

Département des analyses

Mr. Huw Roberts
IAAF Legal Counsel
17, rue Princesse Florestine
BP 359 98007 Monaco

Ref:CAS 2011/A/2353 Erik Tysse v/ Norwegian Athletic Federation & IAAF

Dear Mr. Roberts,

I write in response to your letter of instruction of 20 June 2011 including 15 questions in relation to the finding of CERA in urine samples A and B 3511558 by the WADA-accredited laboratory in Rome.

Background

As a preliminary comment, I would like to indicate that I am the head of the Département des Analyses de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD). The laboratory is accredited by the World Anti-Doping Agency ("WADA") to carry out the analysis of blood and urine samples in order to detect the presence of prohibited substances, including EPO and other Erythropoiesis-Stimulating Agents, as defined in the Prohibited List published by WADA. As my CV shows (*appendix I*), I have been involved in anti-doping work and especially in EPO analysis since 1998. I am the person who developed the urine test for EPO.

Questions & Answers

1. Please explain the development of the IEF analytical method currently used by WADA-accredited laboratories for the detection of recombinant erythropoietin and analogues in doping control samples, and the means by which such method has been validated.

The EPO hormone was included on the list of prohibited substances by the IOC in 1990 but it was only in 2000, just before the Sydney Olympic Games, that anti-doping control of this hormone was validated by the IOC experts. At the time, the strategy consisted of combining an indirect blood test and a direct urine test. The indirect test was designed to demonstrate the erythropoiesis stimulation induced by this hormone while the direct test was designed to establish the presence of the doping agent in urine.

As EPO is naturally produced by the body, the basis of the direct urinary test was to discriminate between the natural hormone and the recombinant exogenous EPO used in cases of doping (see 1 in references). In 2002, the direct urinary test was finally recognised as the only valid method for the detection of recombinant EPO and its analogues.

When the EPO test was first developed, only two forms of recombinant EPO existed: Epoetin alpha and Epoetin Beta. Criteria for identification of these drugs were therefore established and were based on the “percentage of basic isoforms”. The emergence of new forms of recombinant EPO: second generation (NESP), third generation (CERA) and biosimilars of the first generation drugs, meant adapting the identification criteria. These criteria have been defined in the various WADA technical documents on the detection of recombinant EPO (TD2004, TD2007, TD2009).

2. Please comment on the specificity of the IEF method for detecting CERA in urine?

Any test for the detection of recombinant EPO in urine or blood must differentiate between the drug that is used for the purpose of doping, and endogenous EPO that is naturally produced by the human body.

The analysis by isoelectric focusing (IEF) enables such a differentiation. It relies on the fact that naturally produced EPO contains molecules with electrical charges different from those of recombinant EPO. Natural and recombinant EPO will thus migrate differently when placed in an electric field and will show different isoelectric profiles. The method is described in numerous international publications (see references 2-12).

The result of the analysis is an image showing the isoelectric profile of the EPO present in a urine sample.

This image is obtained following a 3-step process as follows:

- The scope of the first step is to concentrate urine with EPO, whose starting level is usually only a few international units by litre (IU/L), corresponding to a couple of tens of ng/L. This is performed by ultra-filtration of urine.
- The second step is the separation of the EPO isoforms (that are the bands composing the isoelectric profile). This is performed by IEF.
- The last step is the detection of these isoforms that constitute the isoelectric pattern of the hormone. This is performed by immuno-blotting.

This last step is critical for the specificity of the method since it relies on the use of antibodies anti-human EPO. It has been necessary to develop a special immune-blotting procedure to get a reliable image of the EPO isoelectric profile. This procedure was named “double-blotting” and has been largely published and patented (see references 2,4,9,14,15 and *appendix 2*).

Initially developed for first generation recombinant EPOs, the IEF method can be applied to all forms of recombinant EPO drugs, in so far as their isoelectric profiles are different from that of natural EPO. It has been successfully used for detection of the second generation recombinant EPO (NESP) and the third generation drug (CERA). The application of the IEF method for detection of CERA has been described in an international scientific publication (see references 10).

After the appearance of CERA on the market in 2007 and intelligence on misuse in sport, the Paris laboratory initiated an internal validation process and sought an extension of its scope of accreditation in 2008 to be able to apply the IEF method for the detection of CERA (both in urine and blood).

Since the principle and the different analytical steps are the same as for the initial validated method, the internal validation of this method for a new recombinant drug essentially consisted in establishing identification criteria for the substance in question and checking that these criteria could not lead to false-positive findings.

Identification criteria were first established from the isoelectric profile of the pure recombinant drug itself. The pattern which was consistently observed from the IEF analysis of pure CERA was the presence of bands displayed in the upper part of the basic area of the IEF gel. This pattern was confirmed in urine samples spiked with CERA and in samples from volunteers having taken CERA (excretion study) (*appendix 3*).

The Paris laboratory reported the first CERA findings during the Tour de France in July 2008. Three of the athletes admitted taking CERA (*appendix 4*). The application and validity of the IEF method for the detection of CERA was subsequently recognised by two CAS panels (TAS 2009/A/1820 Stefan Schumacher c/ Union Cycliste Internationale and TAS 2009/A/2018 Davide Rebellin v/ IOC – *appendix 5 et 6*).

The identification criterion for CERA was discussed and accepted by the WADA working group which is composed of international experts in the field of recombinant EPO detection. The identification criterion for the detection of CERA was included in the 2009 version of the Technical Document on EPO approved by the WADA Executive Committee.

The most important point of the validation was the demonstration of the specificity of this criterion. In the report submitted to COFRAC (accrediting body in France) for ISO accreditation, 135 IEF profiles obtained from IEF analysis for EPO in urine before any authorization for commercialization of CERA (2007) and thus negative for this drug were provided as an example to demonstrate the specificity of the criterion. It is worth mentioning that these profiles were obtained from urine samples taken both at rest and after an intensive physical exercise (effort profiles) in different sports. None of these profiles showed a pattern characteristic of CERA.

The specificity of the IEF method for the detection of CERA is further confirmed by our considerable experience in conducting doping control analysis. Our laboratory analysed 3292 urine samples for the detection of EPO using the IEF method between 2000 and 2007 (when CERA was not available) and in none of samples were the characteristic bands of CERA ever observed.

3. Further to the Panel's order dated 3 June 2011, please document the percentage value for the tests' specificity for CERA.

The criterion for CERA identification is not quantitative. The criterion is qualitative, being the presence of at least 4 bands in the area corresponding to CERA. It is only possible to statistically establish a risk of error for a threshold quantitative criterion.

What can be said is that none of the 3292 urine samples analysed in our laboratory before the invention of CERA (2002-2007) gave rise to a pattern characteristic of CERA and that since then (2007 to now), the CERA findings reported by the Paris laboratory among the 3532 EPO analyses performed, were either confirmed by the athletes themselves who admitted the use of CERA or ultimately confirmed by adjudicating bodies (including CAS).

4. Have you ever observed or been notified of any protein interference in the CERA range using the IEF method?

No. The only protein interfering with the antibody in the pH gradient used for EPO analysis by IEF is zinc-alpha-2-glycoprotein. All the anti-doping laboratories know very well this protein that is observed in some urine samples. The bands corresponding to this protein are situated outside the area corresponding to Epoetins and CERA and thus cannot interfere in the interpretation of the results. This protein was specifically studied and the results of the study were published (References - 13).

5. Are you aware of any other external factor which could interfere in the interpretation of the results from the IEF method?

I understand that the athlete has made an allegation that the IEF result in his case could have been caused by an exercise induced proteinuria.

The effects of strenuous exercise on the Isoelectric patterns of erythropoietin have been carefully monitored and studied (*appendix 7*) by the scientific community. Whilst the study shows that in some rare cases strenuous exercise could result in a slight shift of the endogenous bands into a more basic isoelectric point, there could not be any confusion with the CERA pattern because (1) the CERA bands are located in the upper part of the basic area and (2) because the CERA bands which can be characterized as being usually thick and very close one from another, are significantly different from the bands corresponding to endogenous EPO.

Furthermore, as I already mentioned under 2, the images provided to the ISO accreditation body in France (COFRAC) for the accreditation of the IEF method for the detection of CERA, included urinary profiles from sample taken after strenuous exercise.

On a wider scale, the 3292 urinary profiles observed before 2007 in our laboratory, included numerous of these atypical profiles called "efforts urine". None of these profiles were even close from showing CERA-like patterns.

Finally, you should be advised that exercise-induced proteinuria is caused by a leakage of blood proteins into urine (mix proteinuria caused by an increase of the glomerular filtration and a decrease of the tubular reabsorption). It was demonstrated throughout the validation of the IEF method for the detection of CERA in blood that none of the protein found in blood could interfere with the interpretation of a CERA finding through IEF. Exercise-induced proteinuria cannot therefore affect the test results.

6. *Please comment on the criticisms of the IEF test method that have been cited by Mr Tysse (see section 5.1 and the articles at Appendix 7 of Mr. Tysse's Appeal Brief).*

The main criticism concerns the use of the monoclonal antibody to human EPO clone AE7A5 as the primary antibody. As I have already commented, the only protein interfering with this antibody in the pH gradient used for EPO analysis by IEF is zinc-alpha-2-glycoprotein (and not "alpha 1 antichymotrypsin" or "alkaline proteins" not specified as written in section 5.1) and this protein displays bands outside of the area for interpreting results.

The second criticism relating to the use of a secondary antibody that might bind to the human IgG of the urine sample is most surprising since the double-blotting has been developed especially to prevent any unspecific binding of the secondary antibody. As explained in two articles (2,4), a chapter in a book (9) and two patents (14,15), double-blotting perfectly prevents such a problem.

The criticisms concerning the IEF method have been extensively answered in articles published in international scientific journals (16-19 – *appendix 8*).

7. *Further to the Panel's order by letter dated 3 June 2011, please:*

(i) *Provide a definition of "Band" according to regulations and laboratory practice;*

There is no existing protein with a unique molecular form. EPO, as any natural or recombinant protein, is composed of several forms with slightly different structures. This phenomenon is called micro-heterogeneity. Some of these differences result in different electrical charges. In this case, the molecules can be separated by the IEF method which separates the proteins according to their electrical charge. For this reason, EPO (as any protein) has an isoelectric profile composed of several bands. A single band corresponds to those molecules having identical or very similar charges.

The bands will be more or less thick depending on the abundance and the degree of similarity of the molecules composing the band. A band can be thick and this is usually the case of CERA bands in urine samples.

Another characteristic of the CERA bands on IEF profiles in urine compared to the endogenous EPO bands or the bands from other forms recombinant EPO, is that they are very close one from another and sometimes cannot be clearly distinguished.

(ii) Provide a definition of “corresponding” according to regulations and laboratory practice.

“Corresponding” means that the bands must be located in the area corresponding to the CERA reference substance on the IEF gel. The identification criterion for CERA is not as detailed as the criteria set out for other forms of recombinant EPO (band assignment, intensity) because of the distinctiveness of the CERA pattern which is characterized by thick bands very close one from each other, in the upper part of the basic area as previously described under (i).

8. Please explain what is required from a laboratory director in providing a second opinion in respect of an adverse analytical finding for rEPO in accordance with TD2009EPO. In particular, is the laboratory director required for such purpose to conduct a completely new analysis of the sample in the director’s own laboratory (see section 9.3 of Mr. Tysse’s Appeal Brief)?

The “second opinion” required by WADA for EPO analyses, does not require a second analysis conducted at the laboratory in question, responsible for the opinion. This second opinion is only related to the interpretation of the analytical results on the basis of the images obtained and the corresponding graphics and data.

9. What was the entirety of the data that was made available to you by the Rome Laboratory for the purposes of conducting your second opinions in the case of sample 10E0034433?

The documents I received were twofold: raw images and images processed through the Gasepo software. I received:

- The A sample screening analysis by IEF (13/5/2010)
- The A sample confirmation analysis by IEF (22/5/2010)
- B sample first confirmation by IEF (16/6/2010)
- B sample second confirmation by IEF (7/7/2010)
- Further analysis of the B sample by SDS-electrophoresis (17/6/2010)

10. Did you reach the conclusion that the analysis conducted by the Rome Laboratory on ‘A’ sample 10E003A4433 disclosed the presence of CERA in accordance with the International Standard for Laboratories and TD2009EPO? Further to the Panel’s order dated 3 June 2011, please provide any documented evaluation you made of the ‘Acceptance Criteria’ as part of your review.

The second opinion I provided for sample A is clear: yes, my conclusion is that “*the analysis conducted by the Rome Laboratory on ‘A’ sample 10E003A4433 disclosed the presence of CERA in accordance with the International Standard for Laboratories and TD2009EPO*”.

I consider that the acceptance, identification and stability criteria set out under WADA TD2009EPO for CERA were fulfilled.

I did not specifically record this evaluation. There is no requirement under the WADA ISL or the TD2009EPO to record such evaluation.

In addition to fulfilling the positivity criteria for CERA, the IEF pattern of sample 10E003A4433 was quite similar to those observed in several urine samples analyzed in our laboratory and reported as adverse analytical findings, including from athletes who later admitted doping with CERA.

11. Did you reach the conclusion that the analysis conducted by the Rome Laboratory on 'B' sample 10E003B4433 disclosed the presence of CERA in accordance with the International Standard for Laboratories and TD2009EPO? Further to the Panel's order dated 3 June 2011, please provide any documented evaluation you made of the 'Acceptance Criteria' as part of your review.

Same answer as the previous one for sample B.

12. Were the SDS-Page results necessary to be able to confirm sample 10E003 4433 as an adverse analytical finding for CERA in accordance with WADA's Technical Document TD2009EPO? What do the SDS-Page results for sample 10E003B4433 show?

The results of the SDS electrophoresis were not necessary to establish the presence of CERA in the sample. This method is only recommended as a complementary and optional analysis in TD2009. It is only useful if the IEF results do not entirely fulfil the identification criteria for recombinant EPO. In this case, the IEF results were sufficient to identify formally CERA.

On the other hand, SDS electrophoresis is not the most sensitive method for the detection of CERA as it was shown by C. Reichel et al (ref. 27). To be able to detect CERA with more sensitivity, the SDS of the electrophoresis must be replaced by another detergent, Sarcosyl which was not used in the present case.

The important result is that the signal corresponding to CERA is located at the same level as the CERA reference and does not appear on the negative reference sample.

13. From your review, did the Rome Laboratory commit any breaches of the International Standard for Laboratories or of any other relevant rule or policy in analyzing sample 10E003B4433 which could have caused the adverse analytical finding in Mr Tysse's case? In particular:

No.

(i) Was the storage and handling of sample 10E003 4433 properly conducted (see section 9.2 of Mr. Tysse's Appeal Brief)? Is there any evidence in the analytical material that the stability of the sample was compromised?

The laboratory documentation package and in particular the chain of custody records produced by the Rome laboratory show that sample 10E003 4433 was properly handled in accordance with the International Standard for Laboratories.

The stability test required under WADA TD 2009EPO was duly performed and showed no signs of instability of the sample.

(ii) Did the Rome Laboratory breach section 5.2.4.3.1.4 of the ISL when, at the initial screening stage, it repeated the screening analysis on the same aliquot (see section 10.1 of the Appeal Brief)?

No. There has not been any breach of the ISL. Section 5.2.4.3.1.4 of the ISL is meant to apply to confirmation analyses and not to screening analyses.

(iii) Did the Rome Laboratory breach the ISL documentation and reporting requirements (see section 10.2 of the Appeal Brief)?

No

14. Please comment briefly on the statements made by the experts of Mr Tysse in Appendices 13, 16 and 19 of the Appeal Brief. Do you agree with their respective conclusions?

It is alleged in appendix 13 that an iron injection may have resulted in the presence of EPO dimers.

Iron injections amongst athletes are not rare. If such injections were to create artefacts linked to protein precipitation, we would have observed it amongst the 3292 samples analysed by our laboratory before the existence of CERA and the thousands of samples analysed for EPO each year. The experts try to prove the presence of dimers in the athlete's case:

- Through the fact that protein precipitation with a red coloration due to the presence of transferrin was observed in a sample collected after an injection made on 18 October 2010.
- The presence of dimers on one electrophoresis gel from a urine sample collected three days after the injection.

About the first point: no protein precipitation with a red coloration had been observed on the A and B samples analysed by the Rome laboratory as proven by the yellow coloration and the absence of sediments reported on the laboratory documentation.

About the second point: we have no information as to how the analyses described on slide 6 of appendix 13 were performed and more specifically which method was used to prepare the urine samples before electrophoresis?

Some bands are difficult to interpret. For instance, IgG heavy chains can be observed only if a reducing treatment of the samples has been performed prior to electrophoresis, cleaving IgG into heavy and light chains. In this case, the band attributed to "EPO dimers" cannot in fact correspond to such dimers since the reducing treatment would have cleaved them into monomers.

15. Could there be any other explanation than doping for the presence of bands in the CERA region in Mr. Tysse's sample 10E003 4433?

In my opinion, no.

References:

- 1) Recombinant erythropoietin in urine.Lasne F, de Ceaurriz J.Nature. 2000
- 2) Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures.Lasne F.J Immunol Methods. 2001 Jul 1;253(1-2):125-31.
- 3) Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones.Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J.Anal Biochem. 2002 Dec 15;311(2):119-26.
- 4) Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures.Lasne F.J Immunol Methods. 2003 May 1;276(1-2):223-6.
- 5) "Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable.Lasne F, Martin L, de Ceaurriz J, Larcher T, Moullier P, Chenuaud P.Mol Ther. 2004 Sep;10(3):409-10.
- 6) Detection of recombinant epoetin and darbepoetin alpha after subcutaneous administration in the horse.Lasne F, Popot MA, Varlet-Marie E, Martin L, Martin JA, Bonnaire Y, Audran M, de Ceaurriz J.J Anal Toxicol. 2005 Nov-Dec;29(8):835-7.
- 7) Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors.Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Martin L, Moullier P, Rolling F.Mol Ther. 2006 May;13(5):967-75.
- 8) Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis.Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J.Electrophoresis. 2007 Jun;28(12):1875-81.
- 9) Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures.Lasne F.Methods Mol Biol. 2009;536:213-9.
- 10) Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control.Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J.Haematologica. 2009 Jun;94(6):888-90.
- 11) Effects of exercise on the isoelectric patterns of erythropoietin.Lamon S, Martin L, Robinson N, Saugy M, Ceaurriz J, Lasne F.Clin J Sport Med. 2009 Jul;19(4):311-5.
- 12) A fast preparative method for detection of recombinant erythropoietin in blood samples.Lasne F, Martin L, Martin JA.Drug Test Anal. 2010 Oct;2(10):494-5. No abstract available.

- 13) Identification of zinc-alpha-2-glycoprotein binding to clone AE7A5 antihuman EPO antibody by means of nano-HPLC and high-resolution high-mass accuracy ESI-MS/MS. Reichel C., J Mass Spectrom. 2008 Jul;43(7):916-23.
- 14) Brevet d'invention national INPI 98 14864 « *Procédé d'immuno-analyse qualitative et/ou quantitative par immunoblot, nécessaire et dispositif pour la mise en œuvre de ce procédé* » au nom de : Hospices Civils de Lyon
Inventor : Françoise Lasne
- 15) Brevet d'invention international OMPI PCT/FR01/2001 « *Electrodoubling* »
Aux noms conjoints de : Laboratoire National de Dépistage du Dopage et Hospices Civils de Lyon
Inventor : Françoise Lasne
- 16) Comments on Lundby et al.'s "testing for recombinant human erythropoietin in urine: problems associated with current anti-doping testing". Lasne F. J Appl Physiol. 2008 Dec;105(6):1993-4; author reply 1997-8.
- 17) Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J. Int J Biol Macromol. 2007 Aug 1;41(3):354-7.
- 18) No doubt about the validity of the urine test for detection of recombinant human erythropoietin. Lasne F. Blood. 2006 Sep 1;108(5):1778-9; author reply 1779-80.
- 19) New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. Rabin OP, Lasne F, Pascual JA, Saugy M, Delbeke FJ, Van Eenoo P. Clin Chim Acta. 2006 Nov;373(1-2):186-7; author reply 188. Epub 2006 May 2.
- 20) Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J. Int J Biol Macromol. 2007 Aug 1;41(3):354-7.
- 21) SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. Reichel C, Abzieher F, Geisendorfer T. Drug Test Anal. 2009 Nov;1(11-12):494-504.

Châtenay-Malabry, le 22 juin 2011

Dr. Françoise LASNE

A handwritten signature in black ink, consisting of a vertical line with several loops and flourishes at the top, characteristic of a cursive signature.

