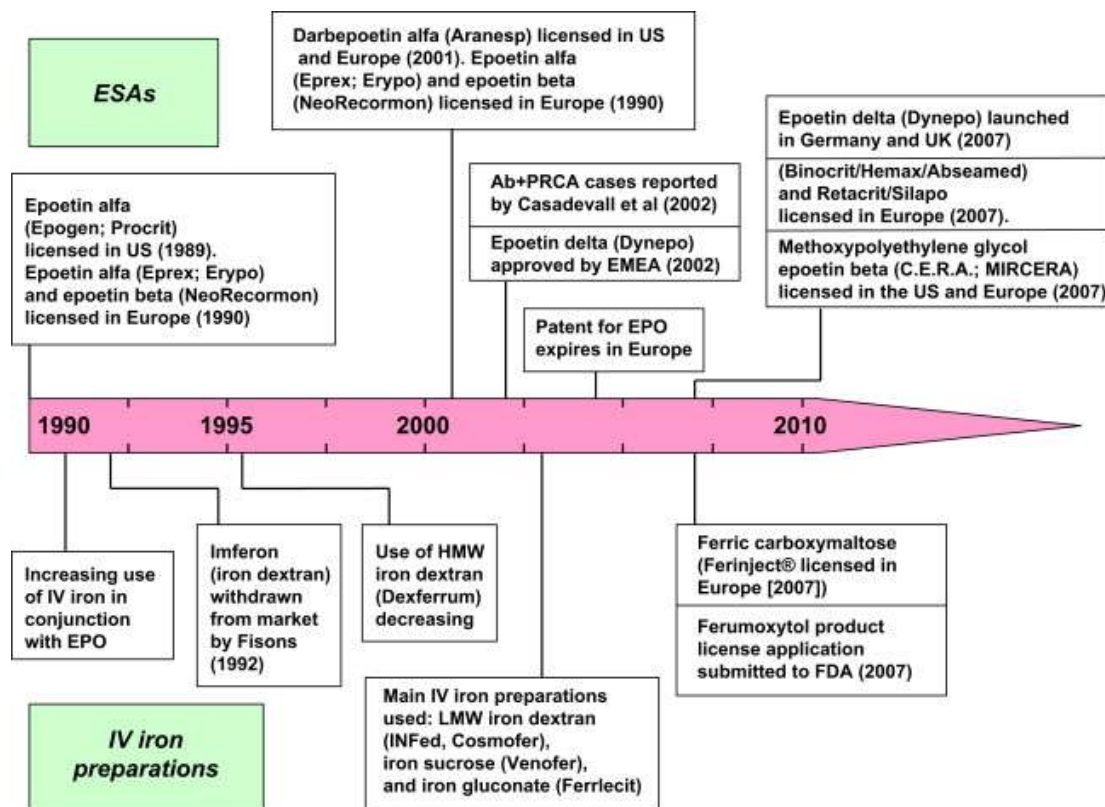


Figure 15: Historique des ASE depuis leur mise sur le marché.

3.3. Modifications chimiques des EPO

3.3.1. L'intérêt de la glycosylation

L'importance de l'acide sialique contenu dans l'EPO impacte sur sa clairance puisqu'elle diminue leur affinité pour EPO-R et augmente ainsi leur demi-vie sérique. Cela suggère que la demi-vie sérique est un facteur plus déterminant que l'affinité vis-à-vis du récepteur. Par conséquent, c'est l'ajout de formes glycosylées sur l'érythropoïétine qui participe à ses propriétés biologiques. Plus l'EPO contiendra d'acide sialique et de formes glycosylées, plus sa demi-vie sérique sera longue. (Elliott S. et al 2008)

3.3.2. L'intérêt de la pégylation

L'utilisation du poly-éthylène-glycol (PEG) a été un succès pour prolonger la demi-vie sérique de nombreuses protéines recombinantes. Cela entraîne un doublement du volume de la protéine et induit une réduction de la clairance en raison d'un taux réduit de translocation du sang vers les tissus. La pégylation réduit l'affinité de liaison de la protéine vis-à-vis de son récepteur en modifiant l'impact de liaison sur EPO-R en provoquant un encombrement stérique (Elliott et al, 2008). Par conséquent la clairance de la protéine diminue et sa demi-vie plasmatique augmente.

3.4. Mircera[®]

3.4.1. Présentation de Mircera[®]

Mircera est une EPO β , avec un groupement méthoxy-polyéthylène glycol (méthoxy-PEG) qui fait doubler son poids moléculaire (de 30 kDa à 60 kDa).

Nous venons de voir que l'avantage de cette augmentation est de prolonger sa demi-vie par rapport aux autres agents stimulant de l'érythropoïèse (ASE) précédentes, d'où son nom CERA pour continuous erythropoietin receptor activator, c'est-à-dire activateur continu du récepteur à l'EPO.

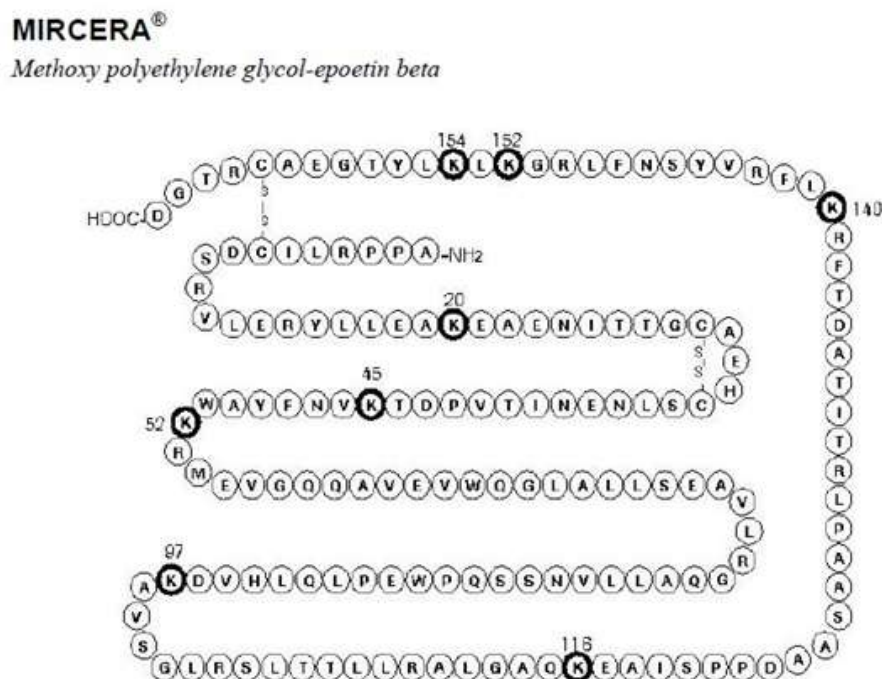


Figure 16 : Structure primaire de la molécule MIRCERA (en gras, les acides aminés glycosylés).

La chaîne Méthoxy-PEG est arrimée à la molécule d'EPO grâce à une liaison amide via un acide succinimidyl-butanoïque sur le résidu Lysine 45 ou 52 en N-terminal (Panchapakesan et al, 2007, Casadevall et al 2006).

Mircera est synthétisée dans des cellules ovariennes de Hamster Chinois (CHO). Par rapport aux autres modèles cellulaires, les CHO permettent d'assurer une meilleure glycosylation de la protéine.

3.4.2. Mécanisme d'action

Les caractéristiques de liaison de Mircera à l'EPO-R sont assez différentes des RhuEPO de premières et secondes génération.

Mircera dispose d'une plus faible affinité pour son récepteur et s'en dissocie plus rapidement.

La fixation de l'EPO à son récepteur est trop brève pour permettre son internalisation.

Ainsi, les associations et dissociations répétées conduisent à prolonger *in vivo* l'activité et la demi-vie de la molécule.

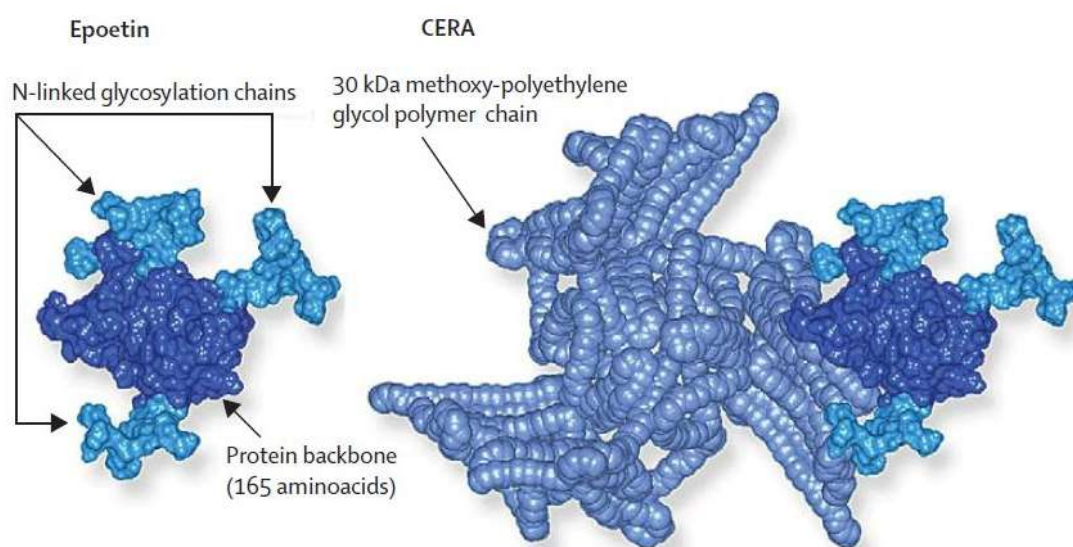


Figure 17: Comparaison de la taille d'une glycoprotéine type Mircera (à droite) avec une érythropoïétine endogène (à gauche), D'après MacDougall, et al, 2006

3.4.3. Les études de sécurité et d'efficacité

a. Les études précliniques *in vitro*

L'activité *in vitro* érythropoïétique de Mircera a été évaluée en mesurant ses effets sur la prolifération de la lignée cellulaire UT-7 issues de patients atteints de leucémie myéloïde aigue (LAM) et qui expriment à leur surface des EPO-R.

En comparant cette EPO de troisième génération aux autres EPO, il a été démontré que Mircera stimulait de façon moins importante la prolifération des cellules UT-7. Les études ont été faites avec des doses allant de 0.003 à 3U/mL. Les études conduites chez des souris saines ont révélée que Mircera induisait un meilleur taux de production des réticulocytes que les autres EPO (Haselbeck et al, 2002; Panchapakesan et al 2007).

b. Les études précliniques *in vivo*

Les études précliniques sur des modèles animaux ont démontré que Mircera était un puissant stimulant de l'érythropoïèse comparé aux autres EPO (Panchapakesan et al, 2007)

c. Les études de Phase I

Les études de phase I ont été réalisées chez des volontaires sains. Les résultats ont démontrés que l'utilisation de doses croissantes de Mircera par voie intraveineuse ou sous-cutanée permettait d'augmenter les taux de réticulocytes sanguins de manière dose-dépendante (Reigner et al, 2003).

Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude randomisée. L'administration de Mircera par voie intraveineuse (0.4 à 3.2 µg/kg) ou sous-cutanée (0.1 à 3.2 µg/kg) entraîne un pic du taux de réticulocytes entre 7 et 10 jours. L'étude a par ailleurs démontré que l'administration de la molécule par voie sous-cutanée était plus efficace que par voie intraveineuse (Panchapakesan et al 2007)

d. Les études de Phase II

Des études ont été menées par De Francisco chez des patients anémiques (>18 ans, Hb=8-11g/dL) souffrants d'IRC, naïfs aux Agents Stimulant l'Érythropoïèse (ASE), dialysés (depuis plus d'un mois) et non-dialysés, pour la correction de l'anémie et le maintien du niveau d'hémoglobines. L'efficacité de Mircera a été évaluée par voie sous-cutanée et les patients étaient suivis pendant 12 semaines (De Francisco et al, 2003).

Cette étude a montré que MIRCERA présentait une activité érythropoïétique puissante avec un profil de sécurité favorable.

En 2004, une étude a montré que Mircera est parfaitement tolérée et permet un contrôle stable de l'anémie chez les patients en IRC (Provenzano et al, 2004).

Une autre étude a également été réalisée par voie intraveineuse chez des patients présentant une anémie liée à une IRC, dialysés et initialement traités par Epoétine α. L'injection de Mircera administrée par voie intraveineuse tous les 15 jours, stabilise le taux d'hémoglobine chez ces patients et montre de meilleurs résultats (Besarab et al, 2004).

Enfin, dans une dernière étude a révélé que l'administration de Mircera toutes les 4 semaines était suffisante pour maintenir des taux d'hémoglobine stables chez des patients dialysés (Locatelli et al, 2004).

e. Les études de Phase III

Le laboratoire Roche a fourni 6 études de phase III pour appuyer sa demande d'autorisation de mise sur le marché. Deux études de correction de l'anémie et de traitement d'entretien chez des patients atteints d'IRC naïfs de traitement par ASE : AMICUS (BA16736) chez des patients dialysés, et ARCTOS (BA16738) chez des patients non dialysés. Quatre études d'entretien chez des patients atteints d'IRC dialysés et précédemment traités par un ASE : MAXIMA (BA16739), PROTOS (BA16740), STRIATA (BA17283), RUBRA (BA17284). Les études ont été effectuées sur une période de deux ans. D'autres études sur une plus longue période sont actuellement en cours.

f. Les études de correction de l'anémie et traitement d'entretien

L'étude AMICUS :

Cette étude évalue l'efficacité de Mircera par voie intraveineuse chez des patients anémiques et souffrant d'IRC, dialysés et n'ayant jamais été traités par un ASE.

L'analyse a été réalisée sur une population considérée comme en intention de traiter.

En phase de correction (24 semaines), la dose initiale est de 0,4 µg/kg 1 fois toutes les 2 semaines, l'objectif est d'obtenir un taux d'hémoglobine cible $\geq 11\text{g/dL}$ avec une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial. Les doses ont été ajustées toutes les 4 semaines en fonction des réponses au traitement.

La phase d'entretien (28 semaines) concerne les patients ayant atteint l'objectif du traitement, qui est de 1 fois toutes les 2 semaines et 1 fois toutes les 4 semaines.

Les doses ont été ajustées pour maintenir une concentration en hémoglobine entre 11,0 et 13,0 g/dL.

Sur un total de 181 patients (moyenne d'âge 54 ans), 135 patients ont été traités par Mircera et 46 par une autre EPO. Le taux moyen d'hémoglobine de la population étudiée était de 9.4 g/dL dans les deux groupes. Quarante vingt dix huit pourcents des patients traités par Mircera étaient hémodialysés contre 100% pour les patients traités par une autre EPO. Le pourcentage de répondeurs étaient de 93.3% chez les patients traités par Mircera et de 91.3% chez les patients traités par une autre EPO.

Dans les deux groupes, la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% étaient supérieure à 60%. Les résultats de cette étude montrent que Mircera administré par voie intra-veineuse est efficace pour traiter l'anémie chez les patients atteints d'IRC dialysés et naïfs aux ASE.

L'étude ARCTOS :

Cette étude évalue l'efficacité de Mircera par voie sous-cutanée chez des patients anémiques souffrant d'IRC, non dialysés et n'ayant jamais été traités par un ASE.

En phase de correction (28 semaines), la dose initiale est de 0,6 µg/kg 1 fois toutes les 2 semaines, l'objectif est d'obtenir un niveau d'hémoglobines cible ≥ 11 g/dL avec une augmentation ≥ 1 g/dL par rapport à l'état initial.

La phase d'entretien (24 semaines) concerne les patients ayant atteint l'objectif du traitement, qui est de 1 fois toutes les 2 semaines et 1 fois toutes les 4 semaines.

Les doses seront ajustées pour maintenir la concentration en hémoglobines entre 11,0 et 13,0 g/dL

Les critères d'évaluation de l'efficacité sont les mêmes que pour l'étude AMICUS.

Mircera sera considéré comme étant non-inférieure à Darbépôïétine α si la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la différence entre les traitements était supérieure ou égale à -0.75 g/dL. L'analyse a été réalisée sur des populations per-protocole et en intention de traiter. L'étude ARCTOS a été menée chez 324 patients (moyenne d'âge de 65 ans), 162 personnes ont été traités par Mircera contre 162 par Darbépôïétine α . Le taux moyen d'hémoglobine à l'inclusion était de 10.2 g/dL dans les deux groupes. Le nombre de patients ayant terminé la phase de correction et d'évaluation était de 151 dans le groupe Mircera contre 158 dans le groupe Darbépôïétine. L'efficacité du traitement était légèrement supérieur dans le groupe de patients traités à Mircera (97.5% vs 96.3%). Dans les deux groupes, la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% a été supérieure à 60%.

Ans, l'étude ARCTOS a démontré que Mircera administré par voie sous-cutanée est efficace pour traiter l'anémie chez les patients atteints d'IRC dialysés et naïfs aux ASE.

En conclusion, les études AMICUS et ARCTOS ont montré l'efficacité de Mircera administrée par voie intraveineuse et sous-cutanée, une fois toutes les deux semaines en vue de traiter l'anémie chez les patients atteints d'IRC, dialysés ou non et naïfs aux ASE.

Etudes en traitement d'entretien

Plusieurs études équivalentes (MAXIMA, PROTOS, STRIATA et RUBRA) ont été menées afin d'évaluer l'efficacité de Mircera sur le maintien du taux d'hémoglobine, en comparaison à l'efficacité d'autres ASE, par voies d'administration en intraveineuse et sous-cutané.

Les études ont été faites chez les patients anémiques, atteints d'IRC, dialysés, déjà traités par un ASE. Les études ont été randomisées et ouvertes.

L'efficacité a été évaluée en 3 phases : la sélection des patients (4 semaines), l'adaptation de la dose (28 semaines) et l'évaluation de l'efficacité (8 semaines).

Dans les études MAXIMA, PROTOS, et STRIATA, le traitement a duré 16 semaines de plus que RUBRA. Les patients étaient sous hémodialyse ou sous dialyse péritonéale depuis au moins 12 mois. Le taux d'hémoglobine devait être situé entre 10.5 et 13 g/dL. Au niveau martial, la ferritine sérique était supérieure ou égale à 100 ng/mL ou la saturation de transferrine supérieure ou égale à 20%.

Tableau 2 : Description des différentes études en traitement d'entretien en Phase III des essais cliniques

Etude	MPG-époétine bêta			Comparateur			
	Posologie	Voie	Effectif	ASE	Posologie	Voie	Effectif
MAXIMA	1x/2 semaines	IV	223	Époétine α et β	1 à 3x/semaine	IV	226
	1x/4 semaines	IV	224				
PROTOS	1x/2 semaines	SC	190	Époétine α et β	1 à 3x/semaine	SC	191
	1x/4 semaines	SC	191				
STRIATA	1x/2 semaines	IV	157	Darbépoétine α	1x/semaine ou 1x /2 semaines	IV	156
RUBRA*	1x/2 semaines	IV ou SC	168	Époétine α et β	1 à 3x/semaine	IV ou SC	168

* : MPG-époétine bêta en seringue préremplie

Mircera était considérée comme étant non-inférieure à son comparateur si la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% pour les études STRIATA et RUBRA, et 97.5% pour les études MAXIMA et PROTOS, de la différence entre les traitements était supérieure ou égale à -0.75 g/dL. La différence entre les traitements ne devait pas excéder 0.3 g/dL.

L'analyse a été effectuée sur des populations per-protocole et en intention de traiter. Sur les quatre études réalisées, le taux d'hémoglobine à l'état basal étaient situés entre 11,7 et 12,0 g/dL. Plus de 70% des patients traités par Mircera au cours des études ont reçu une supplémentation en fer, alors que 63% des patients traités avec les comparateurs en recevaient de façon intermittente.

Mircera a démontré, au cours des quatre études, une non-infériorité par rapport aux autres ASE sur la variation du taux moyen d'hémoglobines entre l'état initial et la phase d'évaluation.

Tableau 3 : Résultats des différentes études en traitement d'entretien en Phase III des essais cliniques

Etude	Traitements	Variation du taux moyen d'Hb	Différence MPG-époétine vs comparateur	IC95%
MAXIMA	MPG-époétine β 1x/2 sem.	- 0,025 (n=172)	0,051	[-0,173 ; 0,275]
	MPG-époétine β 1x/4 sem.	- 0,071 (n=188)	0,004	[-0,215 ; 0,223]
	Époétine α ou β	- 0,075 (n=180)	-	
PROTOS	MPG-époétine β 1x/2 sem.	- 0,131 (n=153)	- 0,022	[-0,262 ; 0,217]
	MPG-époétine β 1x/4 sem.	0,032 (n=154)	0,141	[-0,098 ; 0,380]
	Époétine α ou β	- 0,109 (n=167)	-	
STRIATA	MPG-époétine β 1x/2sem.	0,063 (n=123)	0,180	[-0,049 ; 0,408]
	Darbépoétine	- 0,116 (n=126)	-	
RUBRA	MPG-époétine β 1x/2sem.	0,088 (n=123)	0,118	[-0,116 ; 0,353]
	Époétine α ou β	- 0,030 (n=133)	-	

g. Les études de tolérance

Des études de tolérance ont été menées au cours des phases II et III, chez 2737 patients, dont 1789 traités par Mircera et 948 traités par les comparateurs (ASE).

Les effets indésirables les plus fréquents sont l'hypertension artérielle (HTA), les troubles intestinaux (diarrhées), les céphalées et les infections rhinopharyngées. Dans une moindre mesure, des cas d'embolie pulmonaire et d'hémorragies gastro-intestinales ont été signalés chez les patients traités par Mircera. Globalement, les effets indésirables sont plus fréquemment apparus chez les patients traités par Mircera que les autres ASE. Cependant, aucun patient n'a développé d'anticorps contre Mircera au cours de ces études.

En conclusion, ces études montrent que Mircera est aussi efficace que les autres ASE avec le même profil de tolérance (Haute Autorité de Santé , 2007).

3.4.4. Le service médical rendu (SMR)

Les médicaments sont inscrits sur la liste des médicaments remboursables au vu de l'appréciation du SMR qu'ils apportent.

L'appréciation du SMR doit prendre en compte l'efficacité et les effets indésirables du médicament, sa place dans la stratégie thérapeutique, notamment au regard des autres thérapies disponibles, la gravité de l'affection à laquelle le médicament est destiné, le caractère préventif, curatif ou symptomatique du traitement et son intérêt pour la santé publique. Le SMR sera évalué en fonction de ces critères et le remboursement ira de 15% si le médicament est en voie de déremboursement à 65% si le médicament est remboursé en totalité.

Ces termes permettent au gouvernement d'exercer une pression sur les laboratoires car tout nouveau médicament entraîne une hausse des tarifs.

Le renouvellement de l'inscription a lieu tous les 5 ans et à tout moment à la demande des ministères.

Le SMR est réévalué en fonction des nouvelles données disponibles sur le médicament et la pathologie traitée, des autres médicaments inscrits sur la liste, et des nouvelles thérapies arrivées sur le marché.

Le titulaire de l'AMM ou l'exploitant (laboratoire) fait d'abord une demande d'inscription sur la liste des médicaments remboursables. Cette demande est alors transmise au ministre chargé de la sécurité sociale qui en informe le ministre chargé de la santé et la commission de transparence (Perroy, 2010).

La commission de la transparence est une commission spécialisée de la Haute Autorité de Santé (HAS). Elle permet d'évaluer le SMR du médicament, et en fonction du SMR, elle formule son avis sur un remboursement ou non.

En fonction de cet avis les ministres chargés de la sécurité sociale et de la santé vont prendre un arrêté conjoint sur un remboursement ou un non remboursement. Ils ne sont pas tenus de suivre l'avis de la commission de la transparence.

Le prix des médicaments est contrôlé par l'état seulement pour les médicaments remboursables.

Le titulaire de l'AMM propose un prix au comité économique des produits de santé (CEPS). Le CEPS va faire une évaluation économique du marché possible du médicament et va négocier le prix avec le laboratoire.

La commission de la transparence évalue également l'ASMR, elle le transmet au CEPS. C'est sur les bases de l'ASMR que le laboratoire et le CEPS vont discuter et fixer le prix du médicament (Perroy, 2010).

