

**Etude de validation test EPO  
2003**



---

## **LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

---

L'objet de ce rapport est de valider la méthode de caractérisation de l'Érythropoïétine (EPO) urinaire, utilisée au laboratoire.

La méthode de préparation consiste en une concentration de l'échantillon, après microfiltration, par ultrafiltration, tout en protégeant l'EPO d'éventuelles dégradations enzymatiques. (M-Ex-25)

La caractérisation se fait ensuite par focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide (préparation du gel suivant M-P-11) suivie d'un électrotransfert des protéines sur une membrane. La reconnaissance spécifique des isoformes de l'EPO s'effectue au moyen d'anticorps monoclonaux anti-EPO humaine. Un deuxième électrotransfert est ensuite opéré. Ce dernier permet l'isolement des anticorps primaires sur une nouvelle membrane évitant ainsi le problème de fixation non spécifique des anticorps secondaires sur les nombreuses protéines urinaires focalisées avec l'EPO. La révélation s'effectue par réaction chimiluminescente. (M-An-43)

La caractérisation s'effectue en comparant le profil isoélectrique de l'échantillon avec celui de références constituées d'EPO recombinantes: EPO BRP (mélange d'Epoétine  $\alpha$  et  $\beta$ ) et Aranesp (Darbépoétine  $\alpha$ )

---

# LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

<b>1. MÉTHODE DE PRÉPARATION .....</b>	<b>4</b>
1.1 Appareillage .....	4
1.2 Méthode.....	4
1.3 Validation du kit de dosage EPO .....	5
<b>2. MÉTHODE D'ANALYSE .....</b>	<b>6</b>
2.1 Appareillage .....	6
2.2 Focalisation Isoélectrique (I.E.F.).....	6
2.3 Détection immunologique et révélation par chimiluminescence .....	6
2.4 Mode de caractérisation .....	8
2.4.1 Détermination du pourcentage d'isoformes colocalisées avec l'Epoétine .....	10
2.4.2 Détermination du pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine .	11
2.4.3 Caractérisation qualitative .....	12
2.5 Test d'activité .....	12
<b>3. SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE.....</b>	<b>13</b>
<b>4. CARACTÉRISATION DES PROFILS.....</b>	<b>14</b>
4.1 Evaluation du pourcentage d'isoformes colocalisées avec l'Epoétine.....	14
4.1.1 Répétabilité intra-série .....	14
4.1.2 Répétabilité inter-série.....	14
4.1.3 Incertitude du résultat.....	15
4.1.3.1 Détermination du « Cut-off » .....	15
4.1.3.2 Incertitude du résultat.....	15
4.2 Evaluation du pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine .....	16
4.2.1 Répétabilité intra-série .....	16
4.2.2 Répétabilité inter-série.....	16
4.2.3 Incertitude du résultat.....	17
4.2.3.1 Détermination du « Cut-off » .....	17
4.2.3.2 Incertitude du résultat.....	17
4.3 Application aux échantillons urinaires témoins.....	18
4.3.1 Répétabilité intra-série .....	18
4.3.2 Répétabilité inter-série.....	18
<b>5. ROBUSTESSE DE LA MÉTHODE.....</b>	<b>19</b>
5.1 Vérification des produits critiques avant première utilisation .....	19
5.2 Influence de la préparation des échantillons.....	19
5.2.1 Rendement de la préparation .....	19
5.2.2 Conservation du profil.....	19
5.2.3 Incertitude du résultat.....	21
5.3 Influence de la température et du temps de chauffage du rétentat .....	22
<b>6. LIMITE DE DÉTECTION.....</b>	<b>23</b>

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

<b>7. LIMITE DE QUANTIFICATION</b> .....	<b>24</b>
7.1 Échantillon surchargé en Epoétine $\alpha$ ou $\beta$ .....	24
7.2 Échantillon surchargé en Darbépoétine $\alpha$ .....	24
<b>8. STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON</b> .....	<b>25</b>
<b>9. CONCLUSION</b> .....	<b>26</b>
<b>10. RÉFÉRENCES DES RÉACTIFS ET CONSOMMABLES UTILISÉS</b> .....	<b>27</b>
<b>11. PROFILS DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS</b> .....	<b>28</b>
<b>12. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS</b> .....	<b>31</b>
12.1 Cas des Epoétine $\alpha$ et $\beta$ .....	31
12.2 Cas de la Darbépoétine $\alpha$ .....	32
<b>13. ANNEXES</b> .....	<b>33</b>
Détermination du « Cut-off » lié aux isoformes colocalisées avec l'Epoétine .....	34
Détermination du « Cut-off » lié aux isoformes colocalisées avec la Darbépoétine.....	36
Robustesse de la méthode.....	39
Variable de référence Epoétine .....	39
Variable de référence Darbépoétine .....	40
Influence de la température de chauffage du retentat .....	41
Influence du temps de chauffage du retentat.....	42
Limite de quantification d'un échantillon surchargé en Epoétine.....	43
Limite de quantification d'un échantillon surchargé en Darbépoétine.....	44
Stabilité de l'échantillon.....	45
<b>14. DOCUMENTS RELATIFS A LA QUALITÉ</b> .....	<b>48</b>

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 1. MÉTHODE DE PRÉPARATION

#### 1.1 Appareillage

Centrifugeuse.....Hettich Rotina 46R  
Centrifugeuse.....Hettich Universal 16R  
Lecteur micro plaque.....Dynex DSX

#### 1.2 Méthode

- 1- Prise d 'essai : 18 ml d'urine
- 2- Ajouter 1,8 ml de tampon Tris-HCl 3,75M et 200 µl de solution de Complete™
- 3- Centrifuger 10 minutes à 2700 g, 20°C
- 4- Transvaser le surnageant dans un tube conique
- 5- Effectuer une micro filtration de celui-ci avec un « Stériflip®»
- 6- Transvaser le micro filtrat obtenu dans le premier dispositif d'ultrafiltration « Centricon 20® »
- 7- Centrifuger 20 min à 3500g, 20°C
- 8- Rincer le retentat obtenu avec 20 ml de tampon 50 mM Tris-HCl et 200 µl de Complete™. Centrifuger 20 min à 3500g, 20°C
- 9- Effectuer une centrifugation inverse 4 min à 1000g, 20°C
- 10- Transférer le retentat dans le deuxième dispositif de micro filtration « Microcon® »
- 11- Centrifuger 15 min à 14000g, 20°C
- 12- Effectuer une centrifugation inverse 3 min à 1000g, 20°C afin de récupérer le retentat final. Si celui-ci est inférieur à 25 µl, le compléter à ce volume avec du tampon 50 mM Tris-HCl
- 13 Effectuer le dosage EPO en diluant 3µl de retentat dans 147 µl de spécimen diluant du kit EPO Quantikine® R&D
- 14 Aliquoter le retentat en 20 µl de celui ci, ramené à une concentration de 800 UI/l si nécessaire, et un autre pur s'il reste du volume.
- 15 Placer l'aliquot de 20 µl au réfrigérateur si l'analyse se poursuit le lendemain, sinon le conserver à -20°C ainsi que le reste du retentat pur.

---

## **LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

---

### **1.3 Validation du kit de dosage EPO**

Le kit de dosage « Quantikine®IVD® human Erythropoietin » est validé par le fabricant R&D Systems pour la détermination quantitative de la concentration de l'EPO dans le plasma ou le sérum.

Le dosage est effectué sur un retentat urinaire correspondant à un milieu protéique tamponné à pH 7,4 dilué au  $1/50$  dans le « specimen diluant » fourni dans le kit, puis au  $1/2$  dans l' « assay diluant » lors du dosage. La dilution finale du retentat est alors de  $1/100$  dans les solutions prévues par le fabricant.

L'influence de la matrice urinaire est donc considérée comme négligeable.

De plus, le résultat du dosage n'influe pas directement sur le résultat du test, mais ne sert éventuellement qu'à corriger une concentration trop élevée en EPO, afin d'obtenir une bonne résolution des isoformes lors de la focalisation isoélectrique.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 2. METHODE D'ANALYSE

#### 2.1 Appareillage

Unité d'électrophorèse	Multiphor II Pharmacia
Système de refroidissement	MultiTemp II Pharmacia
Générateur pour I.E.F.	Power Supply EPS 3500 XL et 3501 XL Pharmacia
Générateur de blot	Power Pac 200 Bio-Rad
Caméra CCD	Luminescent Image Analyser LAS 1000 Plus Fuji

#### 2.2 Focalisation Isoélectrique (I.E.F.)

##### 2.2.1 Pré focalisation

La pré focalisation s'effectue à une tension constante de 250V. pendant 30 minutes à une température de refroidissement de 10°C. Intensité et puissance maximale sont fixées respectivement à 150 mA et 70 W.

##### 2.2.2 Préparation des échantillons

Les retentats sont chauffés 3 minutes à 80°C puis refroidis immédiatement.

Les références sont diluées dans du tampon 1%BSA-Tris pour une concentration finale établie à 600UI/l pour l'Epoétine (EPO BRP) et 200 UI/l pour la Darbépoétine (Aranesp).

1% du volume final en Tween 80 est ajouté aux échantillons et références.

##### 2.2.3 Focalisation

La focalisation iso-électrique est effectuée sous une puissance constante de 1W par centimètre de hauteur du gel. Son arrêt est fixé à 3600V/h. Tension et intensité maximale sont fixées respectivement à 2000V et 131 mA.

#### 2.3 Détection immunologique et révélation par chimiluminescence

- 1- Transférer les protéines du gel sur une membrane « Immobilon-P » en effectuant un électro-blot à une intensité constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrane pendant 30 minutes.
- 2- Plonger la membrane dans un bain de DTT 5 mM pendant 45 minutes. Rincer au tampon PBS.
- 3- Plonger la membrane dans un bain de saturant (Régilait) à 5% dans du PBS pendant 45 minutes. Rincer au PBS.
- 4- Plonger la membrane dans un bain d'anticorps primaire monoclonal IgG de souris anti-EPO dilué au 1/1000 dans du 1%Régilait-PBS pendant 1 heure. Rincer 3 fois et laver 3 fois par des bains successifs de 0,5%Régilait-PBS. Rincer au PBS.
- 5- Transférer les anticorps anti-EPO sur une nouvelle membrane « Immobilon-P » en effectuant un second électro-blot à une intensité constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de membrane pendant 10 minutes.
- 6- Rincer cette dernière membrane au PBS avant de la plonger dans un bain de saturant (Régilait) à 5% dans du PBS pendant 45 minutes. Rincer au PBS.

---

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

---

- 7- Plonger la membrane dans un bain d'anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à de la biotine (dilué au  $1/1600$  dans du 1% Régilait-PBS), pendant une nuit à +4°C. Rincer 3 fois et laver 3 fois par des bains successifs de 0,5% Régilait-PBS.
- 8- Plonger la membrane dans un bain de Streptavidine-Peroxydase diluée au  $1/2000$  dans du 1% Régilait-PBS pendant 1 heure à +4°C. Rincer 3 fois et laver 3 fois par des bains successifs de PBS.
- 9- Égoutter la membrane et la recouvrir avec le réactif de chimiluminescence. Effectuer l'exposition dans un caméra CDD par incrément de 30 secondes. Enregistrer l'image obtenue dans l'ordinateur couplé à la caméra.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 2.4 Mode de caractérisation

La caractérisation de l'EPO est basée sur la comparaison du profil iso-électrique de l'EPO d'un échantillon urinaire à celui des références constituées d'EPO recombinantes (Epoétine et Darbépoétine).

Le profil de l'Epoétine se compose de 7 ou 8 isoformes (4 majeures, 3 mineures pour l'Epoétine  $\alpha$ ; et 5 majeures et 3 mineures pour l'Epoétine  $\beta$ ) situées dans la partie basique du gel et dont les pH iso-électriques sont constants (voir figure 1).

Le profil de la Darbépoétine se compose de 6 isoformes (4 majeures, 2 mineures) situées dans la partie acide du gel et dont les pH isoélectriques sont constants (voir figure 1).

Le profil de l'EPO endogène se compose de nombreuses isoformes dont les pH isoélectriques sont hétérogènes. Les formes majeures ont leurs pHi situées entre les isoformes majeures des EPO recombinantes mentionnées ci-dessus.(voir figure 1).