APPENDIX 1

Françoise Lasne

Adresse :

5, rue de Paris

94220 Charenton le Pont

Tel professionnel : +33 (0)1 46 60 28 69

+33 (0)6 80 07 42 92

e-mail : f.lasne@afl.d.fr

■ **Trajet professionnel :**

FONCTIONS UNIVERSITAIRES

1978-1980 : Attaché-assistant de Sciences Fondamentales

Laboratoire de Chimie Biologique (Pr R. Creyssel) Université Claude Bernard
Lyon I, secteur Grange-Blanche

1980-1983 : Assistant des Universités

Laboratoire de Chimie Biologique (Pr R. Creyssel) Université Claude Bernard
Lyon I, secteur Grange-Blanche

FONCTIONS HOSPITALIERES

1976-1977 : Stagiaire interné

Laboratoire d'Endocrinologie (Pr R. Mornex) Hôpital de l'Antiquaille, Lyon

1980-1983 : Assistant des Universités-assistant des Hôpitaux

Service du Pr R. Creyssel, Hôpital Edouard Herriot, Lyon

1991-1998 : Attaché des Hôpitaux

Laboratoire de Biochimie C, Pr C. Collombel, Hôpital Edouard Herriot, Lyon

AUTRES FONCTIONS

1983-1988 : Responsable du secteur Recherche Biologique du Centre Européen
d'Informatique et Automation, Lyon

1990-1991 : Contrat de recherche et encadrement du secteur des dosages
radioimmunologiques
Laboratoire du métabolisme des lipides, Pr F. Berthezène, Hôpital de
l'Antiquaille, Lyon

Depuis 1998 : Chef de section recherche et développement en Biologie
Du Laboratoire National de Dépistage du Dopage
Puis du Département des Analyses de l'Agence Française de Lutte contre le
Dopage, Châtenay-Malabry

Depuis Janvier 2010 : Directeur par intérim du Département des Analyses de l'Agence
Française de Lutte contre le Dopage, Châtenay-Malabry

Depuis Décembre 2010 : Directeur du Département des Analyses de l'Agence Française
de Lutte contre le Dopage, Châtenay-Malabry

■ Diplômes

Doctorat en médecine

Thèse « *Etude quantitative de la Thyroxine-binding Globulin : aspects méthodologiques. Apport dans la maladie de Basedow* » soutenue le 22 Avril 1980 (mention très honorable, félicitations de jury avec échanges), Lyon.

Certificat d'études supérieures de physiologie humaine générale (1^{ère} année mention assez-bien, 2^{ème} année mention bien) 1976-1977, Lyon

Certificat d'études spéciales de biochimie clinique (équivalence), 1989

Certificat d'études spéciales de diagnostic biologique parasitaire, 1990

Certificat d'études spéciales d'immunologie générale, 1991

Certificat d'études spéciales d'hématologie, 1991

■ Publications

Publications dans des revues scientifiques avec comité de lecture.

N'ayant pu avoir accès au logiciel SIGAPS, j'ai indiqué l'Impact Factor (IF) 2008 des différentes revues citées.

1. IF: 3,509

"Cave digitabula".

Lasne F., Martin L., Martin J.A.

Electrophoresis, 2011 accepted for publication

1. IF: 3,328

Simultaneous quantification and qualification of synacthen in plasma.

Chaabo A, de Ceaurriz J, Buisson C, Tabet JC, **Lasne F.**

Anal Bioanal Chem. 2010 Dec 19

2.

A fast preparative method for detection of recombinant erythropoietin in blood samples.

Lasne F, Martin L, Martin JA.

Drug Test Anal. 2010 Oct;2(10):494-5.

3. IF: 0,973

Correlation between plasma and saliva adrenocortical hormones in response to submaximal exercise.

Thomasson R, Baillot A, Jollin L, Lecoq AM, Amiot V, **Lasne F**, Collomp K.

J Physiol Sci. 2010 Nov;60(6):435-9.

4. IF: 1,595

Effects of exercise on the isoelectric patterns of erythropoietin.

Lamon S, Martin L, Robinson N, Saugy M, de Ceaurriz J, **Lasne F.**

Clin J Sport Med. 2009 Jul;19(4):311-5.

5. IF: 5,970

Biosafety in ex vivo gene therapy and conditional ablation of lentivirally transduced hepatocytes in nonhuman primates.

Menzel O, Birraux J, Wildhaber BE, Jond C, **Lasne F**, Habre W, Trono D, Nguyen TH, Chardot C.

Mol Ther. 2009 Oct;17(10):1754-60.

6. IF: 5,978

Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control.

Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J.
Haematologica. 2009 Jun;94(6):888-90.

7. IF: 3,658

Comments on Lundby et al.'s "testing for recombinant human erythropoietin in urine: problems associated with current anti-doping testing".

Lasne F.

J Appl Physiol. 2008 Dec;105(6):1993-4.

8. IF: 0,875

Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures.

Chuan KH, Lim SF, Martin L, Yun CY, Loh SO, **Lasne F**, Song Z.
Cytotechnology. 2006 Jun;51(2):67-79.

9. IF: 1,867

Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine.

Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J.

Int J Biol Macromol. 2007 Aug 1;41(3):354-7.

10. IF: 3,509

Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis.

Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J.

Electrophoresis. 2007 Jun;28(12):1875-81.

11. IF: 10,432

No doubt about the validity of the urine test for detection of recombinant human erythropoietin.

Lasne F.

Blood. 2006 Sep 1;108(5):1778-9

12. IF: 3,399

Leukocyte's Hif-1 expression and training-induced erythropoietic response in swimmers.

Mounier R, Pialoux V, Cayre A, Schmitt L, Richalet JP, Robach P, **Lasne F**, Roels B, Millet G, Coudert J, Clottes E, Fellmann N.

Med Sci Sports Exerc. 2006 Aug;38(8):1410-7.

13. IF: 5,978

The effects of microdose recombinant human erythropoietin regimens in athletes.

Ashenden M, Varlet-Marie E, **Lasne F**, Audran M.

Haematologica. 2006 Aug;91(8):1143-4.

14. IF: 1,931

Living high-training low: effect on erythropoiesis and maximal aerobic performance in elite Nordic skiers.

Robach P, Schmitt L, Brugniaux JV, Nicolet G, Duvallet A, Fouillot JP, Moutereau S, **Lasne F**, Pialoux V, Olsen NV, Richalet JP.

Eur J Appl Physiol. 2006 Aug;97(6):695-705.

15. IF: 2,960

New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis.

Rabin OP, **Lasne F**, Pascual JA, Saugy M, Delbeke FJ, Van Eenoo P.

Clin Chim Acta. 2006 Nov;373(1-2):186-7

16. IF: 5,970

Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors.

Stieger K, Le Meur G, **Lasne F**, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Martin L, Moullier P, Rolling F.

Mol Ther. 2006 May;13(5):967-75.

17. IF: 1,665

Detection of recombinant epoetin and darbepoetin alpha after subcutaneous administration in the horse.

Lasne F, Popot MA, Varlet-Marie E, Martin L, Martin JA, Bonnaire Y, Audran M, de Ceaurriz J.

J Anal Toxicol. 2005 Nov-Dec;29(8):835-7

18. IF: 1,931

Living high-training low: effect on erythropoiesis and aerobic performance in highly-trained swimmers.

Robach P, Schmitt L, Brugniaux JV, Roels B, Millet G, Hellard P, Nicolet G, Duvallet A, Fouillot JP, Moutereau S, **Lasne F**, Pialoux V, Olsen NV, Richalet JP.

Eur J Appl Physiol. 2006 Mar;96(4):423-33.

19. IF: 3,658

Eighen days of "living high, training low" stimulate erythropoiesis and enhance aerobic performance in elite middle-distance runners.

Brugniaux JV, Schmitt L, Robach P, Nicolet G, Fouillot JP, Moutereau S, **Lasne F**, Pialoux V, Saas P, Chorvot MC, Cornolo J, Olsen NV, Richalet JP.

J Appl Physiol. 2006 Jan;100(1):203-11.

20. IF: 9,792

Acetazolamide: a treatment for chronic mountain sickness.

Richalet JP, Rivera M, Bouchet P, Chirinos E, Onnen I, Petitjean O, Bienvenu A, **Lasne F**, Moutereau S, León-Velarde F.

Am J Respir Crit Care Med. 2005 Dec 1;172(11):1427-33.

21. IF: 5,970

"Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable.

Lasne F, Martin L, de Ceaurriz J, Larcher T, Moullier P, Chenuaud P.

Mol Ther. 2004 Sep;10(3):409-10.

22. IF: 5,579

Detection of hemoglobin-based oxygen carriers in human serum for doping analysis: confirmation by size-exclusion HPLC.

Varlet-Marie E, Ashenden M, **Lasne F**, Sicart MT, Marion B, de Ceaurriz J, Audran M. Clin Chem. 2004 Apr;50(4):723-31.

23. IF: 5,579

Detection of hemoglobin-based oxygen carriers in human serum for doping analysis: screening by electrophoresis.

Lasne F, Crepin N, Ashenden M, Audran M, de Ceaurriz J. Clin Chem. 2004 Feb;50(2):410-5.

24. IF: 2,120

Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures.

Lasne F.

J Immunol Methods. 2003 May 1;276(1-2):223-6.

25. IF: 3,088

Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones.

Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J.

Anal Biochem. 2002 Dec 15;311(2):119-26.

26. IF: 2,120

Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures.

Lasne F.

J Immunol Methods. 2001 Jul 1;253(1-2):125-31.

27. IF: 1,626

Effects of acute ingestion of salbutamol during submaximal exercise.

Collomp K, Candau R, Collomp R, Carra J, **Lasne F**, Préfaut C, De Ceaurriz J.

Int J Sports Med. 2000 Oct;21(7):480-4.

28. IF: 2,201

Effects of short-term oral salbutamol administration on exercise endurance and metabolism.

Collomp K, Candau R, **Lasne F**, Labsy Z, Préfaut C, De Ceaurriz J.

J Appl Physiol. 2000 Aug;89(2):430-6.

29. IF: 31,433

Recombinant erythropoietin in urine.

Lasne F, de Ceaurriz J.

Nature. 2000 Jun 8;405(6787):635.

30. IF: 0,960

[Evaluation of the cytotoxicity of antiseptics used in current practice on cultures of fibroblasts and keratinocytes].

Fabreguette A, Zhi Hua S, **Lasne F**, Damour O.
Pathol Biol (Paris). 1994 Nov;42(9):888-92.

31. IF: 1,605

Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes.

Damour O, Hua SZ, **Lasne F**, Villain M, Rousselle P, Collombel C.
Burns. 1992 Dec;18(6):479-85.

32. IF: 2,713

Radioimmunofixation of human ferritin following serum isoelectric focusing.

Lasne Y, Benzerara O, Damour O, **Lasne F**.
Biochim Biophys Acta. 1988 Jan 12;964(1):69-72.

33. IF:3,088

A fast silver staining method for protein detection after isoelectric focusing in agarose gels.

Lasne F, Benzerara O, Lasne Y.
Anal Biochem. 1983 Jul 15;132(2):338-41.

34. IF: 0,593

[Fibrotic interstitial pneumopathies. Collagenolytic activity of the alveolar fluid].

Cordier JF, Lasne Y, Benzerara O, **Lasne F**, Hartmann D, Touraine R.
Presse Med. 1983 May 14;12(21):1345-8.

35. IF: 2,713

Role of sialic acid in the microheterogeneity of serum thyroxine-binding globulin. Study by two-dimensional isoelectric focusing.

Lasne F, Benzerara O, Lasne Y.
Biochim Biophys Acta. 1982 Apr 21;703(1):49-53.

36. IF: 2,713

Microheterogeneity and polymorphism of human serum thyroxine-binding globulin. Study by isoelectric focusing and radioprint immunofixation.

Lasne Y, **Lasne F**, Benzerara O.
Biochim Biophys Acta. 1980 Aug 21;624(2):333-9.

- Chapitres parus dans des livres scientifiques

1) Double blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures
Lasne F

In " Methods in molecular Biology ", vol 536 Protein blotting and detection, methods and protocols, pp.213-219, B. Kurien and H. Scofield eds, Humana Press, 2009

2) Erythropoietin doping: detection in urine

Lasne F

In " Pharmacology, Doping and Sports "

Jean L Fourcroy ed, Routledge London and New York, 2008

3) Abuse of recombinant erythropoietins by athletes

Catlin D H, Hatton CK, Lasne F

In "Erythropoietins and erythropoiesis" Molecular, cellular preclinical and clinical biology

G. Molineux, MA Foote, SG Elliott eds, Birkhäuser, 2003

- Conférences invitées

- 1 " Détection de l'EPO, état des lieux "
colloque scientifique de l'afld, Paris, 10 Juin 2010
- 2 "Detection of current EPOs by IEF "
WADA/JADA symposium on blood manipulations and doping in sport, Tokyo (Japan), 7-8
Novembre 2009
- 3 " Les EPO en contrôle anti-dopage "
XXIX^{ème} congrès national de la Société Française du Sport, Biarritz, 29-31 Octobre 2009
- 4 "Blood versus urine EPO detection (IEF)"
8th annual USADA symposium on anti-doping science, Vancouver (Canada), 2-5 Octobre
2009
- 5 "Contrôle anti-dopage de l'érythropoïétine "
Club Lyonnais de Chromatographie Liquide, Lyon, Journée du 12 Mai 2009
- 6 "Is EPO gene doping detectable by a direct approach?"
International Symposium on gene doping in sports, Florence (Italy), 25-27 Octobre 2008
- 7 "Contrôle anti-dopage de l'érythropoïétine"
réunion thématique du club Ile de France Nord de l'Association Francophone des Sciences
Séparatives, Paris, 16 Septembre 2008
- 8 "L'immunoaffinité: un outil indispensable dans la lutte anti-dopage"
12^{ème} journées scientifiques du Centre de Compétence en Chimie et toxicologie
Analytiques (ccCTA), Leysin, 20-21 Septembre 2007
- 9 "Diversification of EPO treatments and anti-doping control"
Symposium mondial antidopage de l'IAAF, Lausanne (Suisse), 30 Septembre-2 Octobre
2006
- 10 "Diversification des traitements par l'érythropoïétine et contrôle anti-dopage"
XXVI^{ème} congrès national de la Société Française du Sport, Montpellier, 2006
- 11 "Distinction between endogenous and exogenous erythropoietin"
Hormones, body composition and physical performances, Turin (Italy), 15-17 Novembre
2002
- 12 "Urinary test for rHuEPO"
1st annual USADA symposium on anti-doping science, Atlanta (USA), 4-6 Octobre 2002
- 13 "EPO detection in urine"
XIVth International Symposium on Technology Innovation in Laboratory Hematology,
Montpellier (France), 9-12 Mai 2001
- 14 "Détection de l'EPO recombinante"
43e Congrès International de Langue Française de Médecine Légale et de Médecine
Sociale", Limoges, 13-14 Septembre 2001

15 "Analyse des profils isoélectriques de l'erythropoïétine urinaire"
Congrès International sur le Dopage, Tunis (Tunisie), 5-7 Mai 1999

16 "Détection de l'EPO recombinante"
Séminaire multilatéral sprint de la Commission Nationale pour le Contrôle du Dopage,
Conseil de l'Europe, Sofia (Bulgarie), 8-10 Octobre 1998

- Posters et communications non invitees

1 Active urine and detection of recombinant urine

23rd Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Köln (Germany), 27th - 4th March 2005.

2 Detection of recombinant erythropoietin

19th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Köln (Germany), 18th - 23th March 2001.

3 Characterisation of human serum ferritins by radioimmunofixation following isoelectric focusing.

Damour O., **Lasne F.**, Dellamonica C. and Lasne Y.

Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Milan, Italie, Mai 1984.

4 Méthodologie d'approche des variants de la ferritine circulante.

Damour O., **Lasne F.**, Dellamonica C. et Lasne Y.

VI^e colloque international de radioimmunologie de Lyon, Lyon, France, Avril 1984

5 Microheterogeneity of human serum and cerebrospinal fluid prealbumin.

Lasne F. and Lasne Y.

"Electrophoresis 84", Göttingen, R.F.A., Août 1984.

6 Mise au point d'une technique rapide de coloration à l'argent pour la détection des protéines après focalisation isoélectrique en gels d'agarose.

Lasne F. et Lasne Y.

Congrès du G.E.R.M.I., Lyon, France, 1983.

7 Detection of antiacetylcholine receptor antibodies by isoelectric focusing.

Lasne Y., Benzerara O., **Lasne F.**, Bady B., Chazot G. and Trillet M.

V^e congrès international des maladies neuromusculaires, Marseille, France, Septembre 1982.

8 Collagenolytic activity of alveolar fluid of patients with fibrotic interstitial pulmonary disease.

Cordier J.F., Lasne Y., Benzerara O., **Lasne F.**, Hartmann D. and Touraine R.

VIIIth F.E.C.T.S. meeting, Copenhage, Suède, Août 1982.

9 Enzyme two-dimensional isoelectric focusing.

Lasne F., Benzerara O. and Lasne Y.

"Electrophoresis 82", Athènes, Grèce, Avril 1982.

10 Radioimmunofixation of IgG following agarose gel isoelectric focusing of unconcentrated cerebrospinal fluid.

Lasne Y., **Lasne F.**, Benzerara O. and Chazot G.

"Electrophoresis 81", Charleston, S.C., USA, Avril 1981.

11 Microheterogeneity and polymorphism of serum Thyroxine Binding Globulin (TBG): study in human serum by radioprint immunofixation.

Lasne Y., **Lasne F.**, Benzerara O. and Arnaud P.

"Electrophoresis 79", Munich, RFA, Octobre 1979.

- Brevets

Brevet d'invention national INPI 98 14864 « *Procédé d'immuno-analyse qualitative et/ou quantitative par immunoblot, nécessaire et dispositif pour la mise en œuvre de ce procédé* » au nom de : Hospices Civils de Lyon
Inventeur : Françoise Lasne

Brevet d'invention international OMPI PCT/FR01/2001 « *Electrodoble-blotting* »
Aux noms conjoints de : Laboratoire National de Dépistage du Dopage et Hospices Civils de Lyon
Inventeur : Françoise Lasne

- Expertise

Membre du groupe d'experts sur l'EPO de l'Agence Mondiale Anti-dopage (AMA) depuis 2004 ayant élaboré le document technique AMA (versions 2007 et 2009) pour la méthode de détection des érythropoïétines recombinantes

Organisateur et animateur d'un « EPO seminar » à Chatenay-Malabry, 3-4 Novembre 2005 dont l'auditoire était composé de 29 laboratoires internationaux de contrôle anti-dopage, sous l'égide de l'AMA.

- Prix

Prix " Memorial Giampaolo Bardelli " XXVI edizione, Pistoia, 2010

Prix " Henry Deutsch de la Meurthe " de l'Académie des Sports, Paris, 2003

"Manfred Donike Memorial Award, Scientific Excellence in Dope Analysis", Cologne, 2002

APPENDIX 2

Chapter 23

Double-Blotting: A Solution to the Problem of Nonspecific Binding of Secondary Antibodies in Immunoblotting Procedures

Françoise Lasne

Summary

Nonspecific interactions between blotted proteins and unrelated secondary antibodies generate false positives in immunoblotting techniques. Some procedures have been developed to reduce this adsorption but they may work in specific applications and be ineffective in other ones. "Double-blotting" has been developed to overcome this problem. It consists of interpolating a second blotting step between the usual probings of the blot membrane with the primary antibody and the secondary antibodies. This step, by isolating the primary antibody from the interfering proteins, guarantees the specificity of the probing with the secondary antibody. This method has been developed for the study of erythropoietin in concentrated urine since a strong nonspecific binding of biotinylated secondary antibodies to some urinary proteins is observed using classical immunoblotting protocols. However, its concept makes it usable in other applications that come up against this kind of problem. This method is expected to be especially useful for investigating proteins that are present in minute amounts in complex biological media.

Key words: Double-blotting, Immunoblotting, False positives, Secondary antibodies, Erythropoietin

1. Introduction

The development of a test for anti-doping control of erythropoietin (EPO), a hormone used in endurance sport to stimulate the red blood cell production, has been a long and exacting task. The method is based on differentiation of natural and recombinant (used in case of doping) hormones in urine by their isoelectric profiles (1). For this, urine is first submitted to ultrafiltration to concentrate EPO in retentates that are then subjected to isoelectric focusing. Immunoblotting of EPO is then performed

using primary monoclonal anti-human EPO antibodies and secondary biotinylated goat anti-mouse IgG antibodies (2). The major drawback of the ultrafiltration step is the resulting very high protein content of the retentates that are then subjected to the next step of isoelectric focusing. This is particularly true for the urine samples taken at the end of a competition, because of proteinuria induced by physical exercise. This results in retentates with huge total protein contents (about 50 g/L for samples taken at rest and up to 200 g/L for samples taken after a physical exercise) for an EPO concentration generally no more than 4 µg/L. Such a situation is a real challenge for the classical immunoblotting procedures. Indeed, a strong nonspecific binding of secondary antibodies to some proteins present in the retentates was observed, completely masking the detection of EPO. All attempts to prevent or reduce this nonspecific binding were ineffective when working directly on the blotting membrane. The problem was solved by isolating the primary antibody from the interfering proteins on a second membrane that was then probed by the secondary antibody without any risk of nonspecific binding (3, 4). Gershoni has emphasized the difficulty of resolving such a problem (5). For this, after it has been probed by the primary antibody, the membrane with the blotted proteins is assembled with a second blank membrane and submitted to a second blotting under acidic conditions. The primary antibody molecules are thus desorbed from their corresponding antigen and transferred onto the second membrane, whereas the antigen and the interfering proteins remain bound to the first one. The second membrane can then be probed by the secondary antibodies without the risk of nonspecific binding.

2. Materials

Since double blotting (DB) takes place after probing of the blotting membrane (B membrane) with a primary antibody and before probing with the secondary one (Fig. 1), the reagents and materials for these steps (blotting membrane, blocking and washing buffers, primary and secondary antibody solutions, possibly amplification system, development reagents) will not be indicated here, being specific for the application in which DB is introduced (*see Note 1*).

Only the materials used for the DB step itself will be detailed.