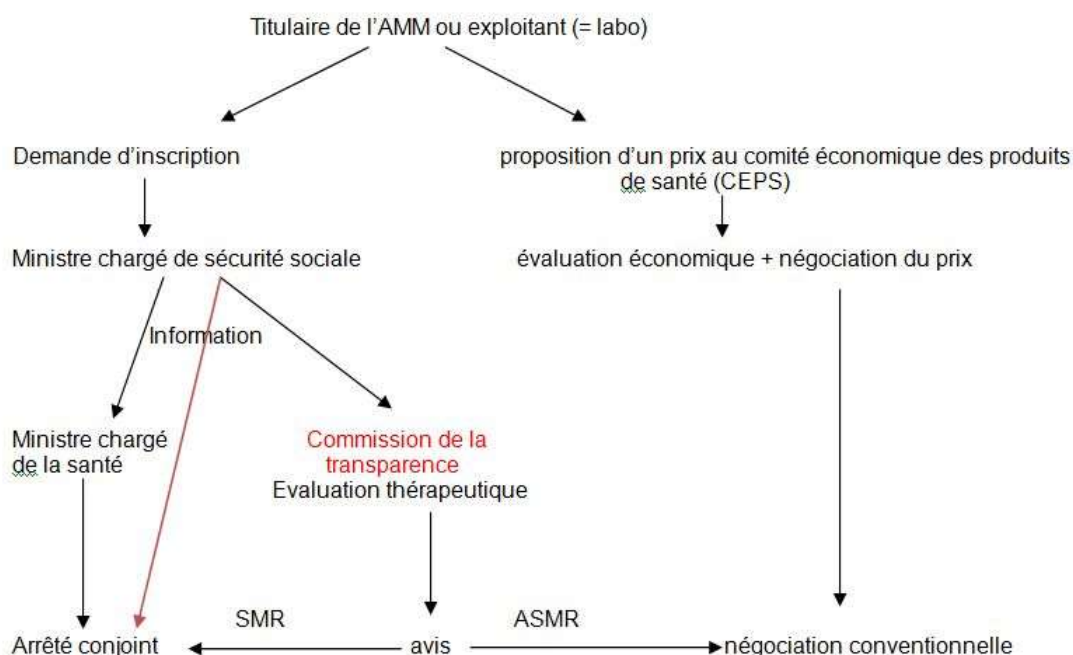


Figure 18: Circuit des démarches à suivre en vue de l'obtention d'une AMM (D'après PERROY AC, 2010).

Concernant Mircera, le rapport efficacité/effets indésirables est important. Cette spécialité est un traitement de première intention. Etant donné qu'il existe des alternatives médicamenteuses et non médicamenteuses (transfusions), le service médical rendu par Mircera est important (Monographie MIRCERA, Vidal, 2007).

3.4.5. L'amélioration du service médical rendu

Mircera n'apporte pas d'amélioration du service médical rendu (niveau V) par rapport aux autres ASE indiqués dans la correction de l'anémie associée à l'IRC.

En France, la Commission de transparence accorde un avis favorable à l'inscription sur la liste des spécialités remboursables et sur la liste des médicaments agréés à l'usage des collectivités et divers services publics dans les indications et posologies de l'AMM (Perroy AC, 2010).

Le CHMP (The Committee for Medicinal Products for Human Use), organe de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) a conclu que Mircera permet de corriger et de maintenir le taux d'hémoglobine chez les patients souffrant d'IRC et que ses effets sont comparables à ceux des autres EPO. Le comité a estimé que les bénéfices de Mircera sont supérieurs à ses risques et a recommandé l'octroi d'une autorisation de mise sur le marché pour ce médicament.

La molécule obtient son AMM 20 juillet 2007 par la Commission Européenne (procédure centralisée), sous le nom commercial de Mircera et est commercialisé par Roche. Mircera est disponible dans toute l'Union Européenne. Le renouvellement d'AMM a eu lieu le 15 mai 2012. (Haute Autorité de Santé, 2007 ; Agence Européenne du Médicament, 2007 ; Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007 ; Fiche Produit Roche MIRCERA®,2007)

3.5. Composition

Il existe plusieurs dosages de principe actif de Mircera dans les seringues à administrer qui vont de 30 µg/0,3 ml à 250 µg/0,3 ml, en solution injectable. Les excipients sont le phosphate monosodique monohydraté, sulfate de sodium, mannitol (E 421), la méthionine, le poloxamère 188, l'eau pour la préparation injectable (Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007).

3.6. Posologies et mode d'administration

Mircera® doit être prescrit par un médecin spécialiste dans le traitement des anémies liées à l'IRC (hématologue, néphrologue).

Le mode d'administration se fait soit par voie sous-cutanée, au niveau de l'abdomen, le bras ou la cuisse, soit par voie intraveineuse.

Il est nécessaire de surveiller régulièrement le taux d'hémoglobine du patient traité, 1 fois toutes les 2 semaines jusqu'à ce que le taux d'hémoglobine soit stabilisé, puis 1 fois par mois.

Si le patient n'a jamais été traité par un ASE, la dose initiale est de 0.6 µg/kg, par voie intraveineuse ou sous-cutanée toutes les 2 semaines afin d'amener le taux d'hémoglobine à 11 g/dL avec une évolution de 1 g/dL par mois. Dans ce cas, l'administration peut s'effectuer 1 fois par mois avec 1 dose double.

Dans le cas d'une évolution des taux d'hémoglobine inférieure à 1 g/dL, l'augmentation de 0.25% de la dose jusqu'à l'obtention du taux d'hémoglobine cible est recommandée.

En revanche, si le niveau du taux d'hémoglobine est supérieur à 2 g/dL en 1 mois ou si le taux d'hémoglobines est de 12 g/dL, une diminution de la dose de Mircera de 25% ou un arrêt temporairement du traitement pour faire redescendre les taux d'hémoglobine sont recommandés.

Si le patient a déjà été traité par un ASE, Mircera sera administré 1 fois par mois par injection en intraveineuse ou en sous-cutanée. Les doses d'injection seront adaptées par rapport aux doses hebdomadaires que le patient prenait avec les ASE précédentes (EPO α , β et Darbépoïétine α) selon le tableau suivant.

Tableau 4 : Doses initiales d'administration de Mircera en fonction des quantités précédemment administrés

Dose hebdomadaire précédente intraveineuse ou sous-cutanée de darbépoétine alpha (microgrammes/semaine)	Dose hebdomadaire précédente intraveineuse ou sous-cutanée d'époétine (UI/semaine)	Dose mensuelle intraveineuse ou sous-cutanée de MIRCERA (microgrammes/une fois par mois)
< 40	< 8 000	120
40 – 80	8 000 – 16 000	200
> 80	> 16 000	360

Au cas où le taux d'hémoglobine évolue anormalement, il faut suivre les recommandations précédentes afin d'arriver à un taux d'hémoglobine de 11 g/dL. Par ailleurs, chez les patients en dialyse péritonéale, il faut contrôler de manière stricte les taux d'hémoglobine et l'ajustement des doses à administrer.

Des précautions sont à prendre chez les patients en insuffisance hépatique (Haute Autorité de Santé, 2007 ; Agence Européenne du Médicament, 2007 ; Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007 ; Fiche Produit Roche MIRCERA®, 2007).

3.7. Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquents sont l'HTA, le risque de thrombose, les céphalées, les diarrhées (Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007).

3.8. Mise en garde et précaution d'emploi

Une supplémentation en fer est recommandée chez les patients dont la ferritinémie est inférieure à 100 µg/l ou dont le coefficient de saturation Cs de la transferrine est inférieur à 20%. Le statut martial doit être régulièrement contrôlé chez tous les patients avant et pendant le traitement pour assurer une érythropoïèse efficace.

L'absence de réponse au traitement par Mircera doit conduire rapidement à en rechercher les causes. Par exemple, les carences en fer, en acide folique ou en vitamine B12 diminuent l'efficacité des ASE.

Des cas d'érythroblastopénie ont été signalés dû à des Anticorps anti-EPO. Par conséquent, il ne faut pas instaurer Mircera lorsque la présence d'Ac Anti-EPO est confirmée.

Il est nécessaire de régulièrement surveiller le taux d'hémoglobine pendant le traitement, ainsi que la tension artérielle.

Mircera pourrait stimuler la croissance tumorale. En effet, des récepteurs à l'EPO peuvent être exprimés à la surface des cellules tumorales (Haute Autorité de Santé, 2007 ; Agence Européenne du Médicament, 2007).

3.9. Interactions médicamenteuses

A ce jour, il n'y pas de preuve de modification du métabolisme d'autres médicaments par Mircera® (Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007)

3.10. Contre-indications

Mircera est contre-indiquée en cas d'hypersensibilité au Mircera ou à l'un des excipients.

Il est également contre-indiqué en cas d'HTA non contrôlé car c'est un des principaux effets indésirables. (Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007 ; Fiche Produit Roche MIRCERA®, 2007)

3.11. Pharmacocinétique

Les profils cinétique et pharmacodynamique de Mircera chez les patients anémiques et dialysés ont été étudiés en intraveineuse et en sous-cutané à des doses programmées ont donnés de bon résultats, et suggèrent, par conséquent, la possibilité d'étendre les intervalles d'injection chez ces population (Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007 ; Fiche Produit Roche MIRCERA 2007)

3.12. Absorption et biodisponibilité

3.12.1. La voie sous-cutanée

Chez des patients non dialysés, les concentrations maximales sériques de Mircera chez des patients atteints d'anémie liée à l'IRC ont été observées 95 heures après l'administration, la biodisponibilité absolue est de 54% et la demi-vie d'élimination est d'environ 142 heures.

Chez des patients dialysés, les concentrations maximales sériques ont été observées à 72 heures, la biodisponibilité absolue est de 62% et la demi-vie d'élimination est d'environ 139 heures (Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007).

3.12.2. La voie intraveineuse

Chez des patients dialysés, la clairance systémique totale de Mircera chez des patients atteints d'anémie liée à l'IRC a été de 0.494mL/h/kg.

La demi-vie d'élimination est d'environ 134 heures. (Haute Autorité de Santé ; 2007 ; Monographie MIRCERA®, Vidal, 2007)

3.12.3. Distribution et élimination

a. Distribution

Dans une étude menée par Roche chez 400 patients atteints d'anémie liée à l'IRC, le volume de distribution était de 5 litres (Roche File Product Australia).

b. Elimination

La demi-vie d'élimination de Mircera est 15 à 20 fois plus longue que les EPO précédentes. Cela permet une administration mensuelle.

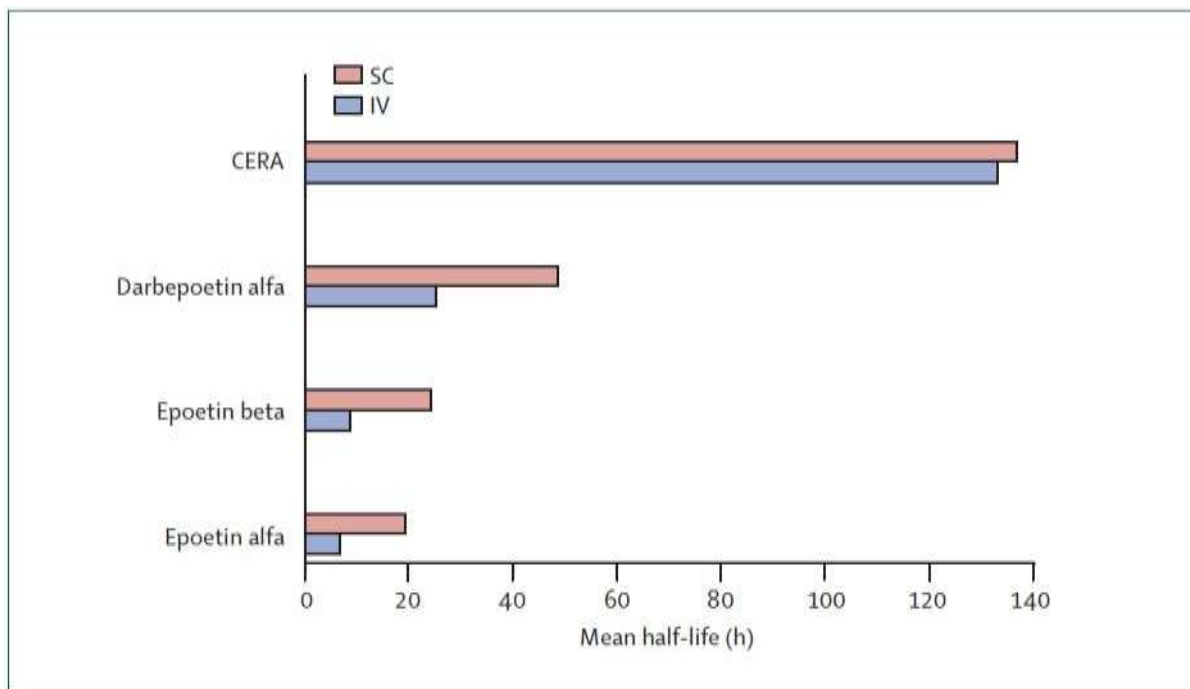


Figure 19: Les demi-vies des différents d'Agents stimulant l'érythropoïèse (MacDougall et al, 2006)

4. Effets recherchés en milieu sportif

4.1 Impact de l'EPO sur les muscles

L'EPO-R est exprimé dans plusieurs endroits du corps humain : cellules érythroblastiques (mégacaryocytes), cerveau, rétine, cœur, reins et muscles.

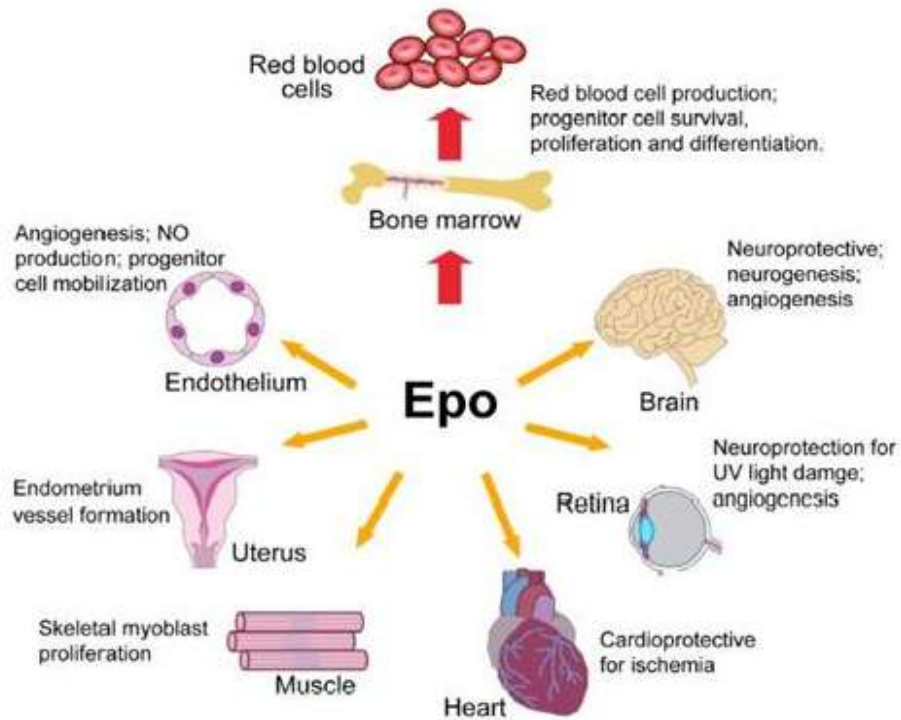


Figure 20: Activité de l'EPO dans divers tissu (D'après Noguchi CT, et al 2008)

4.2. Rappels d'anatomie et de physiologie musculaire

Il existe 3 types de muscles : les muscles squelettiques, les muscles lisses et le myocarde.

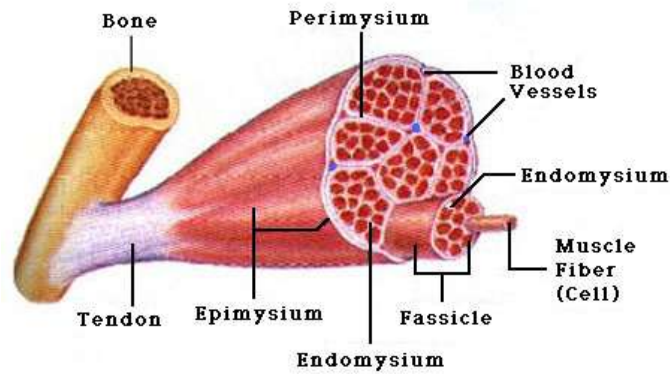


Figure 21 : Représentation anatomique d'une coupe de muscle et sa liaison à l'os.

Les muscles squelettiques consomment peu d'énergie (ATP), ils sont volontaires et adaptés à des exercices d'endurance. Les muscles lisses consomment beaucoup d'énergie, ils sont involontaires et adaptés à des exercices de courte durée (le tube digestif pour le péristaltisme intestinal, ou l'utérus pour la contraction utérine).

Lors d'un effort physique, le muscle a besoin de dioxygène. Celui-ci est stocké au niveau des myoglobines, mais également apporté par les hémoglobines des hématies. Le muscle a également besoin de calcium. Celui-ci est stocké dans le réticulum sarcoplasmique, et sortira lors d'une contraction des protéines musculaires (myofibrilles) lors de l'exercice physique (Berchtold et al, 2000).

Les caractéristiques de la contraction musculaire sont :

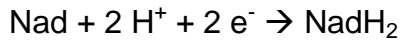
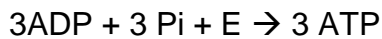
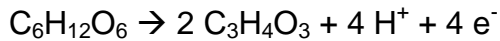
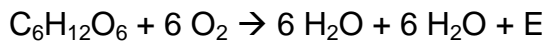
- L'excitabilité: capacité à stimuler via l'influx nerveux
- La contractilité : capacité à diminuer la longueur d'une cellule musculaire
- L'extensibilité : capacité à augmenter la longueur de la cellule musculaire
- L'élasticité : capacité pour une cellule à retourner à sa taille initiale après contraction et extension.

Un potentiel d'action se produit au niveau des terminaisons nerveuses après la libération d'acétylcholine dans l'espace inter-synaptique.

L'apport de dioxygène et de calcium vers le muscle est indispensable pour la synthèse d'ATP et assurer la contraction musculaire.

A partir d'un substrat (glucides, lipides), celui-ci subira une combustion oxydative pour donner du CO₂ et H₂O.

Exemple du glucose



Si l'oxygène est en quantité suffisante dans le muscle, l'acide pyruvique et NADH2 vont pénétrer dans la mitochondrie.

L'acide pyruvique va se lier au coenzyme A pour former l'acétylcoA pour participer au cycle de Krebs.

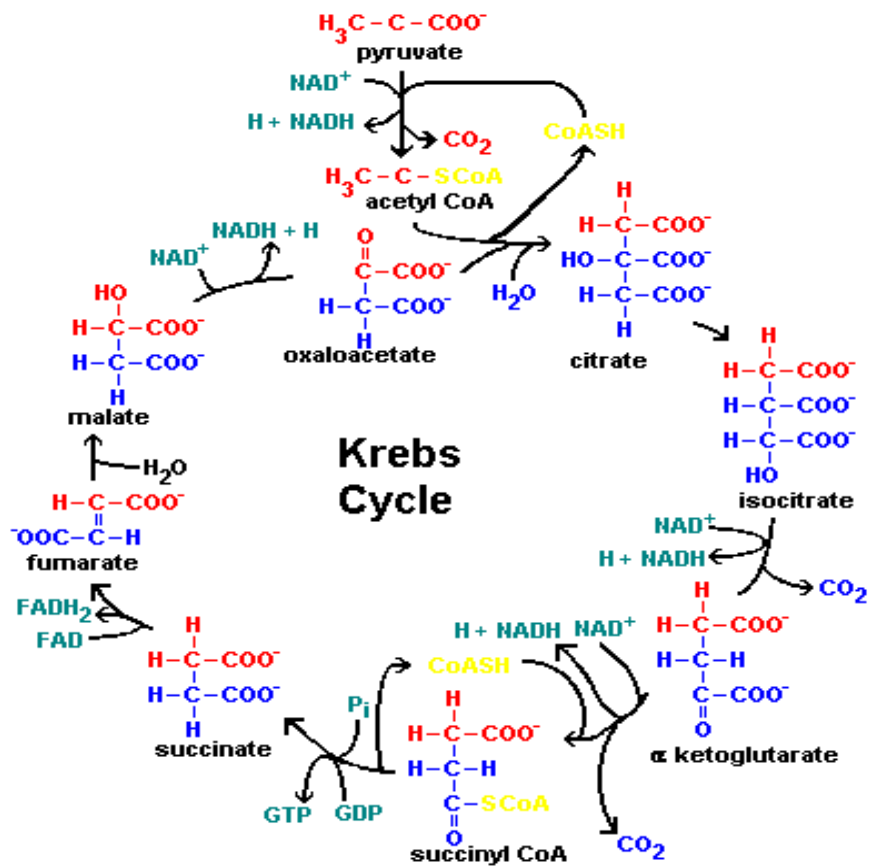
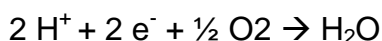


Figure 22: Cycle de Krebs, étape indispensable dans le développement musculaire.

Les couples $H^+ + e^-$ vont entrer dans un second système qui est la chaîne des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les ions $H^+ + e^-$ vont libérer progressivement leur énergie qui sera utilisée pour resynthétiser de l'ATP.

12 couples de $H^+ + e^-$ vont ainsi n'être libérés et chaque couple va permettre la resynthèse de 3 ATP. A la suite de la chaîne des électrons, les hydrogènes vont entrer en combinaison avec l'oxygène pour former l'eau.



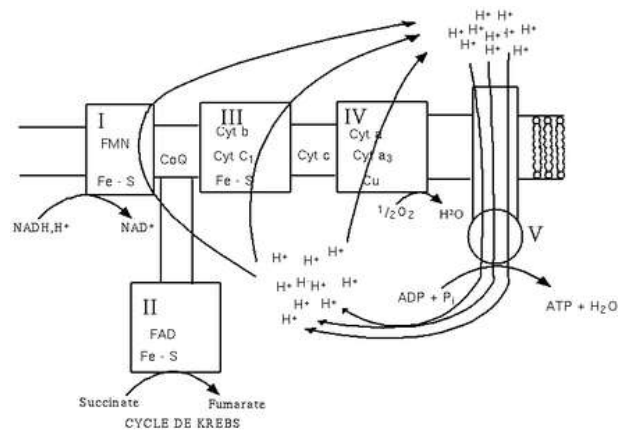


Figure 23: Activation de la chaîne respiratoire mitochondriale à partir du cycle de Krebs.

Au final, il y a eu synthèse de 3 molécules d'ATP (Acide pyruvique), ainsi que 12 couples $H^+ + e^-$ libérant l'énergie permettant la resynthèse de 3 ATP, soient 36 molécules d'ATP d'où un total de 39 molécules ATP.

En ce qui concerne les lipides, les triglycérides sont de bons substrats avec, par exemple, l'acide palmitique, en tant qu'acide gras issu de la dégradation des triglycérides, permet l'obtention de 130 molécules d'ATP.

4.3 Description de l'apport bénéfique d'O₂ aux muscles à partir d'EPO endogènes et recombinantes

4.3.1. Les premières découvertes

Afin de comprendre l'intérêt de l'EPO en milieu sportif, plusieurs études ont été menées.

C'est à partir de 1972 que le Professeur Ekblom de l'institut de physiologie de Stockholm, démontre le lien qui existe entre la concentration en hémoglobines, et le volume sanguin (Ekblom et al, 1991). En 1991, une étude évalue les effets de la de RhuEPO par voie sous-cutané sur 6 semaines (20-40 IU/kg de masse corporelle), 3 fois par semaine pendant 4 mois chez 15 volontaires masculins en bonne santé. Les résultats montrent que :

Le niveau de concentration en hémoglobines évolue de 152 g.L⁻¹ à 169 g.L⁻¹ après administration d'EPO. En parallèle, l'hématocrite augmente de 44.5% à 49.7%. Cette étude conclue que l'effet ergogénique de l'EPO peut-être expliqué par l'augmentation de capacité de transport de l'oxygène par le sang, mais limité par le travail cardiaque (Ekblom et al, 1991).

A partir de 1999, d'autres études confirment ces effets de l'EPO sur l'élévation du taux d'hémoglobine (jusqu'à 173 g.L⁻¹) et du taux d'hématocrite (jusqu'à 52%).

En 2000 une équipe réalise la première étude randomisée (Birkeland et al 2000). L'étude montre que l'administration de doses modérées de RhuEPO pendant 4 semaines augmente de manière significative la quantité d'inspiration maximale d'oxygène mais il démontre également que la RhuEPO allonge le délai d'épuisement chez des athlètes en bonne santé.

Cette étude, réalisée en double aveugle et contrôlée par placebo a été menée avec l'administration de 5000 U de RhuEPO (n = 10) ou un placebo (n = 10) 3 fois par semaine pendant 4 semaines à des athlètes de sexe masculins.