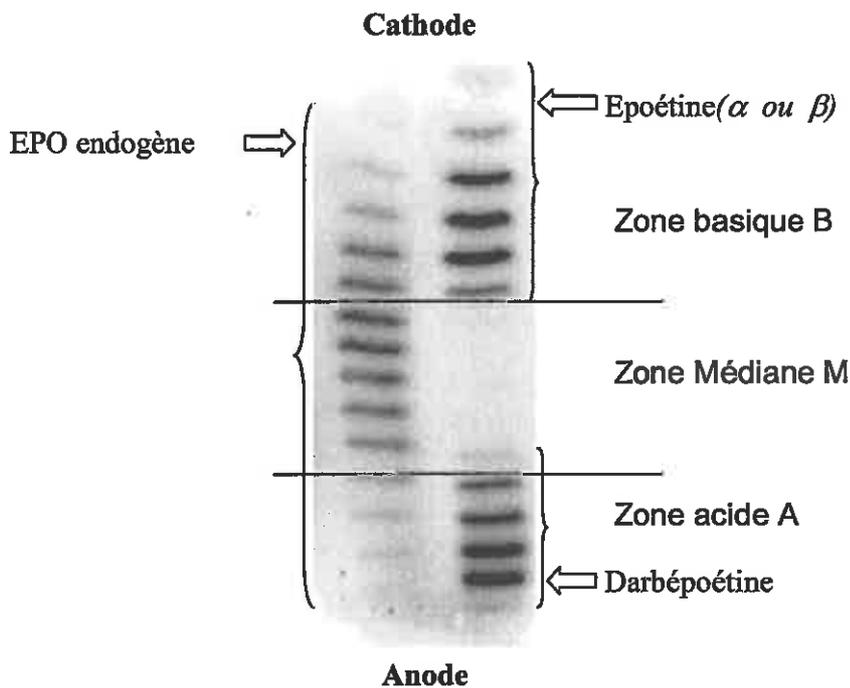


Figure 1

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

L'intensité respective de chaque isoforme est intégrée et quantifiée à l'aide du logiciel AIDA.(figure 2 et 2bis)

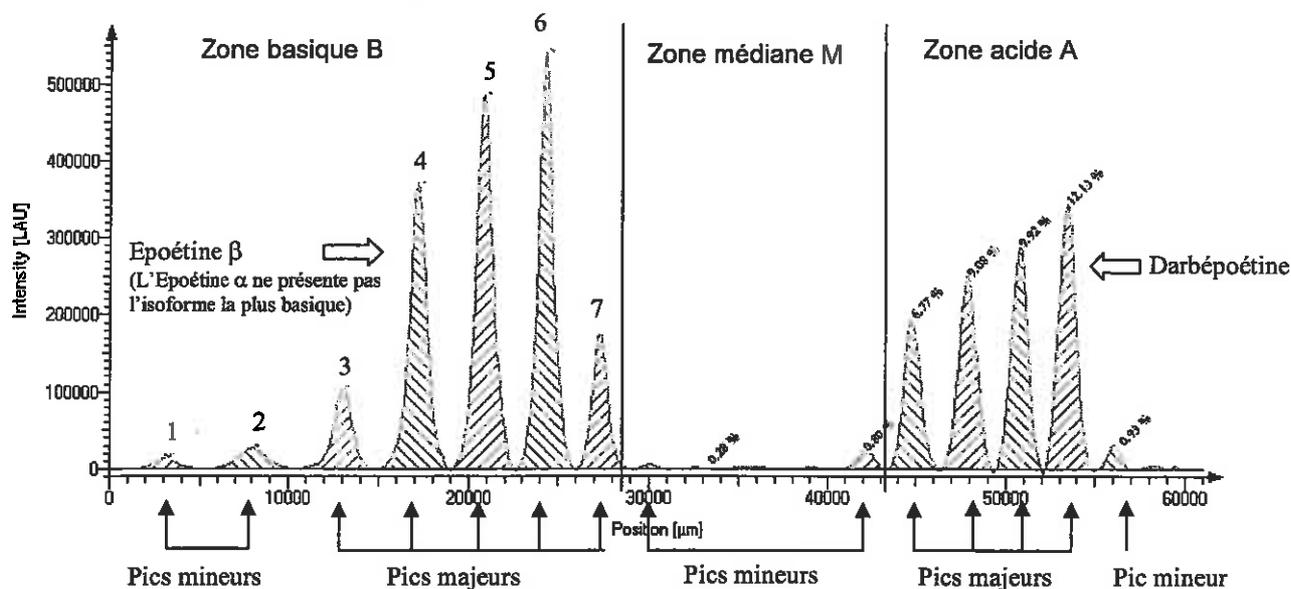


Figure 2

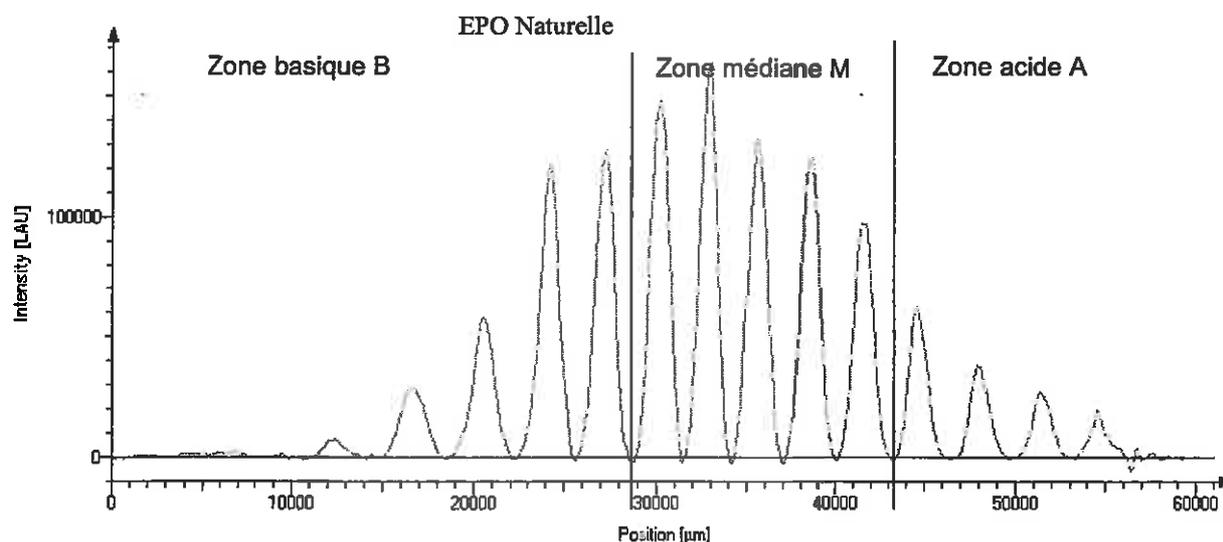


Figure 2bis

Les profils iso-électriques des échantillons sont caractérisés suivant leur co-localisation avec les profils des différentes EPO recombinantes (références Epoétine et Darbépoétine). La co-localisation est définie comme étant la comparaison des profils échantillon et EPO recombinante pour une même zone (B ou M ou A).

La caractérisation est évaluée en rapportant, en pourcentage, la zone du profil co-localisée avec celle de la référence utilisée sur le total du profil.

Le résultat est donc exprimé par le rapport :

Intensité sommée des isoformes co-localisées avec la référence x 100

Intensité totale des isoformes du profil

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

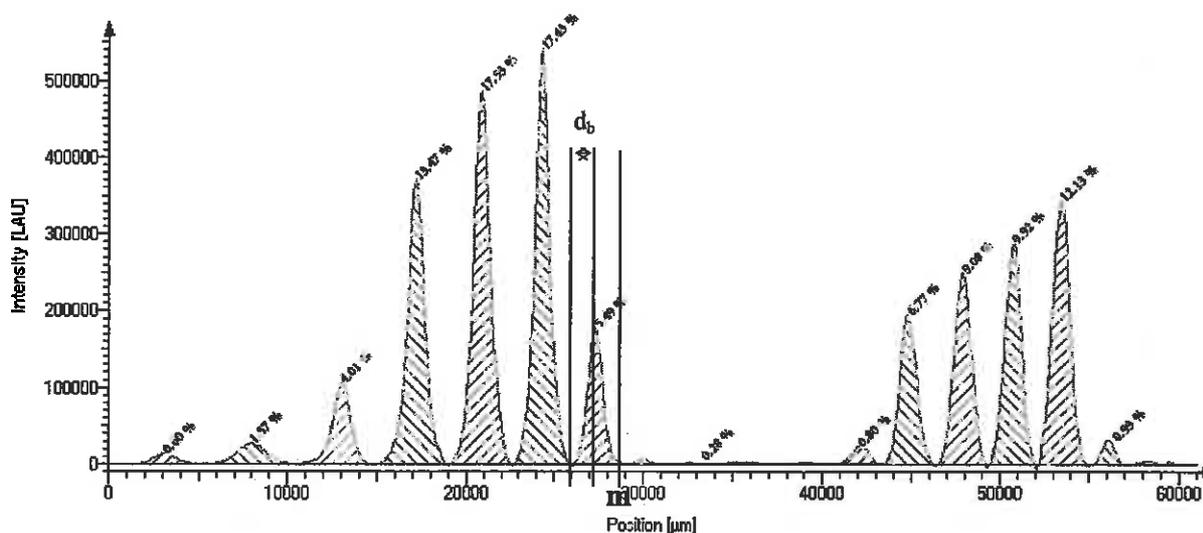
---

### 2.4.1 Détermination du pourcentage d'isoformes colocalisées avec l'Epoétine.

Le pourcentage d'isoformes colocalisées avec l'Epoétine est défini par le rapport de l'intensité de ces isoformes sur la totalité de l'intensité du profil. La zone correspondante à l'Epoétine est dite « zone basique ».

La définition de la zone basique se fait comme suit :

- Déterminer l'abscisse du sommet du pic majeur le plus acide de l'Epoétine.
- Déterminer l'abscisse de la vallée précédant ce même pic.
- Calculer la distance séparant cette vallée de ce sommet . Soit  $d_b$  cette distance.
- Ajouter  $d_b$  à l'abscisse du sommet afin de déterminer l'emplacement du point  $m$  correspondant à la fin de la zone basique.
- Reporter  $m$  sur le profil à analyser.
- Intégrer la part de l'intensité de l'abscisse 0 jusqu'à  $m$  :  $I_{\text{basique}}$
- Calculer le rapport de cette intensité sur l'intensité totale ( $I_{\text{totale}}$ ) du profil.
- Le pourcentage d'isoformes basiques sera  $I_{\text{basique}}/I_{\text{totale}} \times 100$



---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

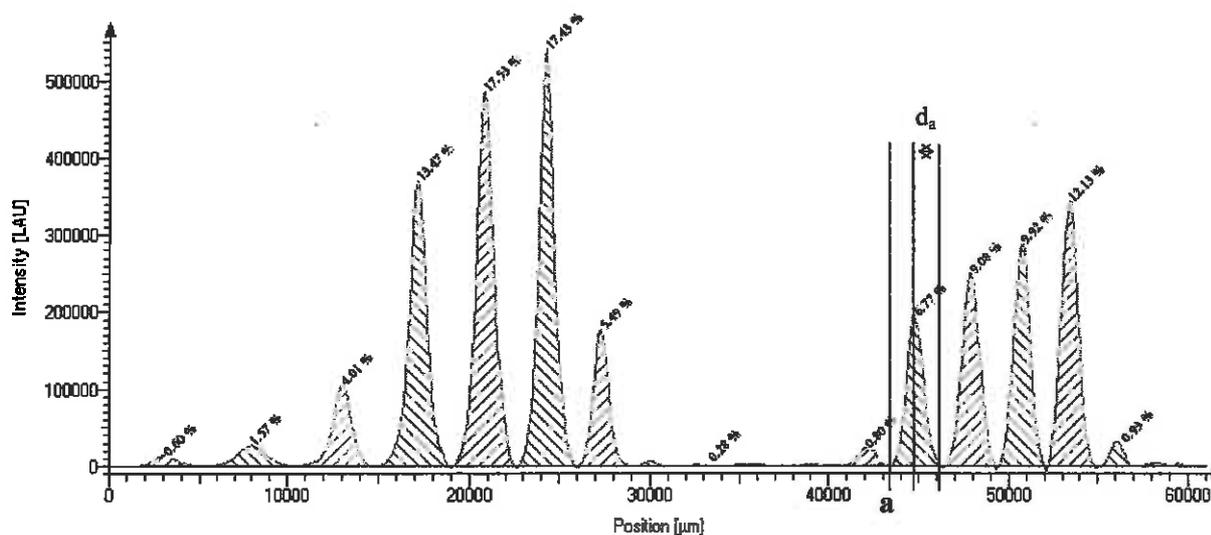
---

### 2.4.2 Détermination du pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine.

Le pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine est défini par le rapport de l'intensité de ces isoformes sur la totalité de l'intensité du profil. La zone correspondante à la Darbépoétine est dite « zone acide ».

La définition de la zone acide se fait comme suit :

- Déterminer l'abscisse du sommet du pic majeur le plus basique de la Darbépoétine.
- Déterminer l'abscisse de la vallée suivant ce même pic.
- Calculer la distance séparant ce sommet de cette vallée . Soit  $d_a$  cette distance.
- Soustraire  $d_a$  à l'abscisse du sommet afin de déterminer l'emplacement du point a correspondant au début de la zone acide.
- Reporter a sur le profil à analyser.
- Intégrer la part de l'intensité de l'abscisse a jusqu'à la fin du profil :  $I_{acide}$
- Calculer le rapport de cette intensité sur l'intensité totale ( $I_{totale}$ ) du profil.
- Le pourcentage d'isoformes acides sera  $I_{acide}/I_{totale} \times 100$



---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 2.4.3 Caractérisation qualitative.

La comparaison des profils des EPO endogène et recombinantes montre que les pics principaux de ces dernières sont situées dans des zones distinctes (figure 2 et 2 bis).

Les 2 pics majeurs de l'Epoétine sont compris dans la zone basique dite B.

Les 2 pics majeurs de la Darbépoétine sont compris dans la zone acide dite A.