1. Semi-dry transfer unit.
2. Roller.
3. Immobilon P (Millipore, Molsheim, France) polyvinylidene fluoride membranes (PVDF), 0.45 µm pore size.

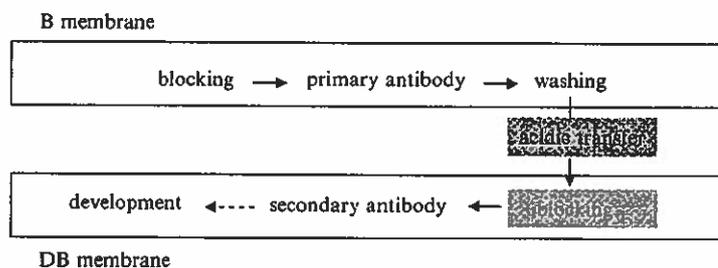


Fig. 1. Positioning of the double-blotting process into an immunoblotting procedure. The additional steps specifically related to DB are grey coloured.

4. Durapore (Millipore) hydrophylic PVDF membranes, 0.65 μm pore size
5. Filter paper sheets: electrode paper Novablot (GE Healthcare, Saclay, France).
6. 0.7% (v/v) acetic acid solution.
7. Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4.
8. Sealing film, parafilm.

3. Methods

1. Proceed to the usual blotting, blocking, primary antibody probing and washing steps of your B membrane, according to your application. DB is performed after the last wash of your B membrane (*see Fig. 1 and Note 2*).
2. Cut two stacks of 9 filter paper sheets, a Durapore (intermediate membrane) and an Immobilon P (DB membrane) membrane to the dimensions of the blotting membrane.
3. Condition them in 0.7% acetic acid: just immerse the Durapore in the acidic solution for at least 10 min, prewet the Immobilon P membrane in methanol for 3 s, rinse in water for 2 min before equilibration in acidic solution for 10 min. The stacks of filter paper are moistened in acetic acid solution by capillary action.
4. During the same time, perform a rinsing of the B membrane in two changes of PBS.
5. Layer the B membrane of your application onto a first stack of filter paper with the blotted proteins facing up and cover it with the intermediate and DB membranes successively. Quickly put the second stack of filter paper onto the DB membrane to prevent the membranes from drying (*see Note 3*).

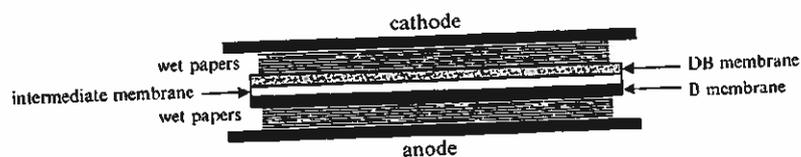


Fig. 2. Experimental set-up for DB.

6. Position this sandwich on the anode plate of the semi-dry electrophoretic blotting instrument so that the B and the DB membranes will face the anode and the cathode, respectively (Fig. 2).
7. Place a sealing film onto the sandwich and carefully press out the air bubbles with the roller. Remove the film.
8. Place the cathode plate on the sandwich and connect the blotting instrument to the power supply.
9. Apply a constant intensity of 0.8 mA per cm² for 10 min (see Notes 4–6).
10. Disconnect the blotting instrument and disassemble the membranes (see Note 3).
11. Keep the B membrane in PBS at 4°C (see Note 7).
12. Rinse the DB membrane quickly in two changes of PBS (see Note 3).
13. Proceed to the blocking of the DB membrane according to your usual procedure.
14. Proceed to the usual steps of your application from the probing with the secondary antibody to the final development, on the DB membrane.

4. Notes

1. Reagents for detection of erythropoietin. The method is illustrated by its application to immunodetection of erythropoietin. The specific reagents used in the case of EPO are: (a) Primary antibodies: monoclonal mouse anti-human EPO (clone AE7A5 from R&D, Abingdon, England), (b) Secondary antibodies: biotinylated goat anti-mouse IgG (H + L) (31800 from Pierce, Rockford, USA), (c) Amplifying systems: Streptavidin/biotinylated peroxidase complexes (GO14–61 from Biospa, Milano, Italy), (d) Development system: Chemiluminescence (SuperSignal West Femto from Pierce), (e) Blocking buffer: 5% (w/v) non-fat milk in PBS buffer.

2. DB has been developed using PVDF as blotting membrane and has not been tested with other types of membranes.
3. Be aware that the DB membrane is very sensitive to drying when not saturated. This, while being not visually perceptible during the handling of the membrane, will produce a high background in the final image. It is thus extremely important to quickly perform the steps in which the membrane is handled without any liquid contact.
4. The acidic pH of this step induces dissociation of the primary antibody molecules from their corresponding antigen. The released antibodies, being positively charged due to the acidic pH, migrate toward the cathode, passing through the intermediate membrane and thus are transferred onto the DB membrane. Since the acidity does not affect hydrophobic interactions with PVDF, the antigen and the unrelated proteins (interfering proteins and proteins used for blocking the B membrane) are retained on the B membrane (Fig. 3). It should be noted that the result is actually an "image" of the probed antigen since it is only the antibody on the second membrane and not the antigen that gives rise to the final signal. However, this image is quite representative of the probed antigen (Fig. 4).
5. The interposition of the intermediate membrane between the B and the DB was very useful in our application (EPO analysis), which uses nonfat milk as a blocking agent, some "holes" in the final image obtained with the DB membrane being sometimes observed when this intermediate membrane was omitted. Although the explanation for this is purely hypothetical (local releases of clumps of casein precipitated by the acidic pH), the interpolated microporous Durapore membrane worked as a barrier definitely remedying this problem. It is possible that this membrane is not necessary in other applications but its use is strongly advised in case of "holes" in the final image.
6. The use of an electric field speeds up the transfer of the primary antibody from the blotting to the DB membrane. However, a simple contact between the membranes (passive transfer) without applying an electric field for a prolonged time (30

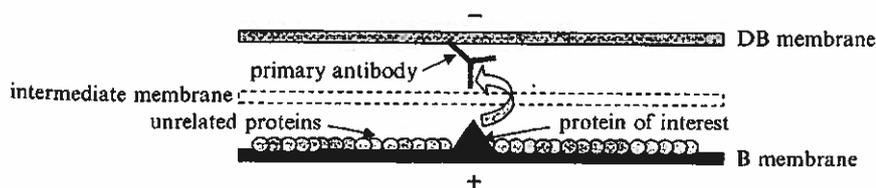


Fig. 3. Principle of double-blotting.

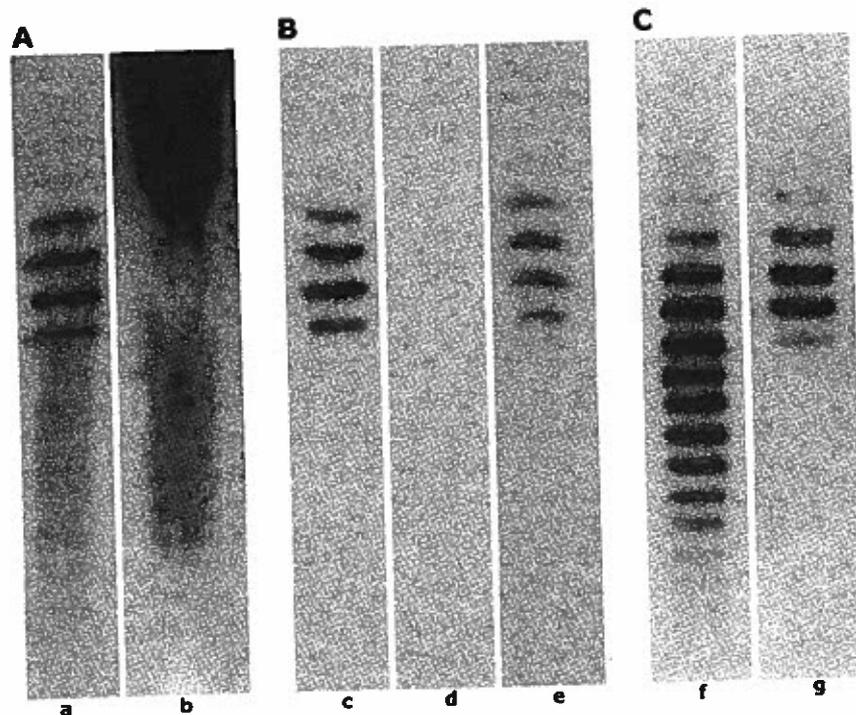


Fig. 4. Isoelectric patterns of EPO (A) images obtained without DB of (a) pure recombinant human EPO (rHuEPO) (Epoetin α), (b) a retentate obtained from ultrafiltration of a urine sample (chosen because it is devoid of endogenous EPO); (B) images obtained with DB of (c) pure rHuEPO (Epoetin α), (d) the same retentate as in b, (e) rHuEPO introduced into this same retentate; (C) images obtained with DB of (f) a retentate from urine containing natural endogenous EPO, (g) a retentate from urine containing excreted rHuEPO. In the case of pure rHuEPO, comparison of the images obtained without (a) and with (c) DB shows that no significant change in the isoelectric pattern is induced by the DB process. In the case of a retentate, due to the binding of the secondary antibody on the urinary proteins, a very strong EPO non-specific signal of is observed with the classical immunoblotting process (b). DB totally eliminates this nonspecific signal (d) and enables to specifically detect the introduced rHuEPO (e). An illustration of the use of DB in anti-doping control analysis is given in (C), natural endogenous urinary EPO (f) and administered rHuEPO excreted in urine (g) are differentiated by their isoelectric patterns.

min) has been tested in dot blot experiments and proved to be usable too (data not shown).

7. Storage of the B membrane (on which the blotted proteins are retained) in PBS may be useful. If some problem is observed on the final image, e.g. high background (*see Note 3*), it is possible to reuse the stored B membrane to perform a second DB. In this case, the B membrane is reincubated in the primary antibody of the application and DB is then performed as described earlier. If desired, it is possible to probe the stored B membrane with a different primary antibody prior to performing a second DB. This enables obtaining an image of another antigen from the same sample.

Acknowledgements

The DB process has been patented (2 786 273) by "Hospices Civils de Lyon", and by "Laboratoire National de Dépistage du Dopage" with "Hospices Civils de Lyon" as PCT/FR01/01331.

References

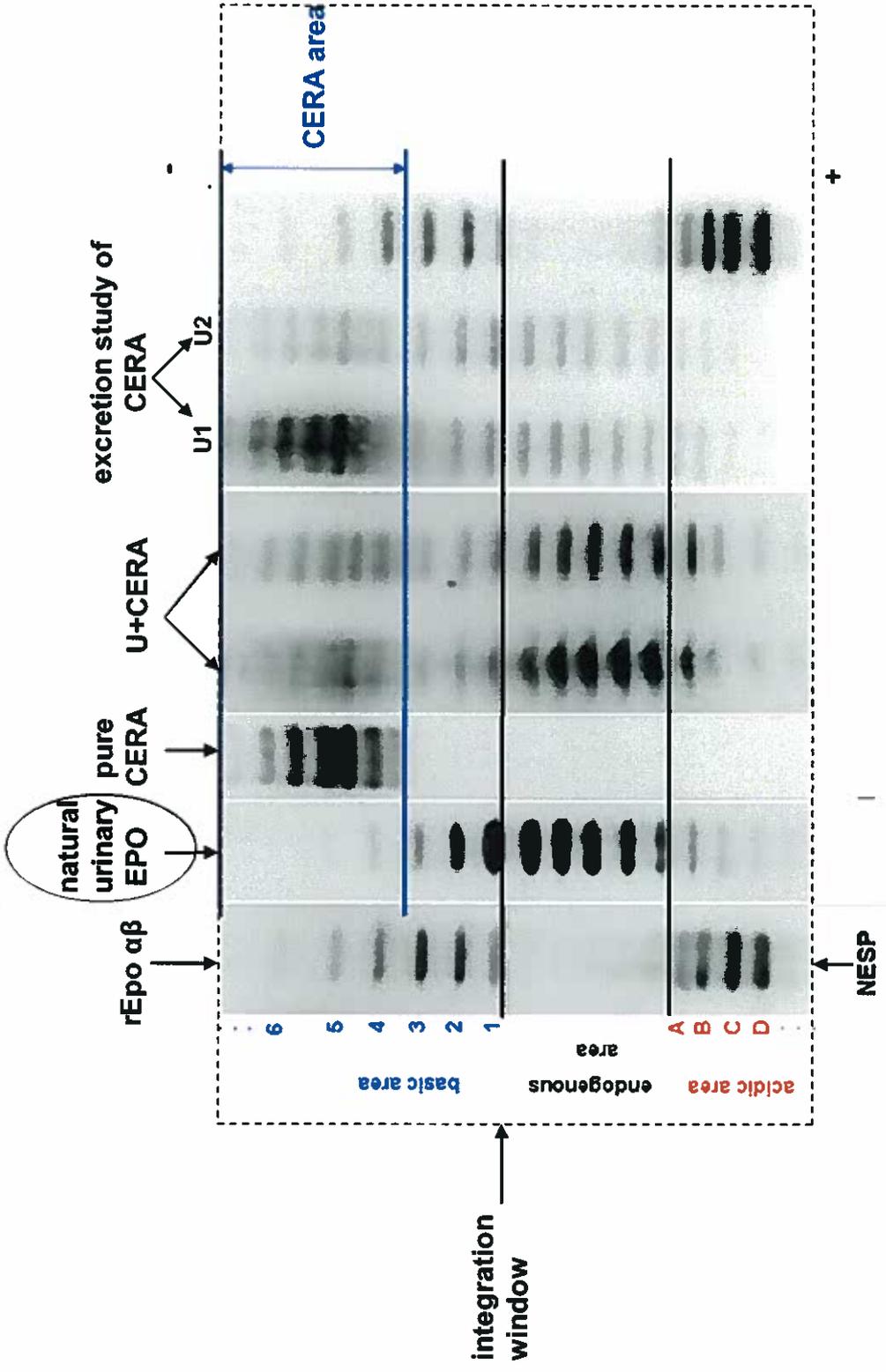
1. Lasne, F., and de Ceaurriz, J. (2000) Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405, 635.
2. Lasne, F., Martin, L., Crepin, N., and de Ceaurriz, J. (2002) Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 311, 119-126.
3. Lasne, F. (2001) Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Meth* 253, 125-131.
4. Lasne, F. (2003) Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures (protocol). *J Immunol Meth* 276, 223-226.
5. Gershoni, J.M. (1988) Protein blotting: a manual, in *Methods of biochemical analysis* (Glick D., ed.), Vol. 33, Wiley, New-York, pp. 1-58.

oetin
; (B)
this
(g) a
with-
n the
acific
) and
alysis
ad by

o be

s are
ved
it is
ond
pri-
ed as
ed B
orm-
ther

APPENDIX 3



APPENDIX 4

RICCO DENIES DOPING AT THE TOUR DE FRANCE

- **Friday, 18 July 2008**
- **By Stephen Farrand**
- [0 Comments](#)

Riccardo Ricco has denied doping at the Tour de France and asked that for the counter-analysis of his urine sample taken after the Cholet time trial, according to Italian media.

According to the Gazzetta dello Sport web site and Italian television's Alessandra di Stefano who was outside the courtroom, Ricco's lawyer announced that the Italian denied ever taking EPO.

Ricco was taken to the Foix court in a convoy of three cars and was protected by at least 15 police officers. He was questioned in court for both the positive test in the Tour de France and for other alleged offences after police searched his belongings last night. He was released just before five o'clock and is now travelling back to Italy with his girlfriend.

Ricco has promised he will speak to Italian television and the police investigating the case will also hold a press conference this afternoon to reveal further details of the case.

Last night police escorted Ricco to the Saunier Duval team hotel and searched his bags. It is not known if anything was found. Police also stopped and searched the Saunier Duval vehicles as they left the Tour de France as rumours circulated of another positive for CERA.

FAMILY SUPPORT

Ricco's uncle and his sister Melissa arrived in France this morning and are expected to take Ricco back to Italy. Ricco's girlfriend Vania also arrived with her mother. Vania and Melissa both defended Ricco.

"What has happened is really sad. And I don't think he's responsible. I don't think he's got anything to be ashamed of," Vania said.

"I'm not convinced about this story of EPO, Riccardo has always been honest but of course if some is strong and exuberant like my brother then they always find a way of get rid of you. The same thing happened with Pantani."



Ricco's demise has been widely compared to that of Marco Pantani. In a kind of flash back to 1999, when Pantani failed a haematocrit test at Madonna di Campiglio during the Giro d'Italia, Ricco had the same blank stare when he was taken away by French police surrounded by photographers and television cameras.

Ricco often compared himself to Pantani and imitated him in the way he attacked in the mountains but following his positive test, the Pantani family quickly got their lawyers to warn the media about making comparison's between Ricco's case and their tragic demise of their son.

Pro Cycling Team Kits

Shop & Earn PBK Reward Points The
Online Road Cycling Experts
ProBikeKit.com/Team_Kits

French in the countryside

Learn French in small groups. Individuals,
families and couples.
www.CoeurDeFrance.com

AdChoices 

Reader comments

No comments have been added yet. Be the first by adding yours below...

[Back to top](#)

Cycling WEEKLY

RICCO ADMITS TAKING EPO BEFORE TOUR DE FRANCE

- **Wednesday, 30 July 2008**
- **By Stephen Farrand**
- [0 Comments](#)

Riccardo Ricco has admitted taking EPO before the Tour de France.

Speaking after being questioned by the Italian Olympic Committee's anti-doping investigators in Rome, Ricco told reporters; "I've admitted my responsibility, it's all my own fault and I've decided not ask for the counter-analysis because there's no need."

Ricco tested positive for the new third generation of EPO at the Tour de France after the stage 4 time trial around Cholet. He claims he was clean during the Giro d'Italia in May but took the blood boosting drug because he was tired.



"I was tired after the Giro d'Italia mentally and physically. I took it but it was a childish mistake. At the Giro I was clean, then the Wednesday before leaving... I can't say where I got it from because there's a legal procedure underway."

"I think I've done the right thing by admitting my mistake. I haven't asked for clemency, I had a weight on my mind and wanted to get rid of it. At the moment my thoughts are for the staff of the team and my team mates who have lost their jobs because of me."

Ricco risks a two-year ban for doping but that could be reduced by as much as a year if he reveals who supplied him with the drug.

RELATED LINKS

[Ricco positive for doping at the Tour de France](#)

[Ricco denies doping at the Tour de France](#)

[CERA - the new EPO discovered at the Tour](#)

[Saunier Duval to quit cycling?](#)

Small Wonders

Stylish catered chalets in France. Book now and get a 10% discount.
www.smallwonders.eu

Pro Cycling Team Kits

Shop & Earn PBK Reward Points The Online Road Cycling Experts
ProBikeKit.com/Team_Kits AdChoices ▶

Thursday, 23. June 2011

austriantimes.at
We've got Austria covered.

croatiantimes.com

romaniantimes.at

salzburgtimes.at

viennatimes.at

austrianindependent.com



Cyclist Bernhard Kohl admits to doping at last

Third-place Tour de France finisher Bernhard Kohl has shocked Austria by admitting that he deliberately used new blood-booster CERA.

Kohl said last night (Weds) that he had resorted to doping because he had felt under "incredibly-strong" pressure to perform well at this summer's Tour de France, in which he finished as best climber.

Kohl added that he wouldn't appeal even though he faces a two-year suspension from international competition and will lose the highly-remunerative, three-year deal he only recently signed with Belgian team Silence-Lotto.

"I succumbed to the temptation because the pressure on me to succeed was incredibly strong," the 26-year-old Vienna-born Kohl said at a hastily-called press conference at Vienna International Airport. Only one day earlier, Kohl had said that he wanted the secondary 'B' sample to be checked as well to rubbish rumours and clarify the situation.

Kohl became the fourth rider to test positive for CERA, an advanced version of EPO. He said yesterday: "I lied to Austria and the world – and I am extremely sorry about that."

Although the Austrian Cycling Federation (ÖRV) said that Kohl had asked for testing of his backup "B" sample, Kohl said Wednesday that he had withdrawn that request.

Kohl, a climbing specialist, rode for Gerolsteiner this season but has signed a contract with Silence-Lotto through 2011. The Belgian team had hoped that he would be a key support rider for Cadel Evans as the Australian challenged for the Tour victory next year.

With his confession, Kohl almost certainly will lose his Tour de France podium spot to fourth-place Denis Menchov of Russia.

Kohl told reporters yesterday that he had opted for CERA to give him an edge because he was worried that, without a good season, he wouldn't get a new contract.

Gerolsteiner said that Kohl shown courage and deserved credit.

"Hats off to Bernhard that he's honestly about what's happening," said team chief Hans-Michael Holczer, insisting that Gerolsteiner had been completely unaware of Kohl's doping.

However, Kohl's former Gerolsteiner team member Stefan Schumacher only recently delivered a positive sample as well.

Andreas Schwab, managing director of Austria's national anti-doping agency (NADA), said that he planned to go ahead with disciplinary proceedings against Kohl, which are likely to get under way within the next eight weeks.

"It's a totally negative experience, and Austrian sport has suffered," Schwab said.

After this year's Tour, Kohl became one of the most sought-after riders, along with teammate Stefan Schumacher. Both tested positive for CERA in rechecks of the samples by the French anti-doping agency.

"I want to be the Bernhard Kohl that I used to be — the one my fans and friends knew," Kohl said.