Vingt athlètes en bonne santé, pratiquants diverses disciplines sportives telles que le cyclisme, la course d'orientation, le triathlon, la natation et le cross-country se sont portés volontaires pour des études à partir de prélèvements sanguins.

Après un échauffement de 5 à 10 minutes, les sujets ont pratiqué du vélo jusqu'à épuisement dans des conditions de travail rigoureuses, mesurées par spiromètre.

Les prélèvements commencent immédiatement avant le début du test et 3 fois par semaine pendant la période de traitement, ainsi que tous les 5 jours après l'arrêt du traitement et 2 fois par semaine pendant le reste des 4 semaines.

Les paramètres mesurés sont l'hématocrite et la concentration d'hémoglobine, la quantité de récepteurs solubles à la transferrine sTfR, le taux de ferritine, ainsi que l'EPO.

Au bout de 30 jours d'études, tous les participants ont atteint un taux d'hématocrite de 50%. La quantité maximale d'inspiration d'oxygène, au départ pour le groupe EPO était de 63,3 ml et évolue jusque 68,1 ml.

En revanche, la quantité maximale d'inspiration d'oxygène augmente légèrement mais de manière non significative dans le groupe placebo

Le temps d'épuisement est passé de 12,8 minutes au départ à 14 minutes dans le groupe EPO contre 13,1 minutes à 13,3 minutes dans le groupe contrôle par placebo. (Truong et al, 2012).

4.3.2. L'importance du volume en dioxygène (VO₂)

Le VO₂ représente la quantité maximale qu'un organisme peut consommer par unité de temps lors d'un exercice dynamique aérobie.

V est un débit (L/min), VO₂ spécifique (mL/min/kg), VO₂ moyen : Homme=45 mL/min/kg, Femme=35 mL/min/kg

De nombreuses études ont montrées que les RhuEPO induisent une augmentation du niveau de concentration en hémoglobine, en augmentant la capacité de transport de l'oxygène vers les hémoglobines ainsi qu'un VO₂ max qui augmente en partie grâce à la quantité d'inspiration maximale en oxygène vers le cœur et les muscles, ainsi qu'un allongement du temps d'épuisement. Cet effet est particulièrement recherché par les sportifs afin d'être plus endurant lors des entraînements ainsi que lors des compétitions sportives (Joyner et al, 2003).

Une première étude a montrée que le VO₂ max augmente de 7.5% (p<0.05) en présence de RhuEPO (Birkeland et al, 2000). D'autres études réalisées dans les mêmes conditions ont abouti à des valeurs similaires (Wilkerson et al, 2005 ; Thomsen et al, 2007 ; Truong et al, 2012). Ces valeurs obtenues grâce à la prise d'EPO sont difficilement atteignables chez des sportifs adultes hautement entraînés par des méthodes conventionnelles telles que les entraînements en continu et l'exposition en altitude (Parisotto et al, 2000 ; Joyner et al, 2003).

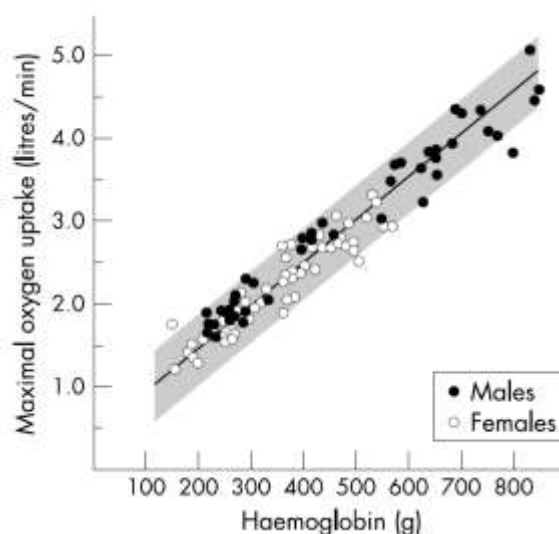


Figure 24: Données montrant la relation entre l'élévation du taux d'hémoglobine en fonction de la VO₂ chez 94 sujets sains âgés de 7 à 30 ans (Joyner et al, 2003).

Par ailleurs, il existe également un risque d'augmentation de la pression artérielle pouvant provoquer un risque d'hypertension artérielle (Vaziri et al,1999).

4.3.3. L'impact de l'EPO sur l'EPO-R musculaire

Les récepteurs à l'EPO sont présents sur les cellules musculaires squelettiques, mais à ce jour, le rôle de la stimulation directe de ce récepteur dans l'augmentation de la masse musculaire n'a pas été mis en évidence.

Cependant, une étude réalisée par Lundby et al, 2008, laquelle précise que les effets de l'EPO sur EPO-R du muscle squelettique induit une angiogénèse par la stimulation de VEGF, ainsi qu'une hypertrophie et l'homéostasie ferrique (Lundby C et al, 2008).

4.4. Cas d'utilisation de Mircera dans le milieu sportif

Roche a obtenu l'A.M.M de Mircera en 2007. Cette année a été très importante sur le plan sportif puisque de nombreuses compétitions sportives se sont déroulées telles que la Coupe d'Europe des Nations de Football disputée en Suisse et en Autriche, les Jeux Olympiques de Beijing en Chine, et le tour de France de cyclisme et Giro en Italie. (Egly et al, 2008 ; la Rédaction la Gazzetta, 2008 ; La Rédaction RTL, 2008).

4.4.1. Tour de France 2008

La compétition s'est déroulée du 6 au 27 juillet 2008. Après Manuel Beltran et Moises Duenas Nevado, Le Figaro annonce que Riccardo Ricco, cycliste italien, appartenant à l'équipe Saunier-Duval et 9^e du classement général, est le troisième sportif contrôlé positif à Mircera. Il sera disqualifié de la compétition le 18 juillet 2008, sera suspendu de toutes compétitions pendant 20 mois et condamné à 2 mois de prison avec sursis.

LE FIGARO · fr ACTUALITÉ · ECONOMIE · SPORT · CULTURE · LIFESTYLE · MADAME · Edition ABONNÉS

Tour de France : Riccardo Ricco contrôlé positif

SPORTS Par Florian Egly, Sport24.com | Mis à jour le 17/07/2008 à 15:31 | Publié le 17/07/2008 à 14:30

L'AUTEUR
SUR LE MÊME SUJET
RÉAGIR (77)
PARTAGER
IMPRIMER



L'Agence française de lutte contre le dopage a annoncé jeudi que Riccardo Ricco avait été contrôlé positif à l'EPO. Son équipe quitte le Tour.

Figure 25 : Article de presse concernant un athlète inculpé lors du Tour de France 2008

Le coureur cycliste italien Leonardo Piepoli, appartenant à l'équipe Saunier-Duval a également été contrôlé positif à Mircera à 2 reprises lors du Tour de France 2008 au début du mois de juillet. Il en a été licencié le 18 juillet 2008 et entendu par le procureur antidopage du comité olympique italien (Coni).

Le journal de presse belge DHnet.be a annoncé le 6 octobre 2008 que le coureur cycliste allemand Stefan Schumacher a été contrôlé positif lors du Tour de France 2008. Stefan Schumacher avait remporté 2 étapes contre-la-montre du Tour de France 2008 et porté pendant 2 jours le maillot jaune.

4.4.2. Tour d'Italie 2008

La compétition s'est déroulée du 10 mai au 3 juin 2008. Le 5 août 2008, Emanuele Sela, cycliste et meilleur grimpeur italien est arrêté par la Gendarmerie italienne suite à un contrôle positif à l'EPO. En effet, l'Ansa (Agenzia Nazionale Stampa Associata), principale agence de presse en Italie, avait dévoilé que des traces de Mircera avaient été détectées lors d'un contrôle «hors compétition» effectué le 23 juillet 2008. Le 8 août 2008, le coureur avoue s'être dopé lors du Giro 2008. Il sera suspendu 1 an à la suite de ce contrôle.

4.4.3. Jeux olympiques de Pékin de 2008

Presqu'un an après la compétition qui s'est déroulée du 6 au 24 août 2008, la presse annonce que des cas de dopage à Mircera ont entaché les Jeux olympiques de Pékin.

RTL annonce que le président du comité olympique Bahreïni a déclaré que l'athlète Rashid Ramzi, champion olympique du 1500 mètres, a été contrôlé positif à Mircera. Des tests approfondis réalisés en France (AFLD, Chatenay-Malabry) confirmeront la présence de Mircera dans le flacon B. La médaille d'or lui sera retirée et attribuée au Kenyan Azbel Kiprop.

Concernant Davide Rebellin, de l'équipe Diquigiovanni, médaillé d'argent lors de l'épreuve cycliste sur route aux jeux Olympiques de Pékin, il a été contrôlé positif à Mircera. Il a été suspendu de l'équipe avec effet immédiat et disqualifié de la compétition.

Après le Tour de France 2008, le coureur cycliste allemand Stefan Schumacher participe aux Jeux Olympiques de Pékin. Il sera contrôlé positif à Mircera en même temps que Ramzi et Rebellin.

D'autres sportifs ont également entaché leur discipline après des contrôles positifs à Mircera pour Athanasia Tsoumeleka, Vanja Perisic et Bernard Kohl.

dopage

JO 2008 - Dopage : Rashid Ramzi, Stefan Schumacher et Davide Rebellin contrôlés positifs

Par [La rédaction de RTL](#) | Publié le 29/04/2009 à 18h40 | Mis à jour le 30/04/2009 à 10h05



Rashid Ramzi, Champion Olympique du 1.500 m en août dernier

Figure 26 : Article de presse concernant des athlètes inculpés lors des Jeux Olympiques de 2008.

4.4.4. Coupe d'Europe de Football 2008

Cette compétition s'est déroulée en Suisse et en Autriche du 7 au 29 juin 2008. Le président de l'UEFA avait déclaré que tout avait été mis en œuvre pour que la compétition se déroule sans dopage. Une véritable campagne anti-dopage a été menée pendant toute la manifestation sportive. Les contrôles anti-dopage ont été effectués par le Laboratoire suisse d'analyse du dopage du CHUV. Grâce à une campagne de communication et de persuasion contre le dopage sans précédent, aucun incident de dopage n'a depuis été signalé pour cette compétition (Platini, Communiqué AFP, 2008).

5. Les risques induits par des injections d'EPO recombinantes

En dehors de leurs indications médicales et des doses thérapeutiques recommandées, l'abus de médicaments peut entraîner des effets secondaires irréversibles. Les principaux organes affectés sont le système cardiovasculaire, le système nerveux, le système locomoteur, le système hépatique, le système endocrinien, ou encore le système immunitaire.

En subissant des injections répétées en EPO, les sportifs cherchent à oxygéner davantage leurs tissus musculaires en augmentant leur concentration en hémoglobines.

Après l'administration d'EPO recombinante, il a clairement été démontré une augmentation dose-dépendante des paramètres hématologiques (Udran et al, 1999). Les effets persistent pendant plusieurs jours après la dernière prise même lorsque les concentrations plasmatiques d'EPO reviennent à des taux normaux.

Des études ont été menées sur des espèces murines et des rats. Les résultats ont montré qu'une surexpression d'EPO conduit à une polyglobulie provoquant un risque de mortalité prématuré (Semenza et al, 1989, Vaziri et al, 1995).

La viscosité du sang augmente suite à une augmentation du nombre de globules rouges et peut induire l'apparition d'une thrombose. Le lien entre la viscosité sanguine et la concentration en hémoglobines est au départ linéaire. Lorsque la concentration en hémoglobine atteint 40 à 50%, la viscosité du sang augmente beaucoup plus rapidement (Fishbane et al, 2007).

L'augmentation de la viscosité du sang associée à une augmentation du taux d'hématocrite conduisent à un risque accru de thrombose veineuse profonde, d'embolie pulmonaire, de thrombose coronaire ou cérébrale (Ergouwen et al, 1999, Elliott et al, 2008). L'apport d'oxygène vers le cerveau est diminué à cause d'une mauvaise circulation sanguine ainsi que le débit en dioxygène et cela augmente le risque de thrombose cérébral (Wade et al 1983).

Par ailleurs, il a été démontré une corrélation entre la prise d'EPO et l'élévation du taux de plaquettes provoquant un risque d'apparition d'agrégation plaquettaire, qui,

associée à une inflammation et une activation endothéliale amplifiant le risque d'apparition de thrombose (Heuberger et al 2013).

De plus, après des injections répétées d'EPO, la viscosité sanguine élevée et la perte de l'hypoxie provoquée par la vasodilatation entraîne une HTA pouvant conduire à des dysfonctions cardiaques telle qu'une hypertrophie du ventricule gauche (Wagner et al, 2001). En effet, 20 à 40% des personnes soumises à des injections en EPO voient leur tension artérielle augmentée, et développent une HTA (Fishbane et al, 2007).

Il a également été rapporté une réduction de la fréquence cardiaque au cours de la nuit (Noakes et al 2004).

Sur le plan hépatique, une croissance générale et un trouble fonctionnel ont été rapportés avec des cas d'insuffisance hépatique aiguë et d'hépatite (Heinicke et al, 2006).

De par son rôle dans la néovascularisation et l'angiogénèse, il a été suggéré que l'EPO pouvait jouer un rôle dans la croissance tumorale. Par ailleurs, l'EPO étant un facteur puissant de l'angiogénèse rétinienne, les injections répétées d'EPO peuvent provoquer des modifications sur le plan ophtalmologiques (Rastmanesh et al, 2012).

La collecte et l'analyse de l'ensemble de ces données sur les modifications physiopathologiques de ces athlètes, rétrospective ou prospective, permettraient donner des informations importantes pour informer et soutenir la sécurité des athlètes.

A partir de 1998, plusieurs cas d'érythroblastopénie due à l'apparition d'anticorps anti-EPO ont été observés chez des patients utilisant les EPO recombinantes pourtant réputées peu immunogènes. L'apparition d'anticorps dirigés contre l'EPO reste assez rare. Ces effets sont essentiellement recensés chez des patients traités par EPO α en sous-cutané.

Elle entraîne de graves troubles de l'érythropoïèse et est caractérisée par une anémie sévère, une faible numération des réticulocytes, une absence d'érythroblastes, une non-réponse aux ASE et la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPO (Casadevall et al, 2005 ; Summers et al, 2008).

Le patient présente généralement une réponse érythropoïétique initiale au traitement de l'ASE pour 6 à 18 mois avec un taux en hémoglobine stable. Elle est suivie d'une baisse soudaine et rapide du taux d'hémoglobine à des taux d'environ 1g/dL/semaine. Le développement d'une anémie sévère est réfractaire à des augmentations de dose de l'ESA, ce qui entraîne un besoin croissant pour des transfusions à environ 4 unités de concentrés de globules rouges par mois. Le plus court intervalle de temps entre le début du traitement par l'ESA et la perte d'efficacité rapportés dans la littérature était de 2 mois et le plus long intervalle de temps était de 90 mois (Potoles et al, 2005).

Les enquêtes hématologiques chez les patients atteints d'érythroblastopénie ont révélé une réticulocytopénie avec des leucocytes et des plaquettes généralement normaux. Le diagnostic d'érythroblastopénie est confirmé par l'examen de la moelle osseuse : cellularité normale avec une élimination presque complète des érythroblastes (<5% des érythroblastes) et la présence d'anticorps neutralisants (Portoles et al, 2005).

Lors du diagnostic d'érythroblastopénie induite par les ASE, la recommandation est l'arrêt du traitement de l'ASE et la transfusion de culots de globules rouges lorsque cela est nécessaire pour éviter une anémie grave et potentiellement mortelle.

Les mécanismes impliqués dans cette réponse immunologique sont partiellement élucidés. Les études ont montré que ces effets étaient dû à un excipient, le polysorbate 80, un tensio-actif qui a remplacé la sérum albumine humaine utilisée jusque là. Par ailleurs, le piston de la seringue en caoutchouc entraînait une libération des composants organiques lorsqu'il était en contact avec le polysorbate 80.

En 2002, les organismes de réglementation de l'Union européenne contre-indiquent l'administration sous-cutanée d'Epex® (EPO α) au profit d'une administration intraveineuse pour les patients hémodialysés. Cette mesure a entraîné une diminution de 90 % du nombre annuel de cas d'érythroblastopénie associé à l'Epex®, ainsi que d'une baisse des taux d'incidence dans ces pays. Avec l'introduction de bouchons en caoutchouc revêtus de téflon en 2004, une nouvelle réduction des taux de déclaration est survenue. La voie sous-cutanée pour l'Epex® a finalement été réintégrée dans la plupart des pays.

Très récemment, une augmentation du nombre de cas d'érythroblastopénie avec l'utilisation en sous-cutané d'Epex® a été recensé à Singapour de 2012 à juin 2013.

Ces résultats ont montré qu'il était nécessaire de contrôler de manière très stricte, les produits biologiques à visée thérapeutique (Casadevall et al 2006). Dans ce contexte, le Dr Béatrice Viron préconise un traitement immunomodulateur dont les modalités resteront à définir (Viron et al ; 2002).

6. Stratégies antidopage et techniques de détection

6.1. Introduction et historique

La liste des produits interdits dans le sport a été introduite pour la première fois en 1967 par la commission médicale. L'utilisation frauduleuse croissante des EPO recombinantes a créé un besoin de les quantifier, principalement dans le plasma et les urines, un milieu de composition protéique très complexe. De nombreuses méthodes (ELISA, spectrométrie, électrophorèse, chromatographie) ont été décrites permettant de les détecter et de différencier les EPO endogènes des EPO recombinantes sur la base de leurs propriétés (forme, poids moléculaire, point isoélectrique) dans le sang et dans les urines.

6.2. Protocole à suivre

Les sportifs sont soumis à des contrôles inopinés, selon des procédures parfaitement réglementées. Les contrôles sont effectués à la demande de l'agence antidopage, de manière ciblée ou aléatoire, après ou en dehors des compétitions. A l'issue de ces contrôles, des échantillons d'urine et de sang sont prélevés chez les sportifs.

Le prélèvement doit s'effectuer dans un lieu de contrôle adapté : il doit contenir une salle d'attente, une salle de traitement et des toilettes pour collecter les urines.

Une équipe de contrôle coordonne la séance de prélèvement. Lors du prélèvement, les sportifs sont informés de leurs droits et sont accompagnés par un dirigeant de l'équipe. Pour le prélèvement urinaire, c'est le sportif qui choisit lui-même son pot de collection, qui effectue la répartition en deux échantillons (A et B), et qui scelle les échantillons sous un numéro anonyme.

Un formulaire est signé au début et à la fin de la procédure. Le sportif y indique également ses traitements, ses habitudes alimentaires et toutes remarques qui lui semblent importantes. Les résultats obtenus sont envoyés à l'agence de lutte contre le dopage, la WADA (World Anti-Doping Agency).

6.3. Démarches à suivre

Une partie de l'échantillon urinaire (5 - 20 mL) ou sanguin (200 microL - 1 mL) subit une étape d'ultrafiltration et de purification sur colonne d'immuno-affinité qui aura pour but de les concentrer. En fonction de la méthode, des étapes de migration selon le point isoélectrique (IEF) ou selon leur poids moléculaire (SAR-PAGE) est associée à une identification sur membrane à l'aide d'un anticorps monoclonal (Western-blots). La détection peut également utiliser des méthodes ELISA. Les méthodes de détection de l'EPO recombinantes dans le cas d'une positivité, sont obligatoirement confirmées par d'autres méthodes à partir du deuxième échantillon (échantillon B)

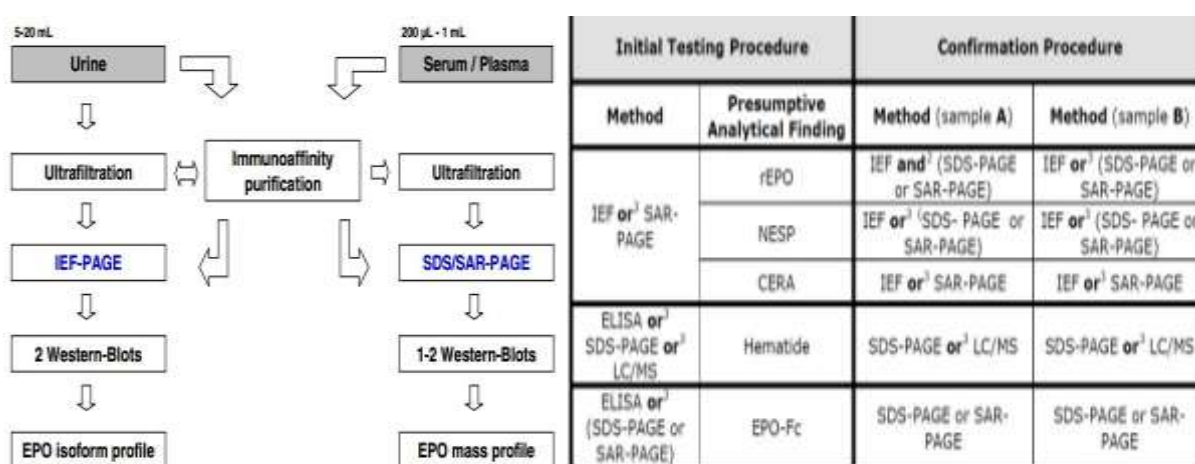


Figure 27: Méthodes de détection directe de l'EPO par IEF, SDS et SAR-PAGE (à gauche) (Reichel C et al 2011) et procédure de confirmation (à droite). (Document technique Agence mondiale Antidopage, 2013)

6.4. Spectrométrie de masse (MS)

6.4.1. Définition

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer les structures moléculaires. Elle est souvent couplée avec un système de chromatographie en phase gazeuse. Cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces (quelques nanogrammes de mélange).

La mesure des rapports masse/charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations permet d'en déduire la masse moléculaire (De Graeve et al 1986).

6.4.2. Principe de la détection

Une méthode de déplétion permet d'éliminer le plasma des protéines majoritaires du plasma. Cette étape d'enrichissement sur une colonne d'affinité permet d'obtenir une fraction enrichie en EPO, qui est ensuite dessalée avant de subir une étape de purification par chromatographie en phase inversée.

La partie protéique subit ensuite une protéolyse à l'aide d'une enzyme, la trypsine, afin d'obtenir des peptides de petites tailles. Ces fragments peptidiques introduits à l'état liquide sont réduits à l'état de vapeur pour subir une ionisation. La mesure des rapports m/z de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations permet d'en déduire la masse moléculaire (Sanglier et al, 2005).

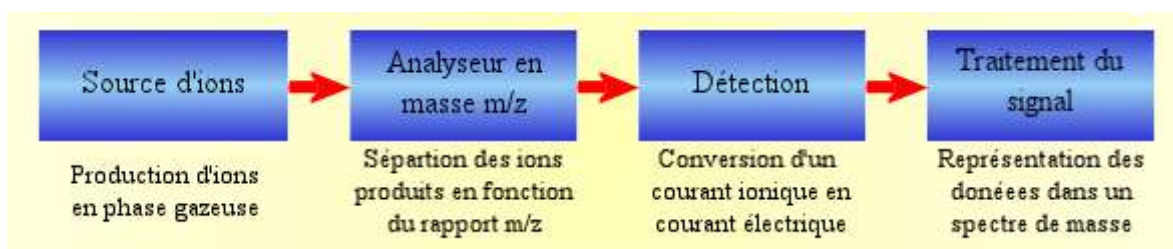


Figure 28: Principe du spectromètre de masse (Sanglier et al 2005).

La confrontation du spectre d'un échantillon inconnu avec ceux d'une banque de spectres (plus de 120.000 produits répertoriés) permet d'identifier et de quantifier les molécules (Xuereb et al, 2008).

Concernant la détection des EPO recombinantes, la technique combine une chromatographie liquide et 2 étapes de spectrométrie de masse (LC/MS/MS). Le premier analyseur sélectionne les ions avec un certain rapport m/z , l'ion est purifié et fragmenté dans une chambre de collision, alors que le second analyseur mesure les rapports m/z des fragments.

Des profils de diverses EPO recombinantes par spectrométrie de masse dans des échantillons sériques humain existent déjà, telle que Aranesp®, celle de Mircera est en cours de création.

Le dopage touchant également les disciplines sportives équestres, cette méthode LC/MS/MS a permis de confirmer la présence d'EPO recombinante chez des

chevaux traités avec 100 µg de Mircera par voie intramusculaire (Chang et al, 2011). Dans cette étude, les séquences peptidiques de l'EPO endogène du cheval (eEPO), la Darbépoïétine (DPO) et l'EPO endogène d'origine humaine, semblable à la rhuEPO et Mircera (hEPO) ont été analysées. Les résultats ont montré que la détection de la séquence peptidique T6 (46-VNFYAWK-52) offre une meilleure sensibilité et une meilleure détection comparée aux autres séquences habituellement utilisées.