Dans le cadre d'administration d'EPO recombinante, leurs isoformes ne sont pas ou peu métabolisées et donc conservent leurs positions et leurs intensités relatives. De plus, on note une disparition quasi complète des isoformes autres que celles de l'EPO recombinante injectée.

Par conséquent un profil présentant deux bandes majeures dans la zone B et peu d'isoformes dans les zones M et A peut traduire la présence d'Epoétine. De la même manière, un profil présentant deux bandes majeures dans la zone A et peu d'isoformes dans les zones B et M, peut traduire la présence de Darbépoétine.

La présence simultanée de deux bandes majeures dans les zones B et A et très peu d'isoformes dans la zone M, correspondra à une présence conjointe d'Epoétine et de Darbépoétine.

### 2.5 Test d'activité

Un test d'activité a été développé (**M-Ex-28B**) pour la confirmation, afin de s'assurer que l'urine testée ne présente pas de facteurs pouvant induire une modification de son profil iso-électrique naturel.

Un mélange d'Epoétine (EPO BRP) et de Darbépoétine est ajouté à l'urine qui a été préalablement protégée de l'action des protéases par adjonction d'un cocktail antiprotéasiques.(Complete™, Pepstatin A) et mise à pH 5.

Après incubations, l'urine est analysée suivant le mode opératoire **M-An-43**.

La présence d'une modification du profil iso-électrique des références (apparition de bandes supplémentaires) invalide l'analyse. Le résultat sera rendu inclassable : échantillon dégradé, impropre à l'analyse.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 3. SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE

La spécificité de la méthode repose sur l'emploi d'anticorps primaires anti-EPO humaine monoclonaux (clone AE7A5) et sur la technique du « double-blot ». Elle a été décrite dans les articles suivants :

F. Lasne , Double-blotting : a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures, *J. Immunol. Methods* 253 (2000) 635

F. Lasne, L. Martin, N. Crépin et J. de Ceaurriz, Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine : differentiation of natural and administrated recombinant hormones, *Anal. Biochem* 311 (2002) 119-26.

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### 4 CARACTÉRISATION DES PROFILS

Toutes les urines utilisées pour cette étude proviennent des urines de 24h de sujets témoins indemnes de toute administration d'EPO recombinante.

#### 4-1 Évaluation du pourcentage d'isoformes colocalisées avec l'Epoétine.

##### 4.1.1 Répétabilité intra-série

Une urine témoin est surchargée en Epoétine (EPO BRP) à quatre concentrations croissantes : 15 , 40, 80, 250 UI/l. Dix aliquotes sont effectués pour chacune des concentrations. Ils sont alors préparés et analysés dans une même série. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation respectifs à chaque surcharge. Ils sont exprimés en pourcentage d'isoformes basiques.

Echantillons	Urine + 15UI/l BRP	Urine + 40UI/l BRP	Urine + 80UI/l BRP	Urine + 250UI/l BRP
A	56,4	72,1	77,6	90,9
B	61,5	73,5	79,0	90,6
C	56,9	72,2	78,1	88,6
D	48,8	72,6	76,9	92,1
E	57,8	74,1	78,2	91,0
F	64,4	72,6	78,6	91,0
G	61,2	76,1	79,6	91,5
H	68,1	71,0	78,4	92,2
I	65,2	66,9	80,9	92,5
J	65,5	75,1	79,2	92,2
Moyenne	60,58	72,71	78,65	91,26
Ecart-type	5,73	2,47	1,11	1,15
Coefficient de variation	9,46 %	3,39 %	1,41 %	1,26 %

##### 4.1.2 Répétabilité inter-série

Une urine témoin est surchargée en Epoétine (EPO BRP) à quatre concentrations croissantes : 15 , 40, 80, 250 UI/l. Dix aliquotes sont effectués pour chacune des concentrations. Ils sont alors congelés à -20°C. Ils sont préparés et analysés dans cinq séries différentes, à des jours différents par deux opérateurs. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation respectifs à chaque surcharge.

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

<i>Échantillons</i>	<i>Urine + 15UIA BRP</i>	<i>Urine + 40UIA BRP</i>	<i>Urine + 80UIA BRP</i>	<i>Urine + 250UIA BRP</i>
A* (J1)	62,5	71,6	79,0	93,0
B* (J1)	60,9	74,3	78,6	92,5
M (J2)	61,5	70,4	83,7	94,9
N (J2)	54,9	71,2	83,3	95,8
O (J3)	58,8	72,1	80,5	93,1
P (J3)	63,0	80,8	84,1	93,9
Q (J4)	60,7	79,2	81,4	95,3
R (J4)	60,9	77,5	77,6	93,2
S (J5)	59,3	65,6	74,8	91,8
T (J5)	47,4	63,8	73,4	90,1
<b>Moyenne</b>	<b>58,99</b>	<b>72,65</b>	<b>79,64</b>	<b>93,56</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>4,67</b>	<b>5,50</b>	<b>3,68</b>	<b>1,81</b>
<b>Coefficient de variation</b>	<b>7,91 %</b>	<b>7,57 %</b>	<b>4,62 %</b>	<b>1,93 %</b>

Le CV diminue avec l'enrichissement en BRP (Epoétine) réalisé. Il devient très faible (1,93%) pour les plus forts enrichissements donnant lieu à de forts pourcentages d'isoformes colocalisées avec la BRP.(cas des échantillons positifs).

### 4.1.3 Incertitude du résultat.

#### 4.1.3.1 Détermination du « Cut-off »

Une étude des profils EPO réalisée sur une population témoin constituées de 472 échantillons d'urines prélevées chez 378 sujets sains âgés de 14 à 53 ans, d'origines ethniques variées a été exécutée. Certains prélèvements ont été réalisés chez un même sujet afin d'apprécier les effets éventuels de différents facteurs tels que séjour en altitude, séjour en chambres hypoxiques, effort physique important. Cette étude a permis d'établir une limite supérieure de l'intervalle de confiance du paramètre étudié (% d'isoformes colocalisées avec l'Epoétine).Celui-ci, au risque  $1/100\ 000$ , est de 75%. (cf annexe page 33)

La valeur du « Cut-off », c'est à dire la valeur seuil de positivité au delà de laquelle un résultat sera considéré comme positif pour la présence d'Epoétine  $\alpha$  ou  $\beta$  est donc de 75%.

#### 4.1.3.2 Incertitude du résultat

Pour les valeurs proches du « Cut-off », l'écart-type observé lors des expériences de répétabilité inter-série est compris entre 3,68 et 5,50 %.

Cet écart-type est approximé à 5%.

L'incertitude élargie à 2 écarts-types est donc de 10 %.

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### 4.2 Évaluation du pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine.

#### 4.2.1 Répétabilité intra-série

Une urine témoin est surchargée en Darbépoétine (Aranesp) à quatre concentrations croissantes : 4 , 10, 50, 200 UI/l. Dix aliquotes sont effectués pour chacune des concentrations. Ils sont alors préparés et analysés dans une même série. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation respectifs à chaque surcharge.

Echantillons	Urine + 4UI/l Nesp	Urine + 10UI/l Nesp	Urine + 50UI/l Nesp	Urine + 200UI/l Nesp
A	22,1	36,8	73,8	87,6
B	24,2	38,3	74,3	86,4
C	21,2	39,3	75,3	87,2
D	22,1	41,8	73,8	88,6
E	22,1	38,2	74,2	88,6
F	23,5	39,4	75,0	90,3
G	21,2	35,2	70,5	88,7
H	20,4	37,4	74,3	88,9
I	22,4	35,0	74,6	86,8
J	17,7	40,6	70,0	91,0
Moyenne	21,69	38,20	73,58	88,41
Ecart-type	1,78	2,19	1,82	1,47
Coefficient de variation	8,23 %	5,73 %	2,47 %	1,64 %

#### 4.2.2 Répétabilité inter-série

Une urine témoin est surchargée en Darbépoétine (Aranesp) à quatre concentrations croissantes : 4 , 10, 50, 200 UI/l. Dix aliquotes sont effectués pour chacune des concentrations. Ils sont alors congelés à -20°C. Ils sont préparés et analysés dans cinq séries différentes, à des jours différents par deux opérateurs. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation respectifs à chaque surcharge.

Echantillons	Urine + 4UI/l Nesp	Urine + 10UI/l Nesp	Urine + 50UI/l Nesp	Urine + 200UI/l Nesp
A' (J1)	21,2	45,4	79,7	92,0
B' (J1)	22,6	42,4	79,1	93,3
K (J2)	24,8	38,0	73,8	91,9
L (J2)	22,7	37,1	77,1	90,7
M (J3)	29,5	45,3	76,1	90,8
N (J3)	28,5	46,3	74,3	91,2
O (J4)	24,3	40,1	75,0	91,3
P (J4)	26,5	36,3	75,2	91,0
S (J5)	27,8	44,3	79,7	91,4
T (J5)	32,7	41,4	78,0	91,7
Moyenne	26,06	41,66	76,80	91,53
Ecart-type	3,60	3,68	2,24	0,76
Coefficient de variation	13,82 %	8,83 %	2,92 %	0,83 %

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

Le CV diminue avec l'enrichissement en Nesp (Darbépoétine) réalisé. Il devient très faible (0,83%) pour les plus forts enrichissements donnant lieu à de forts pourcentages d'isoformes colocalisées avec la Nesp.(cas des échantillons positifs).

### 4.2.3 *Incertitude du résultat.*

#### 4.2.3.1 *Détermination du « Cut-off »*

Une étude des profils EPO réalisée sur une population de 171 échantillons d'urine a été réalisée. Ces échantillons sont issus de l'étude de la détermination du « Cut-off » des isoformes colocalisées avec l'Epoétine. Ils ont permis d'établir une limite supérieure de l'intervalle de confiance du paramètre étudié (% d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine).Celui-ci, au risque  $1/100\ 000$ , est de 58,1%. (cf annexe page 35)

La valeur du « Cut-off », c'est à dire la valeur seuil de positivité au delà de laquelle un résultat sera considéré comme positif pour la présence d'Epoétine  $\alpha$  ou  $\beta$  est donc de 58,1%.

#### 4.2.3.1 *Incertitude du résultat*

Pour les valeurs proches du « Cut-off », l'écart-type observé lors des expériences de répétabilité inter-série est compris entre 2,2 et 3,7 %.

Cet écart-type est approximé à 3%.

L'incertitude élargie à 2 écarts-types est donc de 6 %.

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### 4.3 Application aux échantillons urinaires témoins

#### 4.3.1 Répétabilité intra-série

Une urine témoin et une solution d'EPO naturelle purifiée (NIBSC) sont étudiées. Dix aliquotes sont effectués. Ils sont préparés et analysés dans une même série. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation respectifs à chaque échantillon. La caractérisation est effectuée aussi bien en isoformes basiques que acides.

Echantillons	Urine témoin 1		Standard EPO Naturelle NIBSC	
	Isoformes basiques	Isoformes acides	Isoformes basiques	Isoformes acides
A	41,4	3,9	31,7	10,1
B	36,8	5,7	29,9	13,0
C	34,7	7,4	27,4	11,1
D	43,4	3,8	25,9	15,1
E	38,0	4,4	28,5	14,5
F	41,6	6,9	30,3	11,0
G	45,0	4,9	30,5	9,5
H	42,8	4,4	29,8	11,1
I	43,7	3,9	28,7	11,1
J	48,5	2,8	28,6	13,2
Moyenne	41,59	4,81	29,13	11,97
Ecart-type	4,11	1,45	1,67	1,87
Coefficient de variation	9,88 %	30,14 %	5,73 %	15,62 %

#### 4.3.2 Répétabilité inter-série

Une urine témoin est étudiée. Dix aliquotes sont effectués. Ils sont alors congelés à 20°C. Ils sont préparés et analysés dans cinq séries différentes, à des jours différents par deux opérateurs. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation.

Echantillons	Urine témoin	
	Isoformes basiques	Isoformes acides
A' (J1)	43,0	5,1
B' (J1)	44,0	4,3
K (J2)	41,8	8,1
L (J2)	41,9	7,4
M (J3)	40,7	8,4
N (J3)	39,5	9,7
O (J4)	30,8	9,2
P (J4)	35,8	9,0
S (J5)	37,7	8,1
T (J5)	40,5	8,0
Moyenne	39,57	7,73
Ecart-type	3,92	1,74
Coefficient de variation	9,92 %	22,51 %

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 5 ROBUSTESSE DE LA MÉTHODE

#### 5.1 Vérification des produits critiques avant première utilisation.

Les produits critiques pour la focalisation (Ampholytes), la détection immunologique (Anticorps primaires et secondaires) et la révélation chimiluminescente (Streptavidine peroxydase) sont testés avant leur utilisation. Chaque nouveau flacon ou lot est ainsi comparé et validé en comparaison du précédent, suivant le mode opératoire **M-VPt-01**.

#### 5.2 Influence de la préparation des échantillons

##### 5.2.1 Rendement de la préparation.

Douze urines provenant de sujets indemnes de toutes injections d'EPO recombinante sont testées. Six d'entre elles sont enrichies et dosées à 650 UI/l en EPO BRP, les six autres étant enrichies et dosées à 200 UI/l en Aranesp®.