Kohl finished third at this year's Tour behind Carlos Sastre and Evans in the second-tightest podium finish in the 105-year-old race's history. The Gerolsteiner rider also received the polka-dot jersey as best rider in the mountains.

Austrian Times

Tag cloud:

Lotto fourth positive Bernhard Austria sample doping Evans podium France CERA
Gerolsteiner Belgian signed became rider Silence agency **Kohl** Stefan

[0Share](#)

PIEPOLI LATEST CERA POSITIVE AT THE TOUR DE FRANCE

- **Monday, 6 October 2008**
- By Stephen Farrand
- [0 Comments](#)

The Italian Olympic Committee has confirmed that Leonardo Piepoli twice tested positive during this year's Tour de France.

A short statement on the Comitato Olimpico Nazionale Italiano (CONI) website on Monday afternoon said Piepoli had been formally summoned for questioning on Friday October 10 regarding a double positive from the Tour.

Pierre Bordry, the head of the French Anti-Doping Agency confirmed that Piepoli tested positive. According to l'Equipe newspaper, Stefan Schumacher, Piepoli and Riccardo Ricco all tested positive for CERA, the third generation form of EPO in two blood tests during the Tour de France.

According the CONI note, Piepoli's positive tests were from samples taken on July 4, the day before the Tour de France started in Brest, and on the first rest day in Pau on July 15. Piepoli won stage 10 on July 14 but did not undergo a blood test on that day. The CONI website does not say what doping product Piepoli was found positive for but the dates of the tests coincide with the dates recently indicated as the dates blood samples were taken by the French Anti-Doping Agency.

Unlike his disgraced former team mate Riccardo Ricco, Piepoli did not test positive for CERA in urine tests but fled the Tour de France when Ricco was arrested. Both riders were subsequently sacked by their Saunier Duval team.

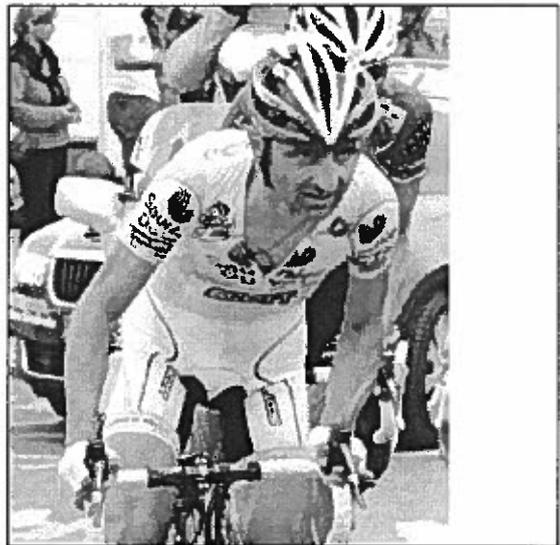
French newspaper Equipe claims that Piepoli, Schumacher and Ricco are the first three riders to be confirmed positive using the new blood tests for CERA. The French newspaper has speculated that at least 10 riders from the Tour de France are under scrutiny because of suspicious urine results in CERA tests. Other names could be announced positive in the next few days.

More later

RELATED LINKS

[Tour de France Cera test results set to emerge](#)

[Ricco banned for two years](#)



APPENDIX 5



Tribunal Arbitral du Sport
Court of Arbitration for Sport

TAS 2009/A/1820 Stefan Schumacher c/ Union Cycliste Internationale

SENTENCE ARBITRALE

rendue par le

TRIBUNAL ARBITRAL DU SPORT

siégeant dans la composition suivante :

Président : M. Bernard Foucher, Président du Tribunal Administratif, Melun, France

Arbitres : M. Ulrich Haas, Professeur, Zurich, Suisse
Me Olivier Carrard, avocat, Genève, Suisse

Greffier : M. Nicolas Chervet, titulaire du brevet d'avocat, Lausanne, Suisse

dans la procédure arbitrale d'appel

entre

Stefan Schumacher, Nürtingen, Allemagne,
représenté par Me Michael Lehner, avocat, Heidelberg, Allemagne

et

Union Cycliste Internationale, Aigle, Suisse,
représentée par Me Philippe Verbiest, avocat, Leuven, Belgique,

* * *

1. FAITS ET PROCEDURE

1.1 Faits

1. L'Union Cycliste Internationale (ci-après : l'UCI) est l'association des fédérations nationales du cyclisme. Elle a comme but la direction, le développement, la réglementation, le contrôle et la discipline du cyclisme dans toutes ses formes, au niveau international (art. 2, let. a Statuts UCI).
2. M. Schumacher, né le 21 juillet 1981, est un coureur cycliste professionnel de la catégorie élite, titulaire d'une licence délivrée par la Fédération nationale de cyclisme d'Allemagne.
3. M. Schumacher a participé à la course cycliste sur route « Tour de France » qui s'est déroulée du 5 juillet au 27 juillet 2008 en France, en tant que membre de l'équipe du ProTour « Gerolsteiner », laquelle a été dissoute à la fin de l'année 2008.
4. En raison d'un litige opposant l'organisateur du Tour de France à l'UCI, cette course n'était pas inscrite au calendrier international des compétitions de l'UCI, mais à celui du calendrier des compétitions nationales organisées par la Fédération française de cyclisme.
5. C'est dans ce contexte que les contrôles antidopage ont été effectués lors du Tour de France 2008, sous l'égide de l'Agence française de lutte contre le dopage (ci-après : l'AFLD) et en application de ses règles.
6. Tous les coureurs ont fait l'objet de contrôles par prélèvement de sang en début de compétition. La moitié d'entre eux, dont M. Schumacher qui avait déjà fait l'objet de plusieurs contrôles à partir de prélèvements d'urine ou de sang, ont encore été contrôlés lors du jour de repos, le 15 juillet 2008.
7. Les procès-verbaux de contrôle des 3 et 15 juillet 2008 concernant M. Schumacher indiquent que celui-ci n'a fait aucune observation quant à la procédure de prélèvement des échantillons.
8. A la demande de l'AFLD, ces derniers ont été transmis immédiatement pour analyse au laboratoire antidopage de Lausanne, lequel est accrédité par l'Agence Mondiale Antidopage (ci-après : l'AMA).

9. Les résultats de cette première analyse établissaient que la valeur sanguine de l'échantillon A ne présentait pas de résultat anormal.
10. Toutefois, le Département des Analyses de l'AFLD, dont le directeur était M. Jacques de Ceaurriz, et qui est l'unique laboratoire accrédité en France auprès de l'AMA, a procédé à l'analyse des échantillons d'urine prélevés chez M. Schumacher.
11. Il ressort du rapport établi le 17 juillet 2008 par ce département, une suspicion de présence d'érythropoïétine recombinante dite de type « Mircera » ou « CERA » (ci-après : l'EPO CERA).
12. Le reliquat de l'échantillon A de sang a alors été retourné au Département des Analyses de l'AFLD, lequel a procédé à une analyse au moyen d'une méthode de dépistage (« focalisation isoélectrique (IEF) et double immunoblotting ») pratiquée habituellement pour détecter la présence d'EPO dans l'urine, et qui avait été adaptée afin de détecter la présence d'EPO CERA dans le sang.
13. Cette méthode d'analyse sanguine a fait l'objet d'une procédure de validation et a obtenu, le 30 juin 2009, une extension d'accréditation délivrée par un organe de contrôle reconnu, en l'occurrence, le Comité français d'accréditation (ci-après : le COFRAC).
14. Les rapports établis le 3 octobre 2008 par le laboratoire de Châtenay-Malabry ont conclu à la présence d'EPO CERA dans les échantillons sanguins de M. Schumacher.
15. Le laboratoire de Lausanne a été requis de procéder à une analyse de confirmation à partir d'une méthode d'analyse différente, dénommée « Elisa », spécifique de l'EPO CERA. Celle-ci a confirmé la présence de cette substance dans le reliquat d'échantillon sanguin de M. Schumacher.
16. Le 6 octobre 2008, une copie des rapports d'analyses a été envoyée à l'UCI, ainsi qu'à l'AMA, par le Département des Analyses de l'AFLD.
17. Par un fax daté du 3 octobre 2008, mais envoyé le 9 octobre 2008, l'AFLD a notifié à l'UCI et à l'AMA l'identité de l'athlète dont il était question, soit M. Schumacher.
18. Le 7 octobre 2008, M. Schumacher a accusé réception du courrier de l'AFLD lui notifiant les griefs retenus à son encontre, ainsi que les droits dont il disposait pour présenter sa défense. Parmi ces droits, figure notamment celui de demander, dans les dix jours suivant son information, la réalisation d'une contre-analyse, ce que M. Schumacher s'est abstenu de faire.

19. Le 18 décembre 2008, M. Schumacher a été convoqué à l'audience qui s'est tenue au siège de l'AFLD, le 22 janvier 2009.
20. Par un fax du 22 janvier 2009, l'UCI a été informée par l'AFLD de la tenue de cette audience.
21. M. Schumacher n'a pas comparu personnellement; il était représenté par ses avocats Me Michael Lehner et Me Inge Duval.
22. Le 22 janvier 2009, la formation disciplinaire du Collège de l'AFLD a rendu une décision à l'encontre de M. Schumacher. Ce dernier a été suspendu pour une période de deux ans, aux compétitions et manifestations sportives organisées par les fédérations sportives françaises à compter de la date de notification, i.e. à partir du 23 février 2009.
23. Cette décision a été notifiée à l'UCI le 25 février 2009.
24. Le 3 mars 2009, l'UCI a notifié à M. Schumacher la reconnaissance internationale de l'intégralité de la décision rendue par l'AFLD, sous réserve du début de la période de suspension qu'elle a fixé au jour de la date de la décision – soit le 22 janvier 2009 – en application de l'article 10.8 du Code Mondial Antidopage (ci-après : le CMA).
25. Le 5 mars 2009, l'UCI a notifié à la Fédération allemande de cyclisme, soit la fédération nationale compétente pour la délivrance de sa licence à M. Schumacher, la reconnaissance de l'UCI et a demandé qu'il soit procédé au retrait de ladite licence pour la période allant du 22 janvier 2009 au 21 janvier 2011.
26. A la suite du Tour de France 2008, M. Schumacher a été licencié par l'équipe Gerolsteiner. Il a ensuite envisagé de rejoindre l'équipe ProTour Quick Step en vue du Championnat du monde 2008, mais, au vu des accusations de dopage pesant sur lui, il n'a pas pu obtenir la délivrance de sa licence ProTour de l'UCI. Il n'a ainsi plus participé à de course cycliste professionnelle depuis le 28 août 2008.
27. Le 22 avril 2009, M. Schumacher a déposé devant le Conseil d'Etat français une requête tendant à l'annulation de la décision susvisée du 22 janvier 2009, par laquelle l'Agence Française de Lutte contre le Dopage lui avait infligé une suspension pour une période de deux ans, de toute participation aux compétitions et manifestations organisées par la fédération française de cyclisme. A l'issue d'une audience tenue le 7 octobre 2009, le Conseil d'Etat a, par une décision du 28 octobre 2009, rejeté la requête de M. Schumacher, confirmant ainsi, le bien fondé de la sanction.

1.2. La procédure devant le Tribunal arbitral du sport

28. Le 1er avril 2009, M. Schumacher a adressé un « recours », valant mémoire d'appel au Tribunal arbitral du sport, à Lausanne (ci-après : TAS), à l'encontre de la reconnaissance par l'UCI, de la décision rendue le 22 janvier 2009 par l'AFLD.
29. Le 11 mai 2009, l'UCI a déposé un mémoire de réponse.
30. Les parties ont signé, par l'intermédiaire de leurs conseils, l'ordonnance de procédure émise par le TAS le 18 juin 2009.
31. Le 8 juillet 2009, une première audience a été tenue au TAS. L'UCI y a été représentée par Me Philippe Verbiest, et M. Schumacher par Me Michael Lehner et Me Inge Duval.
32. Cette audience a été entièrement consacrée à la question de la compétence du TAS dans le litige opposant les parties, l'UCI y invoquant l'inexistence, en l'espèce, d'un droit d'appel au TAS. La Formation a alors impartit aux parties un délai au 17 juillet 2009 pour produire leurs déterminations écrites sur ce point.
33. Divers échanges de correspondances ont alors eu lieu à ce propos entre les parties et le TAS jusqu'à que, par courrier du 17 juillet 2009, l'UCI accepte la compétence du TAS dans la présente cause, reconnaissant ainsi un droit d'appel de M. Schumacher contre la reconnaissance de la décision de l'AFLD. L'UCI acceptait cette compétence avec la précision que cela ne concernait que cette affaire et que cela ne saurait constituer un précédent.
34. A la suite de ce courrier, les parties se sont encore adressées, par l'intermédiaire du TAS, diverses correspondances relatives au fond du litige.
35. Par décision du 28 octobre suivant, le Conseil d'Etat français, ainsi qu'il a été dit, a rejeté la requête de M. Schumacher tendant à annuler la décision prise le 22 janvier 2009 par l'AFLD. A la demande du TAS et avec l'accord des parties, cette décision a été produite par M. Schumacher et versée au dossier.
36. Une seconde audience a été tenue au TAS, le 4 novembre 2009. L'UCI y a été représentée par Me Philippe Verbiest et Mme Amina Lanaya, et M. Schumacher par Me Michael Lehner et Me Inge Duval.
37. La Formation a siégé dans la composition sus indiquée et les parties n'ont formulé aucune remarque quant à cette composition ou au déroulement de l'audience.

38. Durant les débats, la Formation a informé les parties qu'elle avait accepté de prendre en considération leurs écritures jusque et y compris au 20 octobre 2009, en application de l'article R44.1 alinéa 2 du Code de l'arbitrage en matière de sport (ci-après : Code du TAS), quand bien même l'instruction écrite était déjà formellement terminée avant cette date (R44.1 al. 1). La question incidente de l'existence d'un droit d'appel avait en effet nécessité un échange d'écritures complémentaires. Les parties ont accepté cette façon de procéder.
39. En audience, il a été procédé à l'audition des parties ainsi que, en qualité d'experts, de M. Jacques de Ceaurriz, ex-Directeur du laboratoire antidopage de Paris, de M. Michel Audran, Professeur à la faculté de Montpellier et de M. Martial Saugy, Directeur du laboratoire antidopage de Lausanne.

2. ARGUMENTS DES PARTIES

2.1 Arguments et conclusions de M. Schumacher

40. Pour contester la décision de reconnaissance de l'UCI, M. Schumacher se prévaut essentiellement de l'illégalité de la décision de l'AFLD et soutient que celle-ci est entachée de nombreux vices.
41. M. Schumacher invoque tout d'abord un vice dans la procédure menée par l'AFLD en ce sens que ses droits à une procédure d'audition équitable n'auraient pas été respectés et que son identité aurait été divulguée publiquement par le quotidien français « L'Equipe » avant qu'il n'ait lui-même reçu la notification des faits qui lui étaient reprochés. De même, il soutient que la formation disciplinaire de l'AFLD se serait fondée sur des documents n'ayant pas été discutés contradictoirement et que toutes les pièces du dossier n'auraient pas été remises suffisamment tôt à ses défenseurs.
42. Sur le fond, l'appelant reproche à l'AFLD de ne pas avoir respecté la garantie d'anonymat des échantillons, notamment au vu de la publication de leurs codes dans le système ADAMS (Anti-Doping Administration & Management System) et des instructions adressées au laboratoire de Lausanne faisant référence aux dits codes.
43. Il estime que l'AFLD n'a pas apporté la preuve que les échantillons analysés contenaient bel et bien son sang et non celui d'un autre athlète en ce sens que la « chain of custody » ne serait pas vérifiable. En particulier, lors du rapatriement de Suisse en France, des

prélèvements faits durant le Tour de France, une confusion aurait été possible entre les nombreux échantillons transmis. A ce titre, l'appelant relève l'absence d'indication relative aux conditions de stockage (température) et d'envoi (scellés) par le laboratoire suisse.

44. Il résulterait des documents d'analyses présentés par l'AFLD qu'une seule « colonne » aurait été utilisée pour toutes les analyses effectuées, et non seulement pour celle concernant M. Schumacher. Ce procédé aurait obligatoirement entraîné des contaminations réciproques entre les substances analysées.
45. A ses yeux, le contrôle antidopage dont il avait fait l'objet en juillet 2008 était définitivement clos avec l'ouverture de l'échantillon A et le résultat négatif obtenu initialement par le laboratoire de Lausanne. L'AFLD n'était, selon lui, pas en droit de faire procéder, plusieurs mois plus tard, à une analyse rétrospective des échantillons.
46. Cette analyse rétrospective aurait en outre été effectuée au moyen d'une nouvelle méthode de détection de l'EPO CERA, qui ne correspondait pas à celle qui existait jusque là. Une seule procédure de validation interne, au sens de l'article 4.4.10 alinéa 1er du Standard international pour les laboratoires (ci-après : SIL), n'aurait donc pas été suffisante. Ainsi, selon l'appelant, cette nouvelle méthode ne pouvait être valablement utilisée avant d'avoir été formellement validée à la suite d'une procédure d'accréditation. L'extension d'accréditation délivrée par le COFRAC en serait d'ailleurs la preuve. La méthode de détection de l'EPO CERA n'ayant été accréditée que le 30 juin 2009, elle n'aurait donc eu aucune existence légale lors de l'analyse rétrospective des échantillons de M. Schumacher effectuée en 2008.
47. La méthode dite « Elisa » utilisée par le laboratoire de Lausanne dans son analyse de confirmation ne serait, quant à elle, applicable qu'à la procédure de filtrage préliminaire et n'aurait aucune valeur probante pour la détection de l'EPO.
48. L'appelant fait finalement valoir qu'il a été privé de son droit à obtenir la prolongation du délai d'ouverture de l'échantillon B, alors qu'il n'avait pas eu accès à l'intégralité des documents relatifs à l'analyse de l'échantillon A. De même, l'AFLD aurait volontairement soustrait la documentation relative à la validation interne de la nouvelle méthode d'analyse, à la connaissance de M. Schumacher.

49. Ce dernier conclut dès lors à l'annulation de la décision de reconnaissance par l'UCI de la décision rendue le 22 janvier 2009 par l'AFLD. A titre subsidiaire, il conclut à sa réforme en ce sens que la période de suspension mentionnée dans ledit jugement soit corrigée.

2.2 Arguments et conclusions de l'UCI

50. L'UCI rappelle tout d'abord le devoir qui est le sien de reconnaître les décisions prises par les instances qui sont signataires du CMA et qui accordent leur confiance au système antidopage mis en place tant par l'AMA que l'UCI. En l'espèce, après avoir procédé à un examen de la conformité de la décision prise par l'AFLD avec le CMA, conformément à l'article 306 RAD et 15.4 CMA, elle a reconnu cette décision, sous réserve de la période de suspension qu'elle se devait de corriger d'office. Cette modification de la décision ainsi reconnue n'irait pas à l'encontre du système établi par l'article 306 RAD dans la mesure où elle est favorable au coureur.
51. S'agissant des griefs d'ordre technique (scellé et stockage des échantillons, processus d'analyse, contamination, etc.) de M. Schumacher à l'encontre de la décision de l'AFLD, l'UCI estime que ce dernier tente en réalité d'interjeter un appel indirect contre la décision du Conseil d'Etat français qui a validé cette décision et s'y oppose tant sur la forme que sur les moyens invoqués par l'appelant.
52. Pour l'intimée, cette affaire est un cas évident de dopage, révélé par les résultats d'analyses. A ses yeux, la validité scientifique d'une preuve ne dépend pas de l'accréditation ultérieure de la méthode utilisée.
53. Quant à l'analyse de l'échantillon B, l'UCI dit ne pas comprendre comment M. Schumacher pouvait espérer la prolongation d'un délai imposé par la réglementation en vigueur.
54. L'UCI conclut dès lors à la confirmation de sa décision du 3 mars 2009 reconnaissant celle prise le 22 janvier 2009 par l'AFLD.

3. EN DROIT

3.1 Compétence du TAS

55. Si dans un premier temps, l'UCI a fait valoir qu'aucune disposition de ses statuts ou du RAD ne permettait de reconnaître la compétence du TAS en matière d'appel contre une décision de reconnaissance, telle que définie par l'article 306 du RAD, elle a, par déclaration du 17 juillet 2009, expressément accepté que le TAS, saisi par M. Schumacher, statue sur le présent litige.
56. Sans qu'il soit besoin d'examiner la compétence du TAS au regard des règles de l'UCI, sa compétence dans le présent arbitrage, résulte donc de l'article R47 Code du TAS relatif à la convention d'arbitrage particulière, en ce sens que les parties ont fait valoir leur volonté commune de soumettre leur litige à la connaissance du TAS.

3.2 Recevabilité de l'appel

57. Aux termes de l'article R49 du Code du TAS, le délai d'appel est de vingt-et-un jours dès la réception de la décision contestée, en l'absence de délai fixé par les statuts et règlements de la fédération, de l'association ou de l'organisme sportif concerné ou par une convention particulière préalablement conclue.
58. En l'espèce, et dès lors que les parties ont, ainsi qu'il vient d'être dit, accepté la compétence du TAS, il y a lieu de considérer que celles-ci ont également accepté les conditions d'appel au TAS prévues à l'article 285 du Règlement antidopage de l'UCI (ci-après : RAD), selon lesquelles les délais d'appel sont d'un mois pour toute décision de l'UCI susceptible d'appel au TAS, et donc en l'occurrence celle de la décision de reconnaissance litigieuse.
59. Le 3 mars 2009, l'UCI a communiqué à M. Schumacher la reconnaissance internationale de la décision rendue le 22 janvier 2009 par l'AFLD.
60. Le 2 avril 2009, M. Schumacher a envoyé au TAS sa déclaration d'appel contre cette reconnaissance, respectant ainsi le délai réglementaire précité. Son appel est donc recevable en la forme.