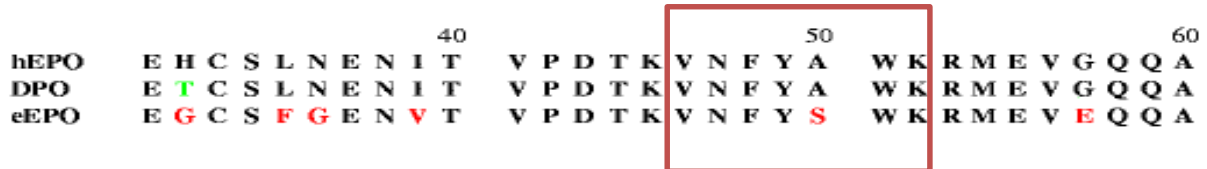


Figure 29: Comparaison des séquences d'acides aminés de l'EPO endogène de cheval (eEPO), l'EPO endogène humaine (hEPO) et la Darbépoïétine alpha. (Yu et al, 2010).

Une comparaison des spectres des échantillons provenant d'un plasma de cheval contrôle versus cheval traité au Mircera a été effectuée à partir de cette séquence T6, détectée avec un rapport m/z de 465.5. Quatre SRM (Selected Reaction monitoring Mode) montrent 4 états de transitions (214.4 ; 714.3 ; 811.9 ; et 828.7). Le pic 714.3 permet de révéler très sensiblement la présence de l'EPO non endogène chez le cheval traité comparé au cheval contrôle (Chang et al 2011)

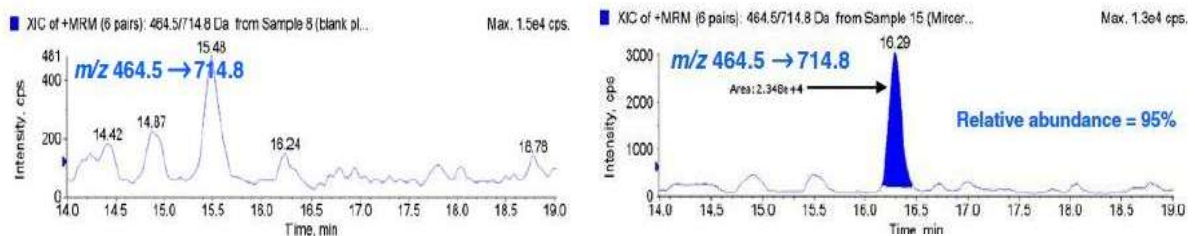


Figure 30 : Comparaison spectrométrique d'un échantillon plasmatique provenant d'un plasma contrôle (à gauche) et d'un plasma positif pour le Mircera (à droite) (Yu et al, 2010 ; Chang et al, 2011).

La technique LC/MS/MS est donc une technique de pointe et très fiable. L'apport de la spectrométrie de masse pour l'identification et le dosage de l'EPO dans les milieux biologiques est double. Par rapport aux techniques de type immunologique employées habituellement, la spectrométrie de masse permet d'atteindre des sensibilités aussi bonnes voire meilleures (1ng/mL) avec surtout une meilleure spécificité (absence de faux négatifs ou de faux positifs).

Si cette technique semble être validée à partir d'un prélèvement sanguin, elle ne fait pas complètement ses preuves à partir d'un échantillon urinaire. Les études chez l'homme ne sont pas encore validées (Reichel et al, 2013).

6.5. EPO WGA MAIIA

6.5.1. Principe

Cette méthode a été décrite en 2009 pour la première fois par Maria Lönnberg. EPO Wheat Germ Agglutinin Membrane Assisted Isoform Immunoassay (EPO WGA MAIIA) est une technique de chromatographie qui exploite les différentes affinités de la lectine d'agglutinine de germe de blé non spécifique pour les formes glycosylées des EPO endogènes et recombinantes (Carlsson et al, 2009). Elle permet d'évaluer 56 échantillons en l'espace de 20 minutes (Lönnberg et al, 2012).

6.5.2. Protocole

Un échantillon d'urine, purifié et concentré en EPO, est mis au contact d'une bandelette MAIIA microcolumn strip. Lorsque la totalité des EPO ont été capturées par la bandelette au niveau d'une zone appelée « lectin zone », celle-ci est trempée dans un puit contenant une solution tampon compétitive contenant une de la N-acetylglucosamine (GlcNAc, 2-10 mmol/L), dit de désorption, et qui a pour but de détacher les lectines des parties glycosylées d'EPO et de les faire migrer vers la zone de capture contenant des anticorps anti EPO.

La bandelette est ensuite découpée au niveau de la zone de découpe (cutting line) et révélée à l'aide d'un deuxième anticorps anti EPO marqué (carbon black nanostring). La positivité de l'échantillon entraîne un changement de coloration (du gris au noir) (Lönnberg M et al 2009).

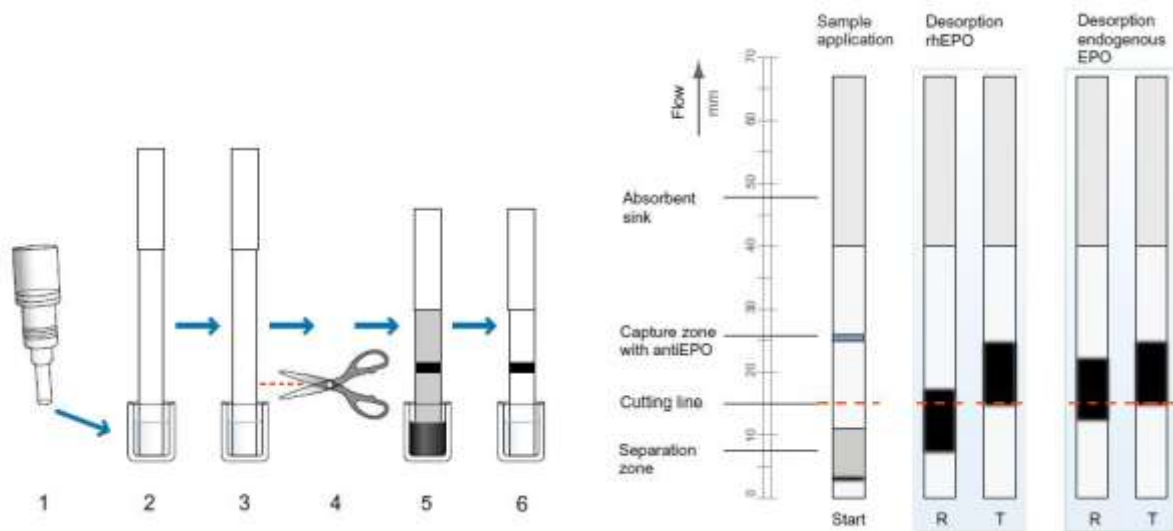


Figure 31: Protocole schématisé de la méthode MAIIA (Lönnberg et al, 2012).

La concentration en EPO est directement proportionnelle à l'intensité de coloration. Les bandes sont scannées et quantifiées à l'aide d'un logiciel de quantification après correction de l'arrière plan (background correction et delta blackness value).

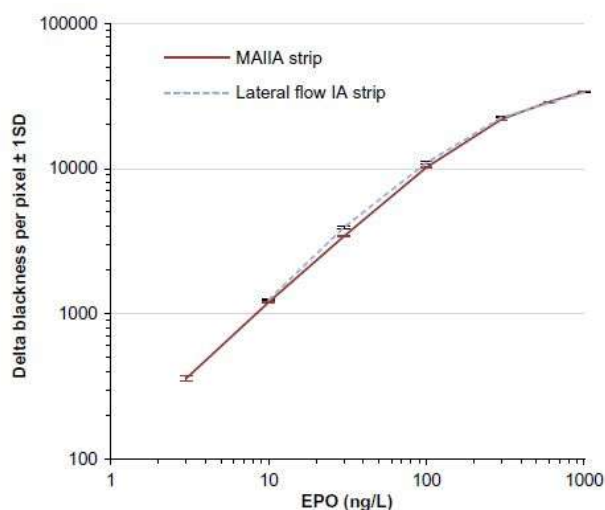


Figure 32: Intensité de la bandelette marquée par un anticorps anti-EPO en fonction de la concentration en EPO (ng/mL) selon la méthode EPO WGA MAIIA (Maria Lönnberg et al, 2012).

6.5.3. Identification de la rhuEPO

Le pourcentage de migration des isoformes.

Les EPO présentes sur la « lectin zone » migrent vers la « capture zone » en raison de leur compétitivité avec le tampon de GlcNAC. Les EPO recombinantes et endogènes présentent une spécificité de détachement et de migration.

Le PMI (Percentage Migrated Isoforms) représente le taux d'EPO désorbé en fonction de la concentration en GlcNac. Ainsi, plus la concentration en GlcNac est importante, plus le détachement de la zone de lectine sera important.

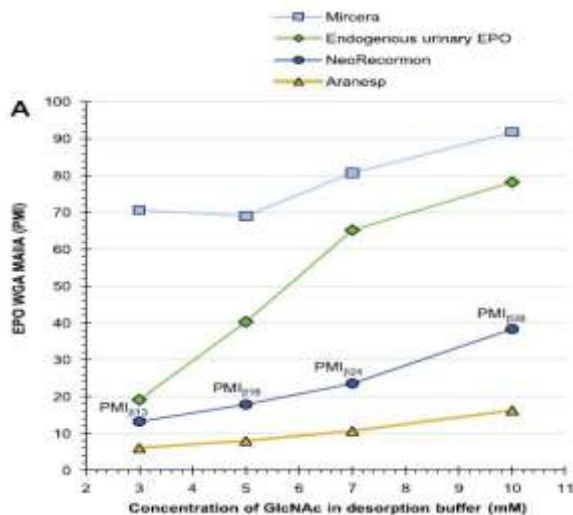


Figure 33: Profils du pourcentage de migration des isoformes des différentes ASE (Mircera, NeoRecormon, Aranesp) en fonction de la concentration en GlcNac (D'après Lönnberg et al, 2012).

La migration des EPO est proportionnelle à leur concentration. En variant la concentration (3 à 10 nM) en GlcNac du tampon de désorption, le PMI de Mircera varie de 70 % 90% contre 20% à 80% pour l'EPO endogène. Par ailleurs, le profil de PMI de Mircera se distingue des autres ASE étudiées.

Afin d'améliorer le discernement des rhuEPO, les auteurs recommandent une troisième étape qui évalue le niveau d'interaction des rhuEPO avec les anticorps de la zone de capture, la « Relative Analyte Migration », et qui facilite la distinction entre EPO endogènes et recombinantes.

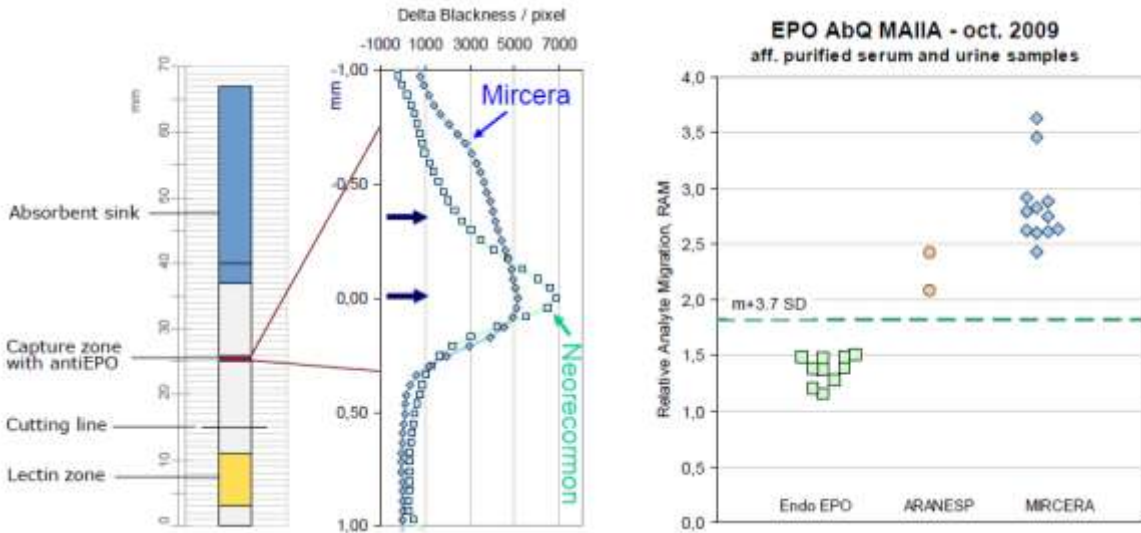


Figure 34 : Résultats obtenus des différentes EPO après fixation sur la bandelette grâce à l'affinité d'un anticorps par chromatographie (Carlsson et al, 2009).

La méthode EPO WGA MAIIA a donc l'avantage de mettre en évidence les EPO recombinantes de manière sensible et spécifique, à partir d'un prélèvement sanguin ou urinaire.

6.6. L'électrophorèse

Il s'agit d'une méthode de séparation des particules chargées électriquement, dissoutes ou en suspension dans un solvant sous l'effet d'un champ électrique. Celui-ci est envoyé par un générateur de courant. Les particules sont déposées sur un support dont chacune des extrémités est en contact avec une solution tampon. Deux électrodes de signes opposées, situées de part et d'autre du support baignent dans une solution tampon.

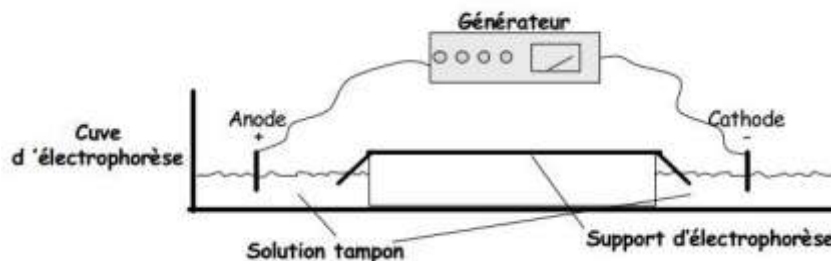


Figure 35: Principe de l'électrophorèse (Barani et al,2007)

Le support utilisé par les agences de lutte contre le dopage est le gel de polyacrylamide (PAGE) obtenu par la polymérisation de l'acrylamide et de la bis-acrylamide.

Au cours de la réaction, l'intervention du persulfate d'ammonium provoque la formation de radicaux libres, entraînant une polymérisation des molécules. En outre, il est transparent, résistant et est inerte pour les pH et les forces ioniques de tampons utilisés en séparations de protéines.

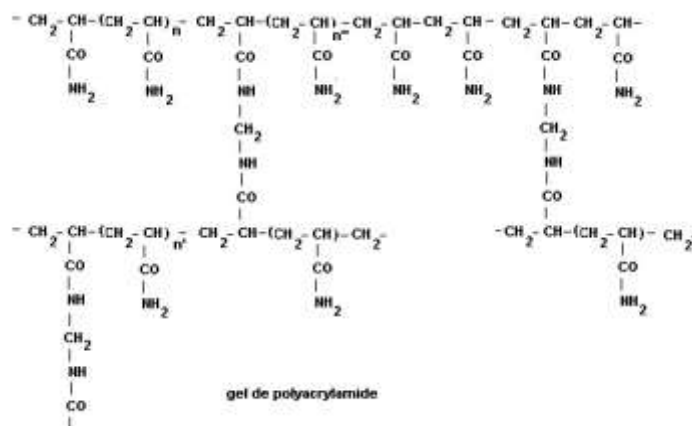


Figure 36: Représentation à l'échelle moléculaire du polyacrylamide

6.7. IEF –PAGE

6.7.1. Principe

Cette méthode a été décrite par Lasne en 2001 en se basant sur les travaux de Wide et Bengsston (1990) ([Reichel et al, 2011](#)).

L'IEF-PAGE est une technique combinant la focalisation isoélectrique (IEF) à un double immunoblot pour la détection des EPO recombinantes humaines dans les urines et de les distinguer des EPO endogène ([Guan et al, 2007](#)).

La technique IEF consiste à faire migrer dans un gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes, des protéines soumises à un champ électrique en créant un gradient de pH (de 2 à 6) compatible avec le point isoélectrique (PI) des EPO endogènes et recombinantes. Le gradient de pH est élaboré en utilisant des ampholytes porteurs de l'IEF. Après l'étape de séparation par IEF, un anticorps primaire (anti-EPO humain, clone AE7A5) est utilisé dans l'étape de double immunoblot.

6.7.2. Protocole

A partir d'un échantillon d'urine ou de plasma, l'EPO est extraite par une étape d'ultrafiltration, ce qui permet d'éliminer la majorité des grosses protéines présentes dans l'échantillon. Une étape supplémentaire de purification par immuno-affinité peut être ajoutée avant de procéder à un double blot en présence d'un anticorps monoclonal anti-EPO (clone AE7A5) (Reichel et al, 2011 ; Ayotte et al, 2009). Le profil isoélectrique des EPO est révélé en utilisant un système de détection sensible (système de chimioluminescence amplifiée). Le signal obtenu est quantifié pour apprécier l'intensité relative des différentes isoformes des EPO.

Les bandes obtenues en présence des EPO recombinantes, EPO endogènes urinaires et NESP sont présentes respectivement dans la zone basique, endogène et acide. Mircera montre un profil spécifique comparé aux autres rEPO, avec des bandes localisées dans la zone acide (Ayotte et al 2009).

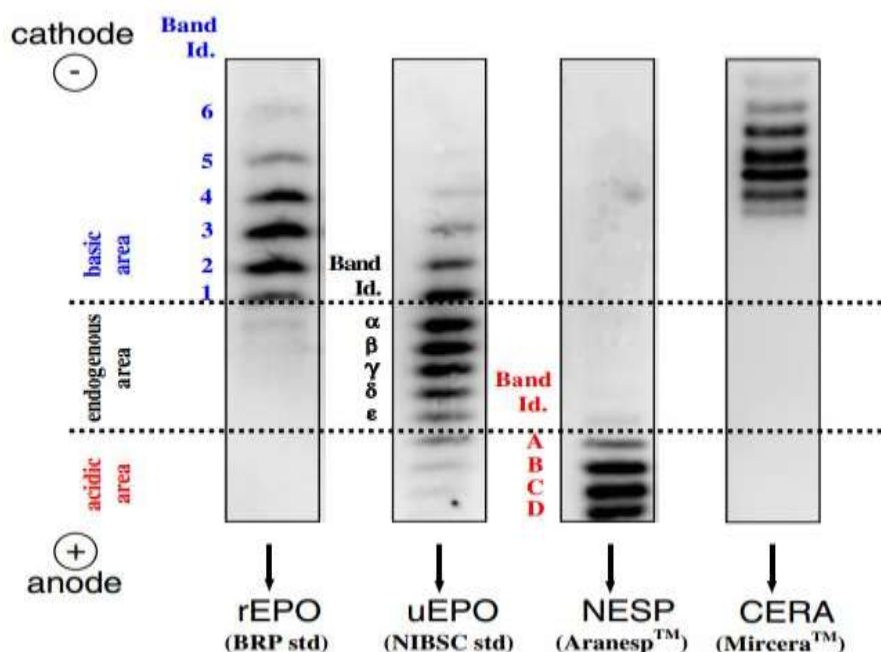


Figure 37 : Profils des ASE sur support IEF Page

Les résidus d'acide sialique présents dans la partie glycosylée seraient responsables de la position de leur EPO sur le profil électrophorétique et de leur migration vers la zone acide (Reichel et al; 2011 ; Segura et al 2007).

L'une des limites de cette méthode est que l'identification des EPO est fonction de leur contenu en acide sialique. Il est donc nécessaire de travailler rapidement et de conserver correctement les échantillons afin d'éviter leur hydrolyse et la modification de leur profil électrophorétique.

Par ailleurs, il a été montré que cette technique pouvait détecter des faux positifs d'EPO β dans des urines riches en protéines prélevées consécutivement à un effort physique. Ce phénomène est lié au fait que les anticorps monoclonaux anti-EPO utilisés dans les techniques immunologiques ne sont pas mono-spécifiques et reconnaissent également dans ces urines certaines protéines présentant une homologie structurale avec l'EPO β (Beullens et al, 2006).

D'autre part, la détection et la quantification des rHuEPO et de la Darbopoiétine α est préférable sur des échantillons plasmatiques car leurs concentrations attendues dans le plasma sont toujours supérieures que dans les urines (Guan et al, 2007).

6.8. SDS-PAGE

6.8.1. Description

Le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un détergent anionique tensioactif qui permet de dénaturer les protéines et de leur conférer une charge globale négative. Par conséquent, leur migration sur le gel de polyacrylamide ne dépend plus leur charge globale, mais uniquement de leur poids moléculaire.

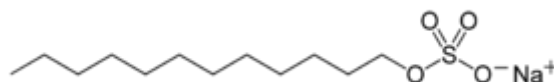


Figure 38 : Représentation moléculaire du sodium dodecyl sulfate

Après migration des différentes EPO sur un gel SDS PAGE, l'EPO endogène urinaire (uEPO) apparaît à 34kDa, l'EPO α à 36kDa et la β à 38 kDa. La NESP est visible à 45 kDa alors que Mircera apparaît à environs 78 kDa (Ayotte et al, 2007 ; Reichel et al, 2010).

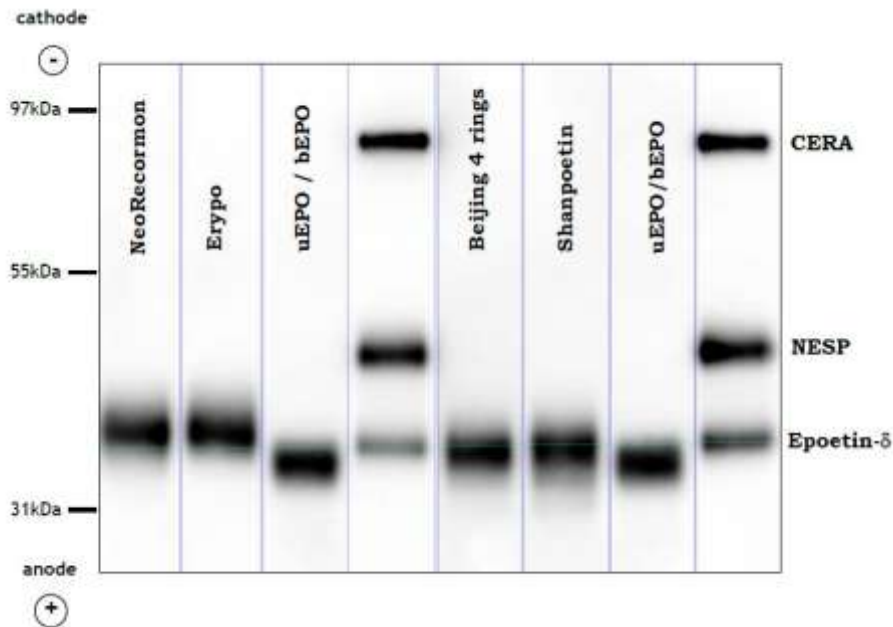


Figure 39 : Représentation de migration de différentes ASE d'un SDS PAGE.

Le SDS Page est une méthode sensible puisqu'elle permet de détecter des quantités de l'ordre du picogramme. Cette détection, contrairement à IEF est basée sur le profil de migration des EPO selon leur masse moléculaire apparente.

Cependant, lorsque l'échantillon est trop dilué, le SDS ne parvient pas à solubiliser entièrement l'échantillon, comme dans le cas de la détection de Mircera dans les urines. Pour cette technique, il est recommandé d'ajouter une étape d'ultrafiltration ou de purification par immunoaffinité, de la même manière que la méthode IEF PAGE afin d'améliorer la résolution des bandes électrophorétique (Reichel et al 2009).

6.8.2. 2D-Electrophoresis

Il s'agit d'une technique combinant les méthodes IEF PAGE et SDS PAGE. Les protéines sont séparées en deux dimension (2D) : selon leur point isoélectrique (PI) puis selon leur masse moléculaire (Schlags et al, 2002).

L'avantage de cette technique est que les protéines sont parfaitement séparées. (Schlags et al, 2002). Cependant, la méthode est longue, fastidieuse et ne permet pas de faire une analyse à haut débit.

Des méthodes similaires ont été testée, avec par exemple l'IPG-strips (Immobilised pH-Gradient Gel) qui utilise un gradient de pH compris entre 3 à 6 et 3 à 1. Cette

méthode ne permet pas de séparer ou de mettre correctement en évidence les protéines à caractères fortement acide comme Mircera, ce qui finalement provoquait la détection de faux positifs (Caldini et al, 2002 ; Segura J et al, 2007 ; Reichel et al, 2010).