La préparation des ces urines est effectuée selon le mode opératoire **M-Ex-25** avec détermination de la quantité d'EPO recombinante retrouvée à l'issue des étapes suivantes :

Ajout du tampon Tris-HCl 3,75M, Complete™ et microfiltration par Stériflip® **R1**.

Ultrafiltrations Centricon 20® et Microcon® **R2**

Rendement global **R = R1xR2**

Les moyennes et écarts type des rendements de la quantité d'EPO recombinante BRP et Aranesp® sont reportées dans le tableau ci-après.

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R</b>
Enrichissement en BRP	89,5 (SD= 6,4)	83,4 (SD= 10,5)	74,7 (SD=11,6)
Enrichissement en Aranesp®	97,4 (SD=3,2)	96,0 (SD=4,0)	93,5 (SD=2,9)

Les rendements de la préparation sont jugés satisfaisants.

##### 5.2.2 Stabilité des profils

Neuf urines provenant de sujets indemnes de toutes injections d'EPO recombinante sont testées. Six d'entre elles sont enrichies et dosées à 650 UI/l en EPO BRP, les trois autres étant enrichies et dosées à 200 UI/l en Aranesp®.

La préparation des ces urines est effectuée selon le mode opératoire **M-Ex-25** avec détermination de la quantité d'EPO recombinante retrouvée, et prélèvement d'un aliquot pour l'analyse selon le mode opératoire **M-An-43** à l'issue des étapes suivantes :

-Enrichissement

-Ajout du tampon Tris-HCl 3,75M et Complete™.

-Microfiltration par Stériflip®

-Ultrafiltrations Centricon 20® et Microcon®

Une urine de concentration élevée en EPO endogène (267 UI/l) est traitée de la même manière.

Les valeurs d'isoformes basiques (enrichissement BRP), d'isoformes acides (enrichissement Nesp), de chaque essai ainsi que les moyennes correspondantes aux différentes étapes de préparation sont reportées dans les deux tableaux ci après :

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### *Enrichissement en BRP : % isoformes colocalisées avec la BRP*

Sujets	Avant préparation	A l'issue de : T18 3,75 + Complete™	A l'issue de : Stériflip®	A l'issue de : Ultrafiltrations
A	97,8	98,6	98,3	99,7
B	97,8	99,1	97,2	97,8
C	99,2	99,1	96,9	98,7
D	98,2	96,1	98,4	97,5
E	98,2	96,5	98,3	97,3
F	98,8	98,8	97,8	98,2
<b>Moyenne</b>	<b>98,33</b>	<b>97,95</b>	<b>97,83</b>	<b>98,21</b>

### *Enrichissement en Nesp : % isoformes colocalisées avec la Nesp*

Sujets	Avant préparation	A l'issue de : T18 3,75 + Complete™	A l'issue de : Stériflip®	A l'issue de : Ultrafiltrations
B	91,9	93,7	94,3	92,2
C	91,8	93,5	90,2	90,2
E	92,8	93,4	94,3	94,0
<b>Moyenne</b>	<b>92,17</b>	<b>93,53</b>	<b>92,93</b>	<b>92,13</b>

Pour l'urine ayant une concentration en EPO endogène, les isoformes basiques et acides sont reportées :

Sujets	Avant préparation	A l'issue de : T18 3,75 + Complete™	A l'issue de : Stériflip®	A l'issue de : Ultrafiltrations
EPO endogène Isoformes basiques	63,2	63,2	67,8	66,7
EPO endogène Isoformes acides	5,6	6,4	4,7	3,7

Les enrichissements en EPO recombinantes sont tels que la participation de l'EPO endogène au profil est nulle. Par conséquent, on peut effectuer une moyenne des valeurs obtenues par tous les sujets à chaque étape de la préparation. Pour les urines enrichies en BRP et Nesp, les moyennes observées aux différentes étapes suivant l'enrichissement sont comparées aux moyennes observées avant toute étape de préparation. Ces dernières sont affectées des incertitudes de mesure évaluées lors de l'étude de reproductibilité pour des valeurs de « % d'isoformes colocalisées » de même ordre. Ainsi, l'écart type de 1,81 observé lors de l'étude de reproductibilité pour un enrichissement à la BRP de 250 UI/l permet d'estimer l'incertitude à 3,62 pour un % d'isoformes voisin de 93,5%.

L'intervalle de confiance de la moyenne observée avant toute préparation sera donc pour l'enrichissement en BRP :  $98,33 \pm 3,62$ .

De la même façon, l'intervalle de confiance de la mesure observée avant toute préparation sera pour l'enrichissement en Nesp :  $92,17 \pm 1,52$

Toutes les moyennes des résultats obtenus à l'issue de chaque étape de préparation sont comprises dans ces intervalles.

Une unique urine de concentration élevée en EPO endogène a été étudiée. Les incertitudes calculées lors de l'étude de reproductibilité de l'urine témoin 1 (page 18), peut être appliquée aux valeurs d'isoformes basiques et acides retrouvées avant préparation de l'urine étudiée. (respectivement 8,22 et 2,90). Les valeurs trouvées à l'issue des différentes

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

étapes de préparation sont incluses dans l'intervalle de confiance calculé à partir des ces incertitudes.

Le résultat des analyses montre qu'il n'existe aucune dénaturation ou modification du profil isoélectrique des EPO recombinantes et endogène.

### 5.2.3 Incertitude du résultat

Deux urines de 24 h d'un sujet exempt de toute administration d'EPO recombinante sont étudiées.

- L'urine U1 est surchargée pour une moitié à 40UI/l en Epoétine et pour l'autre moitié à 10 UI/l en Darbéoétine. Ces urines sont aliquotées, congelées puis préparées autant de fois qu'elles sont analysées.

- L'urine U2 est surchargée pour une moitié à 35UI/l en Epoétine et pour l'autre moitié à 20 UI/l en Darbéoétine. Ces urines sont préparées en une seule fois. Les deux retentat obtenus sont aliquotés puis congelés avant analyse.

La différence entre les urines U1 et U2 permet donc d'apprécier l'influence de la préparation sur la reproductibilité des résultats.

Moyenne, écart type et coefficient de variation sont calculés et comparés.

	Surcharge en Epoétine	
	Urine U1	Urine U2
n	20	60
Moyenne	72,68	67,62
Ecart type	4,15	5,04
CV	5,71%	7,46%

	Surcharge en Darbéoétine	
	Urine U1	Urine U2
n	20	60
Moyenne	39,93	50,54
Ecart type	3,44	4,19
CV	8,61%	8,29%

Écarts type et coefficients de variation ne sont pas majorés dans la cas de la répétition de la préparation. On peut donc conclure que l'étape de préparation n'influence pas l'incertitude liée au résultat.

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### 5.3 Influence de la température et du temps de chauffage du retentat.

L'effet d'écarts de 5°C centrés sur la température cible de chauffage de 80°C, ainsi que l'effet de variations de temps de traitement de 30 secondes centrées sur le temps cible de 3 minutes sont étudiés. Une urine surchargée en Epoétine et une urine surchargée en Darbepoétine sont préparées suivant M-Ex-25. Les retentats sont chauffés 3 minutes à 75°C et 85°C, et 2min30 et 3min30 à 80°C puis analysés par M-An-43. Les résultats sont comparés par rapport à ces même retentats chauffés 3 minutes à 80°C (n=60) (annexe pages 38 et 39).

Urine surchargée en Epoétine	Urine surchargée en Darbepoétine
n=60	n=60
Moyenne = 67,62	Moyenne = 50,54
Ecart-type = 5,04	Ecart-type = 4,19
Intervalle de confiance (m ± 2SD) = 57,54-77,70	Intervalle de confiance (m ± 2SD) = 42,16-58,92

Influence de la température	
BRP, 75°C, 3 min	65,60
BRP, 85°C, 3 min	61,03
Nesp, 75°C, 3 min	54,54
Nesp, 85°C, 3 min	51,90

Influence du temps	
BRP, 80°C, 3 min30	68,13
BRP, 80°C, 2 min30	66,30
Nesp, 80°C, 3 min30	43,35
Nesp, 80°C, 2 min30	43,50

Tous les résultats obtenus sont compris dans les intervalles de confiance.

On peut donc conclure que les variations de température et de temps autour des valeurs cible de 80°C et 3 minutes, n'ont pas d'effets sur les résultats.

D'autre part les valeurs expérimentales trouvées ont été soumis au test Z par comparaison à la moyenne de référence. (Annexe pages 40 et 41)

L'interprétation de ce test confirme la robustesse du résultat quant au temps et à la température de chauffage du retentat analysé.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 6. LIMITE DE DETECTION

La limite de détection est exprimée en unités arbitraires de luminescence (LAU). Elle est calculée en intégrant 10 pistes dénuées d'EPO. Seul le pic le plus intense de chaque profil étudié est pris en compte. Les valeurs sont reportées ci-après.

	LAU
<i>Piste 1</i>	2200
<i>Piste 2</i>	1842
<i>Piste 3</i>	1745
<i>Piste 4</i>	989
<i>Piste 5</i>	1156
<i>Piste 6</i>	1880
<i>Piste 7</i>	1611
<i>Piste 8</i>	1245
<i>Piste 9</i>	1324
<i>Piste 10</i>	2057
<b>Moyenne</b>	<b>1605</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>408</b>
<b>Ecart-type x2</b>	<b>816</b>
<b>Moyenne + 2 écart-type</b>	<b>2421</b>

La limite de détection du pic le plus intense est alors déterminée par la valeur moyenne de ces pics augmentée de deux écarts-type. Sa valeur est de 2500 LAU.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 7. LIMITE DE QUANTIFICATION

#### 7.1 Échantillon surcharge en Epoétine $\alpha$ ou $\beta$

La limite de quantification est exprimée en unités arbitraires de luminescence (LAU). Elle s'applique au pic le plus intense du profil iso électrique étudié. La caractérisation d'un retentat non dilué a été établie à partir de 60 aliquots de ce retentat . (voir robustesse page 21) Après dilutions successives du retentat, la limite de quantification est définie comme la plus faible valeur, en LAU, de ce pic de telle sorte que la caractérisation du profil reste inchangée . Les valeurs sont reportées ci-dessous.

Limite de quantification BRP	
I max du profil	% isoformes colocalisées
43 363 LAU	69,11
20 633 LAU	64,81
19 137 LAU	70,37
17 387 LAU	71,52
11 755 LAU	66,28
7 852 LAU	61,91
6 012 LAU	77,62

Tous les résultats retrouvés sont compris dans l'intervalle de confiance (57,54-77,70) et donnent des valeurs non atypiques au test Z excepté le point 6012 LAU déclaré atypique. (voir annexe page 42).

La limite de quantification fixée à 10 000 LAU (quatre fois supérieure à la limite de détection) est donc acceptable.

#### 7.2 Échantillon surchargé en Darbépoétine $\alpha$

La limite de quantification est exprimée en unités arbitraires de luminescence (LAU). Elle s'applique au pic le plus intense du profil iso électrique étudié. La caractérisation d'un retentat non dilué a été établie à partir de 60 aliquots de ce retentat . (voir robustesse page 21) Après dilutions successives du retentat, la limite de quantification est définie comme la plus faible valeur, en LAU, de ce pic de telle sorte que la caractérisation du profil reste inchangée . Les valeurs sont reportées ci-dessous.

Limite de quantification Nesp	
I max du profil	% isoformes colocalisées
29 355 LAU	49,26
18 281 LAU	48,39
14 516 LAU	53,81
11 333 LAU	48,79
9 000 LAU	49,22
5 919 LAU	46,07
3 688 LAU	45,25

Tous les résultats retrouvés sont compris dans l'intervalle de confiance (42,16-58,92) et donnent des valeurs non atypiques au test Z (voir annexe page 43).

La limite de quantification fixée à 10 000 LAU (quatre fois supérieure à la limite de détection) est donc acceptable.