3.3 Droit applicable

61. Le TAS ayant son siège à Lausanne et les parties intimées étant domiciliées en dehors de la Suisse, le présent arbitrage est régi par le chapitre 12 de la Loi fédérale sur le droit international privé (LDIP).
62. En outre, l'arbitrage sportif est régi par le Code du TAS, et plus spécifiquement par ses articles R27 à R37 et R47 et suivants.
63. Selon l'article 187 alinéa 1 LDIP, un tribunal arbitral statue selon les règles de droit choisies par les parties ou, à défaut de choix, selon les règles de droit avec lesquelles la cause présente les liens les plus étroits.
64. Selon l'article R58 du Code du TAS, une Formation statue selon les règlements applicables et selon les règles de droit choisies par les parties, ou à défaut de choix, selon le droit du pays dans lequel la fédération, association ou autre organisme sportif ayant rendu la décision attaquée a son domicile ou selon les règles de droit dont la Formation estime l'application appropriée. Dans ce dernier cas, la décision de la Formation doit être motivée.
65. En l'espèce, il convient de rappeler que le Tour de France 2008 s'inscrivait dans le cadre des compétitions nationales organisées par la Fédération française de cyclisme. Dans ce contexte, les contrôles antidopage effectués lors de cette course l'ont été sous l'égide de l'AFLD et soumis à ses règles.
66. L'AFLD s'est notamment fondée sur le Code du sport français, en particulier son article L.232-9 qui renvoie à la liste des produits et procédés interdits dans le sport, dont fait partie l'EPO CERA. A l'instar du Conseil d'Etat français, dans sa décision du 7 octobre 2009, l'AFLD a également appliqué la Convention internationale contre le dopage dans le sport (UNESCO), qui prévoit l'engagement des Etats parties à adopter des mesures conformes aux principes énoncés dans le CMA. L'AFLD fait d'ailleurs partie des signataires du CMA et en a donc accepté l'application, conformément à l'article 23.1.1 CMA.
67. Aux termes de l'article 25.2 du CMA, *« Si une affaire en lien avec une violation des règles antidopage est en cours à la date d'entrée en vigueur ou est poursuivie après la date d'entrée en vigueur sur le fondement d'une violation des règles antidopage survenue avant la date d'entrée en vigueur, l'affaire sera régie par les règles antidopage de fond en vigueur au moment où la violation des règles antidopage*

présumée s'est produite, à moins que la formation instruisant l'affaire ne détermine que le principe de rétroactivité de la loi la plus douce "lex mitior" ne s'applique aux circonstances propres à l'affaire. ».

68. L'examen de la présente cause doit donc être apprécié au regard de la version 2003 du CMA.
69. Au demeurant, la reconnaissance par l'UCI de décisions prises par d'autres organisations se fonde sur l'article 306 RAD. Tel est le cas, en l'espèce, de la reconnaissance au niveau international (« certificate of recognition ») prononcée le 3 mars 2009 par l'UCI.
70. Aux termes de la lettre a de l'article 273 RAD, la version au 1er janvier 2009 des règles antidopage « *ne s'applique pas rétroactivement aux affaires en suspens avant le 1er janvier 2009; étant cependant entendu que toute affaire en suspens avant le 1er janvier 2009, ou intentée après le 1er janvier 2009 sur la base d'une violation aux règles antidopage survenue avant le 1er janvier 2009, sera régie par la précédente version des présentes règles antidopage en vigueur au moment de la violation des règles antidopage, sous réserve de l'application du principe de la lex mitior par l'instance d'audition statuant sur l'affaire. »*
71. La version 2008 du RAD est donc celle à laquelle il convient de se référer dans le cas d'espèce car la (présumée) violation des règles antidopage qui fait l'objet de la décision de reconnaissance de l'UCI est survenue avant le 1^{er} Janvier 2009.

3.4 Pouvoir d'examen

72. Le pouvoir d'examen de la Formation dans la présente procédure arbitrale d'appel est régi par les dispositions des articles R47 et suivants du Code du TAS. En particulier, l'article R57 octroie au TAS un pouvoir d'appréciation complet en fait et en droit dans le cadre de l'instruction de la cause.
73. L'admission d'un pouvoir d'examen qui ne soit pas restreint est en outre confortée par les mesures d'instruction étendues que la Formation est autorisée à ordonner aux termes de l'article R44.3 alinéa 2 du Code du TAS : « *La Formation peut en tout temps, si elle l'estime utile pour compléter les présentations des parties, requérir la production de pièces supplémentaires, ordonner l'audition de témoins, commettre et entendre des experts ou procéder à tout autre acte d'instruction (...)* » Cette large capacité

d'instruction démontre l'existence d'un plein pouvoir d'examen de l'affaire, notamment en ce qui concerne les faits.

74. Cependant, ce plein pouvoir d'examen sort du cadre usuel des sentences rendues par l'UCI dans les affaires de dopage et doit s'apprécier dans un contexte tout à fait particulier au regard de la nature et de l'objet de la décision soumise au TAS. En effet la décision attaquée devant le TAS n'est pas la décision de l'AFLD du 22 janvier 2009 faisant suite au contrôle antidopage effectué lors du Tour de France 2008, mais celle de l'UCI de reconnaître la décision de l'AFLD. Le pouvoir d'examen du TAS doit donc porter sur la décision de l'UCI et seulement de manière incidente ou subsidiaire sur la décision de l'AFLD.

4 EXAMEN DU LITIGE

75. Aux termes de l'article 306 alinéa 1 RAD, « (...) *les contrôles, les autorisations d'usage à des fins thérapeutiques, les décisions des instances d'audition et toute autre décision finale rendue par un signataire seront reconnus et respectés par l'UCI et ses fédérations nationales, dans la mesure où ils sont conformes au Code et relèvent du champ de compétences dudit signataire.* ».
76. L'AFLD fait partie des signataires du CMA et en a donc accepté l'application, conformément à l'article 23.1.1 CMA. C'est ainsi sur le fondement de l'article 306 alinéa 1 RAD que l'UCI a le 3 mars 2009, reconnu la décision de l'AFLD par un acte ainsi formulé : « ...On this basis, the decision n°2009-03 of AFLD fulfils conditions of being recognized and respected by UCI and its National Federations. However, where under French law the period of ineligibility imposed upon Mr. Schumacher started on 23 February, this is the date at which Mr. Schumacher confirmed receipt of said decision, the WADC stipulates that the period of ineligibility shall start (no later than) on the date of hearing decision. Therefore, the UCI shall consider M. Schumacher ineligible for a period of two years starting 22 January 2009. This recognition does not affect any right of Mr. Schumacher to appeal the AFLD decision. This recognition will remain in force until such moment that the decision of AFLD is overruled or suspended under applicable law. »

77. L'examen des moyens de droit dirigés contre cette décision de l'UCI nécessite au préalable de résoudre deux questions :

- (1) quelle est la nature juridique de cet acte de reconnaissance ?
- (2) quelle est la portée du contrôle qui peut être exercé sur cet acte de reconnaissance ?

4.1 Qualification juridique de l'acte de reconnaissance

78. L'acte de reconnaissance édicté le 3 mars 2009 par l'UCI peut être considéré soit comme l'expression d'un simple constat de l'existence d'une décision rendue par l'AFLD, en sa qualité d'instance nationale de lutte contre le dopage, soit comme une décision en tant que telle, revêtant une portée juridique et contraignante pour l'athlète auquel elle s'adresse. Dans la première hypothèse, ce simple constat ne ferait que prendre acte de la décision de l'instance française qu'est l'AFLD pour en informer, en quelque sorte, les autres fédérations nationales liées à l'UCI, lesquelles seraient d'elles-mêmes tenues de la respecter et de l'appliquer sur le fondement de l'article 306 RAD. Cet acte reconnaissant et informatif ne constituerait pas une décision faisant grief, ne nécessiterait bien évidemment aucune procédure contradictoire et ne pourrait faire l'objet d'aucun recours. Dans la seconde hypothèse, au contraire, il s'agirait d'une décision formelle qui fait grief en ce qu'elle modifie la situation juridique de l'intéressé. Elle nécessiterait alors une procédure contradictoire et pourrait faire l'objet d'un recours sur lequel le TAS aurait un plein pouvoir d'examen.

79. La Formation est d'avis que la décision de reconnaissance litigieuse doit être considérée comme une décision formelle. Elle crée en effet des conséquences directes pour M. Schumacher puisqu'elle confirme non seulement la sanction prononcée par l'AFLD, mais étend également la portée immédiate de ladite sanction du niveau national au niveau international. Elle confère par la même une publicité beaucoup plus importante aux faits reprochés à l'athlète et modifie l'impact de la sanction. Il ne s'agit donc pas du simple constat d'une décision interne. Il est d'ailleurs à relever en ce sens que l'UCI ne s'est pas contentée de retranscrire fidèlement le contenu de la décision du 22 janvier 2009, mais qu'elle l'a modifiée quant à la période de suspension.

80. Dès lors qu'elle modifie la portée de la sanction, cette décision de reconnaissance devrait alors garantir à l'intéressé un minimum de ses droits de la défense en lui permettant à tout le moins, de pouvoir présenter ses observations préalablement à son édicition.
81. Dans le cas d'espèce le droit de l'athlète d'être entendu a été respecté par l'UCI, laquelle lui a donné la possibilité de s'exprimer par écrit avant de prendre sa décision de reconnaissance. L'intéressé a largement fait usage de ce droit, ainsi qu'en attestent notamment ses courriers à l'UCI datés des 31 octobre 2008 et 26 février 2009. Le 3 mars 2009, l'intimée a par ailleurs confirmé à M. Schumacher qu'elle avait bien eu connaissance de ses arguments: « *It is UCI's view that the arguments in your letter and those in Me Duval's letter of 28 January 2009 do not prevent AFLD's decision from being recognized under UCI's Anti-Doping Rules* ». Par surabondance, la Formation relève que l'appelant et ses défenseurs ont encore bénéficié, sans restriction aucune, de débats contradictoires durant les deux audiences tenues devant le TAS et, qu'à ces occasions, les parties disposaient de tous les éléments du dossier.

4.2 Portée du contrôle de l'acte de reconnaissance

4.2.1 Appréciation du pouvoir général d'examen du TAS sur l'acte de reconnaissance

82. Si l'acte de reconnaissance a bien un effet juridique, il doit pouvoir faire l'objet d'un contrôle. Mais ce contrôle peut aller d'un simple contrôle particulièrement succinct à un contrôle, au contraire, beaucoup plus étendu.
83. Dans la première hypothèse, et en se rapprochant notamment du mécanisme de l'exequatur, il s'agirait de considérer que l'acte de reconnaissance rend bien applicable la décision initiale de l'AFLD à d'autres fédérations nationales, mais qu'il ne peut être exercé qu'un contrôle à minima, se limitant à vérifier d'une part, que cet acte de reconnaissance a été régulièrement édicté et d'autre part, que ledit acte n'étend pas une sanction qui aurait été prise au mépris et en violation des règles de procédures disciplinaires les plus élémentaires.
84. Dans la seconde hypothèse, il s'agirait tout autant de considérer que l'acte de reconnaissance rend bien applicable la décision initiale de l'AFLD à d'autres fédérations nationales, mais qu'il convient d'opérer un contrôle beaucoup plus approfondi pour vérifier d'une part, que cet acte de reconnaissance a bien, toujours été

régulièrement édicté et d'autre part, qu'il n'étend pas une sanction qui ne respecterait pas seulement des conditions de forme, mais aussi des conditions de fond.

85. La Formation estime que la portée de son contrôle relève de la seconde hypothèse. En effet elle constate que selon l'article 306 RAD, les contrôles, les autorisations d'usage à des fins thérapeutiques, les décisions des instances d'audition et toute autre décision finale rendue par un signataire seront reconnus et respectés par l'UCI et ses fédérations nationales, « dans la mesure où ils sont conformes au Code et relèvent du champ de compétences dudit signataire. ». Il en résulte que le contrôle de l'acte de reconnaissance doit bien permettre de vérifier que ces deux conditions sont remplies.
86. Si la vérification de la condition relative au champ de compétences du signataire de la décision initiale, ne pose guère de difficultés, il n'en va pas de même pour la vérification de la conformité de la décision initiale au CMA, vérification qui pourrait être de nature à aboutir, en réalité selon les cas et les circonstances, à reprendre l'examen complet de cette décision initiale.
87. Or la Formation considère que le contrôle qu'elle a à exercer sur l'acte de reconnaissance ne doit pas se confondre avec le contrôle de la décision initiale, voire même servir de mécanisme d'appel ou de cassation à l'encontre des décisions juridictionnelles ayant déjà pu opérer un contrôle sur cette décision.
88. Certes, l'exercice n'est pas aisé, car vérifier que la décision initiale a été prise conformément au CMA, pour en valider la reconnaissance et l'extension, oblige bien à apprécier cette décision initiale par rapport au CMA.
89. Dans un tel contexte, il convient donc de préciser le pouvoir d'examen du TAS en matière de conformité avec le CMA, d'un acte de reconnaissance.

4.2.2 Appréciation du pouvoir particulier d'examen du TAS sur l'acte de reconnaissance, en matière de conformité avec le CMA..

90. La Formation est d'avis que le système mis en place par l'article 306 alinéa 1 RAD pour le contrôle de la conformité d'une décision avec le CMA se fonde sur le fait que ce code est le document fondamental et universel sur lequel repose le Programme mondial antidopage dans le sport. Ainsi que l'évoque la partie introductive du CMA actuel (version 2009), « le but du Code est de promouvoir la lutte antidopage par

l'harmonisation universelle des principaux éléments liés à la lutte contre le dopage. Le Code est suffisamment précis pour permettre l'harmonisation totale des questions où l'uniformité est nécessaire, et suffisamment général pour offrir une certaine souplesse dans l'application des principes antidopage admis. ». Dans le cadre de ce besoin d'harmonisation totale et d'uniformité, le CMA constitue donc, en quelque sorte, « l'ordre public du sport ». Les éléments essentiels de ce dernier sont calqués sur certains articles impératifs, « *qui se rapportent à la portée des mesures antidopage d'une organisation antidopage* » et « *doivent être adoptés sans changement significatif (...)* ». Parmi ceux-ci figurent en particulier, dans l'ancien CMA (version 2003, applicable ici), l'article 1 (Définition du dopage), l'article 2 (Violations des règles antidopage), l'article 3 (Preuve du dopage) l'article 8 (Droit à une audition équitable) et l'article 10 (Sanctions imposées aux individus).

91. En d'autres termes, il appartient au TAS, lorsqu'il est saisi d'un appel contre une décision de reconnaissance, comme en l'espèce, de s'assurer que les principes ayant conduit une autorité à prendre ladite décision ne soient pas contraires aux exigences fondamentales prévues par le CMA dans les dispositions précitées. Respectivement, il appartient à l'athlète, qui se prévaut de l'invalidité de cette même décision, de démontrer, en fait et en droit, dans quelle mesure l'instance antidopage qui l'a rendue a outrepassé ce que l'on pourrait appeler le « cadre fondamental de conformité ». La Formation relève à ce propos que le RAD actuellement en vigueur, même s'il n'est pas applicable à la présente cause, ne parle plus de « conformité » avec le CMA, mais de « cohérence » avec ce dernier. Cette notion démontre la volonté actuelle de l'AMA d'élargir les possibilités de reconnaissance des décisions prises par les signataires du CMA.
92. En outre, la Formation est d'avis que lorsque la décision initiale a fait l'objet, dans la pays d'origine, d'un contrôle et d'une décision juridictionnelle, devenus définitifs, elle doit continuer à vérifier, à travers l'acte de reconnaissance, que cette décision initiale n'est pas contraire aux exigences fondamentales prévues par le CMA, telles que définies ci-dessus.
93. En conclusion sur ce point, la Formation retient sur cette délicate question, que le TAS garde sur l'acte de reconnaissance un contrôle qui l'amène à vérifier que la décision initiale qui est ainsi reconnue et étendue, est conforme aux exigences fondamentales du CMA, que l'exercice de ce contrôle revêt en principe un caractère subsidiaire par rapport au contrôle ayant déjà pu être opéré par les instances juridictionnelles nationales

et que ce contrôle doit rester limité aux infractions manifestes des exigences fondamentales du CMA.

4.3. Appréciation des moyens de droit invoqués

4.3.1 Moyens relatifs au champ de compétence de l'autorité dont la décision est reconnue par l'UCI.

94. La décision doit, en premier lieu, selon l'article 306 RAD, être rendue par un «signataire du Code».
95. Selon la définition contenue dans le RAD de l'UCI, les signataires sont les entités qui ont signé le CMA et s'engagent à le respecter, comprenant le Comité International Olympique, l'UCI, le Comité International Paralympique, les comités nationaux olympiques, les comités nationaux paralympiques, les organisations responsables de grands événements sportifs, les organisations nationales antidopage, et l'AMA.
96. Il s'agit dès lors de rappeler le statut de l'AFLD.
97. L'AFLD, autorité publique indépendante dotée de la personnalité morale en droit français, 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, puis par le décret du 29 septembre 2006, qui l'a fait naître le 1er octobre suivant. Le Code du sport français dispose que l'AFLD peut diligenter des contrôles antidopage pendant les compétitions organisées par les fédérations sportives délégataires. Ainsi l'AFLD n'a pas la possibilité légale d'organiser, de sa propre volonté, des contrôles antidopage lors de compétitions internationales. Cependant elle peut en coordination et avec l'accord de l'AMA ou d'une fédération sportive internationale, diligenter des contrôles à l'occasion des compétitions de niveau international.
98. L'AFLD revêt également la qualité de membre signataire du CMA depuis le 4 octobre 2007, à la suite de sa délibération n°68 du même jour portant acceptation du CMA.
99. Il convient ensuite de vérifier que la décision initiale du 22 janvier 2009 relève bien de la compétence de l'AFLD.
100. La compétence de l'AFLD pour prononcer sa décision à l'encontre de M. Schumacher résulte de l'article 2 du RAD, qui reprend les dispositions de l'article 15.1 CMA.

101. L'article 2, alinéa 2 du RAD prévoit que *« les coureurs participant à des manifestations nationales sont soumis à des contrôles en compétition initiés et réalisés par l'organisation nationale antidopage du pays ou par toute autre organisation ou personne ainsi habilitée par l'organisation nationale antidopage en question. Le contrôle du dopage est régi par le règlement antidopage de cette organisation nationale antidopage »*.
102. Comme indiqué ci-dessus, le Tour de France 2008 était une manifestation nationale s'agissant des contrôles antidopage. Ceux-ci ont donc été initiés et dirigés par l'AFLD, sous l'égide du règlement de l'AFLD.
103. Conformément à l'article 15.3.1 CMA, *« la gestion des résultats et la conduite de la procédure d'audition en cas de violation des règles antidopage découlant d'un contrôle effectué par une organisation nationale antidopage, ou découverte par cette dernière, et impliquant un sportif qui n'est pas ressortissant, résident, titulaire d'une licence ou membre d'une organisation sportive du pays en question, seront administrées conformément aux règles de la fédération internationale compétente »*.
104. L'article 11 du RAD prévoit que *« la gestion des résultats et la procédure d'audition concernant une violation des règles antidopage découlant d'un contrôle effectué ou une violation décelée, par une organisation nationale antidopage impliquant un licencié qui n'est pas citoyen ou résident de ce pays seront effectuées par cette organisation nationale antidopage et suivant son règlement. »*
105. De plus, la compétence de l'AFLD pour prononcer des sanctions à l'encontre des personnes non licenciées d'une fédération sportive française, est prévue par la loi française, plus précisément par les dispositions prévues aux articles L. 232-5 et L. 232-33 du Code du sport français.
106. Au vu de ces dispositions légales et réglementaires, ainsi que de la structure, du fonctionnement et de l'intégration de l'AFLD dans le réseau international de lutte contre le dopage, celle-ci dispose bien de la compétence pour procéder à des contrôles, gérer les résultats des compétitions, tenir des audiences et rendre des décisions en matière de lutte contre le dopage. Ses décisions sont donc susceptibles d'être reconnues par l'UCI, au sens de l'article 306 alinéa 1 RAD.