6.9. Sarcosyl-PAGE

Mircera étant une molécule de taille et de masse moléculaire importante (60kDa), son élimination urinaire est limitée et n'augmente qu'après un effort intense. Cette limitation entrave fortement sa détection. Par conséquent, la détection de Mircera est préférable à partir d'un échantillon sanguin.

Pour résoudre le problème de la solubilité du Mircera et améliorer la sensibilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide, le SDS a été remplacé par le sodium N-lauroyl sarcosinate (Sarcosyl). Ils présentent tous les deux des masse moléculaires voisines (respectivement de 293.3 Da et SDS 288.4 Da).

La validation de cette méthode a été effectuée par le Professeur Reichel, soutenue et financée par Roche et l'AMA (Reichel et al, 2012).

Des volontaires sains ont reçu par voie sous-cutanée, une dose de médicament dérivé de l'EPO (Neorecormon 66UI/kg, Dynepo 35UI/kg, Mircera 50 µg). Des prélèvements sanguins ont été effectués à différents temps. La détection des EPO recombinantes a été effectuée à partir des échantillons sériques obtenus par centrifugation et soumis à une migration sur un gel d'électrophorèse, en présence de SDS ou Sarcosyl. Après migration des protéines, le gel a été soit directement coloré au bleu de Coomassie R-250 soit subit une étape de western-blot.

Les résultats de cette étude ont montré que le profil d'électrophorèse en présence de Sarcosyl était de meilleure qualité (intensité, résolution des bandes) qu'en présence de SDS, et ne modifiait pas le profil de migration des EPO recombinantes.

Le Sarcosyl est un surfactant anionique à base de methyl-glycine, qui a l'avantage de ne se lier qu'à la partie protéique et pas à la partie pégylée, contrairement au SDS. Cette particularité permettrait même au Sarcosyl d'obtenir une meilleure migration de Mircera sur le gel et d'en faciliter la liaison de l'anticorps monoclonal sur la partie protéique de la molécule.

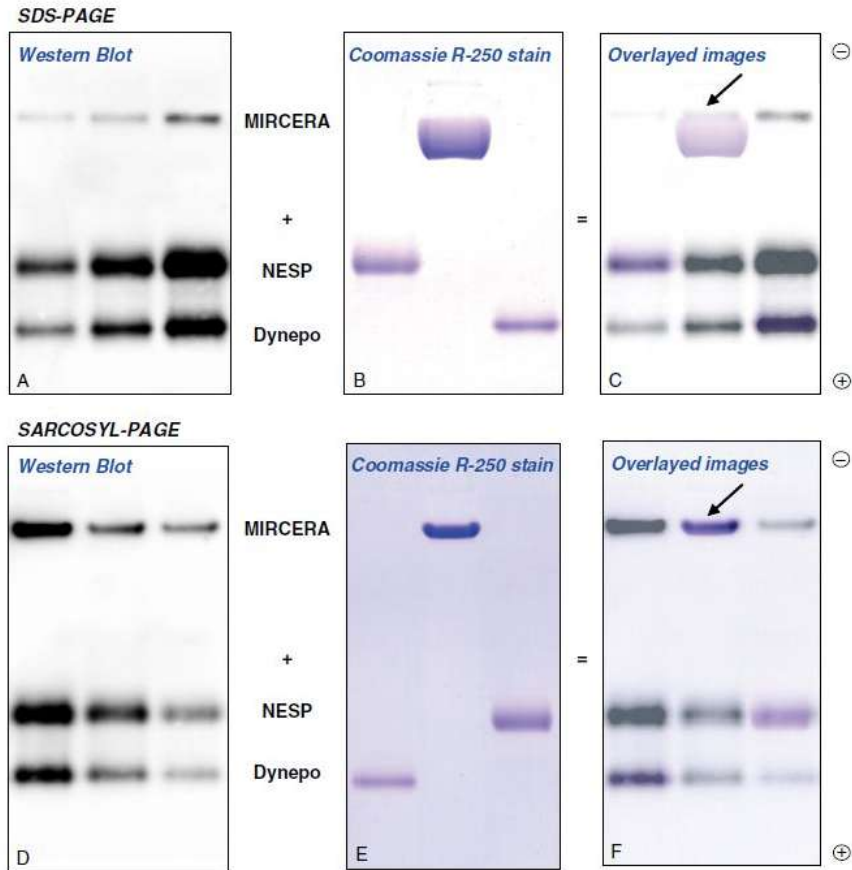


Figure 40: Comparaison des profils de migration électrophorétique des EPO recombinantes (Mircera, NESP et Dynepo) en présence de SDS (A, B, C) et Sarcosyl (D, E, F) en Western-Blot (A, D) et après coloration au bleu de Coomassie R-250 (BE). Les images C et F ont été obtenues en superposant les images obtenues par western-blot et bleu de Coomassie R-250.

Sur le mécanisme, il a été suggéré que le Sarcosyl formait moins de micelles autour de la molécule, ce qui améliorerait sa migration, sa résolution et sa détection (jusque 3 pg).

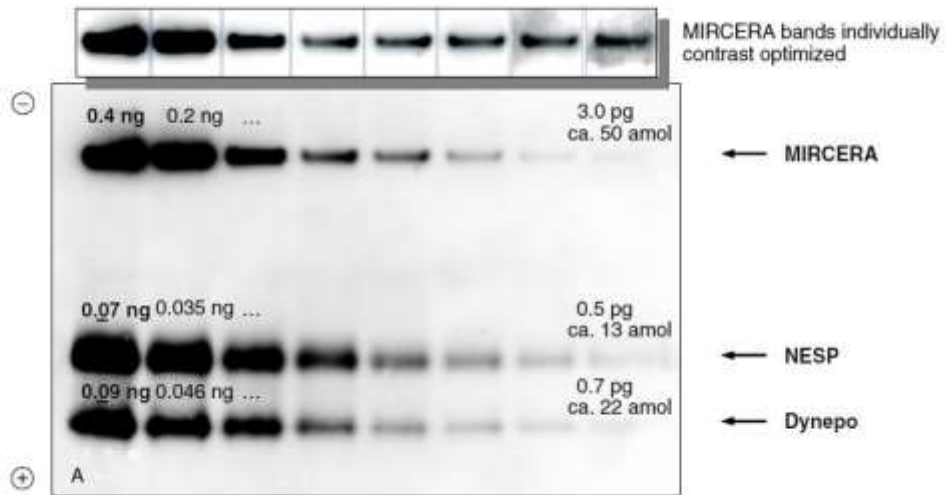


Figure 41 : Western-Blot des EPO recombinantes en présence de Sarcosyl

Par ailleurs, cette méthode permet de détecter Mircera dans le sérum jusqu'au 11^e jour de l'administration en sous-cutané.

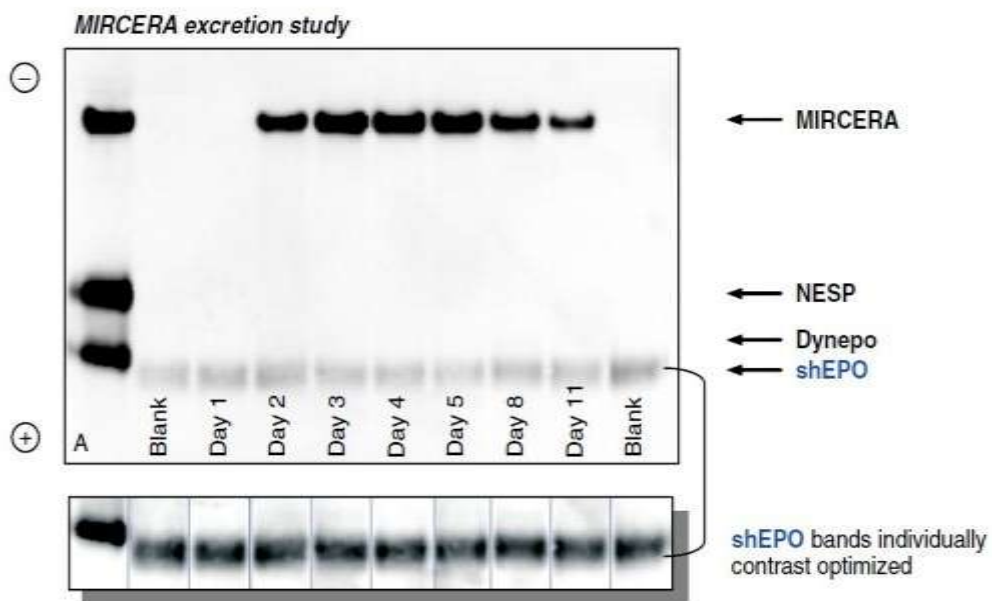


Figure 42 : Profil des différentes EPO dont Mircera de J0 à J11 sur Sar-Page

6.10. La méthode ELISA à haut débit combinée à IEF- Page

Cette méthode a été mise au point en 2004 par Roche alors que Mircera était encore en phase II (Rabon et al, 2011, Lamon et al, 2009). Le test ELISA, pour *enzyme-linked immunosorbent assay* ou dosage d'immuno-adsorption par l'enzyme liée, est un dosage immuno-enzymatique sur support solide (Nguyen et al, 2012).

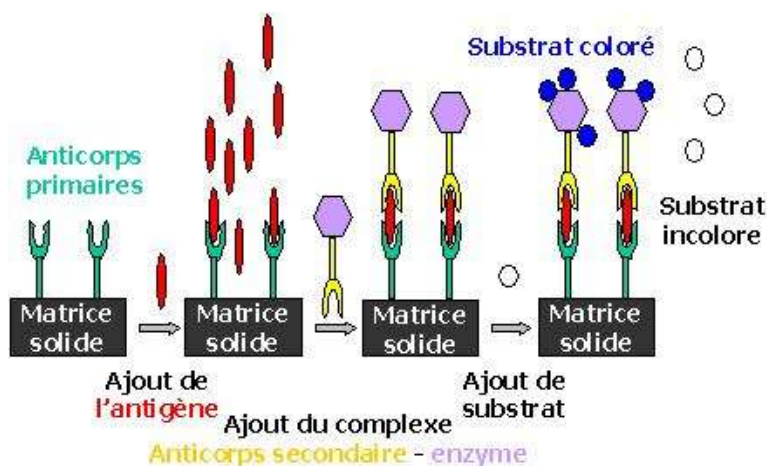


Figure 43 : Principe simplifié d'un test ELISA sur support solide.

La validation de la méthode a été effectuée chez des volontaires sains ayant reçu une dose de 200µg de Mircera, en injection sous-cutané ou en intraveineuse (Lamon et al, 2009). Les résultats ont permis de montrer que les cinétiques de détection de Mircera dans le sérum étaient différentes selon le mode d'injection. Par voie intraveineuse, un pic de détection de Mircera apparaît dès le lendemain de l'injection puis diminue rapidement dans le temps. Par voie sous-cutané, la détection de Mircera est moins importante en termes de quantité mais est détectable de manière plus prolongée.

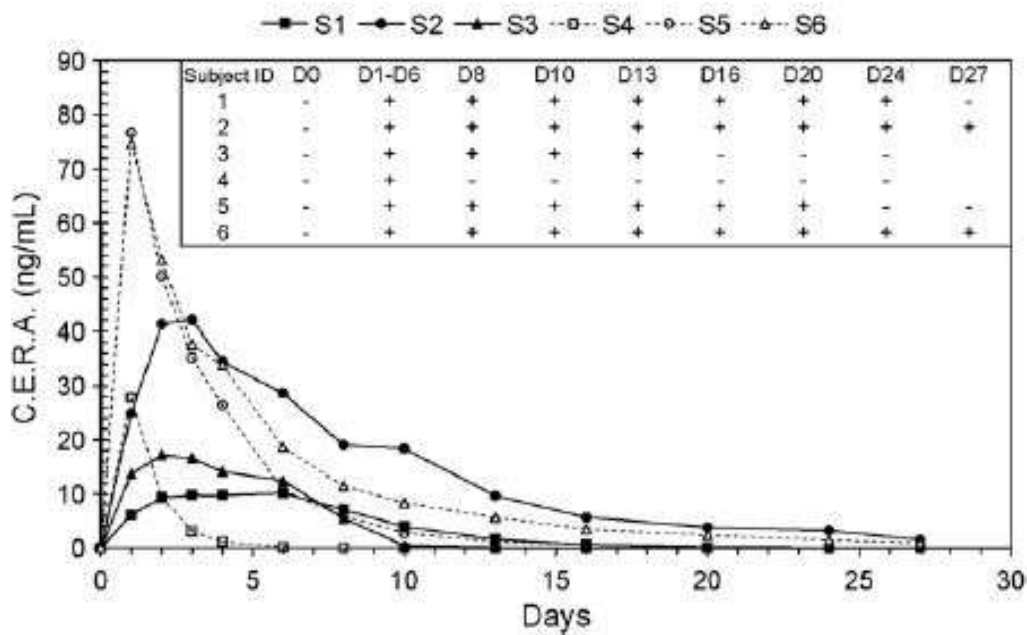


Figure 44: Evolution des concentrations sériques (ng/mL) de Mircera (CERA, ng/ml) en fonction du temps (en jours) chez 6 patients ayant reçu une injection de 200µg de Mircera par voie sous-cutanée (S₁, S₂ et S₃) ou par voie intraveineuse (S₄, S₅ et S₆), (Lamon S et al 2009).

Le résultat de cette étude a été confirmé par un IEF-Page (Lamon et al 2009; Reichel et al 2011).

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'analyser plus de 80 échantillons en même temps. La technique est simple et à la portée de nombreux laboratoires. Il s'agit également d'une méthode très sensible, avec des seuil de détection de l'ordre du picogramme.

Elle ne permet cependant pas à elle seule de confirmer la positivité de la substance et doit être associée obligatoirement à une autre méthode, l'IEF-Page.

6.11. Le passeport biologique (PBA) ou hématologique (PHA) de l'athlète

Une première version du passeport biologique de l'athlète (PBA) avait été proposée lors des Jeux Olympiques de Sydney, par le Dr Parisotto (Parisotto et al, 2001). Dans ses travaux, il avait observé que l'injection d'EPO augmentait les taux de globules rouges, d'hémoglobine et les constantes érythrocytaires ainsi que le

récepteur de la transferrine TfR2. Selon Parisoto, la comparaison de ces paramètres avant et après une épreuve athlétique permettrait de détecter les sportifs ayant consommés illicitement des ASE.

Cette méthode manquait cependant de sensibilité et ne permettait pas de détecter les patients s'administrant régulièrement des micro doses d'ASE.

La première étude de faisabilité du passeport biologique individuel ayant réellement mis en évidence l'importance des variations interindividuelles des paramètres hématologiques a été réalisée en 2003 (Malcovati et al, 2003). Le PBA consistait dans ce cas, à suivre régulièrement l'évolution des paramètres biologiques du sportif, en dehors même des compétitions sportives. Dans le cas d'une étude sur les ASE, c'est le module hématologique (PHA) qui est utilisé. Les marqueurs hématologiques sont représentés par l'hématocrite, le taux d'hémoglobine, la numération des globules rouges, des réticulocytes et leur pourcentage, le VGM, le TCMH et CCMH. L'ensemble de ces paramètres permettent d'évaluer un index de stimulation et de calculer un score de profil sanguin anormal (Agence Mondiale Antidopage ; 2012).

Cette méthode se base sur un modèle graphique probabiliste appelé réseau Bayésien afin de définir les relations entre un ensemble de causes et un ensemble d'indices. Elle prend en compte des variables discrètes (Genre, Ethnie, Sport, Age, Altitude, Dopage) et des variables continues (moyenne μ , variance σ) spécifiques de l'athlète et inscrite dans son passeport hématologique (PHA). La cause (le dopage) va induire des modifications sur les marqueurs biologiques de l'athlète (conséquences) qui seront analysés et vont être calculés dans un nouveau paramètre, le nœud observable M (Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage; 2009).

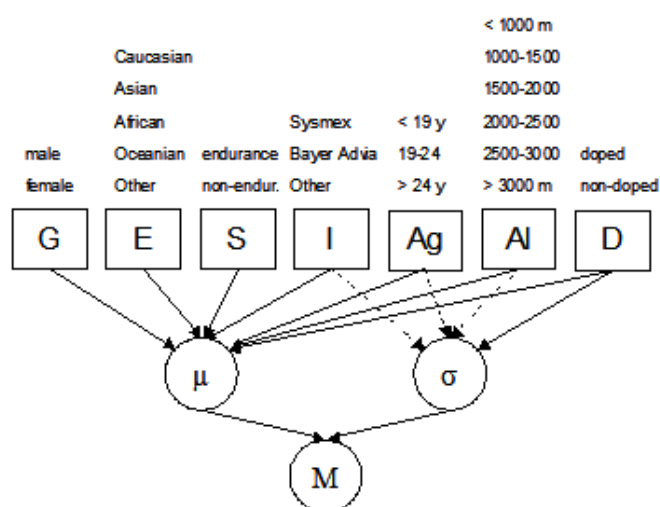


Figure 45: Représentation du passeport hématologique de l'athlète suivant le réseau Bayésien (Centre Hospitalier Université du vaudois, Lausanne, 2009).

Le but de cette procédure consiste à reconnaître l'amélioration du transfert d'oxygène par les ASE, et d'identifier l'utilisation de méthodes illicites (amélioration du transfert d'oxygène par transfusion).

Des informations très personnelles sur les sportifs sont à prendre en compte : sexe, date de naissance, discipline sportive, lieu et date de chaque prélèvement, modalités de transport des échantillons, informations sur la localisation du sportif au cours du mois précédant chaque prélèvement d'échantillons, y compris les activités en compétition et hors compétition. Il faut également fournir des informations sur les pertes et apports de sang (transfusions) au cours des 3 mois précédant chaque prélèvement et des informations sur le recours à du matériel hypoxique (simulation d'altitude).

Chronologiquement, en 2009, l'AMA (WADA) établit pour la première fois des lignes directrices concernant le PBA. En 2010, le PBA est obligatoire pour les équipes cyclistes professionnelles qui veulent participer aux compétitions internationales. En 2011, au PHA est ajouté le module endocrinien et stéroïdien. Depuis 2013, la mise en place PBA est obligatoire pour tous les sports de haut niveau partenaires de l'AMA.

Le PBA n'a pas pour vocation de se substituer aux techniques usuelles de détection des ASE mais de mettre en évidence des biomarqueurs permettant de déceler les fraudeurs. Ainsi, il complète la stratégie globale de lutte contre le dopage.

Lorsqu'un athlète voit ses normes sanguines anormalement modifiées, les techniques de détection des substances potentiellement illicites sont utilisées pour confirmer ou non la fraude (Agence Mondiale Antidopage ; 2012).

Dans la figure 46, sont montrés l'évolution de la masse en hémoglobines.

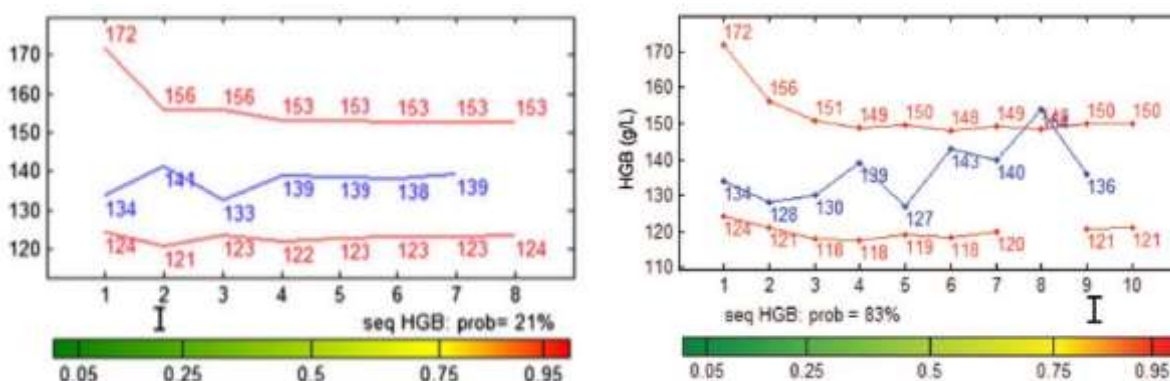


Figure 46: Evolution de la masse en hémoglobine (HGB) de deux sportifs détectés négatif (gauche) ou positif (droite) au Mircera (Sottas et al, 2011).

Cette méthode tient compte des variations intra-individuelles et s'avère être plus fiables que les méthodes précédentes.

Le PBA est donc une méthode personnalisée qui permet de suivre en permanence l'évolution des valeurs biologiques de l'athlète et qui prend en compte ses comportements et habitudes sportives et non sportives. Toutefois, le PBA demande des prélèvements sanguins réguliers et l'alternative urinaire n'est pour l'instant pas envisageable. Elle nécessite donc une collaboration étroite entre l'athlète et des agences de lutte contre le dopage, ce qui peut dans certains cas imputer sur le respect de l'intimité du sportif.

7. Place de l'Industrie Pharmaceutique dans la lutte contre le dopage

7.1. Historique de la lutte contre le dopage

Le mot dopage vient du mot « dop », il s'agissait d'un breuvage consommé par les colons Hollandais en Amérique du Nord au XVIIe siècle afin de les stimuler pour bâtir leur construction.

En France, le mot dopage apparaît pour la première fois dans le courant du XXe siècle pour remplacer le mot stimulant.

Et même si des substances stimulantes étaient consommées par les Grecs et les Chinois pendant la période antique, ce n'est qu'à partir du vingtième siècle que les évènements de dopage prennent de l'ampleur et entachent les compétitions sportives.

En effet, avec la modernisation des Jeux Olympiques en 1901, le Tour de France en 1903 et la première Coupe du Monde de Football en 1930, le sport prend une place de plus en plus importante, liée notamment au phénomène de globalisation.

Les progrès en thérapeutique, biochimie ou biologie moléculaire, la médiatisation des évènements sportifs et les enjeux (célébrité, gloire, richesse et respect) liés à ces évènements contraignent les sportifs à améliorer en permanence leurs performances et à se surpasser. C'est dans ce contexte que des instances se sont créées et se sont organisées afin de mieux lutter contre les individus utilisant des produits issus de l'industrie pharmaceutique et interdits dans le sport telle que l'EPO.

En 1928, la fédération internationale d'athlétisme (IAAF) a été la première fédération à interdire l'usage de substances stimulantes, malgré le manque de tests de détection, d'autres fédérations sportives emboîteront le pas.

Avec l'apparition des hormones synthétiques et leur utilisation croissante dans les années 50, les fédérations de football (FIFA) et de cyclisme (UCI) sont les premières à mettre en place, en 1966, des contrôles du dopage dans les championnats du monde.

La France est le premier pays, en 1963, à se doter d'une législation anti-dopage, d'autres pays suivront son exemple. Le Laboratoire national de dépistage du

dopage (LNDD) a été créé en 1966 lors de la publication du décret d'application de la loi, dite Herzog tendant à la répression de l'usage des stimulants à l'occasion des compétitions sportives.

En 1967, le Comité International Olympique (CIO) crée une commission médicale et dresse une première liste de substances interdites. Des contrôles antidopage sont réalisés au cours des Jeux Olympiques de Grenoble et de Mexico en 1968.

Dans les années 70, la plupart des fédérations internationales sportives réalisent des contrôles, notamment la détection de stéroïdes.

En 1985, la première EPO recombinante est isolée, sa première mise sur le marché arrive en 1989. En 1990, l'EPO a été ajoutée à la liste des substances interdites par le CIO.

Au cours des 80, les fédérations sportives et les gouvernements collaborent de plus en plus dans la lutte contre le dopage. Des forums s'organisent sur les définitions, les règles et les sanctions à attribuer aux tricheurs. Mais à cause de nombreuses divergences, du manque d'harmonie entre les diverses parties, les sanctions attribuées sont parfois contestées et rejetées par les tribunaux civils.

En 1998, suite à l'affaire Festina qui secoue le Tour de France de cyclisme et le monde du sport, les autorités réorganisent en profondeur, leurs points de vue dans la lutte contre le dopage.

Dans la foulée, l'Agence Mondiale Anti-dopage (AMA ou WADA) est créée en novembre 1999 après la conférence sur le sport, organisée par le CIO.

En 2000, une méthode de détection de l'EPO a été approuvée par l'AMA aux JO de Sydney. L'AMA est une agence internationale et indépendante. Son but est de promouvoir, coordonner et superviser la lutte contre le dopage dans le monde.

Son siège principal est à Montréal mais dispose de plusieurs bureaux régionaux en Europe, en Asie, en Afrique, en Amérique du sud et en Océanie.