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### 8. STABILITE DE L'ECHANTILLON A -20 °C

Trois échantillons urinaire témoins aliquotés et conservés à -20°C ont été suivis pendant plusieurs mois. Leurs valeurs respectives sont notées ci-dessous :

<i>Témoin négatif 008 Évaluation du % d'isoformes basiques</i>					
Jour de préparation	% d'isoformes basiques	Jour de préparation	% d'isoformes basiques	Jour de préparation	% d'isoformes basiques
28/07/2002	16,4	18/09/2002	21,3	29/10/2002	21,4
01/08/2002	25,9	18/09/2002	23,3	29/10/2002	20,3
30/08/2002	26,8	26/09/2002	22,6	31/10/2002	26,9
30/08/2002	19,1	30/09/2002	21,9	20/11/2002	19,5
30/08/2002	17,0	02/10/2002	22,4	05/12/2002	18,6
04/09/2002	18,6	04/10/2002	24,4	06/12/2002	17,8
04/09/2002	20,9	04/10/2002	19,6	09/12/2002	20,7
13/04/2002	12,4	08/10/2002	17,0	10/01/2003	14,3
13/09/2002	20,1	11/10/2002	20,0	15/01/2003	16,2
13/09/2002	21,5	23/10/2002	20,3	16/01/2003	18,6
Moyenne	20,19	Ecart-type	3,37	Coeff de variation	16,68%

<i>Témoin négatif 010 Évaluation du % d'isoformes acides</i>					
Jour de préparation	% d'isoformes acides	Jour de préparation	% d'isoformes acides	Jour de préparation	% d'isoformes acides
		26/07/03	7,3	26/08/03	8,7
10/07/03	7,1	29/07/03	7,2	27/08/03	8,4
15/07/03	15,1	01/08/03	12,2	27/08/03	15,2
16/07/03	13,4	20/08/03	16,8	29/08/03	9,0
17/07/03	10,3	21/08/03	11,9	30/08/03	8,3
21/07/03	11,9	23/08/03	9,7	30/08/02	9,2
22/07/03	8,1	23/08/03	8,7	31/08/03	10,5
23/07/03	10,9	24/08/03	10,5	02/09/03	13,1
24/07/03	9,6	25/08/03	9,7	03/09/03	14,2
24/07/03	12,5	26/08/03	7,4		
Moyenne	10,60	Ecart-type	2,67	Coeff de variation	25,17%

<i>Témoin négatif 005 Évaluation du % d'isoformes basiques</i>			
Jour de préparation	% d'isoformes basiques	Jour de préparation	% d'isoformes basiques
29/05/2002	14,4	08/07/2002	24,5
05/06/2002	19,5	09/07/2002	18,6
10/06/2002	17,2	12/07/2002	17,9
10/06/2002	17,4	12/07/2002	22,2
10/06/2002	22,7	16/07/2002	21,5
25/06/2002	22,0		
26/06/2002	18,9		
		Moyenne	19,73
		Ecart-type	2,88
		Coeff de variation	14,62%

Après études statistiques (voir annexe page 44), on peut conclure que la durée de congélation d'un échantillon n'a pas d'influence sur la caractérisation des profils EPO.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 9. CONCLUSION

La méthode de caractérisation de l'EPO, décrite dans ce document, permet de calculer un pourcentage d'isoformes colocalisées avec les Epoétines  $\alpha$  et  $\beta$  et un pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine  $\alpha$  d'un profil échantillon urinaire témoin. Ces pourcentages sont obtenus par comparaison du profil étudié avec les profils de références constituées d'EPO recombinantes (Epoétine  $\alpha$  et  $\beta$  et Darbépoétine  $\alpha$ ).

L'incertitude sur le pourcentage d'isoformes colocalisées avec les Epoétines  $\alpha$  et  $\beta$  est de 10 % dans les valeurs proche du « Cut-off » définie à 75%.

L'incertitude sur le pourcentage d'isoformes colocalisées avec la Darbépoétine  $\alpha$  est de 6 % dans les valeurs proche du « Cut-off » définie à 58%.

La limite de détection, exprimée en unité arbitraire de luminescence, est 2500 LAU. La limite de quantification est estimée à 10 000 LAU.

---

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

---

**10. RÉFÉRENCES DES RÉACTIFS ET CONSOMMABLES UTILISÉS**

<b>Références</b>	<b>Fournisseurs</b>	<b>Références</b>
Érythropoïétine BRP	Conseil de l'Europe	E1515000
Aranesp	Amgen	NM321
Érythropoïétine humaine urinaire	NIBSC	67/343

<b>Réactifs</b>	<b>Fournisseurs</b>	<b>Références</b>
Acide acétique glacial	Farmitalia Carlo Erba	401 422
Acide chlorhydrique 12N 37%	Farmitalia Carlo Erba	403 871
Acide orthophosphorique	Panreac	131032
Acrylamide / Bis-Acrylamide	WWR International	1 006 340 042
Albumine bovine	Sigma Aldrich Fluka	A 78 88
Alcool éthylique	Farmitalia Carlo Erba	414 577
Alcool méthylique RPE ACS	Farmitalia Carlo Erba	414 816
Ampholytes 2-4 : "Servalyt 2-4"	Coger	42 902 - 02
Ampholytes 4-6 : "Servalyt 4-6"	Coger	42 904 - 02
Ampholytes 6-8 : "Servalyt 6-8"	Coger	42 906 - 01
Anti IgG de souris biotinylé (chèvre)	Perbio	31800
APS : Ammonium Peroxodisulfate	WWR International	443 074 F
Complete	Roche Diagnostics	183 61 45
DTT : Dithiotréitol	Sigma Aldrich Fluka	D 97 79
Eau doublement distillée	Farmitalia Carlo Erba	307 586
Glycine (Acros)	Coger	22 091.- 00 10
Human EPO Quantikine IVD	R&D	DEP 00
Réactif de luminescence « SuperSignal »	Perbio	34 095
Monoclonal anti-human EPO Ab "AE7A5"	R&D	MAB 28 71
Pepstatin A	Sigma Aldrich Fluka	P 53 18
PBS : Posphate Buffered Saline tablets	Sigma Aldrich Fluka	P 44 17
Streptavidine Peroxidase	Abcys	GO 14 61
Sucrose	Amersham-Biosciences	US 21 938
TEMED	Amersham-Biosciences	17-1312-01
Tris (Acros)	Coger	32 736 - 00 10
Tween 80 : "Surfact-Amps 80"	Perbio	283 228 Z
Urée plus One	Amersham-Biosciences	17 - 1319 - 01

<b>Consommables</b>	<b>Fournisseurs</b>	<b>Références</b>
"Microcon YM30"	Millipore	42410
"Centricon Plus-20"	Millipore	UFC2 LTK 24
"Gelbond Pag Film"	Amersham-Biosciences	80 - 1129 - 36
Membrane "Immobilon" 0,45 µm	Millipore	IPVH 000 10
Membrane "Durapore" 0,65 µm	Millipore	DVPP 000 10
Microtubes 0,2 mL en barrettes	WWR International	14 355 - 170
"Electrode Paper Novablot"	Amersham-Biosciences	80 - 1106 - 19
Parafilm	Fisher Scientific	A 126 80 10
"Sample Application Pieces"	Amersham-Biosciences	80 - 1129 - 46
Stériflip	Millipore	SCGP 00 525
"Electrode Strips IEF"	Amersham-Biosciences	18 - 1004 - 40

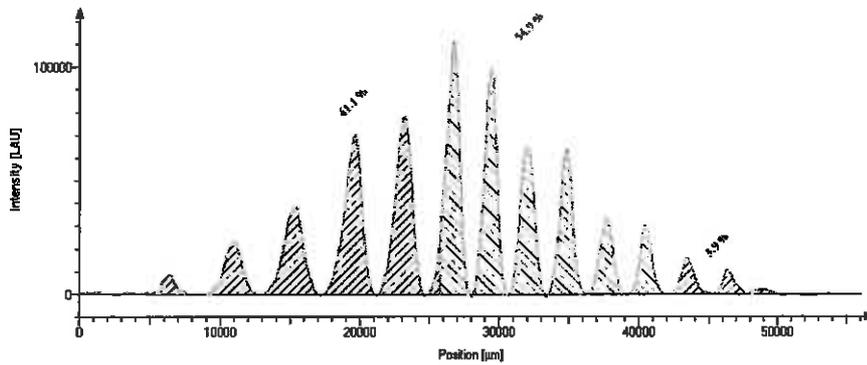
---

# LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

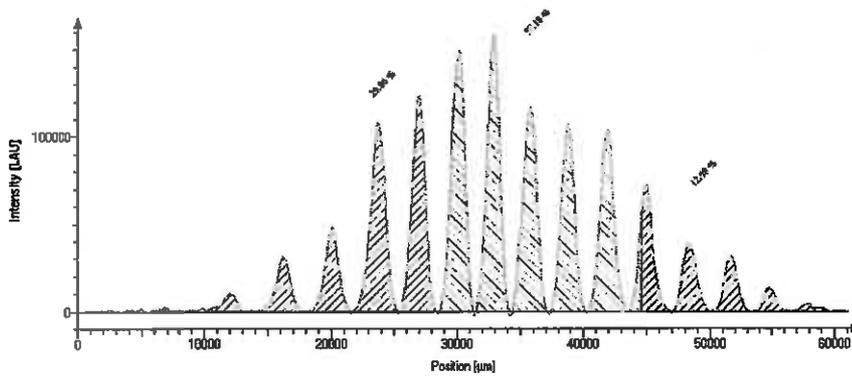
---

## 11. PROFILS DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS

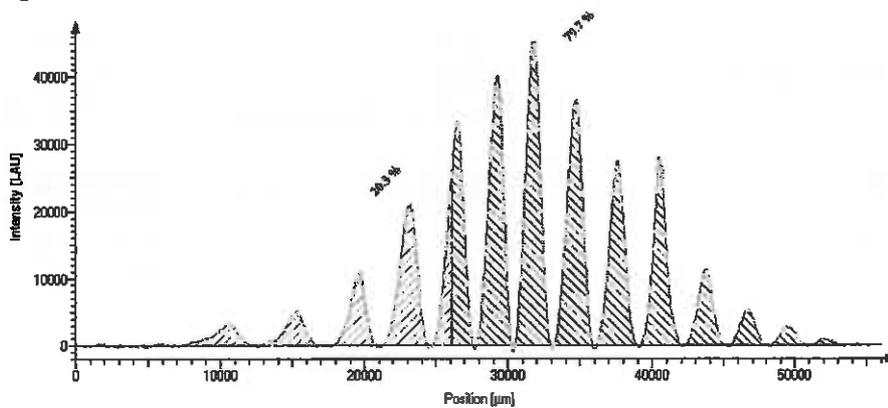
Urine témoin



EPO Naturelle NIBSC



Témoin négatif 008

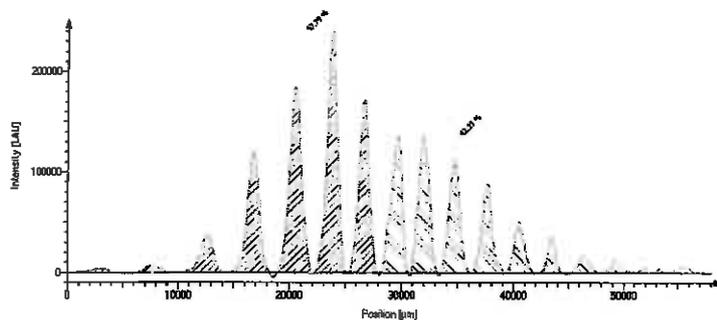


---

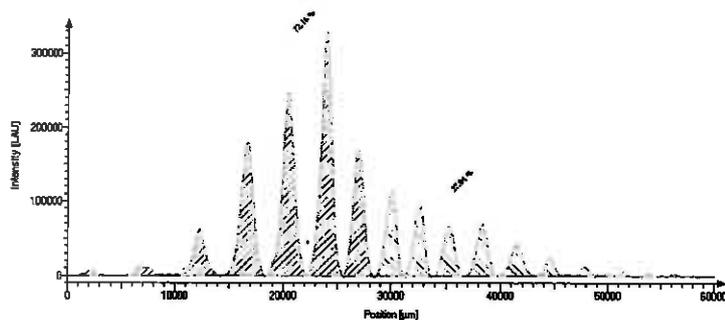
## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

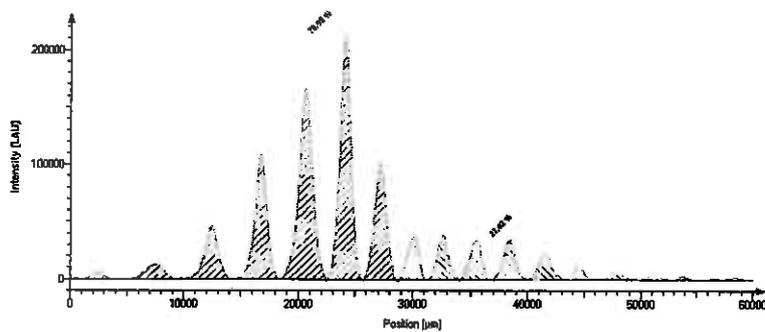
Urine + 15 UI/l BRP



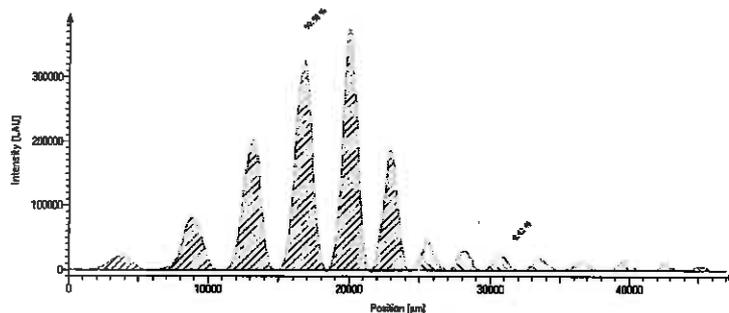
Urine + 40 UI/l BRP



Urine + 80 UI/l BRP



Urine + 250 UI/l BRP

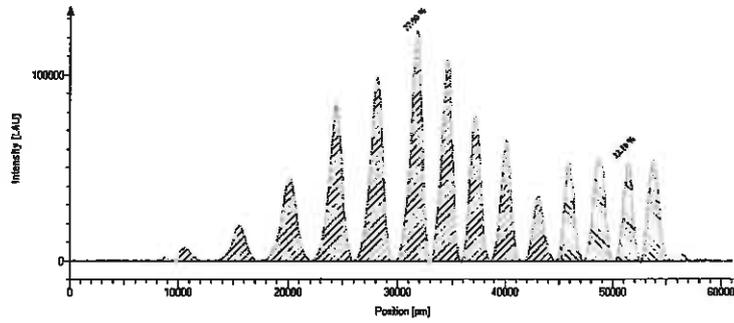


---

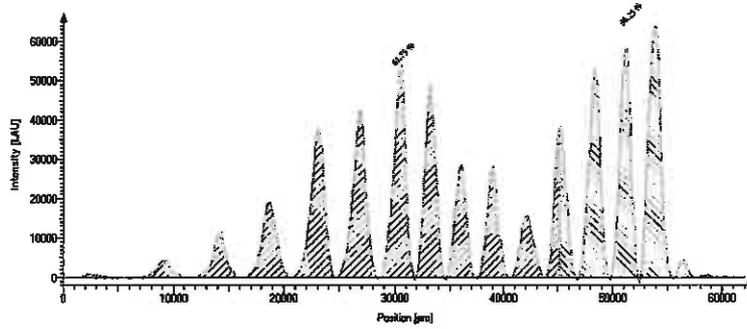
## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