4.3.2 Moyens relatifs à la conformité avec le CMA

4.3.2.1 Conformité avec les exigences du CMA en matière de procédure d'audition.

107. L'article 8 CMA prévoit des règles minimales de procédure devant être respectée par l'instance antidopage dans le cadre de la procédure d'audition d'un athlète. Il s'agit dès lors de vérifier si l'AFLD n'a pas commis une violation de ces règles.
108. L'obligation de la tenue d'une audience dans un délai raisonnable (art. 8 ch. 1 CMA) a été respectée: la violation commise par M. Schumacher lui a été notifiée par l'AFLD le 3 octobre 2008 et l'audience a eu lieu le 22 janvier 2009, soit dans un délai de quatre mois, ce qui constitue un délai raisonnable.
109. M. Schumacher a pu faire valoir ses droits devant une instance d'audition équitable et impartiale (art. 8 ch. 2 CMA): selon la loi française, c'est la formation disciplinaire du Collège de l'AFLD qui constitue l'instance d'audition. L'on relève sur le site internet de l'AFLD que « *L'indépendance de l'Agence est garantie à la fois par la composition du collège qui la dirige, et par son autonomie de fonctionnement. Le collège de l'AFLD comprend neuf membres, qui sont tous désignés par des autorités elles-mêmes indépendantes du Gouvernement : trois juristes, issus du Conseil d'Etat et de la Cour de cassation, trois scientifiques, désignés par les Académies des sciences, de médecine et de pharmacie, trois personnalités qualifiées dans le domaine du sport, désignées pour deux d'entre elles par le président du CNOSF (un membre du conseil d'administration du CNOSF, ainsi qu'un sportif ou ex-sportif de haut-niveau), et la troisième, par le Comité consultatif national d'éthique. Par ailleurs, une personnalité ayant compétence en médecine vétérinaire participe aux travaux du collège en matière de dopage animal.* » Il ressort de ce qui précède que l'impartialité du Collège de l'AFLD ne peut pas être mise en cause.
110. Il a régulièrement exercé son droit de pouvoir être représenté à ses frais par un conseil (art. 8 ch. 3 CMA): Me Michael Lehner et Me Inga Duval ont représenté l'appelant dans le cadre de la procédure devant l'AFLD.
111. Il a été informé équitablement et dans un délai raisonnable de la violation des règles antidopage retenues à son encontre (art. 8 ch. 4 CMA): il ressort de la décision de l'AFLD du 22 janvier 2009 que M. Schumacher en a été régulièrement informé le 7 octobre 2008 par l'AFLD. Dans ce contexte, le fait que son identité aurait été divulguée

Court of Arbitration for Sport

publiquement par le quotidien français « L'Equipe » avant la notification formelle est sans incidence ici. En effet, il ne résulte ni du dossier ni des affirmations de l'appelant que les informations parues dans la presse émanaient de l'AFLD. De même, les déclarations publiques du président de cette institution, qui s'est borné à confirmer le résultat positif des analyses sans pour autant déclarer que l'athlète était coupable de dopage, ne contreviennent pas au principe de la présomption d'innocence.

112. Son droit de se défendre contre les accusations de violation des règles antidopage et les conséquences qui en résultent (art. 8 ch. 5 CMA) a été garanti : il ressort de la décision de l'AFLD du 22 janvier 2009 que M. Schumacher, par l'intermédiaire de ses avocats, s'est défendu contre les accusations de violation des règles antidopage en soumettant un grand nombre d'arguments, qui ont d'ailleurs été repris dans son mémoire d'appel adressé au TAS.
113. Il a régulièrement bénéficié de son droit à soumettre des preuves, y compris le droit de faire citer et d'interroger des témoins (art. 8 ch. 6 CMA): il ressort de la décision de l'AFLD du 22 janvier 2009 que M. Schumacher a produit au dossier un grand nombre de courriers et de documents techniques à l'appui de son argumentation. Il a en outre pu faire entendre des témoins dans le cadre de la procédure devant le TAS.
114. Son droit à disposer d'un interprète à l'audience (art. 8 ch. 7 CMA) n'a pas été méconnu : il ressort de la décision du 22 janvier 2009 que M. Schumacher n'était pas présent à l'audience du 22 janvier 2009, mais qu'il était représenté par ses deux avocats, tous deux maîtrisant la langue française.
115. Enfin, il a disposé d'une décision écrite, motivée et dans un délai raisonnable, comportant notamment des explications sur les motifs justifiant la suspension (art. 8 ch. 8 CMA): les motifs de la suspension ont été précisément établis dans la décision du 22 janvier 2009. De plus, la décision motivée du 22 janvier 2009 a été notifiée à M. Schumacher le 23 février 2009, soit moins d'un mois plus tard, ce qui constitue un délai raisonnable.
116. L'instruction de la cause n'a donc pas permis à la Formation de constater une erreur dans la façon avec laquelle l'autorité de première instance a conduit sa procédure.
117. Contrairement à l'argument de M. Schumacher, rien n'indique au demeurant qu'il aurait été sanctionné sur la base de documents qui n'auraient pas été discutés contradictoirement. Son moyen selon lequel certains documents techniques auraient été

établis lors des analyses et ne lui auraient pas été communiqués, à le supposer établi, est sans incidence sur la régularité de la procédure disciplinaire suivie, dès lors qu'il n'est ni établi ni même allégué que ces documents auraient été portés à la seule connaissance de l'AFLD. A ce propos, la procédure n'est pas non plus entachée de vice au motif que toutes les pièces du dossier n'auraient pas été remises simultanément aux défenseurs de l'appelant puisqu'il est incontestable que ceux-ci ont pu utilement les discuter lors de la procédure disciplinaire.

118. En outre, et ainsi qu'il a été précisé supra (§81) le droit de l'athlète d'être entendu a également été respecté par l'UCI qui lui a donné la possibilité de s'exprimer par écrit avant de prendre sa décision de reconnaissance.
119. La décision litigieuse a donc été rendue par une organisation antidopage compétente en la matière et est valide d'un point de vue procédural.

4.3.2.2 Conformité avec les exigences du CMA en matière de preuve de dopage.

120. La Formation tient tout d'abord à rappeler les exigences fondamentales prévues par le CMA en ce qui concerne la preuve du dopage.
121. En application de l'article 3.1 CMA, « *la charge de la preuve incombera à l'organisation antidopage, qui devra établir la réalité de la violation d'un règlement antidopage. Le degré de preuve établira si l'organisation antidopage a satisfait à la charge de la preuve à la satisfaction de l'instance d'audition qui appréciera le sérieux de l'allégation. Le degré de preuve, dans tous les cas, devra être plus important qu'un juste équilibre des probabilités, mais moins qu'une preuve au-delà d'un doute raisonnable. Lorsque le code confie à un sportif ou à toute autre personne présumée d'avoir commis une violation des règles antidopage, la charge de renverser une présomption ou d'établir des circonstances ou des faits spécifiques, le degré de preuve devra être fondé sur un juste équilibre des probabilités* ». Il convient donc de confronter les moyens de preuve présentés par chacune des parties.
122. Quant au mode d'établissement des faits, l'article 3.2.1 alinéa 1 CMA prévoit que « *les laboratoires accrédités par l'AMA sont présumés avoir effectué l'analyse des échantillons et respecté les procédures de la chaîne de sécurité conformément aux standards internationaux pour les laboratoires. Le sportif pourra renverser cette présomption en démontrant qu'un écart aux standards internationaux pour les*

laboratoires est survenu ». Il existe donc une présomption réfragable selon laquelle les laboratoires accrédités par l'AMA ont effectué les analyses dans les règles de l'art, conformément au SIL. Il appartient alors à l'athlète de démontrer qu'un écart est survenu par rapport au SIL pour renverser cette présomption. Comme le précise la jurisprudence constante du TAS, l'athlète ne peut se contenter d'invoquer l'existence d'une erreur potentielle dans la procédure d'analyse, mais doit au contraire rapporter la preuve d'une violation du SIL (cf. not. TAS 2006/A/1119, UCI c. L. & RFEC, en part. § 61, p. 19; TAS 2007/A/1444 & TAS 2008/A/1465, UCI c/Iban Mayo & Real Federación Española de Ciclismo, § 111, p. 20). Selon l'article 3.2.1 alinéa 2 CMA, si l'athlète parvient à renverser la présomption en démontrant qu'un écart au SIL est survenu, il incombera alors à l'organisation antidopage de démontrer que cet écart n'a pas pu être à l'origine du résultat d'analyse anormal.

123. Selon les termes et définitions du SIL (art. 3.1), un « *résultat d'analyse anormal* » est le « *rapport d'un laboratoire ou d'une autre instance habilitée à réaliser des analyses révélant la présence, dans un échantillon, d'une substance interdite ou d'un de ses métabolites ou marqueurs (y compris des quantités élevées de substances endogènes) ou l'usage d'une méthode interdite* ».

124. Il convient dès lors d'apprécier les moyens développés par M. Schumacher tendant à réfuter les preuves du dopage

A. Rupture de la « chain of custody »

125. Selon M. Schumacher, l'AFLD n'aurait pas apporté la preuve que les échantillons analysés contenaient bel et bien son sang et non celui d'un autre athlète, en ce sens que la chaîne de sécurité (« *chain of custody* ») ne serait pas vérifiable.

126. Après étude du dossier, des documents techniques qui y ont été versés et des explications données par les experts durant les débats, la Formation n'a trouvé aucun élément permettant de soupçonner que les échantillons sanguins analysés ne seraient pas ceux prélevés sur M. Schumacher lors des contrôles des 3 et 15 juillet 2008. Elle estime, au contraire, que l'intimée a produit les pièces en sa possession qui allaient dans le sens du respect des règles applicables en la matière. En particulier, les dossiers analytiques du Département des Analyses et du laboratoire d'analyse de Lausanne démontrent qu'un numéro d'identification a été affecté à chacun des échantillons dès le contrôle et que

toutes les garanties ont été apportées s'agissant des opérations de réception, de transport, de conservation, de surveillance et de manipulation pour assurer le suivi et l'intégrité des échantillons. L'intéressé ne produit, quant à lui, aucun autre document particulier ou preuve, de nature à étayer sa thèse selon laquelle des irrégularités auraient été commises soit dans la procédure de prélèvement, soit durant les différents transferts subséquents. Contrairement à ce qu'il prétend, aucune règle n'impose que les échantillons sanguins fassent l'objet de nouveaux scellés en présence de l'athlète, lorsqu'ils ont fait l'objet de premières analyses, les stipulations combinées des articles 5.2.2.12.1.1. et 6.2.2.11 du SIL imposant seulement leur conservation et leur analyse dans le cadre des règles qu'il édicte. Tel a été le cas et, en l'absence d'une rupture avérée de la « chain of custody » telle que prévue par le SIL.

127. L'absence d'indication relative aux conditions de stockage (température) et d'envoi (scellés) par le laboratoire suisse, dont se prévaut l'appelant, ne saurait lui permettre d'en déduire que les résultats d'analyse sont faux. Selon le Dr. Saugy, une conservation éventuellement inadéquate des échantillons, due par exemple à un refroidissement insuffisant durant leur transport, pourrait tout au plus causer une altération de son contenu et éliminer la substance interdite. Le Dr. Saugy en conclut même que, si l'on trouve un résultat positif après une longue période de stockage, ce résultat va dans le sens d'une positivité bien marquée au début du stockage.

B. Violation de la garantie d'anonymat

128. L'appelant reproche à l'AFLD de ne pas avoir respecté la garantie d'anonymat des échantillons, notamment au vu de la publication de leurs codes dans le système ADAMS et des instructions adressées au laboratoire de Lausanne faisant référence aux dits codes.
129. Considérant que le prélèvement et les transferts des échantillons sanguins ont été effectués dans les règles de l'art, la seule possibilité de rompre l'anonymat y relative pourrait provenir d'un échange d'information entre les deux laboratoires ayant travaillé sur ces échantillons. Or, il résulte de l'instruction qu'aucun d'eux n'avait la possibilité de relier le numéro d'identification donné aux échantillons, à l'identité du sportif dont ils provenaient. Les données nominatives figurant dans les procès-verbaux de contrôle ne sont en effet pas transmises aux laboratoires et ceux-ci ne peuvent pas davantage avoir

accès à ces informations lorsqu'elles sont enregistrées dans le système d'administration et de gestion antidopage (ADAMS) de l'AMA. En d'autres termes, l'AFLD a confié de façon tout-à-fait anonyme la nouvelle analyse des échantillons sanguins de M. Schumacher à ces laboratoires.

130. Durant son audition, le Prof. de Ceaurriz a par ailleurs confirmé ce point en certifiant que ni lui, ni ses collaborateurs n'avaient pu avoir connaissance de l'identité correspondant au numéro d'identification des échantillons reçus au laboratoire de Châtenay-Malabry. Le Dr. Saugy a, quant à lui, confirmé ce point en ce qui concerne les analyses effectuées à Lausanne.

C. Contamination des échantillons

131. L'appelant soutient qu'une seule « colonne » aurait été utilisée pour toutes les analyses effectuées, et non seulement pour celle le concernant. Ce procédé aurait obligatoirement entraîné des contaminations réciproques entre les substances analysées.
132. Les experts entendus ont expliqué et défini cette notion de « colonne » comme étant le système qui permet le transport de l'anticorps chargé de filtrer l'EPO. Selon le Prof. de Ceaurriz, la documentation technique versée au dossier montre clairement que les échantillons analysés ont été à chaque fois « séparés par des témoins », ce qui écarte tout risque de contamination. Selon le Prof. Audran, les analystes ont effectivement appliqué une technique de vérification de la non contamination des échantillons entre eux en « passant un blanc » entre chacun d'eux.
133. De son côté, l'appelant – bien que procédant à un exposé crédible des risques inhérents à ce type d'analyses – n'a apporté aucun élément de preuve formelle selon lequel le SIL n'aurait pas été respecté ou selon lequel il y aurait effectivement eu une contamination ayant un impact sur le résultat d'analyse (dans le sens d'une positivité du résultat).

D. Analyse subséquente de l'échantillon A

134. M. Schumacher estime que le contrôle antidopage dont il avait fait l'objet en juillet 2008, était définitivement clos avec l'ouverture de l'échantillon A et le résultat négatif obtenu initialement par le laboratoire de Lausanne. L'AFLD n'était, selon lui, pas en

droit de faire procéder, plusieurs mois plus tard, à une analyse rétrospective des échantillons.

135. Aucune disposition applicable au cas d'espèce, fût-elle prévue par le CMA ou par le Code du sport français, ne prévoit qu'un contrôle doit être considéré comme définitivement terminé à l'issue de la première analyse de l'échantillon A dès lors que le volume de sang encore disponible est suffisant pour permettre une nouvelle analyse.
136. Au contraire, le chapitre 5.2.4.3.1 (« Confirmation sur l'Échantillon "A" ») du SIL ouvre clairement la porte à la répétition d'une analyse de l'échantillon A, voire même à de multiples répétitions, tant que subsiste un reliquat suffisant pour y prélever une partie aliquote: *« L'identification présomptive, par une Procédure de dépistage, d'une Substance interdite, de Métabolite(s) associé(s) ou de Marqueur(s) indiquant l'Usage d'une Substance interdite ou d'une Méthode interdite doit être confirmée sur une deuxième Partie aliquote prélevée sur l'Échantillon "A" original. »* (5.2.4.3.1.1). *« Le Laboratoire doit disposer d'une politique définissant les circonstances dans lesquelles il est admis de répéter l'analyse de confirmation d'un Échantillon "A" (par exemple dans le cas d'une défaillance dans le contrôle de la qualité d'un lot). Chaque nouvelle analyse de confirmation doit être documentée et être réalisée sur une nouvelle Partie aliquote de l'Échantillon "A". »* (5.2.4.3.1.4).
137. Le but de ces dispositions est notamment d'éviter des situations dans lesquelles des problèmes techniques, qui se produiraient pendant une analyse, empêcheraient l'achèvement ou la bonne réalisation de celle-ci (cf. TAS 2007/A/1444 & TAS 2008/A/1465, UCI c/Iban Mayo & Real Federación Española de Ciclismo, § 140, p. 27).
138. En outre, l'article 177 RAD (version 2008) prévoit expressément que *« lorsque des circonstances spécifiques le justifient, la commission antidopage peut demander qu'une partie de l'échantillon soit analysée dans un second laboratoire »*. Et l'article 196 RAD, qui traite de l'échantillon B, autorise l'exécution de deux analyses distinctes par deux laboratoires différents, lorsque les conditions le justifient. Il convient en effet de pallier au fait que tous les laboratoires ne disposent pas des technologies requises pour certains types d'analyses complexes et de s'assurer qu'une analyse puisse malgré tout être menée à son terme, dans le respect du contradictoire (ibidem, § 141, p. 27).

139. Cette approche est parfaitement compatible avec les principes généraux de la lutte antidopage et de la protection des athlètes – en l'occurrence des concurrents de l'athlète incriminé – qui imposent de tout mettre en œuvre pour découvrir, autant que possible, la vérité et, par conséquent, de déterminer s'il y a présence ou non d'une substance interdite dans les échantillons corporels de l'athlète.
140. L'article 3.2 CMA (version 2003) va d'ailleurs dans ce sens puisqu'il prévoit que « *les faits liés aux violations de règles antidopage peuvent être établis par tout moyen sûr (...)* ». Et l'article 6.5 CMA (version 2009) précise que, moyennant le respect de certaines conditions, un échantillon peut être soumis en tout temps à une nouvelle analyse. Même si cette disposition n'était pas encore en vigueur au moment des faits reprochés à l'appelant, il démontre néanmoins clairement que la volonté des instances antidopage n'était en tous cas pas, en 2008, d'empêcher la découverte de la vérité par la réalisation d'une ou de plusieurs analyses complémentaires sur un même échantillon.
141. En l'espèce, à la suite du rapport établi le 17 juillet 2008 par le Département des Analyses et évoquant la présence possible d'EPO CERA dans l'urine de l'athlète, l'AFLD a estimé qu'il était nécessaire de procéder à une nouvelle analyse de l'échantillon A. Cette démarche était conforme à la lettre et à l'esprit tant du CMA que du RAD.

E. Accréditation et utilisation de la méthode de détection de l'EPO CERA dans le sang

142. M. Schumacher considère que la méthode pratiquée par le Département des Analyses pour détecter l'EPO CERA dans son échantillon sanguin ne pouvait être valablement utilisée avant d'avoir été formellement validée à la suite d'une procédure d'accréditation. En d'autres termes, il remet en cause la validité de la méthode de détection effectuée par le laboratoire de Châtenay-Malabry compte tenu de son absence d'accréditation par le COFRAC au moment de l'analyse. A ses yeux, seul le deuxième alinéa de l'article 4.4.10 du SIL pouvait s'appliquer, ce qui interdisait une simple procédure de validation interne.
143. Le but du SIL est d'assurer la production par les laboratoires, de résultats d'analyse valides et de données ayant valeur de preuve, ainsi que l'harmonisation des modalités

d'obtention et de rendu des résultats pour l'ensemble des laboratoires accrédités. Le SIL et les documents techniques associés spécifient également les critères qui doivent être remplis par les laboratoires antidopage pour obtenir et conserver leur accréditation de l'AMA. La version du SIL applicable en l'espèce est celle en vigueur antérieurement à 2009 dans la mesure où la méthode utilisée pour l'analyse de l'échantillon de M. Schumacher été accréditée par le COFRAC en date du 30 juin 2009.

144. L'article 4.4.10 (« Flexibilité de la portée d'accréditation ») du SIL est ainsi libellé:
« Les Laboratoires accrédités par l'AMA sont autorisés à modifier des méthodes scientifiques existantes ou à y ajouter des analyses pour étendre le champ de leurs activités, ou à mettre au point de nouvelles méthodes qui impliquent une technologie qui entre déjà dans le champ de leur accréditation, sans en référer à l'organisme qui a procédé à l'accréditation ISO/CEI 17025 du Laboratoire. Pour obtenir une flexibilité de son champ d'accréditation, le Laboratoire doit disposer, dans sa documentation sur le management de la qualité, de processus relatifs à la validation/acceptation des méthodes, aux compétences du personnel principal, à l'archivage et au compte rendu. »
(alinéa 1).

« Toute nouvelle méthode ou procédure d'analyse de Contrôle du dopage exigeant des compétences et une technologie qui n'entrent pas dans le champ d'accréditation du Laboratoire devra être adéquatement validée par le Laboratoire et son adéquation à l'usage prévu devra être déterminée par l'AMA avant sa première mise en œuvre par tout Laboratoire dans le domaine du contrôle du dopage. L'AMA utilisera tout moyen considéré approprié, y compris les consultations formelles avec des groupes de travail d'experts scientifiques et/ou une ou plusieurs publications dans des revues scientifiques appliquant un système d'évaluation par les pairs, afin de juger si la méthode est adaptée à l'usage qui en est prévu avant d'accorder son approbation. Avant d'appliquer une de ces nouvelles méthodes ou procédures à l'analyse d'Échantillons de Contrôle du dopage, mais après avoir obtenu l'approbation de l'AMA, le Laboratoire devra obtenir une extension du champ de son accréditation par l'organisme d'accréditation compétent. » (alinéa 2).

145. La question qui se pose ici est celle de savoir si le Département des Analyses pouvait ou non jouir de la flexibilité de la portée de l'accréditation dont elle bénéficiait en 2008, soit au moment de l'analyse de l'échantillon A de l'appelant. Afin d'y répondre, il s'agit donc de déterminer si cet organisme s'est contenté soit de modifier des méthodes

scientifiques existantes ou d'y ajouter des analyses pour étendre le champ de ses activités, soit de mettre au point de nouvelles méthodes qui impliquent une technologie qui entre déjà dans le champ de son accréditation, ou si, au contraire, il a dû créer une nouvelle méthode ou procédure d'analyse exigeant des compétences et une technologie qui n'entraient pas dans le champ de son accréditation préalable.

146. S'agissant ici d'éléments techniquement complexes qui requièrent des connaissances scientifiques spécifiques, la Formation estime qu'il lui appartient, pour trancher cette question, de s'appuyer avant tout sur les déclarations des différents experts auditionnés durant les débats, lesquels avaient été désignés par les parties.