La collaboration avec les différentes fédérations sportives s'intensifie mais également avec les compagnies d'industrie pharmaceutique, directement concernées par les produits à usage thérapeutiques utilisées à des fins de dopage.

L'Agence française de lutte contre le dopage (AFLD), autorité publique indépendante a été créée par la loi du 5 avril 2006 relative à la lutte contre le dopage et à la protection de la santé des sportifs. L'AFLD voit le jour le 1^{er} octobre 2006. Elle succède à la LNDD (Agence Mondiale Antidopage ; 2009).

7.2. AMGEN

AMGEN est un laboratoire américain, leader mondial des biotechnologies. Celui-ci est de loin en avance sur concurrents, dans la mesure où le Pr Fu Kuen Lin issu d'AMGEN est le premier à synthétiser l'EPO recombinante. Par ailleurs, ce laboratoire s'implique depuis longtemps dans les diverses compétitions sportives.

Après le scandale Festina, la lutte contre le dopage s'organise. AMGEN travaille en collaboration étroite avec le CIO aux JO de Salt Lake City en l'aidant à développer des méthodes pour la détection d'Aranesp®. Ce médicament est cité dans une affaire de dopage (Johann Mühlegg).

Depuis 2006 la société finance le « Amgen Tour of California », compétition de cyclisme. Des membres de l'entreprise Amgen viennent régulièrement faire de la prévention aux professionnels et amateurs pour le bon déroulement de la compétition. Par ailleurs, Amgen étend le partenariat le 13 septembre 2013 (La Rédaction Amgen Tour of California ; 2013).

En 2009, la société collabore avec la Fédération Suisse de Natation (F.S.N) pour l'opération Clean Water et expérimente le « Passeport Biologique de l'Athlète » sur 9 athlètes suisses en vue des J.O 2012 de Londres.

En 2010 Amgen travaille avec la fondation « Antidoping Suisse » en vue des J.O Vancouver La société a financé l'exécution des contrôles antidopage supplémentaires chez les sportifs d'endurance (La Rédaction Amgen ; 2012).

7.3. Roche

La compagnie suisse dispose de deux EPO recombinantes (Neorecormon® et Mircera®) sur le marché. En 2007, le laboratoire Roche anticipe la mise sur le marché de Mircera® en délivrant des informations confidentielles à l'AFLD et l'AMA en raison de sa très longue demi-vie et de sa très faible élimination urinaire.

7.4. GLAXO-SMITH-KLINE (GSK)

GSK est un laboratoire d'industrie pharmaceutique britannique. Le 6 juillet 2011, GSK signe un partenariat historique avec l'AMA en délivrant lors des essais de

phase clinique, des données confidentielles sur les médicaments susceptible d'être détournés de leur usage afin de trouver des méthodes appropriées avant leur mise sur le marché (La Rédaction AIPS Media ; 2011).

Dans le cadre de cette entente, les scientifiques de GSK évalueront les nouveaux médicaments et seront amenés à identifier les substances dont le potentiel dopant est élevé. Jusqu'à présent, l'AMA n'avait accès aux informations que sur les médicaments déjà homologués.

En 2012, GSK offre sa contribution aux Jeux Olympiques de Londres 2012 (J.O.2012) en partenariat avec King's College of London et le Comité d'organisation des Jeux olympiques et paralympiques d'été de Londres (L.O.C.O.G.) (La Rédaction GSK ; 2012)

En effet, un laboratoire de 4400m² est mis en place où plus de 1000 personnes se relayent 24 heures sur 24, 7 jours sur 7, et peuvent étudier jusqu'à 400 échantillons par jour émanant de 50% des athlètes participant aux J.O incluant les sportifs ayant obtenu une médaille. Lors de cette expérience, plus de 240 substances interdites ont été répertoriées.

Patrick Vallance, R&D GSK, John Fahey, President de l'AMA et Seb Coe, Responsable du Comité Olympique des J.O 2012, déclarent que le partenariat avec GSK est indispensable pour le bon déroulement des Jeux.

Par exemple, un produit encore aux phases de recherches précliniques, nommé GW501516, était prévu dans le traitement des dyslipidémies. Cependant, le produit permettait de stimuler les fibres musculaires lors des efforts d'endurance. En 2006, GSK décide de stopper les recherches car le produit s'avérait toxique pour les souris et les rats.

En décembre 2012, l'AMA lance une alerte car les sportifs *Vargas Barrantes* et *Mudarra Segura* sont contrôlés positifs lors d'une course au Costa-Rica. Ce produit était vendu sur le marché noir en Amérique du nord (Bacquaert et al, 2013).

7.5. IFPMA

L'IFPMA (International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Association) est une ONG à but non lucratif qui regroupe les secteurs de la recherche pharmaceutique et de la biotechnologie, soit 25 des principales sociétés internationales de renom et 46 associations nationales et régionales dans le monde.

Le 6 juillet 2010, l'AMA et l'IFPMA signent un accord à Lausanne afin de collaborer dans la lutte contre le mésusage de médicaments. L'objectif de cette coopération consiste à déceler les produits thérapeutiques ayant un potentiel dopant, à minimiser le risque de mésusage de médicaments en développement, à renforcer le transfert d'informations et à faciliter le développement de méthodes de détection dans le cadre de la lutte contre le dopage dans le sport.

7.6. Conférence internationale de l'industrie pharmaceutique et la lutte contre le dopage

Le 12 novembre 2012 à l'Assemblée Nationale à Paris, s'est déroulée le premier symposium international consacré à la coopération entre l'industrie pharmaceutique et les autorités publiques en charge de lutte contre le dopage.

Dans cette conférence étaient présents 262 représentant de 43 pays à travers le monde. Elle a été organisée conjointement par l'AMA, l'Unesco, le Conseil de l'Europe et le Ministère français des sports. Plusieurs invités de marque étaient présents : le président du CIO le directeur général du LEEM (Les Entreprises du Médicament), le vis-président de GSK, le PDG de O.I.B (Organisation de l'Industrie et des Biotechnologies), le responsable international de la sécurité du médicament de Roche, le directeur exécutif science de Amgen, le Responsable de IFPMA, un coordinateur de l'OMS, le président de l'agence antidopage de Grande-Bretagne (UKAD), le directeur général des affaires scientifiques et réglementaires (US BIO), le directeur du renseignement de Abbott, la directrice médicale de Affimax et le président de l'AFLD.

Cette conférence avait pour objectif d'accroître le partenariat entre l'industrie pharmaceutique et les autorités de santé en charge de lutte contre le dopage selon 3 piliers :

-Un soutien sans faille à la lutte contre les trafics (à travers la surveillance des réseaux et internet) et un soutien à toute stratégie améliorant l'efficacité des contrôles, en confortant leur caractère inopiné et ciblé.

-Une collaboration étroite avec l'industrie pharmaceutique afin d'anticiper la mise sur le marché de molécules potentiellement dopantes et la mise au point de méthode de détection correspondantes. Une telle coopération nécessite une stricte politique de confidentialité, mais aussi de la part des scientifiques industriels, une bonne connaissance des fondements physiologique et biologique qui sous-tendent la réalisation d'une performance physique donnée.

-Enfin, la lutte contre le dopage doit comprendre l'adossement structuré des laboratoires de détection au monde scientifique, afin de leur permettre d'accéder aux méthodes d'analyses les plus performantes, notamment dans le domaine du génie génétique et dans celui des techniques à haut débit. De tels liens restent aujourd'hui à inventer, en ayant à cœur de préserver la confidentialité et l'indépendance des uns et des autres dans le cadre de leur mission. (La Rédaction du Ministère des sports ; 2012).

Conclusion

En conclusion, nous pouvons dire que d'important progrès thérapeutiques ont été réalisés pour la prise en charge des patients souffrant d'une anémie liée à une IRC. Le but de l'utilisation de Mircera est d'améliorer la survie, la qualité de vie des malades et de réduire les complications cardio-vasculaires.

L'utilisation non médicale de Mircera est hautement dangereuse et totalement interdite. Elle a pourtant été utilisée frauduleusement lors de compétitions sportives au moment de sa mise sur le marché. Ceci peut nuire à l'image du médicament, à la compagnie l'ayant mise sur le marché, mais surtout à la santé du sportif l'ayant consommé.

Il est donc impératif aujourd'hui pour les compagnies d'industrie pharmaceutique de s'impliquer dans la lutte contre le détournement d'usage de ces médicaments avec les organisations locales, nationales et internationales de lutte contre le dopage.

Avec l'arrivée du passeport biologique de l'athlète, des contrôles de plus en plus nombreux et des techniques de détections de plus en plus fiables comme le Sar-Page permettent aujourd'hui de déceler Mircera et les autres ASE.

Ces contrôles de plus en plus excessifs peuvent cependant nuire aux sportifs car cela empiète sur l'intimité et les libertés individuelles. Le sportif doit justifier systématiquement aux agences de lutte contre le dopage sur l'endroit où ils se trouvent et répondre aux exigences imposées par le contrôle anti-dopage.

BIBLIOGRAPHIE

ACMTS, L'Activateur continu de récepteur de l'érythropoïétine (Mircera ®) dans l'anémie rénale ; Février 2008 ; Numéro 113;
URL: www.cadth.ca/media/pdf/E0025_Mircera_for_Renal_Anemia_cetap_f.pdf

Agarwal N, Prchal JT. Erythropoietic agents and the elderly. *Semin Hematol.* 2008 Oct;45(4):267-75.

Agence de la Biomédecine, La maladie rénale chronique ; Société de néphrologie, 2007 ;
URL : www.soc-nephrologie.org/PDF/epart/rein/ABM-MRC.pdf

Agence Européenne du Médicament, Mircera®, methoxy-polyethylene glycol beta, Résumé EPAR à l'intention du Public, EMA/227862/2012, EMA/H/C/000739, décembre 2007 ;
www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000739/WC500033672.pdf

Agence Européenne du Médicament; Aranesp® darbépoétine alfa, Résumé EPAR à l'intention du public ; EMA/437598/2013, EMEA/H/C/000332; 2013 URL :
www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000332/WC500026141.pdf

Agence Européenne du Médicament; Dynepo® Epoïétine δ , Résumé EPAR à l'intention du public ; EMEA/H/C/372 ; 2007 ; URL :
www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000372/WC500054472.pdf

Agence Mondial Antidopage ; Code mondial antidopage, lignes directrices opérationnelles pour le passeport biologique de l'athlète. Liste des exigences, Avril 2012 ; URL : www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Athlete_Biological_Passport/WADA-ABP-Operating-Guidelines-v3.1-FR.pdf

Agence Mondiale Antidopage ; Bref historique de l'antidopage ; World AntiDoping Agency ; 2009 ; URL : www.wada-ama.org/fr/A-propos-de-IAMA/Historique/

Audran M, Méthodes indirectes de détection dans la lutte contre le dopage ; 8^e colloque National Fondation Santé-Sport, France Olympique; Paris Mars 2008 :
URL : <http://franceolympique.com/files/File/actions/sante/documentation/2008/8ecolloque/3.pdf>

Ayotte C, Pascual JA, Gmeiner G, Reichel C, Lasne F, Saugy M ; Document technique de l'Agence Mondiale Antidopage, TD2009EPO-FR ; Harmonisation de la méthode d'identification des érythropoïétines recombinantes (c'est-à-dire des EPOETINES) et de leurs analogues (par exemple la Darbepoetine et la Methoxy-polyéthylèneglycol-epoétine beta) ; World Anti Doping Agency ; 2009 ; URL : www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2009EPO_Harmonization_of_Method_Identification_Recombinant_Erythropoietins_Analogues_FR.pdf

Bacquaert P, Le GW501516, un produit dopant hautement toxique ; Institut de Recherche du Bien-être de la Médecine et du Sport-santé IRBMS; Juin 2013 ; URL: www.irbms.com/gw501516-un-produit-dopant-hautement-toxique

Barani A, Les méthodes d'électrophorèse : L'essentiel, Faculté de Médecine, Université J.Monnet, St-Etienne, 2007 ; URL : <http://chaveffi.free.fr/Cours/FasciculePCEM1electrophorese.pdf>

Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* 2000 Jul;80(3):1215-65. Review

Beullens M, Delanghe JR, Bollen M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood.* 2006;107: 4711-4713

Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, Hallen J, Haug E, Bahr R. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Jul;32(7):1238-43.

Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood.* 2007 Feb 1; 109(3):868-73

Burggraaf J, Cohen AF. Erythropoietin doping in cycling: lack of evidence for efficacy and a negative risk-benefit. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Jun;75(6):1406-21

C.Lacombe, P.Mayeux, L'Erythropoïétine, M/S Synthèse, médecine/sciences 1995; II: 947-55

Casadevall N, Eckardt KU, Rossert J. Epoetin-induced autoimmune pure red cell aplasia. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Mar;16 Suppl 1:S67-9

Casadevall N, L'Erythropoïétine, Données fondamentale et application clinique ; Formation Universitaire, INTS, 2012 ; URL : http://www.ints.fr/pdf/Formation_Universitaire/M18/Casadevall_0.pdf

Casadevall N, Rossert J, Nouveaux agents stimulant l'érythropoïèse, *Hématologie. Volume 12, 44-8, Août 2006, Revue.*

Chang Y, Maylin GM, Matsumoto G, Neades SM, Catlin DH. Screen and confirmation of PEG-epoetin β in equine plasma. *Drug Test Anal.* 2011 Jan;3(1):68-73.

Dame C, Hubert Fahnenstich, Patricia Freitag, Dietmar Hofmann, Thair Abdul-Nour, Peter Bartmann and Joachim Fandrey, Erythropoietin mRNA Expression in Human Fetal and Neonatal Tissue, *Blood Journal*, 1998 92: 3218-3225

De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Riccioni R, Felli N, Samoggia P, Peschle C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood.* 1999 Feb 1;93(3):796-803

Deicher R, Hörl WH. Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: a guide to selection for anaemia of chronic kidney disease. *Drugs.* 2004;64(5):499-509. Review

Delanghe JR, Bollen M, Beullens M. Testing for recombinant erythropoietin. *Am J Hematol.* 2008 Mar;83(3):237-41.

Dickerson RE, Irving G; Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology; Benjamin/Cummings Pub. Co., 1983 - 176 pages

Document technique de l'Agence Mondiale Antidopage; TD2013EPO; Harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin, pegserpoetin, peginesatide, epo-fc) by electrophoretic techniques; World Anti Doping Agency; 2013; URL: www.wada-ama.org/documents/world_anti-doping_program/wadp-is-laboratories/technical_documents/wada-td2013epo-harmonization-analysis-of-recombinant-erythropoietins-en.pdf

Document vidéo sur les informations concernant les contrôles antidopage; World Anti-Doping Agency ; URL: http://216.46.1.34/wada/dc_part1_fr.wmv et http://216.46.1.34/wada/dc_part2_fr.wmv

Dr Viron B, Kolta A, Kiladjian J J, Mignon F, Mayeux P, et Casadevall N ; Anticorps anti-érythropoïétine humaine recombinante: une cause exceptionnelle de résistance à l'érythropoïétine, Service de Néphrologie, Hôpital BICHAT, Paris, 2002 ; Néphrologie Vol. 23 n° 1 2002, pp. 19-22 ; http://www.soc-nephrologie.org/PDF/esociete/journal/2002/1/A4_resistance.pdf

Duthilleul P, Prado-Dupont A, Thuillier P, et Tagzirt M, Cours d'hématologie Faculté de Pharmacie Université Lille 2 ; 2013 URL :<http://hematobiopharm.univ-lille2.fr/>

Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. J Appl Physiol (1985). 1989 Apr;66(4):1785-8

Egly F, Tour de France: Riccardo Ricco contrôlé positif, le Figaro, Juillet 2008 ; URL : www.lefigaro.fr/sport/2008/07/17/02001-20080717ARTFIG00358-riccardo-ricco-controle-positif-.php

Ekblom B, Berglund B. Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. Scand J Med Sci Sports 1991;1:88-93

Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. Exp Hematol. 2008 Dec;36(12):1573-84

Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):529-41.

ergouwen PC, Collee T, Marx JJ. Haematocrit in elite athletes. Int J Sports Med 1999; 20 :538-541

Fiche Produit MIRCERA®, methoxy-polyethylene glycol beta PI 120507, F.Hoffmann-La Roche Ltd, 2007 ; URL : www.roche.fr/content/dam/corporate/roche_fr/doc/Mircera10139865MAJ07-08-12.pdf

Fishbane S, Besarab A. Mechanism of increased mortality risk with erythropoietin treatment to higher hemoglobin targets. Clin J Am Soc Nephrol. 2007 Nov;2(6):1274-82. Epub 2007 Oct 17

Fliser D, Dellanna F, Koch M, Seufert J, Witzke O, Hauser IA. The Primavera study protocol design: evaluating the effect of continuous erythropoiesis receptor activator (C.E.R.A.) on renal function in non-anemic patients with chronic kidney disease. Contemp Clin Trials. 2011 Nov;32(6):786-92

Forejtnikova, Maud Vieillevoye, Yael Zermati, Mireille Lambert, Rosa Maria Pellegrino, Soizic Guihard, Muriel Gaudry, Clara Camaschella, Catherine Lacombe, Antonella Roetto, Patrick Mayeux and Frédérique Verdier, Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis, Blood December 9, 2010 vol. 116 no. 24 5357-5367

Girard M, Puerta A, Diez-Masa JC, de Frutos M. High resolution separation methods for the determination of intact human erythropoiesis stimulating agents. A review. Anal Chim Acta. 2012 Feb 3;713:7-22

H.Franklin Bunn et al, Erythropoietin, Cold Spring Harb Perspect Med 2013; 3:a011619

Haselbeck A, Bailon P, Pahlke W, et al The discovery and characterization of CERA, an innovative agent for the treatment of anemia. Blood 2002 ; 100 : 227A ; (Abstract 857).

Haute Autorité de Santé ; Dynepo® Epoïétine δ ; Avis de la Commission de Transparence H.A.S. CT-4163, 2007, URL : www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-4163_dynepo.pdf

Haute Autorité de Santé ; MIRCERA®, methoxy-polyethylene glycol beta ; Avis de la Commission de Transparence H.A.S. CT-5111, 19 décembre 2007 ; www.has-sante.fr/portail/jcms/c_642502/mircera

Heinicke K, Baum O, Ogunshola OO, Vogel J, Stallmach T, Wolfer DP, Keller S, Weber K, Wagner PD, Gassmann M, Djonov V. Excessive erythrocytosis in adult mice overexpressing erythropoietin leads to hepatic, renal, neuronal, and muscular degeneration. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006 Oct;291(4):R947-56.

Heuberger JA, Cohen Tervaert JM, Schepers FM, Vliegenthart AD, Rotmans JI, Daniels JM, J. de Graeve, F. Berthou, M. Prost. *Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse*. Editions Masson, Paris, 1986

Jacobson LO, Goldwasser e, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. Nature. 1957 Mar 23;179(4560):633-4

Jan Carlsson, Mats Garle, Maria Lönnberg; MAIA method for EPO detection; WADA/JADA Symposium on Blood Manipulations and Doping in Sport 7-8 November 2009 – Tokyo – Japan; URL: www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Scientific%20Events/Tokyo_Symposium_2009/WADA_Tokyo_Symposium_Dr.Carlsson-Dr.L%C3%B6nnberg-Dr.Garle.pdf

Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. J Physiol. 2011 Mar 15;589(Pt 6):1251-8.

Joyner MJ. VO2MAX, blood doping, and erythropoietin. Br J Sports Med. 2003 Jun;37(3):190-1

Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, Epstein JA, Moores SL, Erickson-Miller CL, Haase VH. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. Blood. 2010 Oct 21;116(16):3039-48

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol Pharmacol. 2006 Nov;70(5):1469-80. Epub 2006 Aug 3. Review

Kim WS, Zhu Y, Deng Q, Chin CJ, He CB, Grieco AJ, Dravid GG, Parekh C, Hollis RP, Lane TF, Bouhassira EE, Kohn DB, Crooks GM, Stem Cells. 2014.

La rédaction AIPS Media; WADA signs historic agreement with pharma giant GSK, Agence Internationale de la Presse Sportive AIPS, July 6, 2011, Montreal; URL: www.aipsmedia.com/index.php/index.php?page=news&cod=6093&tp=n

La rédaction Amgen Tour of California ; 2013 Comprehensive Anti-Doping Protocols ; AMGEN ; 2013 ; URL : www.amgentourofcalifornia.com/Tour/about/anti-doping-protocols.html

La rédaction Amgen ; Des innovations et des services au quotidien, Amgen Néphrologie ; Oct 2008 ; URL : www.amgen.fr/pdfs/Brochure_Amgen_nephrologie.pdf

La rédaction AMGEN ; Soutenir la lutte contre le dopage ; AMGEN ; Mars 2012 ; URL : www.amgen.ch/pdfs/Factsheet_Lutte_contre_le_dopage_Mars2012.pdf

La rédaction de La Gazzetta, Sella come Riccò: Cera L'Uci: "Controllo mirato", La Gazzetta dello sport, Aout 2008 ; URL: www.gazzetta.it/Ciclismo/Primo_Piano/2008/08/05/sella_0508.shtml

La rédaction de RTL ; JO 2008 - Dopage : Rashid Ramzi, Stefan Schumacher et Davide Rebellin contrôlés positifs, RTL Sport, Avril 2009 ; URL : www.rtl.fr/actualites/article/jo-2008-dopage-rashid-ramzi-stefan-schumacher-et-davide-rebellin-controles-positifs-4652281

La rédaction du Ministère des Sports ; Conférence internationale sur l'industrie pharmaceutique et la lutte contre le dopage ; nouveaux partenariats pour un sport propre ; Le Ministère des Sports ; 12 novembre 2012, Paris, URL : <http://www.sports.gouv.fr/presse/article/Ouverture-de-la-Conference>

La rédaction GSK; GlaxoSmithKline celebrates its role in supporting the biggest anti-doping operation in the history of the Olympic Games, July 16, Glaxo Smith Kline Pharma GSK; 2012, London, UK; URL: www.gsk.com/media/press-releases/2012/glaxosmithkline-celebrates-its-role-in-supporting-the-biggest-anti-doping-operation-in-the-history-of-the-olympic-games.html

Laboratoire Suisse d'analyse du dopage Bayesian network for the evaluation of blood doping; Centre Hospitalier Université du Vaudois CHUV Lausanne, 2009; URL: www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-passeport/lad-prestations-laboratoire-passeport-bn-sang.htm

Laboratoire Suisse d'analyse du dopage, Projet CERA ; Centre hospitalier Université Vaudois CHUV. Décembre 2009

Lamon S, Giraud S, Egli L, Smolander J, Jarsch M, Stubenrauch KG, Hellwig A, Saugy M, Robinson N. A high-throughput test to detect C.E.R.A. doping in blood. J Pharm Biomed Anal. 2009 Dec 5;50(5):954-8.

Le Creff, C.; Lecron, J.C.; Legros, P.; Denjean, A, Endogen erythropoietin production and exercise-induced arterial hypoxemia in trained cyclists; Science and Sports, Volume 17, Number 6, November 2002 , pp. 286-290(5)

Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Nov;82(22):7580-4.

Locatelli F, Del Vecchio L. Erythropoiesis-stimulating agents in renal medicine. Oncologist. 2011;16 Suppl 3:19-24

Lönnberg M, Andrén M, Birgegård G, Drevin M, Garle M, Carlsson J. Rapid detection of erythropoiesis-stimulating agents in urine and serum. Anal Biochem. 2012 Jan 15;420(2):101-14

Lönnberg M; The MAIIA technology for rapid determination of protein isoforms; MAIIA Diagnostics; URL:www.maiadiagnostics.com/research/maiaa_technology.pdf

Lundby C, Hellsten Y, Jensen MB, Munch AS, Pilegaard H. Erythropoietin receptor in human skeletal muscle and the effects of acute and long-term injections with recombinant human erythropoietin on the skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 2008 Apr;104(4):1154-60

Lundby C, Robach P, Boushel R, Thomsen JJ, Rasmussen P, Koskolou M, Calbet JA. Does recombinant human Epo increase exercise capacity by means other than augmenting oxygen transport? J Appl Physiol (1985).2008 Aug;105(2):581-7. doi: 10.1152/jappphysiol.90484.2008. Epub 2008 Jun 5

Macdougall IC, Ashenden M. Current and upcoming erythropoiesis-stimulating agents, iron products, and other novel anemia medications. Adv Chronic Kidney Dis. 2009 Mar;16(2):117-30

Macdougall IC, Eckardt KU. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential new treatments for anaemia. Lancet. 2006 Sep 9;368(9539):947-53.