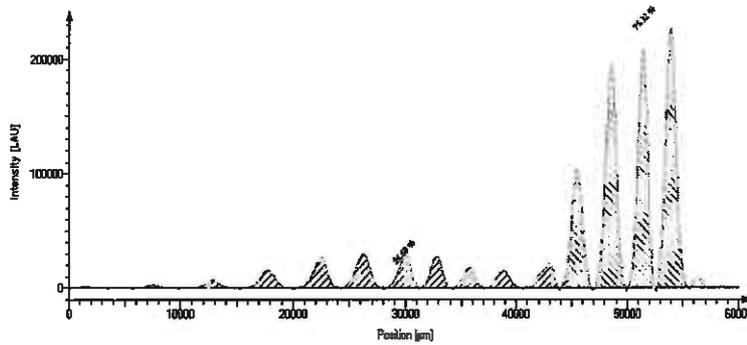
Urine + 4UI/l Aranesp



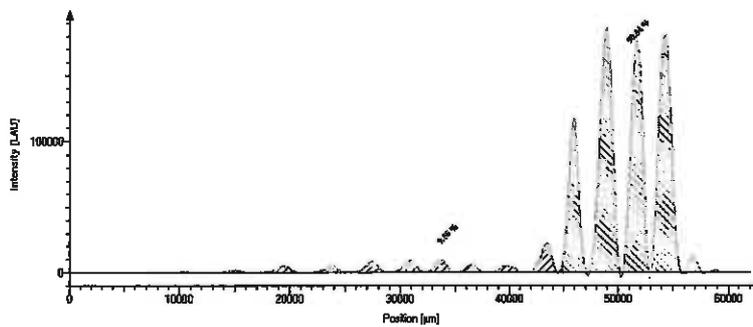
Urine + 10 UI/l Aranesp



Urine + 50 UI/l Aranesp



Urine + 200 UI/l Aranesp



---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 12. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les normes des paramètres analysés (pourcentage basique et pourcentage acide) ont été définies à partir des résultats obtenus avec des échantillons urinaires provenant d'une population témoin.

Les résultats ont fait l'objet d'études statistiques ci joints.

Un risque pour 1/100 000 a été choisi.(voir annexe)

#### 10.1 Cas de l'Epoétine $\alpha$ et $\beta$

Le seuil de présence d'EPO recombinante d'un échantillon urinaire est établi à un pourcentage d'isoformes basiques de son profil supérieur ou égal à 75 %.

L'incertitude élargie liée à cette mesure est 10.

La classification des résultats est établi comme suit :

Résultats négatifs : Intensité maximale du pic le plus élevé du profil (I max) > limite de détection et pourcentage d'isoformes colocalisées (%IC) <65  
Commentaire : « Absence d'EPO recombinante »

Résultats positifs :  
-I max >limite de quantification  
-%IC>85  
-Intensité relative de la bande n°2 < 5% (voir figure 2 page 9)  
-Intensité de la bande n°3 < intensité de la bande n°4 (voir figure 2 page 9)  
-Test d'activité négatif  
-Aucune différence notable entre les profils obtenus lors de l'analyse de screening et de confirmation.  
-Commentaire : « Présence d'EPO recombinante »

Résultats inclassables :- I max<limite de détection  
ou limite de détection<I max<limite de-quantification et %IC>65  
Commentaire : « résultat inclassable-raison : EPO indétectable »  
-I max >limite de quantification et  $65 \leq \%IC \leq 85$   
Commentaire : « résultat inclassable-raison incertitude de mesure »  
- I max>limite de quantification et %IC>85 et test d'activité positif  
Commentaire : « résultat inclassable-raison : échantillon dégradé impropre à l'analyse »  
- Présence d'un artefact invalidant l'analyse  
Commentaire : « résultat inclassable-raison : présence d'un artefact invalidant l'analyse »

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 10.2 Cas de la Darbépoétine

Le seuil de présence d'EPO recombinante d'un échantillon urinaire est établi à un pourcentage d'isoformes acides de son profil supérieur ou égal à 58 %.  
L'incertitude élargie liée à cette mesure est 6.

La classification des résultats est établi comme suit :

Résultats négatifs : Intensité maximale du pic le plus élevé du profil ( $I_{max}$ ) > limite de détection et pourcentage d'isoformes colocalisées (%IC) <52  
Commentaire : « *Absence d'EPO recombinante* »

Résultats positifs :  $I_{max}$  > limite de quantification et %IC > 64  
Commentaire : « *Présence d'EPO recombinante* »

Résultats inclassables :-  $I_{max}$  < limite de détection  
ou limite de détection <  $I_{max}$  < limite de quantification et %IC > 52  
Commentaire : « *résultat inclassable-raison : EPO indétectable* »  
-  $I_{max}$  > limite de quantification et  $52 \leq \%IC \leq 64$   
Commentaire : « *résultat inclassable-raison incertitude de mesure* »  
- Présence d'un artefact invalidant l'analyse  
Commentaire : « *résultat inclassable-raison : présence d'un artefact invalidant l'analyse* »

La classification des résultats est reportée dans l'instruction **I-Lec-09**.

---

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des  
Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

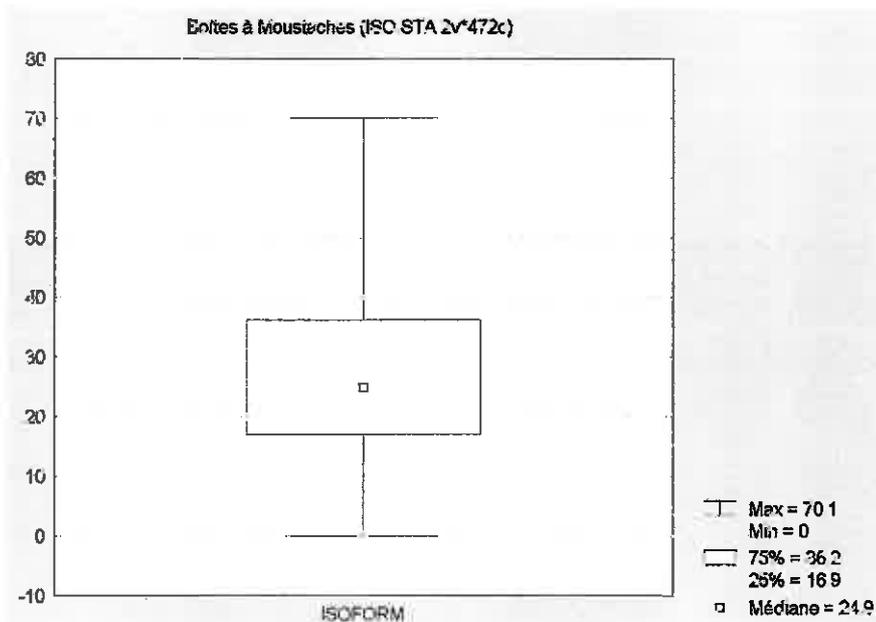
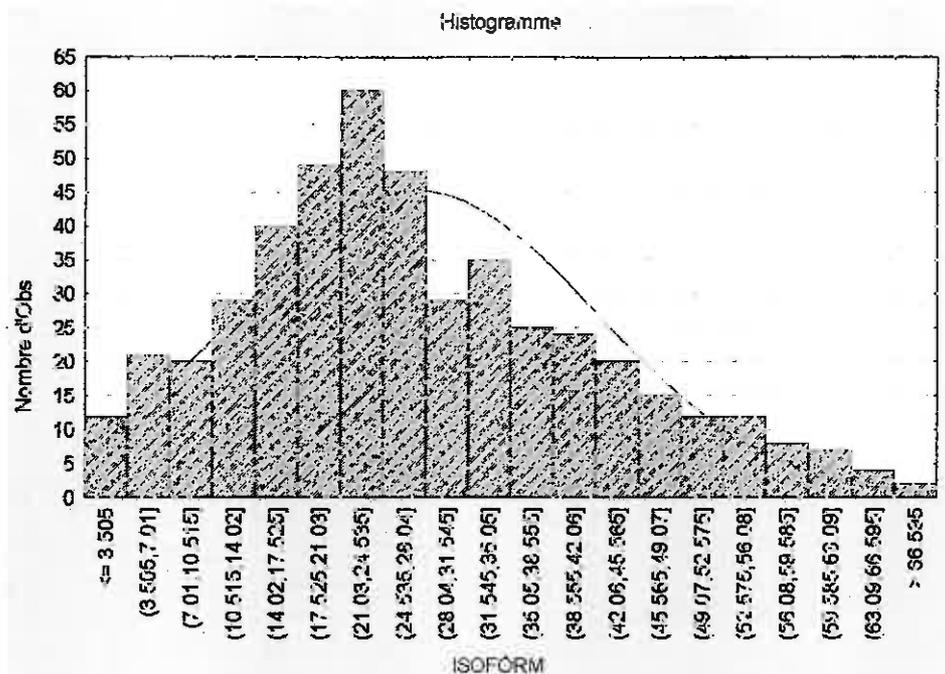
---

**13. ANNEXES**

# LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

## Détermination du « Cut-off » des isoformes colocalisées avec l'Epoétine

### I – Représentations graphiques de la variable « % isoformes basiques »



## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### II – Statistiques élémentaires

STAT. ELEMENT. (Suppression des Observ. à 0)												
Variable	Effectif	Moyenne	Médiane	Minimum	Maximum	1er Quartile	2ème Quartile	3ème Quartile	Standard Ecarts	Et-Tota	Asymétrie	Aplatiss
EPOR	472	27.33602	24.90000	0.00	70.10000	16.90000	36.20000	70.10000	19.30000	14.59336	.513513	-.228005

#### Description

- pourcentage moyen obtenu : 27.34%
- dispersion : en moyenne, les individus obtiennent des valeurs comprises entre 13% et 42%
- 1 individu sur 2 obtient une valeur de 25%
- la moitié des individus a une valeur comprise entre 17% et 36%
- un quart des individus obtient moins de 17%
- un quart des individus obtient plus de 36%

Coefficient d'asymétrie assez faible (.51 ; proche de 0)

Test de normalité de Kolomogorov-Smirnov : d = .074 ; limite de la significativité

Test de normalité de Shapiro-Wilk : W = .955 ; significatif à .01

**Conclusion :** ajustement presque normal... Avec asymétrie à droite (moyenne > médiane) ; ce qui laisse supposer que les données sont influencées par les valeurs extrêmes à droite. La distribution se trouve ainsi légèrement décalée par rapport à une distribution normale.

**Suggestion :** calculer les probabilités sur une distribution ajustée aux données, c'est-à-dire décaler la valeur centrale vers la gauche pour se rapprocher de la médiane et du mode. Pour une distribution normale, on donne  $\mu = 0$  et  $\sigma = 1$  ; ici, on suggère de donner la valeur :

$\mu = -1$  car aucun autre ajustement ne convient sur ces valeurs numériques (Bêta, Gamma, etc.).