147. Les déclarations du Prof. de Ceaurriz peuvent être résumées ainsi :

- Le laboratoire de Châtenay-Malabry a développé la méthode d'immuno-extraction dans le milieu urinaire sur plusieurs années, en parallèle à ses recherches sur le sang. Il s'agissait donc d'un travail de longue haleine et non d'une découverte soudaine et totalement nouvelle.
- Les recherches sur le sang avaient, à l'origine, un but thérapeutique et non de lutte contre de dopage; elles s'effectuaient sur du sérum de singe. Puis, dès 2008, environ 70 sérums sanguins humains, provenant de volontaires sains, ont fait l'objet d'analyses portant sur l'EPO CERA. La structure moléculaire de cette substance empêchait en effet d'obtenir des résultats sûrs en utilisant uniquement l'urine et il a été nécessaire de développer des tests sanguins.
- La méthode d'immuno-extraction, i.e. d'extraction de la molécule, de l'EPO CERA ne présente pas de différence majeure, selon qu'elle est pratiquée à partir de l'urine ou à partir du sang.
- La technique utilisée par le Département des Analyses et accréditée en 2009 a repris celle de 2007 en l'étendant toutefois à de nouvelles substances, dont l'EPO CERA.
- Il est normal que l'athlète n'ait pas pu avoir connaissance de la documentation technique nécessaire à l'obtention de l'accréditation car cette documentation doit rester interne, conformément aux directives des autorités d'accréditation. Cela étant, il est notoire que la procédure d'accréditation porte sur toute la documentation en question.

- Le Département des Analyses a passé une double convention : d'une part, avec l'AMA pour garantir le respect du SIL et, d'autre part, avec le COFRAC pour le respect de la procédure d'accréditation. De son côté, le COFRAC a lui-même passé une convention avec l'AMA pour lui garantir que les laboratoires soumis à son contrôle respectent bel et bien le SIL.
- Les règles internes du COFRAC imposent l'accréditation d'une méthode lorsqu'il y a un changement de milieu. Tel a été le cas pour le Département des Analyses, auquel le COFRAC a demandé l'obtention d'une extension de son accréditation lorsque ses recherches sont passées de l'urine au sang. Toutefois, cette extension n'était pas nécessaire car la méthode d'analyse sanguine était couverte par l'accréditation existante (ISO/IEC 17025) délivrée au laboratoire de Châtenay-Malabry par le COFRAC et reconnue par l'AMA. Cela est notamment illustré par la rubrique « Description de la méthode » dans le document technique de l'AMA TD2009EPO: la méthode décrite est la même que celle qui figure au document TD2007EPO. La méthode sanguine utilise des procédés identiques à ceux mis en jeu pour l'urine (immunoaffinité, ultra-filtration, focalisation isoélectrique et double immunoblotting). L'extension de l'accréditation du 30 juin 2009 n'a donc été réalisée que pour des motifs de forme.
- Avant le mois de juin 2009, le Département des Analyses avait déjà procédé à de nombreuses analyses similaires en milieu sanguin. Cependant, il a attendu l'obtention de l'accréditation du COFRAC avant de pouvoir utiliser le label COFRAC.

148. Les déclarations du prof. Audran peuvent être résumées ainsi :

- La méthode utilisée par le Département des Analyses pour l'analyse de l'échantillon de M. Schumacher entre dans le cadre de la « portée flexible » de l'accréditation dont bénéficiait déjà ce laboratoire. La méthode utilisée était donc déjà validée et le fait de l'employer pour un milieu sanguin ou urinaire n'a pas d'influence déterminante.
- Le COFRAC a requis une extension d'accréditation au vu du changement de milieu, mais sans s'arrêter au fait que la méthode de base était identique. Au regard des dispositions de l'AMA, aucune accréditation complémentaire n'était néanmoins nécessaire.

- Ayant travaillé pour différents organismes d'accréditation au Canada et en France, il a pu constater que l'appréciation des besoins d'accréditation variait d'un pays à l'autre. En revanche, la procédure d'accréditation est universelle.
- L'obtention de cette accréditation du COFRAC, le 30 juin 2009, n'était pas nécessaire pour utiliser la méthode en milieu sanguin, laquelle était parfaitement valable avant cette date, sous réserve du fait que le laboratoire ne pouvait pas se prévaloir du label COFRAC dans son résultat d'analyse.
- Dès que la validation interne d'une méthode, au sens de l'article 4.4.10 1er alinéa du SIL, est faite par un laboratoire, celui-ci peut sans autre formalité, utiliser la nouvelle application, pour autant qu'elle ne dépasse pas le cadre de la « portée flexible » précitée. Tel a été le cas en l'espèce.

149. Les déclarations du Dr. Saugy peuvent être résumées ainsi :

- Il confirme clairement la présence d'EPO CERA dans le sang de l'échantillon qui lui a été soumis et dont il a appris par la suite, qu'il s'agissait de celui de M. Schumacher.
- En 2009, la « second opinion » était obligatoire pour toutes les analyses portant sur la détection d'EPO. Dès lors, celle émise par le laboratoire de Lausanne dans le cas de M. Schumacher ne signifie pas qu'il y ait eu un quelconque doute ou problème dans les analyses effectuées par le Département des Analyses.
- La méthode utilisée par ce dernier ne constituait clairement pas une nouvelle méthode au sens de l'article 4.4.10 alinéa 2 du SIL. En effet, à partir de la matrice, il a utilisé des méthodes semblables de purification (immuno-affinité), applicables indifféremment de la matrice utilisée et du milieu.

150. Il ressort des explications ci-dessus que le présent cas relève de l'article 4.4.10 alinéa 1 du SIL. Ainsi, le Département des Analyses était en droit d'utiliser la méthode d'analyse préexistante pour détecter l'EPO CERA dans les échantillons de sang, après validation interne de l'extension de sa méthode à la matrice sanguine, ceci même en l'absence d'extension formelle d'accréditation par le COFRAC. Or, cette validation interne a été réalisée le 25 septembre 2008, tel qu'il en ressort des attestations du Prof. de Ceaurriz et du Prof. Audran (pièces 20 et 21 en annexe produites par l'intimée). La procédure de validation interne a donc été achevée avant le 3 octobre 2008, date de l'analyse de l'échantillon de M. Schumacher par le Département des Analyses.

151. Dès lors que le deuxième alinéa de l'article 4.4.10 du SIL ne s'applique pas, une déclaration « fit-for-purpose » de l'AMA n'était pas non plus requise. Dans son attestation du 8 juillet 2009, produite par le conseil de M. Schumacher avec sa lettre du 5 août 2009, M. Rabin, directeur scientifique de l'AMA, confirme par ailleurs que le laboratoire de Châtenay-Malabry s'est entièrement conformé au SIL et pouvait utiliser sa méthode de détection de l'EPO CERA à des fins antidopage.
152. Par surabondance, la Formation est d'avis que l'extension d'accréditation par le COFRAC n'a fait que confirmer la validité scientifique de la méthode de détection de l'EPO CERA appliquée dans le cas de M. Schumacher. Dans la mesure où la validité d'une méthode d'analyse est jugée suivant sa conformité avec un document technique, la question qu'il y a lieu de se poser est de savoir si le résultat de l'analyse répond aux critères du document technique. Pour cela, il est sans importance que l'analyse ait été faite avant ou après l'entrée en vigueur dudit document technique. Ce dernier présente certes la méthode à suivre par les laboratoires à partir d'une certaine date. Mais si une analyse est conforme au document technique, elle est alors parfaitement valable quelles que soient les dates respectives de l'analyse et du document. En l'espèce, l'analyse était conforme non seulement au document technique TD2007EPO, mais également au document technique TD2009EPO. En d'autres termes, l'extension d'accréditation n'était pas une condition de la validité ou de la légalité de la méthode qui a été appliquée par le Département des Analyses lors de l'analyse des échantillons de M. Schumacher. Elle n'en a, en réalité, que confirmé a posteriori, la validité et la légalité.
153. Dans un tel contexte, la jurisprudence du TAS a déjà pu préciser l'importance, pour la lutte antidopage, du développement des technologies nouvelles, d'une part, et la nécessité de pouvoir les appliquer sans délai dans les méthodes de détection des substances interdites, d'autre part: *« The International Standards bring with them companion documents known as Technical Documents ("TD") which are relevant to the laboratories in the fight against doping. The WADA accredited laboratories are constantly adjusting to take the most recent developments and product into account when designing and applying the analytical procedure for the detection of Prohibited Substances. EPO has been on the Prohibited List for some years and the initial TD for EPO was based on analysis and reporting of EPO-, EPO- and NESP. The TD applicable to the analysis of these substances was reflected in TD2007EPO. The expiration of the patents for these substances brought with it a rapid development of*

new products and methods. *The Panel is advised that there are presently some 80 different variations of this substance available on the market many of which are not produced by the regulated pharmaceutical industry. These developments necessitated the writing of a new TD.* » (CAS 2009/A/1931 Ekaterina Iourieva & Albina Akhatova v. International Biathlon Union, § 7.7, p. 7). [ndr. : souligné par la Formation]

« (...) *The accredited laboratories were in transition from the use of TD2007EPO to TD2009EPO at the time of testing the Athletes' samples in this case. But TD2009EPO had not become effective when the "A" samples were analysed in December 2008; nor, when the "B" samples were analysed in February 2009. The TD2009EPO is not applicable because its effective date is after the "B" sample was analysed. However, it was Dr. Rabin's opinion in his testimony that the laboratories must always use the most recent state of the art technology and knowledge to identify prohibited substances and methods. (...) Therefore, it is the opinion of this Panel that the ISL ought to indicate that the use of the most recent state of the art technology and knowledge will be used in testing, particularly in a transitional period between use of an existing and effective TD and a replacing one.* » (ibidem, § 7.8, pp. 7-8). [ndr.: souligné par la Formation]

154. Force est donc de constater que le Département des Analyses ne s'est nullement écarté du SIL lors de son analyse de l'échantillon sanguin prélevé chez M. Schumacher dans la mesure où il n'a fait qu'appliquer une méthode de détection préexistante et déjà validée de façon interne, conformément à l'article 4.4.10 1er alinéa du SIL, au moment de l'analyse.

F. Analyse de confirmation

155. L'appelant fait valoir que la méthode dite « Elisa » utilisée par le laboratoire de Lausanne dans son analyse de confirmation n'aurait aucune valeur probante pour la détection de l'EPO puisqu'elle ne serait applicable qu'à la procédure de filtrage préliminaire.
156. Interrogé sur cette question, le Dr. Saugy a tout d'abord décrit le test « Elisa » comme une « méthode utilisant un anticorps qui capte les molécules à détecter, sur lesquelles on ajoute un autre anticorps, lequel reconnaît et compte le nombre de molécules concernées ». Ses explications peuvent ensuite être résumées ainsi:

- L'AMA a demandé aux laboratoires d'adapter ce test à la lutte antidopage. Ce test a dès lors été utilisé, notamment au Tour France 2008, pour le criblage (« screening ») d'une molécule; il s'agit donc d'un test destiné à établir une présomption de la présence d'EPO.
- Le laboratoire de Lausanne a utilisé ce test avant son accréditation formelle parce qu'il faisait partie d'un processus publié et connu depuis 2004 déjà. Il y a en effet souvent un décalage entre le moment de la publication d'une méthode, de son utilisation et de son officialisation. La seule conséquence de ce décalage temporel est l'interdiction, pour un laboratoire, d'utiliser le sceau de l'organe d'accréditation avant l'obtention de celle-ci.
- Le laboratoire de Lausanne n'aurait effectivement pas pu utiliser le test « Elisa » comme moyen d'émettre une « adverse analytical finding ». Cela étant, cette méthode a été mise au point non pas pour rapporter l'existence d'un résultat positif, mais pour effectuer un screening sur un grand nombre d'échantillons.

157. La méthode « Elisa » n'a donc été utilisée, en l'espèce, qu'à titre de « screening », l'analyse ayant été réalisée par le Département des Analyses selon la méthode IEF (isoélectrofocalisation) prévue par les documents TD2007EPO et TD2009EPO. A cet égard, l'attestation du laboratoire de Lausanne produite par l'UCI (pièce 22) à propos de la validation de la méthode « Elisa » établit que l'utilisation de celle-ci à but de diagnostic médical, était déjà validée en juillet 2008 et qu'elle pouvait donc être valablement utilisée à des fins de « screening ».

158. L'appelant ne se trompe donc pas lorsqu'il soutient que ce test n'a pas de valeur probante pour la détection de l'EPO. Cela étant, il n'en demeure pas moins que, même si la méthode « Elisa » n'est intervenue qu'à titre de « screening », son résultat positif donne encore plus de poids au résultat obtenu par le Département des Analyses.

G. Renonciation à l'analyse de l'échantillon B

159. M. Schumacher considère finalement qu'il a été privé de son droit à obtenir la prolongation du délai d'ouverture de l'échantillon B, alors qu'il n'avait pas eu accès à l'intégralité des documents relatifs à l'analyse de l'échantillon A.

160. Le principe à l'origine du délai imposé à l'athlète pour requérir la contre-analyse de l'échantillon B est celui de célérité de la procédure disciplinaire. Il est en effet important pour toutes les parties concernées par un cas de dopage, aussi bien l'athlète que la fédération nationale, de savoir rapidement si le résultat d'analyse de l'échantillon A est définitivement admis ou s'il sera au contraire nécessaire de procéder à une contre-analyse sur l'échantillon B. Cette situation conditionne en effet toute la suite de la procédure et notamment la décision de la fédération nationale d'engager ou non une procédure disciplinaire à l'encontre de cet athlète. (cf. TAS 2007/A/1444 & TAS 2008/A/1465, UCI c/Iban Mayo & Real Federación Española de Ciclismo, § 149, p. 29).
161. L'appelant ne pouvait ignorer qu'il disposait d'un délai de dix jours, imposé par la législation française applicable, pour faire connaître son intention de procéder à l'analyse de l'échantillon B, en particulier parce que ce délai lui a été clairement rappelé dans le courrier envoyé le 3 octobre 2009 par l'AFLD (pièce 10 produite par l'appelant). Il incombait à ce dernier non seulement d'exprimer sa volonté de prendre connaissance des documents analytiques, comme il l'a fait, mais également de préserver ses droits en demandant l'analyse de l'échantillon B dans le délai de dix jours. En ne le faisant pas, il a lui-même créé le risque que l'AFLD considère qu'il renonçait à ses droits. Tel a été le cas et on ne saurait en faire grief à l'AFLD. Il appartient au contraire à M. Schumacher d'assumer aujourd'hui les conséquences de son choix consistant à laisser s'écouler le délai de dix jours pour des raisons qui lui sont propres.
162. Le respect du délai de dix jours n'est pas soumis à la condition que les explications techniques demandées par l'athlète lui soient fournies. En l'espèce, rien n'empêchait M. Schumacher de demander, dans les dix jours, à ce que la contre-analyse soit fixée à une date permettant à son expert de prendre connaissance de la documentation du laboratoire et de se familiariser le cas échéant avec la méthode appliquée.
163. En ce qui concerne enfin la production des documents techniques requis par l'appelant, on rappellera ici que son argument, selon lequel certains documents techniques auraient été établis lors des analyses et ne lui auraient pas été communiqués, a déjà été écarté (cf. ch. 3.5.3 ci-dessus). Toutes les pièces du dossier ont en effet été remises aux défenseurs de l'appelant et ceux-ci ont pu utilement les discuter tant lors de la procédure disciplinaire que devant le TAS.

164. Il résulte de toute cette analyse qu'aucune des règles essentielles du CMA pouvant être appliquées en ce qui concerne l'établissement de la preuve du dopage n'ont été violées.

4.3.2.3 Conformité avec les exigences du CMA en matière de sanction

165. A partir de l'ensemble des circonstances et éléments décrits ci-dessus, la Formation estime qu'il doit être tenu compte du résultat d'analyse de l'échantillon A obtenu par le Département des Analyses, lequel établit la présence d'EPO CERA dans le sang prélevé chez M. Schumacher.

166. L'UCI a en effet démontré, à satisfaction de fait et de droit, « *la présence d'une substance interdite, de ses métabolites ou marqueurs* » dans l'échantillon corporel de l'appelant, au sens de l'article 2.1 CMA (version 2003). Cette présence constitue une violation des règles antidopage.

167. M. Schumacher n'est, quant à lui, pas parvenu à démontrer qu'un écart serait survenu par rapport au SIL et donc à renverser la présomption réfragable selon laquelle le Département des Analyses, accrédité par l'AMA, a effectué ses analyses dans les règles de l'art, conformément au SIL.

168. La sanction prévue pour une telle violation des règles antidopage est déterminée par l'article 10.2 CMA, qui prévoit une suspension de deux ans, ainsi que par l'article 9 CMA relatif à l'annulation automatique des résultats obtenus en compétition.

169. La décision prise le 22 janvier 2009 par l'AFLD sanctionnant M. Schumacher par une période de deux ans de suspension et annulant tous ses résultats obtenus durant le Tour de France 2008 est donc conforme au CMA, tant sur les éléments de fond ayant motivé cette décision que sur la durée de la sanction.

170. Il en résulte que la reconnaissance au niveau international (« certificate of recognition ») prononcée le 3 mars 2009 par l'UCI respecte les conditions prévues par l'article 306 alinéa 1 RAD.

171. Cet acte de reconnaissance a toutefois modifié les dates respectives de début et de fin de la période de suspension pour la raison de non-conformité avec le CMA. La question qui se pose alors est celle savoir si cette non-conformité (même partielle) de la décision de l'ALFD avec le CMA fait obstacle à une reconnaissance de la décision française par l'UCI tout entière. Le commentaire sous l'article 15.4. CMA (dans la version 2009)

prévoit expressément la possibilité d'une reconnaissance partielle en substituant les parties non-conformes de la décision (à reconnaître) par une appréciation autonome de l'organisation reconnaissante. Comme le texte de la version du CMA 2009 est identique à celui applicable en espèce (la version 2003) la Formation est de l'avis que l'UCI pouvait écarter la partie de la décision concernant le début de la période de suspension en reconnaissant le reste. La question qui reste à résoudre est le bien fondé de cette modification faite par l'UCI.

172. Aux termes de l'article 10.8 CMA, « *la période de suspension débutera à la date de la décision de l'instance d'audition ou, en cas de renonciation à l'audition, à la date où la suspension a été imposée ou acceptée. Toute période de suspension provisoire (imposée ou volontairement acceptée) sera déduite de la période totale de suspension à subir. Dans un but d'équité, en cas de délais dans la procédure d'audition ou d'autres aspects du contrôle du dopage non attribuables au sportif, l'instance infligeant la sanction pourra faire débuter la période de suspension à une date antérieure pouvant remonter jusqu'à la date du recueil de l'échantillon concerné.* ».
173. En l'espèce, M. Schumacher n'a plus participé à des courses cyclistes professionnelles depuis le 28 août 2008 puisqu'il n'a pas pu obtenir la délivrance de sa licence ProTour de l'UCI à la suite de son contrôle antidopage, lors du Tour de France 2008.
174. La conformité de la décision de l'AFLD avec l'article 10.8 CMA est donc discutable dans la mesure où elle impose une suspension à compter du 23 février 2009 et ne tient pas compte de la période de suspension provisoire imposée à l'athlète, qui aurait donc dû être imputée sur la durée totale de sa sanction.
175. La décision de reconnaissance de l'UCI relève à ce propos que « (...) *where under the French law the period of ineligibility imposed upon Mr. Schumacher started on 23 February, this is the date at which Mr. Schumacher confirmed receipt of said decision, the WADC stipulates that the period of ineligibility shall start (no later than) on the date of the hearing decision* ».
176. Faisant application de son pouvoir d'examen complet, la Formation, qui dispose de la faculté de faire rétroagir le début de la suspension jusqu'à la date de la collecte de l'échantillon (art. 10.8 CMA), décide, en équité, que la période de deux ans de suspension infligée à M. Schumacher débutera à partir du jour de sa suspension effective et imposée, soit à partir du 28 août 2008.

5. FRAIS ET DEPENS

177. Conformément à l'article R65, la procédure est gratuite, s'agissant d'un litige disciplinaire à caractère international jugé en appel.
178. Le montant de CHF 500.- versé par l'appelante au Greffe du TAS reste acquis à ce dernier, conformément à l'article R65.2 du Code du TAS.
179. Selon l'article R65.3 du Code les frais des parties, témoins, experts et interprètes sont avancés par les parties. La Formation en attribue la charge dans la sentence en tenant compte du résultat de la procédure, du comportement des parties et des ressources financières des parties.
180. En l'espèce, l'UCI obtient gain de cause sur l'ensemble de ses conclusions. M. Schumacher succombe en revanche sur ses conclusions principales, mais obtient gain de cause sur sa conclusion subsidiaire tendant à la modification de sa période de suspension.
181. Dans ces circonstances, la Formation décide d'ordonner à M. Schumacher le paiement d'un montant de CHF 3000.- à l'UCI pour la contribution de ses frais d'avocat.