Macdougall IC. Novel erythropoiesis stimulating protein. Semin Nephrol. 2000 Jul;20(4):375-81.Review.

Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Johnson MH, Ratcliffe PJ. The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression. Kidney Int. 1997 Sep;52(3):715-24

McKoy JM, Stonecash RE, Cournoyer D, Rossert J, Nissenson AR, Raisch DW, Casadevall N, Bennett CL. Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations. Transfusion. 2008 Aug;48(8):1754-62.

Molineux G, Structural basis for the signal transduction of Erythropoietin, Erythropoietin and Erythropoiesis, Milestones in Drug therapy, 2003 p27-28

Monographie MIRCERA®, methoxy-polyethylene glycol beta, E-Vidal, 2007

Nathan DG, Schupak E, Stohlman F Jr, Merrill JP. Erythropoiesis in anephric man. J Clin Invest. 1964 Nov;43:2158-65

NguyenLD ; Définition de la méthode immuno-enzymatique ELISA ; WIKIPEDIA, Mai 2012 ; URL : http://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9thode_immuno-enzymatique_ELISA

Noakes TD. Tainted glory. Doping and athletic performance. N Engl J Med 2004; 151 :847–849

Noguchi CT, Wang L, Rogers HM, Teng R, Jia Y. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med*. 2008 Dec 1;10:e36.

Panchapakesan U, Sumual S, Pollock C. Nanomedicines in the treatment of anemia in renal disease: focus on CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator). *Int J Nanomedicine*. 2007;2(1):33-8. Review.

PARISOTTO R, WU M, ASHENDEN MJ, EMSLIE KR, GORE CJ, HOWE C, KAZLAUSKAS R, SHARPE K, TROUT GJ, XIE M. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica*. 2001; 86(2):128-37

Perroy A.C, Maître de conférence, Cours de droit pharmaceutique : Le prix et le remboursement, Faculté de Pharmacie, Université Lille 2; 2010

Pharmaceutiques, Retrait d'AMM pour Dynepo® Archives Biopharma, Pharmaceutiques, l'information de référence du secteur pharmaceutique, Mai 2009 ;
URL :www.pharmaceutiques.com/biopharma/archive/bp_1898.html

Platini M, Communiqué AFP : L'Euro-2008 placé sous le signe du respect et de la lutte contre le dopage ; RFI ; Mars 2008 ; URL :
www.rfi.fr/sportfr/afp/001/spo/080312145544.sz9r061o.asp

Pol D, Cours d'immunologie: Test ELISA : détection de la bêta-lactoglobuline bovine ; SNV Jussieu ; B-Média 1999-2004 ; URL :<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/immu6el1.htm>

Portolés J, Krisper P, Choukroun G, de Francisco AL. Exploring dosing frequency and administration routes in the treatment of anaemia in CKD patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Sep;20 Suppl 8:viii13-17.

Pr Luc G, Cours de Physiologie rénale, Faculté de Pharmacie, Université Lille 2, 2008

Rabin O. Involvement of the health industry in the fight against doping in sport. *Forensic Sci Int*. 2011 Dec 10;213(1-3):10-4

Rastmanesh R. Possibility of enhanced risk of retinal angiogenesis in athletes with pre-existing retinal situation abusing erythropoietin doping: a hypothesis. *Curr Drug Saf*. 2012 Apr;7(2):164-9.

Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):862-5

Reichel C, Abzieher F, Geisendorfer T. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal*. 2009 Nov;1(11-12):494-504

Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and analogs. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(195):251-94

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*. 2013 Nov;5(11-12):877-89.

Reichel C. Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Aug;401(2):463-81

Reichel C. SARCOSYL-PAGE: a new electrophoretic method for the separation and immunological detection of PEGylated proteins. *Methods Mol Biol*. 2012;869:65-79

Reigner B, Jordan P, Pannier A, et al 2003. Phase 1 studies of the new erythropoietic agent, CERA (continuous erythropoiesis receptor cativator):demonstration of a dose-dependent response [abstract] *Nephrol Dial Transplant* 18Suppl 4167(Abstract M527)

Roche, Plus d'un siècle d'innovation au service de la santé..., Historique ; F. Hoffmann-La Roche Ltd, 2012 ; URL :www.roche.be/portal/roche_be_fr_V2/history

ROCHE, Product File Australia, by Hoffman-La Roche URL : <http://www.roche-australia.com/fmfiles/re7229005/downloads/anaemia/mircera-pi.pdf>

Ruas JL, Poellinger L, and Pereira T (2002) Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem* 277: 38723-38730.

Sanglier S; Cours de spectrométrie de masse, Université Louis Pasteur, Strasbourg ; 2005 ; URL : www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/3eme-annee/gap/MmeSanglier05-10-05/Intro_SS.pdf

Sasaki, R. (2003) Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern Med* 42, 142-149; 2003

Saurabh Somvanshi, Nahid Zia Khan, Mufazzal Ahmad, Anemia in chronic kidney disease patients; *Clinical Queries: Nephrology*, Volume 1, Issue 3, July–September 2012, Pages 198-204

Segura J, Pascual JA, Gutiérrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Aug;388(7):1521-9

Semenza GL, Traystman MD, Gearhart JD, Antonarakis SE. Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2301-5

Sheena Surindran MD, New York, NY, Internal Medicine, ERYTHROPOIETIN, 2011; URL: http://medicine.med.nyu.edu/nephrology/files/med_nephrology/attachments/Erythropoetin-1.pdf

Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*. 2001 Dec15;98(13):3626-34.

Sottas PE, Robinson N, Giraud S, Taroni F, Kamber M, Mangin P, Saugy P, "Statistical Classification of Abnormal Blood Profiles in Athletes", *The international journal of biostatistics*, 2006; Vol.2:Iss.1, Article 1

Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell*/ 19 90 ; 63 : 11 37)

Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B, Lee J. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol*. 1998 Jan;100(1):79-89

Summers S, Holdsworth S, Sharples E. The (re)challenging question of erythropoiesis-stimulating agents inducing pure red cell aplasia. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Oct;23(10):3053-5

- Truong HB, Ip EJ, A review of Erythropoietin abuse: An analysis of Effectiveness and safety in exercise; *J Sports Med Doping Stud* 2012, Vol.2: Issue 2
- Udran M, Gareau R, Matecki S, Durand F, Chenard C, Sicart MT, et al Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31 639–645)
- Valeurs biologiques chez l'Homme, selon les normes à connaître pour le Concours d'Internat de Pharmacie. URL: www.cnci.univ-paris5.fr/pharmacie/Constantes_biologiques_adultes_2009.pdf
- Vaziri ND, Zhou XJ, Smith J, Oveisi F, Baldwin K, Purdy RE. In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 2):F838-45.
- Vaziri ND. Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. *Am J Kidney Dis.* 1999 May; 33(5):821-8. Review
- Wade JP. Transport of oxygen to the brain in patients with elevated haematocrit values before and after venesection. *Brain.* 1983 Jun;106 (Pt 2):513-23.
- Wagner KF, Katschinski DM, Hasegawa J, Schumacher D, Meller B, Gembruch U, et al Chronic inborn erythrocytosis leads to cardiac dysfunction and premature death in mice overexpressing erythropoietin. *Blood* 2001;97 :536–542.
- Watowich SS. The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J Investig Med.* 2011 Oct;59(7):1067-72.
- Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX, Rafie CA, Boutin AT, Stockmann C, Takeda N, Scadeng M, Shih AY, Haase VH, Simon MC, Kleinfeld D, Johnson RS. The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest.* 2009 Nov;119(11):3373-83. doi: 10.1172/JCI39378. Epub 2009 Oct
- Xuereb F, Schmitter JM, Chaignepain S, Godde F, Canelo N, Saux MC, Breilh D; Mise au point d'une méthode quantitative de dosage de l'époétine bêta par spectrométrie de masse ; *J Pharm Clin* 2008 ; 27 (3) : 181-8
- Yu NH, Ho EN, Wan TS, Wong AS. Doping control analysis of recombinant human erythropoietin, darbepoetin alfa and methoxy polyethylene glycol-epoetin beta in equine plasma by nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Apr;396(7):2513-21
- Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest.* 1981 Apr;67(4):1183-8
- Zermati Y, Fakhouri F, Delarue R, Ribeil J.A, Knebelmann B, Hermine O, Régulation de l'érythropoïèse: Application physiopathologique en Néphrologie, Flammarion Médecine-Sciences-Actualités néphrologiques, 2003
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 2001 Jan 15;193(2):247-54

Annexes

ANNEXE 1 : Etudes réalisées lors des essais cliniques de Mircera®

Etude	AMICUS	ARCTOS
Objectif principal	Démontrer l'efficacité de MIRCERA en IV pour corriger l'anémie chez des patients avec IRC dialysés et non traités par un ASE.	Démontrer l'efficacité de MIRCERA en SC pour corriger l'anémie chez des patients avec IRC non dialysés et non traités par un ASE avant l'étude.
Méthode	Etude non comparative, randomisée, ouverte avec bras époétine alpha ou bêta (validité interne de l'étude).	Etude comparative versus darbépoétine alpha randomisée, ouverte.
Schéma de l'étude	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Phase de correction</u> : 24 semaines avec pour objectif un taux d'hémoglobine (Hb) $\geq 11\text{g/dL}$ avec une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial - <u>Evaluation</u> : après 24 semaines - <u>Phase d'entretien</u> : 28 semaines Randomisation des patients sous MPG-époétine bêta en 2 groupes de posologie pour ceux ayant atteint l'objectif de traitement	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Phase de correction</u> : 28 semaines avec pour objectif un taux d'Hb $\geq 11\text{g/dL}$ et une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial - <u>Phase d'évaluation</u> : 10 dernières semaines de la phase de correction. - <u>Phase d'entretien</u> : 24 semaines Randomisation des patients sous MPG-époétine bêta en 2 groupes de posologie pour ceux ayant atteint l'objectif de traitement
Critères d'inclusion	Patients adultes avec IRC de stade 5, dialysés et ne recevant pas de traitement stimulant l'érythropoïèse avant l'étude. Statut martial : ferritine sérique $\geq 100\text{ ng/mL}$ ou saturation de la transferrine $\geq 20\%$ (ou globules rouges hypochromes $< 10\%$). Taux d'Hb en pré-dialyse : 8-11 g/dL Hémodialyse ou dialyse péritonéales pendant au moins 2 semaines avant la sélection.	Patients adultes avec IRC de stade 3/4, non dialysés et ne recevant pas de traitement stimulant l'érythropoïèse avant l'étude. Statut martial : ferritine sérique $\geq 100\text{ ng/mL}$ ou saturation de la transferrine $\geq 20\%$ (ou globules rouges hypochromes $< 10\%$). Taux d'Hb : 8-11 g/dL
Traitements	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MPG-époétine bêta* : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Correction</u> : dose initiale de 0,4 $\mu\text{g/kg}$ 1x/2 semaines Concentration en Hb cible : $\geq 11\text{g/dL}$ avec une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial. Ajustement des doses toutes les 4 semaines si réponse au traitement inadéquate. - <u>Entretien</u> : pour les patients ayant atteint l'objectif du traitement, randomisation en 2 groupes : 1x/2 semaines et 1x/4 semaines. Ajustement des doses pour maintenir la concentration en Hb entre 11,0 et 13,0 g/dL ▪ Époétine alpha ou bêta : 3x/semaine selon la posologie de l'AMM, en IV, sur toute la durée de l'étude. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MPG-époétine bêta : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Correction</u> : dose initiale de 0,6 $\mu\text{g/kg}$ 1x/2 semaines Concentration en Hb cible : $\geq 11\text{g/dL}$ avec une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial. Ajustement des doses toutes les 4 semaines si réponse au traitement inadéquate. - <u>Entretien</u> : pour les patients ayant atteint l'objectif du traitement, randomisation en 2 groupes : 1x/2 semaines et 1x/4 semaines. Ajustement des doses pour maintenir la concentration en Hb entre 11,0 et 13,0 g/dL ▪ Darbépoétine alpha : 1x/semaine selon la posologie de l'AMM, en SC, pendant les phases de correction et d'évaluation puis 1x/2 semaines pendant la phase d'entretien.
Critères de jugement principaux	% de répondeurs au cours de la phase de correction (24 semaines) avec taux d'Hb $\geq 11\text{g/dL}$ et une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial (mesure hebdomadaire du taux d'Hb), sans transfusion de globules rouges avant la réponse, pendant les 24 semaines après la première dose.	<ul style="list-style-type: none"> - % de répondeurs au cours de la phase de correction (28 semaines) avec taux d'Hb $\geq 11\text{g/dL}$ et une augmentation $\geq 1\text{g/dL}$ par rapport à l'état initial. - Variation du taux moyen d'Hb entre la phase d'évaluation et l'état initial.

* : méthoxy polyéthylène glycol-époétine bêta

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

HARMONIZATION OF ANALYSIS AND REPORTING OF RECOMBINANT ERYTHROPOIETINS (I.e. EPOETINS) AND ANALOGUES (E.g. DARBEPOIETIN, PEGSERTPOIETIN, PEGINESATIDE, EPO-Fc) BY ELECTROPHORETIC TECHNIQUES.

1.0 Introduction

This document has been established to harmonize the detection and reporting of recombinant erythropoietins (I.e. epoetins) and their analogues (e.g. darbepoetin, pegsertpoetin, peginesatide, EPO-Fc) by Laboratories when analyzed by electrophoretic techniques.

All Laboratories are required to apply these criteria in the routine performance of the tests to identify the referred substances.

In this document, the following abbreviations, acronyms and trademarks are used:

CERA: (Mircera®, Roche): Continuous Erythropoietin Receptor Activator, the erythropoietin analogue known by its INN as pegsertpoetin, a pegylated derivative of epoetin-β.

EPO: Erythropoietin
EPO-Fc: Fusion protein of EPO with human immunoglobulin heavy chain Fc (fragment, crystallizable) region.

βEPO: endogenous erythropoietin (secreted naturally by the athlete's own tissues) as found in blood (either serum or plasma).

rEPO: recombinant erythropoietin. These pharmaceutical substances are known by their International Non-proprietary Name (INN) as "epoetin". The different preparations are identified by a Greek letter, e.g. epoetin-α, -β, -γ, -δ, etc. Other preparations (e.g. generics or copies) referred collectively as "rEPO biosimilars" may have differing isoform profiles not exactly matching those already referenced.

uEPO: endogenous erythropoietin (secreted naturally by the athlete's own tissues) as excreted in urine.

Hematide: (Omorlys®, Afymax Inc.): Known by its INN as pegnesatide, a pegylated homodimeric peptide with no structural relationship to EPO.

IEF: Isoelectric focusing.

NESP (Aranesp®, Amgen): Novel erythropoietin stimulating protein, the erythropoietin analogue known by its INN as darbepoetin-α.

SAR-PAGE: sodium N-lauroylsarcosinate ("sarcosyl") polyacrylamide gel electrophoresis.

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

2.0 Analysis

The Laboratory shall use methods that are validated and fit for the purpose of detecting the administration of rEPO and analogues in urine or in plasma/serum. A summary of the analytical strategy is given in **Table 1**.

2.1 Initial Testing Procedure

- For the **Initial Testing Procedure**, the Laboratory shall apply either IEF [1] or SAR-PAGE [8, 9] after enrichment for EPO and/or its analogues (either through non-specific methods or after immunopurification¹ [2-7]).
- Following proper validation in the matrix of analysis, the Laboratory may also apply, when available, substance-specific detection methods (e.g. immunoassays or other affinity-binding assays or mass spectrometry (MS)-based methods) for the detection of EPO analogues (e.g. CERA, Hematide, EPO-Fc) [10-12].

2.2 Confirmation Procedure

- The **Confirmation Procedure** will depend on the rEPO or analogue presumptively found and the methodology employed for the **Initial Testing Procedure**.
- Immunopurification of all **Sample Aliquots** shall be performed prior to Sample confirmation analyses by electrophoretic methods [2-7].

2.2.1 rEPOs

- When the **Initial Testing Procedure** is performed by IEF [1] following immunopurification, the confirmation of rEPOs in urine shall be performed by SDS-PAGE [13, 14] or SAR-PAGE [8, 9] analysis on a new, immunopurified **Aliquot of Sample "A"**. There is no need to repeat the IEF to consider the **Confirmation Procedure** as completed.
- When the **Initial Testing Procedure** is performed by IEF without immunopurification, the confirmation of rEPOs in urine shall be performed by IEF **plus** SDS-PAGE or IEF **plus** SAR-PAGE on new, immunopurified **Aliquots of Sample "A"**. If available, a retentate remaining from the **Initial Testing Procedure** may be further immunopurified and used for the application of IEF analysis as part of the **Confirmation Procedure**.
- When the **Initial Testing Procedure** is performed by SAR-PAGE, the confirmation of rEPOs in urine shall be performed by IEF **plus** SDS-PAGE or IEF **plus** SAR-PAGE on new, immunopurified **Aliquots of Sample "A"**.

¹ For immunopurification, antibodies other than the one used for blocking shall be used.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

- Irrespective of the Initial Testing Procedure used, the confirmation of rEPOs in serum/plasma shall be performed by SDS-PAGE or SAR-PAGE on new, immunopurified Aliquots of Sample "A".

2.2.2 NESP

- Irrespective of the Initial Testing Procedure used, for the confirmation of NESP in urine or serum/plasma, the Laboratory may choose to apply IEF or SDS-PAGE or SAR-PAGE on new, immunopurified Aliquots of Sample "A". At its discretion, the Laboratory may also use a combination of IEF and either SDS-PAGE or SAR-PAGE.

2.2.3 CERA

- Irrespective of the Initial Testing Procedure used, for the confirmation of CERA in urine or serum/plasma, the Laboratory may choose to apply IEF or SAR-PAGE or, at the Laboratory's discretion, a combination of these methods on a new, immunopurified Aliquots of Sample "A".

2.2.4 Alternative Procedures

- EPO analogues, which are initially tested by substance-specific methods (e.g. ELISA for Hematide), shall be confirmed by a second, independent method (e.g. SDS-PAGE or SAR-PAGE).
- Where an MS method is available, it can be used for both the Initial Testing and the Confirmation Procedures, i.e. no independent second method is required (however, a second method may be used in place of the MS for either the Initial Testing or the Confirmation Procedure). In that case, the identification criteria described in the Technical Document on Identification Criteria for Qualitative Assays, TD IDCR [15] shall be met.
- For the Confirmation Procedure of any rEPO or analogue, the Laboratory may also apply alternative methods, validated according to International Standard for Laboratories (ISL) requirements that demonstrate the exogenous origin of the substance detected (e.g. based on the detection of chemical structures only found on rEPO, but not on endogenous EPO).

2.3 "B" Sample Confirmation Procedure

- For the Confirmation Procedure on the "B" Sample, the Laboratory shall apply either IEF or SDS-PAGE or SAR-PAGE or LC/MS according to Table 1.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

Table 1. Testing for rEPOs and analogues in urine and blood (serum/plasma)

Urine

Initial Testing Procedure		Confirmation Procedure	
Method	Presumptive Analytical Finding	Method (sample A)	Method (sample B)
IEF or ¹ SAR-PAGE	rEPO	IEF and ² (SDS-PAGE or SAR-PAGE)	IEF or ¹ (SDS-PAGE or SAR-PAGE)
	NESP	IEF or ¹ (SDS-PAGE or SAR-PAGE)	IEF or ¹ (SDS-PAGE or SAR-PAGE)
ELISA or ¹ SDS-PAGE or ¹ LC/MS	CERA	IEF or ¹ SAR-PAGE	IEF or ¹ SAR-PAGE
	Hematide	SDS-PAGE or ¹ LC/MS	SDS-PAGE or ¹ LC/MS
ELISA or ¹ (SDS-PAGE or SAR-PAGE)	EPO-Fc	SDS-PAGE or SAR-PAGE	SDS-PAGE or SAR-PAGE

Serum/plasma

Initial Testing Procedure		Confirmation Procedure	
Method	Presumptive Analytical Finding	Method (samples A and B)	
IEF or ¹ SAR-PAGE	rEPO	SDS-PAGE or SAR-PAGE	
	NESP	IEF or ¹ (SDS-PAGE or SAR-PAGE)	
ELISA	CERA	IEF or ¹ SAR-PAGE	
	CERA	IEF or ¹ SAR-PAGE	
ELISA or ¹ SDS-PAGE or ¹ LC/MS	Hematide	SDS-PAGE or ¹ LC/MS	
	EPO-Fc	SDS-PAGE or SAR-PAGE	

¹ When the Initial Testing Procedure included the application of IEF with EPO immunopurification, it is not necessary to repeat the IEF analysis for the confirmation of rEPOs; the application of SDS-PAGE or SAR-PAGE is sufficient. However, if the Initial Testing Procedure was performed by IEF without immunopurification, the confirmation of rEPOs in urine shall be performed by both methodologies (IEF plus either SDS-PAGE or SAR-PAGE) on new, immunopurified Aliquots of Sample "A". See §2.2.1 for details.

² The decision on which method(s) is used lies with the Laboratory. At its discretion, the Laboratory may also use a combination of IEF and either SDS-PAGE or SAR-PAGE.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written By:	WADA EPO Working Group	Approved By:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

3.0 Description of the methods

3.1 The Isoelectrofocusing (IEF) test [1]

3.1.1 Sample preparation

For the Initial Testing Procedure, any validated method able to concentrate EPO and/or its analogues (e.g. ultrafiltration [1], selective protein precipitation [2], etc.) may be used; immunopurification is not mandatory.

For the Confirmation Procedures, immunopurification of the Sample is required prior to the application of the IEF method [2-7].

*Note: Any pre-concentration or purification method shall require an appropriate validation by the Laboratory.

3.1.2 Isoelectric Focusing

Isoelectric focusing is performed in a pH range compatible with the isoelectric points (pI) of both the natural urinary EPO and its recombinant analogues. IEF is performed under denaturing conditions (approximately 7M urea).

3.1.3 Double blotting

After IEF separation, double blotting procedure is mandatory. The primary antibody used in this step must be the monoclonal mouse anti-human EPO clone AE7A5.

3.1.4 Detection

The isoelectric patterns of EPO are revealed by the use of an appropriate, sensitive detection system (e.g. amplified chemiluminescent system). The signal obtained must be quantifiable in order to appreciate the relative intensities of the different isoforms of an EPO pattern.

3.2 SDS-PAGE and SAR-PAGE tests [8, 9, 13, 14]

SDS-PAGE is a well established technique that does not require further specific description. The electrophoretic separation (e.g. on a 10% T gel) may be used in combination with single or double blotting and an appropriate sensitive detection system (e.g. amplified chemiluminescent system). For SAR-PAGE, SDS in gel, sample and running buffers is replaced by sodium N-lauroylsarcosinate.

For the Initial Testing Procedure, any validated method able to concentrate EPO and/or its analogues in an SDS-PAGE or SAR-PAGE compatible form may be used; immunopurification is not mandatory but has proved to be very efficient for this step.

*Note: Any pre-concentration or purification method shall require an appropriate validation by the Laboratory.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written By:	WADA EPO Working Group	Approved By:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

For the Confirmation Procedures, immunopurification of the Sample is required prior to the application of SDS-PAGE or SAR-PAGE.

3.3 SDS-PAGE test for detection of Hematide [11]

Hematide may be detected, for example, by SDS-PAGE (e.g. Nu-PAGE 4-12% Bis Tris gels). Immunopurification of the Sample is required for confirmation. Different antibodies may be used for immunopurification of Hematide which are specific for either the peptide (e.g. clone 1G9, Affymax Inc.) or the polyethylene glycol moieties of the molecule. The immunodetection shall be performed by double-blotting using antibodies other than those used for the immunopurification (e.g. clone 11F9, Affymax Inc.) and using an appropriate, sensitive detection system (e.g. amplified chemiluminescent system).

4.0 Evaluation and Interpretation of Results

Results from the Confirmation Procedure need to fulfil the quality and identification criteria described herein.

- When more than one method is used for the Confirmation Procedure, the acceptance and identification criteria must be fulfilled on both procedures employed before reporting an *Adverse Analytical Finding*;
- In cases when the acceptance and identification criteria are met for only one of the methods employed for the Confirmation Procedure, the Sample shall be reported as an *Atypical Finding*.

4.1 Acceptance criteria

The acceptance criteria for the IEF and SDS-PAGE or SAR-PAGE procedures define the requisites that an image shall fulfil to allow the application of the identification criteria in order to ascertain the presence of REPO, CEBA, NESP or any other EPO analogue.

1. Spots, smears, areas of excessive background or absent signal in a lane that significantly interfere with the application of the identification criteria shall invalidate the lane.
2. Comparison to reference samples shall allow assignment of corresponding migrating bands in the Athlete's Sample.