#### 1 Calcul de probabilités sur ajustement Normal avec recalcul du paramètre $\mu = -1$

Risque 1/25 000 (soit  $p = .99996$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de **70.20%**

(0 sujet sur 472 a une valeur égale ou supérieure à 70.20% ; ce qui représente 0% de l'échantillon testé)

Risque 1/30 000 (soit  $p = .999966667$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de **70.83%**

Risque 1/50 000 (soit  $p = .99998$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de **72.57%**

Risque 1/100 000 (soit  $p = .99999$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de **74.86%**

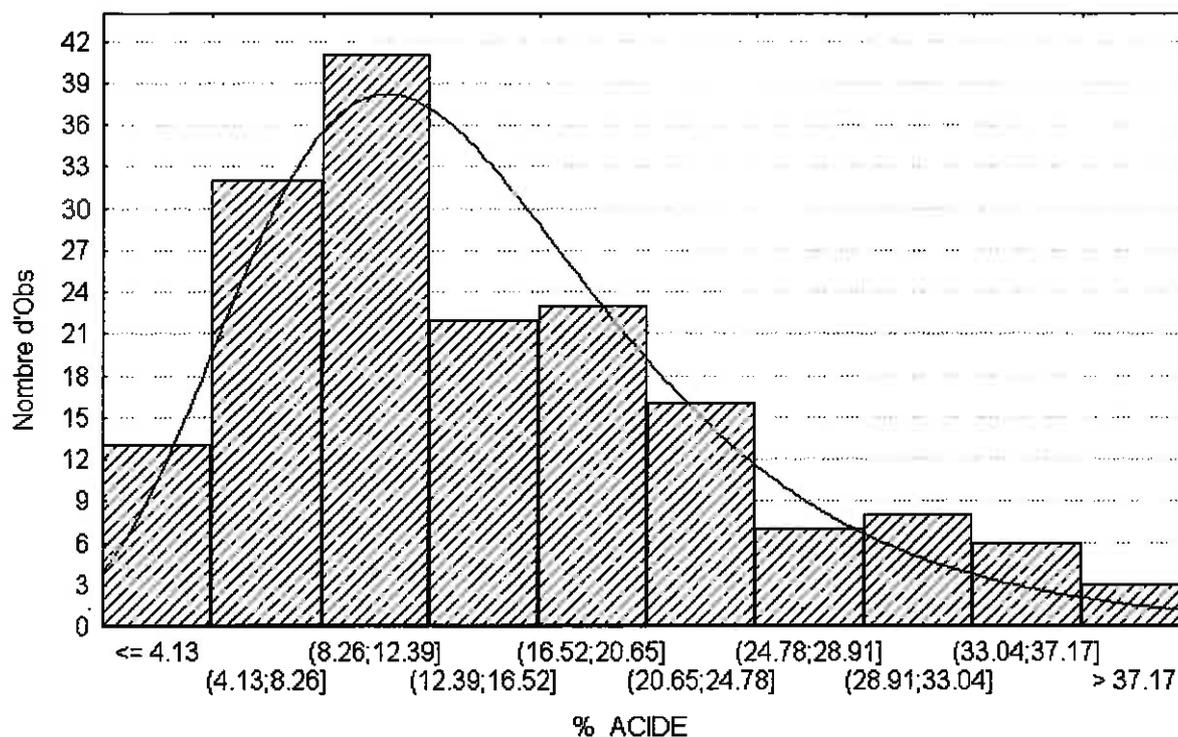
Risque 1/500 000 (soit  $p = .999998$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de **79.9%**

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

**Détermination du « Cut-off » des isoformes colocalisées avec la Darbépoétine**

**Histogramme "% Acide" (n = 171)**

Ajustement "Extrême" de Gumbel



STAT. ELEMENT.	N	Actifs	Moyenne	Médiane	Minimum	Maximum	1 <sup>er</sup> Quartile	3 <sup>ème</sup> Quartile	Écart-type	Asymétrie	
%_ACIDE	171		14.770	12.200	0.00	41.300	8.1000	19.900	11.800	8.9808	.8772

**Les indices de centralité :**

moyenne = 14.77 et médiane = 12.20 indiquent que la distribution est légèrement dissymétrique vers la droite (la moyenne est influencée par les valeurs élevées et la différence moyenne/médiane est d'environ 2.57 unités).

1 individu testé sur 2 obtient un indice inférieur à 12.20

**Représentation de la distribution :**

25% des individus testés ont un indice inférieur à 8.10 (1<sup>er</sup> quartile)

25% des individus testés ont un indice supérieur à 19.90 (3<sup>ème</sup> quartile)

Cette dernière constatation peut être exprimée sous la forme : 75% des individus testés obtiennent moins de 19.90

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### *Les indices de dispersion :*

Ecart-type = 8.98 indique que les valeurs s'étendent en "moyenne" entre 5.79 et 23.75

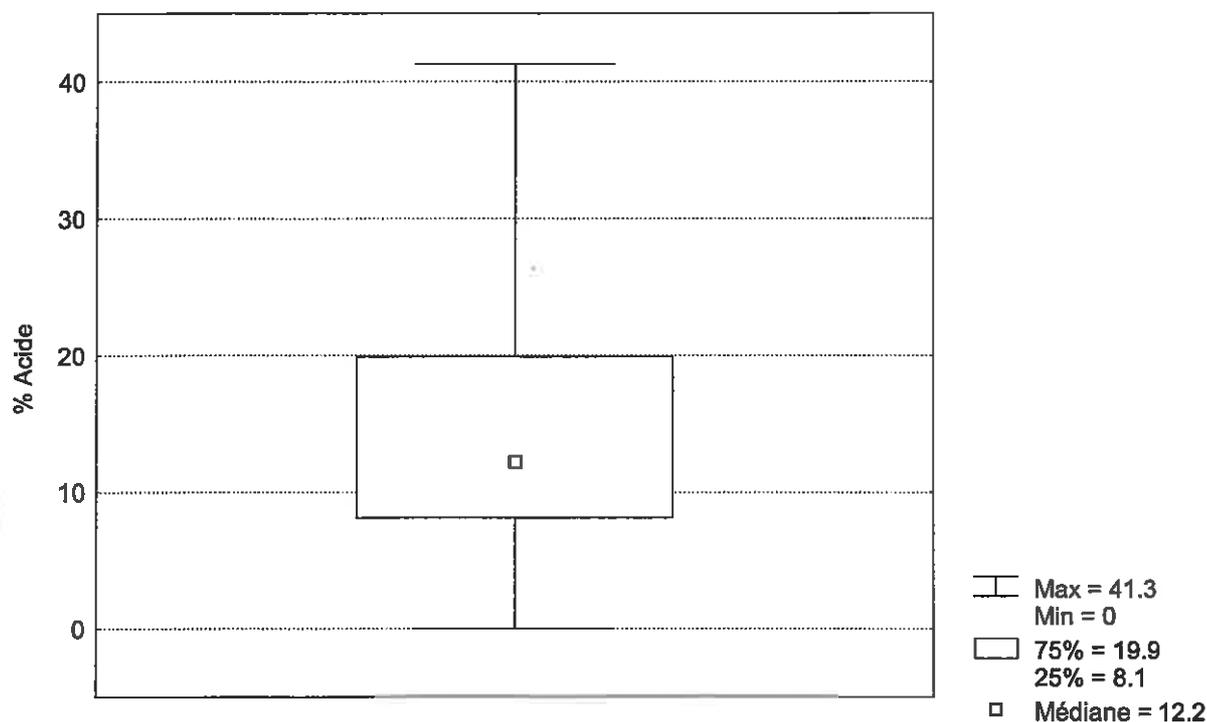
Etendue = 41.30 (différence entre la valeur minimale qui est égale à .000 et valeur maximale qui est égale à 41.30)

Etendue inter-quartile : la dispersion entre le 3<sup>ème</sup> quartile et le 1<sup>er</sup> est de 11.80 unités

En d'autres termes, 50% de la population testée obtient des valeurs comprises entre 8.10 et 19.90.

Ces différents indicateurs sont illustrés Figure 2, ci-après :

**FIGURE 2 : Boîte à Moustaches "% Acide" (n = 171)**



### **Calcul de probabilités sur ajustement de la distribution des 171 témoins**

*Compte tenu de la dissymétrie positive de la distribution des témoins (approximativement normale avec asymétrie sur la droite), nous avons opéré un ajustement en tenant compte, d'une part de la dispersion, et d'autre part du coefficient d'asymétrie et de l'erreur-type de l'asymétrie. En valeurs centrées réduites, cet ajustement ramène la moyenne à -1 et l'écart-type à 0.9 ; ce qui est proche de la distribution "Extrême" de Gumbel.*

---

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des  
Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

---

**Si cette distribution sert de distribution de référence, on peut donner comme valeurs repères (seuil unilatéral) :**

Risque 1/25 000 (soit  $p = .99996$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de 55.51

Risque 1/30 000 (soit  $p = .99997$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de 56.05

Risque 1/50 000 (soit  $p = .99998$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de 56.86

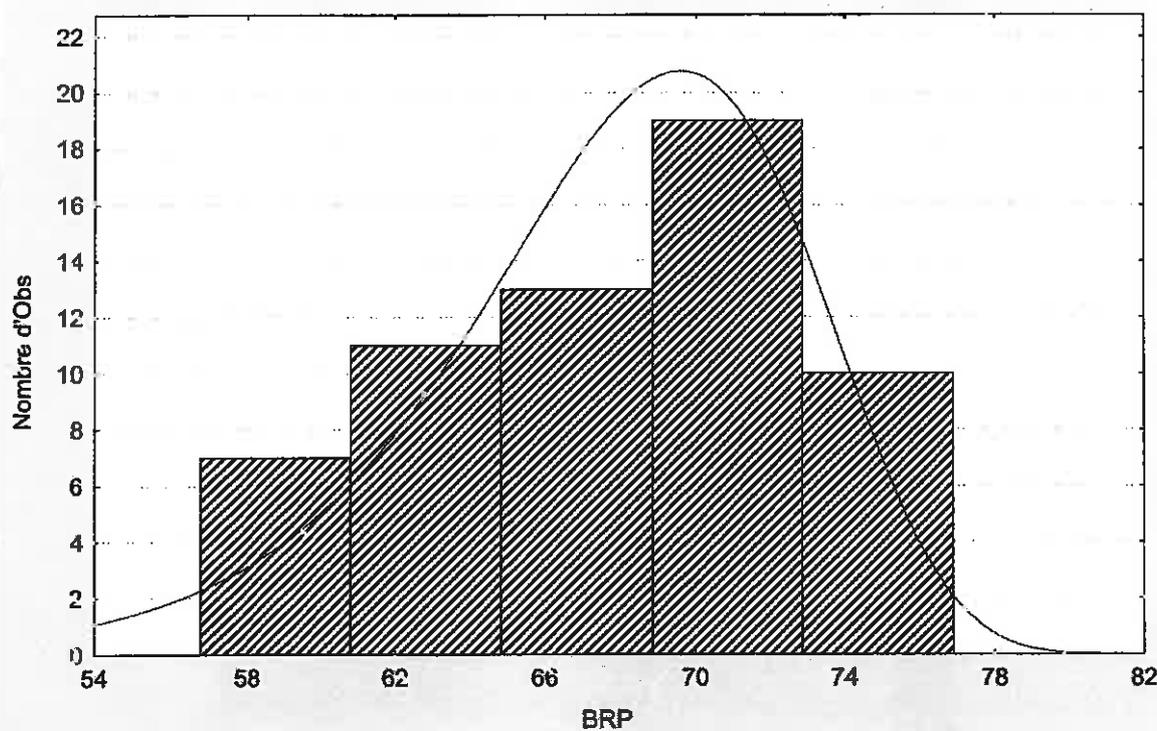
Risque 1/100 000 (soit  $p = .99999$ ) ; valeur déclarée atypique à partir de 58.11

Risque 1/500 000 (soit  $p = .999998$ ) ; valeur déclarée atypique à partir 60.89

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

**Robustesse de la méthode  
Étude de la variable de référence BRP**

STAT. ELEMENT.	N. d'Obs	Moyenne	Médiane	Minimum	Maximum	1er Quartile	2ème Quartile	3ème Quartile	Écart-type	Asymétri	Aplosiss
BRP	60	67.623	68.565	56.790	76.910	63.815	71.540	77.250	5.0449	-.4389	-.6434

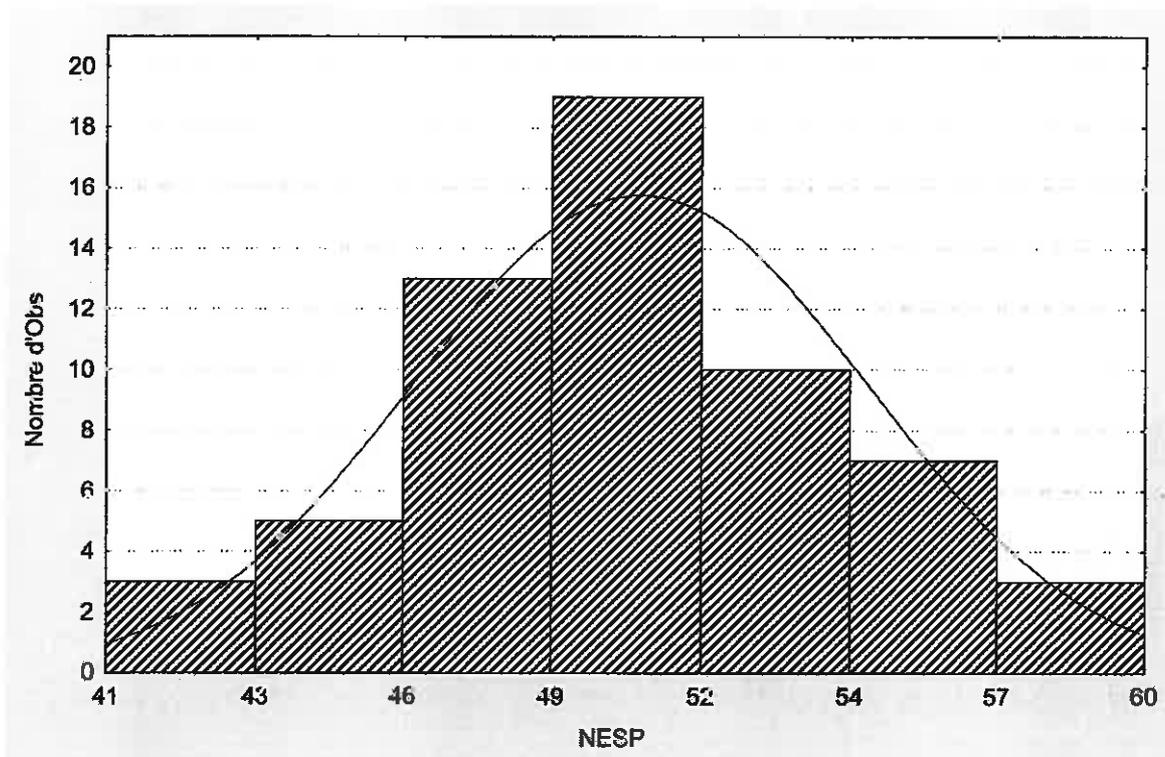


Distribution légèrement dissymétrique à gauche (Moyenne < Médiane) ; mais ajustement possible avec la Loi Normale (faible valeur du coefficient d'asymétrie)

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### 2 Étude de la variable de référence NESP

STAT. ELEMENT.	N	Moyenne	Mediane	Minimum	Maximum	1er Quantile	2eme Quantile	Quantile Standard	Ec-Type	Asym str	Skellat
NESP	60	50.541	50.375	40.630	59.950	47.905	53.205	5.3000	4.1895	.1547	-.0048



Distribution homogène. Ajustement également possible.

**Conclusion :** les 2 distributions permettent l'utilisation de la statistique Z (comparaison d'une valeur à une moyenne de référence)

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### Influence de la température, du temps, des différentes quantifications pour BRP et NESP

Afin d'étudier les différentes influences et savoir si les valeurs obtenues à partir des 2 échantillons varient significativement des moyennes issues des distributions de référence, nous utiliserons le test Z pour la comparaison d'une valeur à une moyenne de référence.

Un échantillon sera déclaré atypique de la distribution de référence au seuil  $p = 0.025$  (seuil unilatéral).

### 1) Étude de l'influence de la température

#### **Moyenne de référence : $Moy(M) = 67.623$**

**a) BRP, 75°, 3 mn**

$X = 65.60$ .  $d = -2.02$ .  $Z = -0.404$  ;  $p = 0.34$ . Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**b) BRP, 85°, 3 mn**

$X = 61.03$ .  $d = -6.59$ .  $Z = -1.318$  ;  $p = 0.09$ . Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

#### **Moyenne de référence : $Moy(M) = 50.641$**

**c) NESP, 75°, 3 mn**

$X = 54.54$ .  $d = 4.00$ .  $Z = 0.963$  ;  $p = 0.17$ . Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**d) NESP, 85°, 3 mn**

$X = 51.99$ .  $d = 1.45$ .  $Z = 0.349$  ;  $p = 0.36$ . Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**Conclusion :** Quelle que soit la température utilisée (à 75° ou 85°), et quelle que soit la variable étudiée (BRP ou NESP), la température ne semble pas avoir d'influence à 3 mn.

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 2) Etude de l'influence du temps

#### **Moyenne de référence : $Moy(M) = 67.623$**

**a) BRP, 80°, 3.30 mn**

X = 68.13. d = 0.51. Z = 0.297 ; p = 0.38. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**b) BRP, 80°, 2.30 mn**

X = 66.36. d = -1.26. Z = -0.253 ; p = 0.40. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

#### **Moyenne de référence : $Moy(M) = 50.641$**

**c) NESP, 80°, 3.30 mn**

X = 43.35. d = -7.19. Z = -1.731 ; p = 0.04. Résultat Non Significatif au seuil unilatéral .025. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**d) NESP, 80°, 2.30 mn**

X = 43.50. d = -7.04. Z = -1.695 ; p = 0.04. Résultat Non Significatif au seuil unilatéral .025. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

<b>Conclusion : pour BRP ou NESP, à 80°, le temps ne semble pas avoir d'influence.</b>
--

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 3) Etude de la quantification pour BRP

**Moyenne de référence : Moy(M) = 67.623**

**a) 43 363 LAU**

X = 69.11. d = 1.49. Z = 0.297 ; p = 0.38. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**b) 20 633 LAU**

X = 64.81. d = -2.81. Z = -0.562 ; p = 0.29. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**c) 19 137 LAU**

X = 70.37. d = 2.75. Z = 0.549 ; p = 0.29. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**d) 17 387 LAU**

X = 71.52. d = 3.90. Z = 0.779 ; p = 0.22. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**e) 11 755 LAU**

X = 66.28. d = -1.34. Z = -0.269 ; p = 0.39. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**f) 7 852 LAU**

X = 61.91. d = -5.71. Z = -1.1142 ; p = 0.13. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

**g) 6 012 LAU**

X = 77.62. d = 10.00. Z = 1.998 ; p = 0.022. Résultat Significatif au seuil 0.025 unilatéral. L'échantillon est déclaré atypique de la distribution de référence.

<p><b>Conclusion :</b> de 43 363 LAU à 7 852 LAU, les échantillons ne semblent pas atypiques de la distribution de référence. Ces dilutions n'auraient ainsi pas d'effet. <i>Cependant à 6 012 LAU (d = 10.00 entre la moyenne de référence et la valeur testée), on constate que l'échantillon est atypique de la distribution de référence (avec 2.5 chances sur 100 de se tromper).</i></p>
--

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### 4) Etude de la quantification pour NESP

**Moyenne de référence : Moy(M) = 50.641**

***a) 29 355 LAU***

X = 49.26. d = -1.28. Z = -0.308 ; p = 0.38. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

***b) 18 281 LAU***

X = 48.39. d = 2.15. Z = -0.518 ; p = 0.30. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

***c) 14 516 LAU***

X = 53.81. d = 3.27. Z = 0.787 ; p = 0.22. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

***d) 11 333 LAU***

X = 48.79. d = -1.75. Z = -0.421 ; p = 0.34. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

***e) 9 000 LAU***

X = 49.22. d = -1.32. Z = -0.318 ; p = 0.38. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

***f) 5 919 LAU***

X = 46.07. d = -4.47. Z = -1.076 ; p = 0.14. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

***g) 3 688 LAU***

X = 45.25. d = -5.29. Z = -1.274 ; p = 0.10. Résultat Non Significatif. Échantillon déclaré non atypique de la distribution de référence.

<p><b>Conclusion :</b> Pour NESP, quelle que soit la dilution (de 29 355 LAU à 3 688 LAU), les échantillons ne sont pas atypiques de la distribution de référence.</p>
--

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

### II Stabilité de l'échantillon

#### II.1. Témoin négatif 008

L'échantillon témoin est constitué de 30 unités, dont 14 ont subi une congélation inférieure à 3 mois (groupe 1 : g1), et 16 une congélation supérieure à 3 mois (groupe 2 : g2).

l'échantillonnage a été effectué au hasard, et les dispersions sont relativement homogènes (variances respectivement égales à 13.23 et 8.76 ; variance inter groupe : 0.10). Les deux distributions sont approximativement normales.

##### a) Statistiques descriptives

	g1	g2
Moyenne	20.56	19.88
Variance	13.23	8.76
Variance corrigée	14.25	9.35
Ecart-type	3.64	2.96
Ecart-type corrigé	3.77	3.06
n	14	16

La différence entre les deux moyennes est égale à  $d_{obs} = 0.68$  (différence observée), et peut être descriptivement considérée comme faible.

Pour tester l'effet de la durée de la congélation sur les résultats, on a eu recours à la statistique  $\eta^2 = \frac{V_{inter}}{V_{totale}}$ . Ce rapport donne

le résultat suivant :  $\eta^2 = \frac{0.12}{10.96} = 0.0106$ . Le paramètre "durée de la congélation" ne rend compte que de 1% de la dispersion des résultats, ce qui peut être considéré comme très faible. On en conclut donc que pour cet échantillon de 30 unités, la durée de congélation n'a pas d'influence sur les résultats.

##### b) Statistiques inférentielles

Le test *T* de Student – inférence *fréquentiste* - (pour groupes indépendants :  $t = 0.55$ ) donne un résultat non significatif (test NS au seuil .05). On en conclut donc que si la durée de la congélation n'a pas eu d'effet sur l'échantillon de 30 unités, on peut conclure au même résultat pour une population beaucoup plus vaste.

### *Inférence bayésienne*

**L'inférence fréquentiste ne permet pas de conclure à la compatibilité entre la valeur de l'effet dans la population parente et les données observées. Les conclusions inférentielles dans le cadre fréquentiste portent uniquement sur l'existence et le sens de l'effet, mais pas sur son importance. Avec le cadre bayésien, on cherche à prolonger la conclusion descriptive d'effet important par une garantie notable ; une conclusion descriptive d'effet faible par une garantie négligeable.**

**On dispose au niveau descriptif d'un critère soit sémantique, soit psychométrique, pour pouvoir conclure à l'importance de l'effet.**

---

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

---

*Critère sémantique* : il est donné par le chercheur ou les travaux antérieurs dans le domaine. *Critère psychométrique* : c'est un critère interne aux données. Il est calculé pour ce cas un *Effet Calibré pour des Groupes (d de Cohen)* de la façon suivante :

$$d = \frac{d_{obs}}{s_{int ra}} = \frac{0.68}{3.41} = 0.20$$

Conventionnellement, on compare ensuite cette valeur à 2/3 (soit environ 0.67) pour conclure à un effet important et à 1/3 (environ 0.33) pour conclure à un effet négligeable.

**Si  $d > 2/3 \Rightarrow$  effet important ; si  $d < 1/3 \Rightarrow$  effet négligeable.**

*Pour notre exemple, on peut conclure descriptivement à un effet très faible de la durée de la congélation.*

**Quelle garantie avons-nous de retrouver cet effet négligeable dans une population plus vaste ? C'est là qu'intervient le bayésien.**

Recherche à une garantie donnée

**La recherche de garantie d'effet négligeable consiste à déterminer pour une garantie choisie ( $\gamma$ ) la limite  $l$ , telle que  $P(\delta > l) = \gamma$ . Dans le cadre bayésien, les garanties retenues sont en général  $\gamma = 0.90$  (équivalent dans le cadre fréquentiste au seuil  $\alpha = .10$ ), et  $\gamma = 0.95$  (équivalent dans le cadre fréquentiste au seuil  $\alpha = .05$ ).**

**On prendra ici  $\gamma = 0.95$  (pour mettre en relation les conclusions fréquentiste et bayésienne).**

*Pour ces données, dans 95% des cas, on aura un effet négligeable qui sera inférieur à 2.86.*

Recherche à partir d'une limite donnée :

Si on sait définir une valeur à partir de laquelle l'effet peut être considéré comme important, par exemple, à partir du critère sémantique et/ou du critère psychométrique, ou de la différence observée, on peut obtenir la garantie correspondante à cette limite  $l$ . Nous posons comme limite  $l$ , la différence  $d_{obs} = 0.68$ .

*Pour ces données, on trouvera un effet négligeable inférieur à 0.68 ( $d_{obs}$ ) dans 36% des cas.*

## LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1

### II.1. Témoin négatif 005

L'échantillon témoin est constitué de 12 unités, dont 6 ont subi une congélation inférieure à 2 mois (groupe 1 : g1), et 6 une congélation supérieure à 2 mois (groupe 2 : g2).

l'échantillonnage a été effectué au hasard, et les dispersions sont relativement peu hétérogènes (variances respectivement égales à 8.30 et 5.46 ; variance inter groupe : 0.75). Les deux distributions sont approximativement normales.

#### a) Statistiques descriptives

	g1	g2
Moyenne	18.87	20.60
Variance	8.30	5.46
Variance corrigée	9.96	6.55
Ecart-type	2.88	2.22
Ecart-type corrigé	3.16	2.56
n	6	6

La différence entre les deux moyennes est égale à  $d_{obs} = 1.73$  (différence observée), et peut être descriptivement considérée comme faible.

Pour tester l'effet de la durée de la congélation sur les résultats, on a eu recours à la statistique  $\eta^2 = \frac{V_{inter}}{V_{totale}}$ . Ce rapport donne

le résultat suivant :  $\eta^2 = \frac{0.75}{7.63} = 0.10$ . Le paramètre "durée de la congélation" ne rend compte que de 10% de la dispersion des résultats, ce qui peut être considéré comme très moyen. On en conclut donc que pour cet échantillon de 12 unités, la durée de congélation n'a pas d'influence sur les résultats.

#### b) Statistiques inférentielles

Le test *T* de Student (pour groupes indépendants :  $t = 1.04$ ) donne un résultat non significatif (test NS au seuil .05). On en conclut donc que si la durée de la congélation n'a pas eu d'effet sur l'échantillon de 12 unités, on peut conclure au même résultat pour une population beaucoup plus vaste.

### Bayésien

Effet Calibré pour des Groupes (*d* de Cohen) :

$$d = \frac{d_{obs}}{s_{intra}} = \frac{1.73}{2.87} = 0.60$$

Effet calibré considéré comme moyen.

**Probabilité sur l'effet négligeable : dans 95% des cas, on trouvera un effet de la congélation inférieur à 4.77**

*Probabilité sur la limite  $d_{obs} = 1.73$  : dans 47% des cas, on trouvera un effet inférieur à 1.73 pour ces données.*

---

**LNDD- Analyse par focalisation et double immunoblotting des isoformes des  
Erythropoïétines (EPO) . ES07VA1**

---

**14. DOCUMENTS RELATIFS A LA QUALITE**