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

4.2 Identification Criteria

4.2.1 The IEF procedure

Figure 1 shows an illustration of an IEF test result⁴. The identification windows for each electrophoretic lane as well as the basic, endogenous and acidic areas are defined. Bands of the preparations used as reference are identified by numbers and letters.

The basic and acidic areas are defined, as described, by the position of the bands corresponding to the rEPO Biological Reference Preparation (BRP)⁵ of the European Pharmacopoeia (equimolar mixture of epoetin- α and - β) and NESP⁶, by exclusion, the endogenous area is defined in between. In the figure the endogenous area is exemplified by uEPO (International Reference Preparation, IRP, from the National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, UK⁷).

The bands of rEPO, uEPO and NESP in the basic, endogenous and acidic areas respectively, are identified by numbers and letters as shown. CERA shows a different pattern with some bands approximately co-localized with those defined by rEPO and others interspersed amongst rEPO bands. This band pattern specifically identifies CERA.

The following identification criteria define the requisites that the image shall fulfil to consider an *Adverse Analytical Finding* corresponding to the presence of rEPO, NESP or CERA.

4.2.1.1. rEPO

1. In the basic area (Figure 1) there must be at least 3 acceptable, consecutive bands assigned as "1", "2", and "3" as defined in the corresponding rEPO preparation used as reference⁸;
2. The 2 most intense bands measured by densitometry shall be in the basic area.
3. When the analysis is performed in blood (serum/plasma) the intensity of those bands must be approximately twice or more than any other band in the endogenous area.

⁴ These are examples of standards of different EPO analogues after IEF; in an actual sample the presence of endogenous uEPO may also be detected.

⁵ Other preparations of uEPO or hEPO may be utilized as reference for endogenous EPO.

⁶ The beginning of the basic area is established by band "1" in the rEPO preparation used as reference (Figure 1).

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

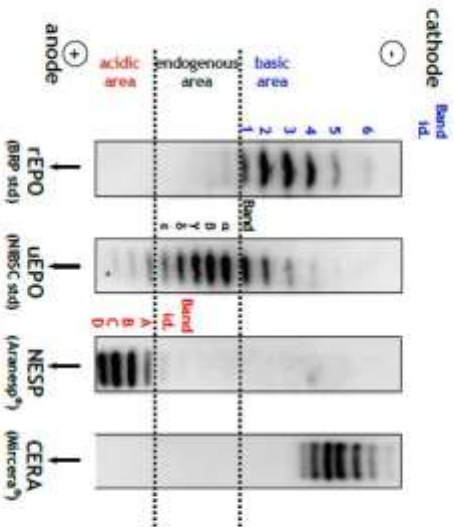


Figure 1. Image of the identification windows of lanes obtained by the chemiluminescence acquisition system corresponding to the analysis of rEPO, CERA, NESP and uEPO⁴.

4.2.1.2 NESP

1. In the acidic area (Figure 1) there must be at least 3 acceptable, consecutive bands assigned as "A", "B", "C" or "D" as defined in the corresponding NESP preparation used as reference⁷;
2. The two most intense bands measured by densitometry shall be in the acidic area.

4.2.1.3 CERA

In the basic area, there must be at least 4 consecutive bands corresponding with the CERA preparation used as reference.

⁷ The beginning of the acidic area is established by band "A" in the NESP preparation used as reference (Figure 1).

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

4.2.2 The SDS-PAGE or SAR-PAGE procedure

The identification criteria for SDS-PAGE and SAR-PAGE are the same, since both methods perform identically except for the better sensitivity of SAR-PAGE for CERA.

rEPOs and analogues can be distinguished from endogenous EPO (uEPO, bEPO) based on their characteristic band shape and different molecular mass.

The migration behaviour (band) of each rEPO or analogue, i.e. position and shape (width, focused or more diffused) can be used to confirm the identity and/or exogenous origin of the substance. The centroid or the boundaries of the width of the band can be used to ascertain that its position and shape differs from the position of endogenous EPO run in parallel as illustrated in Figure 2 (which exemplifies the SDS-PAGE behaviour of different rEPOs as well as uEPO/bEPO, NESP and CERA).

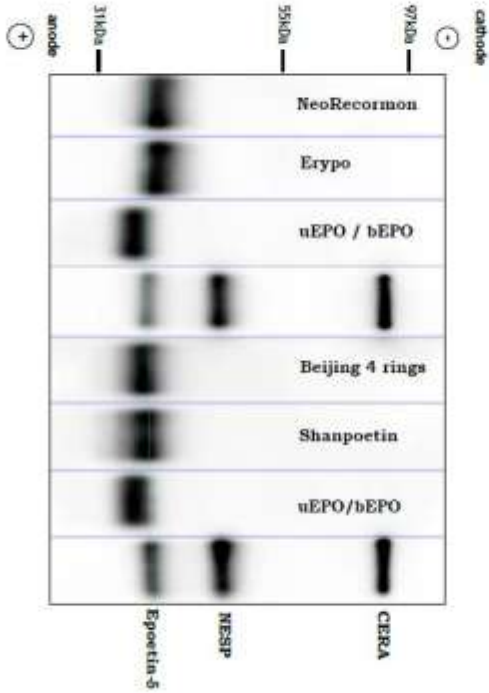


Figure 2. SDS-PAGE image showing the broad band characteristic of some commercially available Epoetin- α and - β preparations (NeoRecormon[®], Erypo[®], Beijing 4 rings, Shanpoetin[™]). The relative positions of endogenous urinary/blood EPO, Epoetin- α , NESP and CERA are also shown.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

The following identification criteria define the requisites that the image shall fulfil to consider an *Adverse Analytical Finding* corresponding to the presence of rEPO, NESP, CERA or EPO-Fc when the SDS-PAGE or SAR-PAGE method is applied.

1. A *single band* is detected

rEPO: The band shape and the apparent molecular mass of the band centroid correspond to the band shape and apparent molecular mass of the rEPO preparation used as reference.

• Epoetin- α and - β as well as the biosimilars have a characteristic band shape ("broad band") and higher apparent molecular mass than endogenous uEPO/bEPO (Figure 2);

• Epoetin- δ has a characteristic band shape ("sharp band") and higher apparent molecular mass than endogenous uEPO/bEPO. Due to the sharpness of its band, epoetin- δ can be also differentiated from other recombinant epoetins (α and β as well as the biosimilars) (Figure 2, 3);

NESP, CERA, EPO-Fc:

• The apparent molecular mass of the band centroid corresponds to the mass of the corresponding NESP, CERA or EPO-Fc preparation used as reference.

• NESP (Figure 2, 3), CERA (Figure 2, 3), and EPO-Fc (Figure 3*) can be distinguished from endogenous EPOs (uEPO, bEPO) as well as from rEPOs based on their higher apparent molecular masses [16].

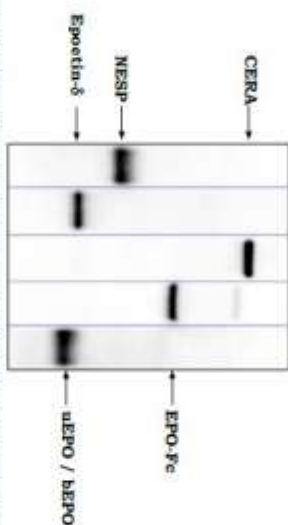


Figure 3: SAR-PAGE image showing the higher apparent molecular masses of CERA, EPO-Fc, NESP and Epoetin- δ in comparison to endogenous uEPO/bEPO.

* For EPO-Fc a second band in the higher mass region may be observed depending on the EPO-Fc concentration in the sample or reference preparation. This band is due to EPO-Fc aggregation.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written By:	WADA EPO Working Group	Approved By:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

2. A mixed band consisting of endogenous EPO (uEPO, bEPO) and rEPO is detected: The band shape resembles that of the rEPO plus parts of the total of the uEPO/bEPO band.

- A diffuse or faint area of the band above the corresponding endogenous band is also indicative for the presence of epoetin- α and - β (Figure 4).

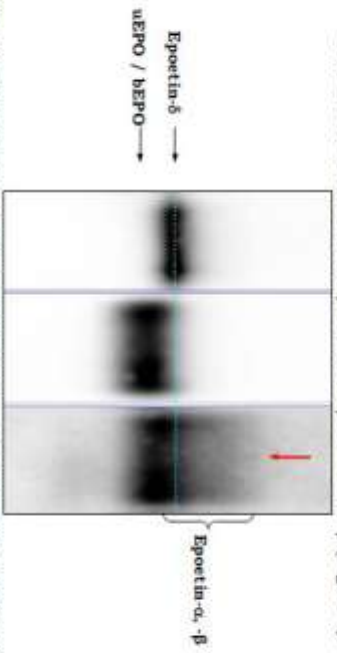


Figure 4. SDS-PAGE image showing a mixed band of endogenous EPO and rEPO (red arrow). The diffuse area of the band above the corresponding endogenous band is also indicative for the presence of epoetin- α and - β .

3. Two or more bands are detected:

- One of the bands fulfils the identification criteria for a single band as provided above (see Figure 5 as an example for NESP).

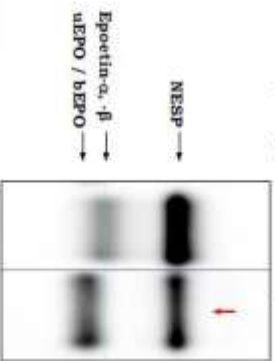


Figure 5. SDS-PAGE image showing two bands (red arrow), one corresponding to NESP and the other to endogenous (uEPO/bEPO).

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written By:	WADA EPO Working Group	Approved By:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

4.2.3 SDS-PAGE for Hematide

The presence of hematide in a Sample is indicated by a band in the position corresponding to this EPO analogue, as indicated by the migration of the preparation used as reference (Figure 6). Additional bands corresponding to the light chains and heavy chains of the antibodies used for the immunopurification may be present and do not interfere with the interpretation of the results.

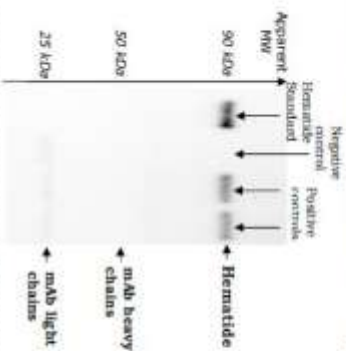


Figure 6. Image of the identification of hematide by SDS-PAGE on Nu-PAGE 4-12% Bis Tris gel.

5.0 Documentation and Reporting

When reporting results based on the application of the IEF and/or SDS-PAGE or SAR-PAGE, the Laboratory shall comply with the requirements of the WADA ISL and its associated Technical Document on Laboratory Documentation Packages (TD LDOC):

Initial Testing Procedure Requirements:

- o Sample (Initial Testing Aliquot):
- o Appropriate preparation used as reference enabling to define basic, acidic and endogenous areas (IEF) or apparent molecular mass (SDS-PAGE, SAR-PAGE).
- o Negative control sample or reference material of uEPO.

Confirmation Procedure Requirements:

- o Sample (Confirmation Aliquot):
- o Positive control sample (e.g. rEPO, NESP, CERA, etc.);
- o Appropriate preparation used as reference (e.g. rEPO, NESP, CERA, etc.);
- o Negative control sample.

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

5.1 Provision of a Second Opinion

WADA requires that one second opinion is provided by one of the experts designated below⁹ before any Adverse Analytical Finding for rEPOs or analogues is reported to the Result Management Authority(-ies). Any second opinion provided shall be inserted as part of the Laboratory record in the Laboratory Documentation Package.

Provisions 3.2 and 6.2 of the Code allow the use of results to establish profile of doping by Athletes. Thus, even if the results of EPO analysis are reported as negative by a Laboratory on the basis of IEF and/or SDS/SAR-PAGE analysis, information contained in the analysis combined with other information (e.g. blood variables, longitudinal profiles, testimonies,...) may remain relevant in a more general context to establish anti-doping rule violations.

6.0 References

1. Lasse F, Martin L, Crepin N, de Ceaurutz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem* **311**: 119–126 (2002).
2. F. Lasse, Martin L, Martin JA, de Ceaurutz J. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol* **41**: 354-357 (2007).
3. Mallonqui J, Segura J, de Bolos C, Gutiérrez-Gallego R, Pascual JA. Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Hematologica* **93** (2): 313-314 (2008).
4. Dehnes Y, Lamou S, Lennberg M. Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns – A powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogues. *JPhB* **53**: 1028-1032 (2010).
5. Lennberg M, Dehnes Y, Dravin M et al. Rapid affinity purification of erythropoietin from biological samples using disposable monoliths. *J Chromatogr A*. **1217**(45): 7031-7037 (2010).

⁹ Experts (Laboratory affiliation) that may provide second opinions on Laboratory findings for EPO:

1. François Laine (Paris)
2. Laurent Martin (Paris)
3. Christian Raschi (Salbersdorf)
4. Jiri A. Paschal (Barcelona)
5. Christiane Ayotte (Nouzard)
6. Yvette Dehnes (Oslo)
7. Nicolas Lennberger (Lausanne)
8. Michael Saugy (Lausanne)

WADA Technical Document - TD2013EPO

Document Number:	TD2013EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 November 2012	Effective Date:	01 March 2013

6. Mallonqui J, Llop E, de Bolos 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).
7. Reiben P, Vötker-Schänzer E, Majer B, Schänzer W. Easy-to-use IEF compatible immunoaffinity purification of Erythropoietin from urine repletates. *Drug Test Anal* doi: 10.1002/dta.1361 (2012). [Epub ahead of print]
8. Reichel C, Abzieher F, Geisendorfer T. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIFCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal* **1**(11-12): 494-504 (2009).
9. Reichel C. SARCOSYL-PAGE: A New Electrophoretic Method for the Separation and Immunological Detection of Pegylated Proteins. *Methods Mol Biol*. **869**:65-79 (2012).
10. Lamou S, Giraud S, Egli L et al. A high-throughput test to detect C.E.R.A. doping in blood. *J Pharm Biomed Anal* **50**(5): 954-8 (2009).
11. Lauenberger 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. Moller J, 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).
13. Kohler M, Ayotte C, Deshaunais 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).
14. Reichel C, Kulovics R, Jordan V, Walzinger 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).
15. WADA Technical Document TD2010IDCR: Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry (2010). http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identifier%20Criteria%20Qual%20Assays_May%2009%202010_FA.doc.pdf
16. Reichel C, Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: Screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug Test Anal* (2012) (in press).

“Membrane Assisted Isoform Immunoassay (MAIIA 1) a unique method for rapid detection of rEPO in doping”

J. Carlsson, M. Länberg (Uppsala University, Uppsala, Sweden), **M. Garle** (Karolinska University, Stockholm, Sweden)

Results and Conclusions

A novel, rapid and easy-to-use method, EPO WGA MAIIA, for determination of aberrant EPO isoform subpopulations in urine or serum, has been tested for its use as an EPO doping control method. The method separates EPO subpopulations due to their different interactions with the lectin wheat germ agglutinin (WGA). The glycosylated structures on recombinant epoetins show stronger interaction with the lectin, probably due to their higher content of polysaccharose amine. The WGA-based separation of isoforms and the subsequent ultrasensitive EPO determination is rapidly carried out within a few square cm of a thin porous layer formed as a test strip, using an image scanner for quantification. The test takes only 20 min. to perform and is well suited both for determination of single samples and for large series.

Before analysis with the EPO WGA MAIIA method, EPO is purified and concentrated from urine or plasma by use of a newly developed disposable EPO affinity purification device (www.analabdiagnostics.com). With this easy-to-use sample preparation device EPO can rapidly be captured from large sample volumes and be eluted in a final volume of only 55 µL. The high EPO recovery of 65%, and the retained isoform distribution, makes the device a useful pre-step tool also for e.g. IEF, SDS-PAGE and LC/MS.

The EPO WGA MAIIA method allows detection of recombinant EPO in urine specimens from patients up to about 7 days after the last injection ($p < 0.0001$). Recombinant epoetin e.g. alpha, beta, omega, delta, zeta and four Chinese types ($p < 0.0001$), and EPO analogues like Aranesp ($p < 0.0001$) and Mirceira can be distinguished from endogenous EPO isoforms. Mirceira shows less interaction with WGA compared to endogenous EPO, while recombinant EPOs show stronger and Aranesp shows the strongest interaction. Only 2 µg of EPO is required for isoform detection, which is about 1/10 of the amount of EPO required for the presently used IEF-based doping method. When rEPO beta and endogenous EPO appear in the same sample it is possible to detect rEPO down to a level where it constitutes only 40% of total EPO.

Besides measuring the interaction of the various types of EPO with WGA, it is possible in the same test strip to utilize also their interaction with the anti-EPO immobilized in the detection zone (see J. Immunol. Meth. 339 (2008): 236-244). By interpreting the antibody interaction profile, using the EPO AbQ MAIIA algorithm, it is possible to distinguish EPO and epoetins from EPO analogues like Aranesp and Mirceira. The EPO WGA MAIIA test gives also an estimate of the EPO concentration in the dilute, enabling calculation of optimal application volume for the IEF or SDS-PAGE confirmation test.

The recommended test set-up for doping control utilizes EPO WGA MAIIA for identification of epoetins and Aranesp, while Mirceira preferably is identified by EPO AbQ MAIIA.

The EPO WGA MAIIA test classifies all tested epoetin varieties and EPO analogues correctly, shows good resolution between endogenous EPO and epoetins, and can measure very low amounts of EPO. The quality controlled reagents will be supplied worldwide as a complete kit. The hands-on time is reduced compared to presently accredited tests, which significantly decreases the analysis cost. The excellent results and the easy-to-use concept seem to fulfil the requirements for a screening EPO doping control test.

Such a test makes it possible to considerable increase the number of EPO doping controls performed without increasing the total analysis cost.

ANNEXE A

Exigences liées au prélèvement d'échantillons de sang pour le Passeport biologique de l'Athlète

Document technique de l'AMA – TD2010BSCR

N° de document :	TD2010BSCR	Version :	2.0
Rédaction :	AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	15.11.2011	Date d'entrée en vigueur :	01.01.2012

Exigences liées au prélèvement d'échantillons de sang pour le Passeport biologique de l'Athlète

1. Objectif

Ces exigences visent à fournir un soutien aux procédures de prélèvement d'échantillons de sang pour la mesure des variables hématologiques individuelles d'un sportif dans le cadre du *Passeport biologique de l'Athlète* (PBA).

2. Portée

Les *Standards internationaux de contrôle* s'appliquent au prélèvement d'échantillons effectués pour la mesure des variables sanguines individuelles d'un sportif dans le cadre du PBA. La présente annexe décrit les exigences additionnelles liées à la conservation et au transport des échantillons de sang en relation avec le *Passeport biologique de l'Athlète*. Les meilleures pratiques de prélèvement des échantillons précitées dans les Lignes directrices pour le prélèvement des échantillons sanguins publiées par l'AMA devraient être prises en compte, mais ne sont pas obligatoires. En cas de divergence entre les exigences établies dans la présente annexe et celles stipulées dans les SIC ou dans les Lignes directrices pour le prélèvement des échantillons sanguins, le contenu de la présente annexe doit prévaloir pour les prélèvements d'échantillons de sang effectués pour les besoins du *Passeport biologique de l'Athlète*.

3. Moment du prélèvement des échantillons

Si un prélèvement est effectué après un entraînement physique ou une compétition, la planification du contrôle tiendra compte de la localisation du sportif afin que le contrôle ne se déroule pas dans les deux heures précédant ou suivant cette activité. Dans le cas où un sportif a participé à un entraînement ou à une compétition dans les deux heures précédant sa notification, l'ACD/APS ou l'escorte surveillera le sportif jusqu'à ce que ces deux heures soient écoulées. Le prélèvement sanguin pourra ensuite se faire. L'ACD/APS consignera également la nature (compétition, entraînement, etc.), la durée et l'intensité de l'activité physique.

4. Début du processus de prélèvement et période de repos de 10 minutes

Après que le sportif a été notifié de sa sélection pour subir un contrôle de dopage et que l'ACD/APS lui a expliqué ses droits et responsabilités dans le cadre de cette procédure, l'ACD/APS demandera au sportif de rester en position assise, ses pieds touchant le sol, pendant une période d'au moins 10 minutes avant le prélèvement de l'échantillon.

5. Documentation de contrôle du dopage du Passeport biologique de l'Athlète

L'ACD/APS utilisera le formulaire de *contrôle du dopage* propre au PBA, si un tel formulaire existe. Si ce n'est pas le cas, l'ACD/APS utilisera un formulaire de *contrôle du dopage* standard et consignera les informations additionnelles suivantes sur un formulaire correspondant ou sur un formulaire de rapport supplémentaire. Le sportif et l'ACD/APS signeront ensuite le document.

- Confirmer que le sportif n'a participé à aucune compétition au cours des deux heures précédant le prélèvement de l'échantillon sanguin.
- Le sportif a-t-il participé à une séance d'entraînement ou à une compétition, ou a-t-il séjourné dans un lieu se trouvant à une altitude supérieure à 1 000 mètres au cours des deux dernières semaines? Si oui, ou en cas de doute, l'ACD/APS doit inscrire le nom de ce lieu et la durée du séjour. Le niveau d'altitude estimé doit être indiqué, si cette information est connue.
- Le sportif a-t-il eu recours à un quelconque dispositif de simulation d'altitude, notamment une tente ou un masque hypoxique, au cours des deux dernières semaines? Si oui, l'ACD/APS devra fournir le plus de détails possible quant au type de dispositif utilisé et au contexte d'utilisation (fréquence, durée, intensité, etc.).

Université de Lille 2

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire 2013/2014

Nom : BENAISA

Prénom : Ridouan

Titre de la thèse : MIRCERA : Indications thérapeutiques, Utilisation frauduleuse en milieu sportif, et méthodes de détections.

Mots-clés : MIRCERA®, Erythropoïétine, Insuffisance rénale chronique, Dopage, Industrie pharmaceutique, Sport, Méthodes de détection

Résumé : MIRCERA®, EPO de 3^e génération commercialisée en 2007 dans le traitement symptomatique de l'anémie associée à l'IRC.

Il est également utilisé dans le cadre du dopage sportif.

Le laboratoire ROCHE travaille en partenariat avec plusieurs agences de lutte contre le dopage lors des phases d'essais cliniques, en vue de développer une méthode de détection avant même sa commercialisation.

Les techniques mises en place ont permis d'épingler plusieurs sportifs lors des compétitions sportives organisées l'année suivante (Jeux Olympiques de Pekin, Tour de France 2008, Tour d'Italie 2008).

Ce partenariat est un exemple qui souligne la volonté de lutter activement contre le dopage et protéger les sportifs d'un mésusage thérapeutique.

Membres du jury :

Président : Madame GRAS Hélène, Professeur des Universités- Faculté de Pharmacie, Université Lille 2

Assesseur(s) : Monsieur TAGZIRT Madjid, Maître de Conférences-Faculté de Pharmacie, Université Lille 2

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur NEGGAZ Mehdi, Pharmacien d'officine



Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE Cedex - Tél. 03.20.96.40.40 - Fax 03.20.95.90.09

<input checked="" type="checkbox"/> Thèse d'Exercice	Dépôt du sujet	Mémoire d'Internat <input type="checkbox"/>
---	-----------------------	--

Ces renseignements sont à fournir au Bureau des thèses, minimum 2 mois avant la date prévue de soutenance.

Nom : BENATSA

Prénom : R. DOUAN

Année d'étude : 5^e année - Médecine Industrielle

SUJET

Ces renseignements doivent être dactylographiés de préférence ou inscrits en majuscules

Thèmes abordés et mots clés :

MIRCERA, EPO de 3^{ème} génération, commercialisé dans le traitement symptomatique de l'anémie associée à l'insuffisance rénale chronique. Il est également utilisé dans le cadre du dopage sportif. Il existe actuellement une méthode de détection (Sarcosyl (ACE)) qui permet de doser la molécule.

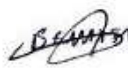



Titre prévu : MIRCERA : indications thérapeutiques, utilisation frauduleuse en milieu sportif et méthodes de détections.

DESIGNATION ET AVIS DU CONSEILLER DE THESE

Nom : TAGZIE Prénom : Madjid

Fonctions (si extérieur à la Faculté) : Maître de Conférences

Remarques :

L'étudiant	Le Conseiller de Thèse	Avis et signature du Doyen
Date : le <u>28.03.2013</u> Signature : 	Date : le <u>28/03/13</u> Signature : 	<input checked="" type="checkbox"/> Avis Favorable <input type="checkbox"/> Avis défavorable Date : <u>Mavil 2013</u>  Le Doyen  L. DUBREUIL