* * *

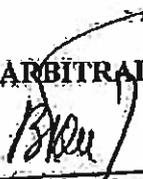
PAR CES MOTIFS,

LE TRIBUNAL ARBITRAL DU SPORT,

- I. Admet partiellement l'appel interjeté par Stefan Schumacher dans la mesure où il est recevable ;
- II. Réforme l'acte de reconnaissance de la décision rendue le 22 janvier 2009 par l'Agence française de lutte contre le dopage, en ce sens que la suspension de deux ans infligée à Stefan Schumacher et applicable sur le seul fondement de cet acte de reconnaissance, prend effet à partir du 28 août 2008;
- III. Confirme pour le surplus ladite décision de reconnaissance;
- IV. Dit que la sentence est rendue sans frais, à l'exception des droits de greffe par CHF 500.- versés par Stefan Schumacher, qui restent acquis au TAS ;
- V. Dit que Stefan Schumacher contribue à concurrence d'un montant de CHF 3000.- (trois mille francs suisses) aux frais de l'Union Cycliste Internationale; pour le surplus chaque partie supporte ses propres frais d'avocat;
- VI. Dit que toutes autres ou plus amples conclusions sont rejetées.

Lausanne, le 22 janvier 2010

LE TRIBUNAL ARBITRAL DU SPORT


Bernard Foucher
Président

APPENDIX 6

TAS 2009/A/2018 Davide Rebellin c. CIO

SENTENCE ARBITRALE

rendue par le

**TRIBUNAL ARBITRAL
DU SPORT**

siégeant dans la composition suivante :

Président : M. Bernard **Foucher**, Conseiller d'Etat, Président de la Cour administrative d'appel de Douai, France

Arbitres : Me Michele **Bernasconi**, avocat, Zurich, Suisse
M. Ulrich **Haas**, professeur, Zurich, Suisse

Greffier ad-hoc : Me Patrick **Grandjean**, avocat, Lausanne, Suisse

dans la procédure d'arbitrage d'appel entre

M. Davide Rebellin, Monaco

représenté par Mes Federico **Cecconi**, Lucio **Colantuoni**, Fabio **Pavone**, Paolo **Martelli** et
Nicolo **Velati**, avocats, Milan, Italie

Appelant

contre

Comité International Olympique (CIO), Lausanne, Suisse

représenté par Mes François **Kaiser** et Yvan **Henzer**, avocats, Lausanne, Suisse

Intimé

I. LES PARTIES

1. M. Davide Rebellin (ci-après l'Appelant) est né le 9 août 1971 à San Bonifacio en Italie. Il est un coureur cycliste professionnel et est membre de la fédération cycliste italienne. Il a été sélectionné pour faire partie de la délégation italienne aux Jeux Olympiques d'été de 2008.
2. Le Comité International Olympique (ci-après CIO) est une organisation internationale non gouvernementale, à but non lucratif, constituée sous la forme d'une association de droit suisse, dont le siège est à Lausanne, en Suisse. La Charte olympique lui confère la mission de diriger le Mouvement olympique qui comprend, outre le CIO, les fédérations internationales, les comités nationaux olympiques, les comités d'organisation des Jeux Olympiques, les associations nationales, les clubs, de même que les personnes qui en font partie, notamment les athlètes, ainsi que d'autres organisations et institutions reconnues par le CIO. Les Jeux Olympiques constituent le point culminant de son activité. Pour être admis à y participer, un concurrent doit se conformer à la Charte olympique ainsi qu'aux règles édictées par la fédération internationale concernée (ATF 129 III 445, page 446).

II. LES FAITS

II.1 LE CONTROLE POSITIF DE L'APPELANT

3. Les Jeux Olympiques d'été de 2008, Jeux de la XXIXe Olympiade de l'ère moderne, ont eu lieu en Chine. La période des Jeux Olympiques, ou période dite en compétition, a commencé le 27 juillet et s'est terminée le 24 août 2008.
4. Les faits sont les suivants :
 - Le 5 août 2008, l'Appelant a fait l'objet d'un contrôle antidopage, au cours duquel des échantillons de sang et d'urine ont été prélevés.
 - Le 9 août 2008, l'Appelant a pris part à la course cycliste sur route des Jeux Olympiques d'été de 2008, où il a terminé deuxième, obtenant ainsi la médaille d'argent.
 - Par la suite, l'échantillon sanguin A de l'athlète a été analysé par le National Anti-Doping Laboratory à Beijing, en Chine, lequel possède l'accréditation de l'Agence Mondiale Antidopage (ci-après AMA). Les tests effectués visaient à détecter la présence de l'hormone de croissance humaine recombinée et se sont avérés négatifs.
 - En octobre 2008, tous les échantillons prélevés au cours des Jeux Olympiques d'été de 2008 ont été envoyés au Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage (ci-après LAD), à Lausanne, en Suisse, pour y être conservés. Le LAD est également accrédité par l'AMA.
 - En janvier 2009 et conformément à la réglementation applicable en la matière, le CIO a décidé de soumettre les échantillons prélevés au cours des Jeux Olympiques d'été de 2008 à des tests complémentaires, en vue de déceler la présence éventuelle de la CERA ("Continuous erythropoietin receptor activator"), une EPO de 3ème génération.

- Dans ce contexte, le CIO a demandé au LAD de procéder à un balayage (screening) des échantillons A afin de sélectionner ceux présentant des résultats positifs à la CERA. Le LAD s'est exécuté entre le 11 et 17 février 2009 et a détecté la présence de la CERA dans l'échantillon A de l'Appelant.
- Les échantillons A positifs à la CERA, accompagnés de l'échantillon B, ont alors été acheminés au Laboratoire d'Analyse de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage, à Chatenay-Malabry, en France (ci-après LAAF LD). Ce laboratoire est également accrédité par l'AMA.
- Le 24 avril 2009, le LAAF LD a procédé à l'analyse de l'échantillon A de l'Appelant qui s'est révélé positif à la CERA.
- Le 28 mai 2009, à la demande de l'Appelant et en présence de son représentant, M. Douwe De Boer, l'échantillon B a été ouvert puis analysé par le LAAF LD. La présence de la CERA a été confirmée, ce qui a été communiqué à l'athlète en date du 4 juin 2009.

II.2 LA PROCEDURE DEVANT LA COMMISSION DISCIPLINAIRE DU CIO

5. A la suite du résultat positif de l'échantillon A de l'Appelant, le Président du CIO a mis en place, le 28 avril 2009, une commission disciplinaire, conformément aux dispositions de l'article 7.2.4 des règles antidopage du Comité International Olympique applicables aux Jeux de la XXIXe Olympiade en 2008 à Beijing. Cette Commission a procédé à l'audition de l'athlète le 27 juillet 2009.
6. Devant la Commission Disciplinaire du CIO, l'Appelant a clamé son innocence, mettant en doute la régularité du prélèvement de ses échantillons, le respect de la chaîne de sécurité, les méthodes d'analyse utilisées pour la détection de la CERA.
7. Après avoir pris en compte les arguments de l'Appelant ainsi que l'ensemble du dossier, la Commission Disciplinaire du CIO a considéré à l'unanimité que l'Appelant avait commis une violation du Règlement antidopage applicable en raison de la présence de la substance interdite CERA dans son corps.
8. En date du 11 Novembre 2009, la Commission Disciplinaire du CIO qui, en application de l'article 7.1.7 des règles susvisées, dispose d'un pouvoir de proposition à l'adresse du Commission Exécutive du CIO, a recommandé à ce dernier de rendre la décision suivante:
 - "I. *L'Athlète Davide Rebellin, Italie, Cyclisme:*
 - (iii) *est disqualifié de l'événement de Cyclisme sur route hommes des Jeux Olympiques de Beijing 2008, où il s'est classé 2^e.*
 - (iv) *sa médaille et son diplôme pour l'événement susmentionné seront retirés.*
 - II. *Il a été demandé à l'Union Cycliste Internationale de modifier les résultats de l'événement susmentionné en conséquence et de prendre en compte toute action supplémentaire relevant de sa compétence.*

III. Il a été ordonné au Comité National Olympique ("CNO") d'Italie de rendre au CIO, dès que possible, la médaille et le diplôme remis à l'Athlète en rapport avec l'événement susmentionné.

IV. Le CNO d'Italie doit assurer la mise en œuvre intégrale de cette décision."

9. Le 17 novembre 2009, le Commission Exécutive du CIO qui, toujours selon les dispositions de l'article 7.1.7 sus indiqué, dispose du pouvoir de sanction, a suivi intégralement les recommandations précitées, tout en précisant que sa décision entrerait en force avec effet immédiat.
10. La décision a été notifiée aux Parties en date du 17 novembre 2009.

III LA PROCEDURE DEVANT LE TRIBUNAL ARBITRAL DU SPORT

III.1 L'APPEL

11. Par déclaration d'appel datée du 30 novembre 2009, l'Appelant a recouru contre la décision rendue par la Commission Exécutive du CIO auprès du Tribunal Arbitral du Sport (ci-après le "TAS").
12. Dans son mémoire d'appel déposé le 14 décembre 2009, l'Appelant a formulé plusieurs conclusions qu'il a limitées au cours de l'audience qui s'est tenue devant le TAS en date du 17 juin 2010 comme suit:

"On demande par conséquent l'annulation de la mesure contestée et de toutes les sanctions émises à la charge de M. Davide Rebellin, en particulier:

- *que soit révoquée la disqualification de l'épreuve sur route hommes des Jeux Olympiques de Pékin 2008, où il était arrivé deuxième;*
- *que soient restitués la médaille et le diplôme afférents à l'événement susmentionné."*

13. A l'appui de ses conclusions, l'Appelant a soulevé les moyens et arguments qui sont, en substance, les suivants:

- Les procédures liées à la chaîne de sécurité n'ont pas été respectées. De graves anomalies ont été constatées tant en ce qui concerne la conservation des échantillons prélevés qu'en ce qui concerne l'intégrité de ces derniers.
- Le CIO n'a pas été en mesure de démontrer l'absence de manipulation des échantillons de l'Appelant lors de leur transport ou durant la période qui a suivi l'analyse de l'échantillon A. "A partir de la documentation produite par le CIO, on arrive pas à savoir qui a effectué après le premier contrôle la fermeture de l'échantillon A, ni en présence de qui la fermeture a été effectuée, ni qui par la suite a gardé l'échantillon en fournissant toutes les garanties prévues, pas tellement pour ce qui est de la chaîne de froid car, comme nous le savons, elle n'influe pas sur la substance, étant donné que le CERA est un produit synthétique, mais plutôt pour la possibilité de contamination ou, pire, de manipulation dolosive ou par imprudence"). Le CIO n'a pas su apporter la preuve que l'échantillon B n'a pas été manipulé ou falsifié. Les documents remis ne permettent pas de savoir où ce dernier se trouvait ni comment il était conservé jusqu'au moment de son transfert au LAD.

- Lorsque le LAD a procédé au balayage destiné à détecter la présence de la CERA, il a nécessairement dû rouvrir l'échantillon A de l'Appelant, ce qu'il a fait en dehors de la présence de l'athlète ou de ses représentants. Une manipulation dolosive à ce moment ne peut donc pas être exclue.
- Du fait de toutes ces irrégularités, le CIO n'a pas démontré de manière satisfaisante la violation d'une règle antidopage par l'Appelant.
- La méthode utilisée par le LAAFLD n'était pas validée au moment des analyses des échantillons de l'Appelant et n'était alors pas fiable. En outre, *"il n'existait aucun critère formel de positivité pour la méthode de test sur le CERA"*, le document technique émis par l'AMA et applicable en mars 2009 (TD2007EPO) ne faisait aucune référence à la CERA.
- Cette méthode était une nouvelle méthode, ce que le LAAFLD admet, puisqu'il a demandé une accréditation auprès du COFRAC. *"Quelle nécessité avait le Laboratoire LAAFLD d'obtenir l'accréditation de la méthode IEF par le COFRAC, si cette dernière n'était qu'un simple développement d'une méthode déjà accréditée?"*.
- En l'absence de validation formelle, le CIO avait l'obligation d'établir que la méthode utilisée par le LAAFLD était reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique. En l'espèce, le CIO n'a même pas produit d'article ou d'étude entérinant cette méthode mais s'est exclusivement appuyé sur une attestation écrite du 10 septembre 2009, de M. Jacques de Ceaurriz, directeur du Département des Analyse de l'Agence Française de Lutte contre de Dopage. Selon ce document, la méthode en question a été validée en interne au LAAFLD le 25 septembre 2008, soit avant la nouvelle analyse des échantillons de l'Appelant.
- Au vu des circonstances dans lesquelles la nouvelle méthode a été appliquée par le LAAFLD, il existe un risque important de "faux-positif", comme le démontrerait le cas de l'athlète Yudelquis Contreras, dont l'échantillon A était positif au CERA et l'échantillon B négatif.
- Le droit d'être entendu de l'Appelant n'a pas été respecté. En effet, les recommandations de la Commission Disciplinaire du CIO sont notamment fondées sur un certain nombre de documents établis après l'audition de l'Appelant en date du 27 juillet 2009 et sur lesquels ce dernier n'a jamais eu l'occasion de se déterminer. *"Le temps écoulé à partir de la date de l'audition du 27.07.2009, qui a eu lieu au siège du CIO à Lausanne et la communication de la mesure du Comité exécutif du CIO a été employé non pas pour réfuter les preuves documentaires apportées par la défense (...) mais pour se procurer à l'avance, en l'absence de tout examen contradictoire avec la défense de l'athlète Davide Rebellin, des écrits postérieurs aux faits contestés à seule fin de combler les vides probatoires manifestement présents et relevés par la défense"*.

III.2 LA REPONSE DE L'INTIME

14. Par fax et par courrier recommandé datés du 25 janvier 2010, le CIO a adressé sa réponse, laquelle contient les conclusions suivantes:

Fondé sur ce qui précède, le Comité International Olympique a l'honneur de conclure à ce qu'il plaise au Tribunal Arbitral du Sport prononcer:

I.- L'appel interjeté par M. Davide Rebellin est rejeté.

II.- Une indemnité est allouée au CIO pour ses frais d'avocat".

15. Les moyens dont se prévaut le CIO peuvent être résumés comme suit:

- La thèse de la manipulation dolosive ou de la contamination des échantillons de l'Appelant est insoutenable puisque l'échantillon B est demeuré scellé depuis son prélèvement jusqu'à la contre-analyse requise par l'athlète. Si l'échantillon A avait été manipulé et/ou contaminé, le résultat de son analyse ne pourrait pas être identique à celui découlant de l'analyse de l'échantillon B.
- L'Appelant *"ne fait qu'avancer une hypothèse, selon laquelle ses échantillons auraient été manipulés ou contaminés, sans fournir le début du commencement d'une preuve à l'appui de ses dires"* (par. 42, page 13 de la réponse).
- En l'espèce, les procédures liées à la chaîne de sécurité ont été respectées. La traçabilité des échantillons A et B de l'Appelant depuis leur prélèvement à la station de contrôle du dopage à Pékin jusqu'à leur arrivée au LAAFLD est parfaitement documentée et peut être intégralement vérifiée.
- La méthode utilisée par le LAAFLD n'est pas nouvelle. Il ne s'agit que d'une variante de celle qui était pratiquée à partir de prélèvements urinaires pour détecter la présence d'EPO, autres que la CERA.
- Cette extension de méthode, à la matrice sanguine, a fait l'objet d'une validation interne qui a eu lieu le 25 septembre 2008, rendant ainsi son utilisation légitime à partir de cette dernière date.
- La validité de cette méthode a d'ailleurs été confirmée par le Conseil d'Etat de la République française dans un arrêt rendu en octobre 2009 et produit au dossier, concernant, dans une autre affaire, des échantillons sanguins prélevés le 3 et 15 juillet 2008 et analysés le 3 octobre 2008.
- *"Il est admis que lorsque le LAAFLD a procédé à l'analyse de l'échantillon A de l'athlète, en mars 2009, le document technique "TD2009EPO" (...) n'était pas encore formellement entré en vigueur. Toutefois, Mme Françoise Lasne, du LAAFLD, avait déjà connaissance de ce document dans la mesure où elle faisait partie du comité de rédaction de celui-ci. Surtout, le LAAFLD n'avait pas d'autre choix que d'appliquer le document technique "TD2009EPO" dans la mesure où le précédent document technique établi par l'AMA, le "TD2007EPO", était devenu obsolète. En effet, les critères fixés dans ce dernier document n'étaient valables que pour les premières générations d'EPO et non pas pour les nouvelles formes, comme la CERA".*
- Le risque de faux-positif est exclu au vu des résultats concordants obtenus par le LAD et le LAAFLD qui ont utilisés des méthodes et des anticorps différents.
- Le droit d'être entendu de l'Appelant a été respecté. Il n'est pas contesté que le CIO a obtenu des attestations après la tenue de l'audience à laquelle a participé l'athlète, mais ces dernières ne faisaient que confirmer la régularité des analyses et du transport des échantillons. Dans tous les cas, la procédure devant le TAS répare les éventuels vices commis par l'instance inférieure.

III.3 L'AUDIENCE DU 17 JUIN 2010

16. En date du 17 juin 2010, une audience a été tenue à Lausanne, au siège du TAS.
17. A l'ouverture de l'audience, les Parties n'ont pas formulé d'objection quant à la composition de la Formation arbitrale, constituée le 4 mars 2010 et composée de M. Bernard Foucher (Président), de Me Michele Bernasconi (Arbitre) et du Professeur Ulrich Haas (Arbitre).
18. Les personnes suivantes étaient présentes à l'audience:
 - L'Appelant était présent et accompagné par Mes Federico Cecconi, Lucio Colantuoni, Fabio Pavone, Paolo Martelli et Nicolò Velati, avocats, assistés par Mme Monica Zardoni, interprète.
 - Le CIO était représenté par son conseiller juridique, M. André Sabbah, assisté par Me François Kaiser, avocat.
19. La Formation arbitrale a entendu le témoignage des personnes suivantes, après les avoir invitées à dire la vérité, ce qu'elles se sont expressément engagées à faire:
 - Dr. Giovanni Inghilleri, responsable du département d'hématologie, auprès de l'hôpital Fatebenefratelli de Milan, Italie.
 - Dr. Martial Saugy, directeur du LAD.
 - Dr. Françoise Lasne, directrice du département des analyses et cheffe de la section recherche et développement biologie de l'Agence française de lutte contre le dopage.
 - Dr. Francesco Botré, directeur scientifique du laboratoire antidopage de Rome, Italie.
 - Dr. Olivier Rabin, directeur Science de l'AMA.
20. MM. Inghilleri, Botré et Rabin ont été entendus par téléconférence avec l'accord de la Formation arbitrale, en application de l'article R44.2 du Code de l'arbitrage en matière de sport (ci-après le Code) ; Mme Lasne et M. Saugy étaient présents à Lausanne.
21. Au cours de l'audience, les Parties ont eu l'occasion de présenter et défendre leur position respective. Au terme des plaidoiries, la Formation arbitrale a clôturé les débats et communiqué que sa décision serait rendue en temps et en heure. La Formation arbitrale a attentivement étudié le dossier de la cause et pris en compte toutes les preuves et les arguments présentés, même s'ils n'ont pas été résumés dans la présente sentence. A l'audience, les Parties ont expressément reconnu que leur droit d'être entendu avait été respecté et qu'elles étaient satisfaites de la manière dont elles avaient été traitées au cours de la présente procédure arbitrale.

IV. EN DROIT

IV.1 COMPETENCE DU TAS

22. La compétence du TAS résulte de l'article 12.2.1 des Règles antidopage du CIO, applicables aux Jeux de la XXIXe Olympiade en 2008 à Beijing (ci-après les Règles antidopage du CIO) ainsi que de l'article R47 du Code.
23. Il convient d'ajouter que les Parties ont expressément reconnu la compétence du TAS dans leurs écritures ainsi que par la signature de l'ordonnance de procédure.

IV.2 RECEVABILITE

24. La déclaration d'appel a été adressée au TAS le 4 décembre 2009, soit dans le délai de 21 jours fixé par l'article 12.5 des Règles antidopage du CIO. En outre, elle répond aux conditions fixées par l'article R48 du Code.
25. Partant, l'appel est recevable, ce qui n'est d'ailleurs pas contesté.

IV.3 DROIT APPLICABLE

26. L'article R58 du Code prévoit que la Formation arbitrale statue selon les règlements applicables et selon les règles de droit choisies par les Parties, ou à défaut de choix, selon le droit du pays dans lequel la fédération, association ou autre organisme sportif ayant rendu la décision attaquée, a son domicile ou selon les règles de droit dont la Formation arbitrale estime l'application appropriée. Dans ce dernier cas, la décision de la Formation doit être motivée.
27. La présente affaire est liée à un contrôle du dopage qui a été effectué dans le cadre des Jeux Olympiques d'été de 2008. Pour être admis à y participer, l'Appelant a dû signer une déclaration par laquelle il a accepté de respecter notamment la Charte olympique en vigueur, le Code mondial antidopage, le Code d'éthique du CIO ainsi que les Règles antidopage du CIO (par. 6 du texte d'application de la Règles 45 de la Charte olympique).
28. La Formation arbitrale observe que, dans leurs écritures, les Parties se réfèrent aux Règles antidopage du CIO, dont l'application n'est pas remise en cause. Ces règles sont régies par la Charte olympique, le Code mondial antidopage et le droit suisse (article 16.1 des Règles antidopage du CIO).
29. Dès lors, la Formation arbitrale retient que les règlements applicables et les règles de droit choisies par les Parties sont la Charte olympique, le Code mondial antidopage, les Règles antidopage du CIO et le droit suisse.

IV.4 EXAMEN DE LA DECISION DONT APPEL

30. La présence d'une substance interdite, de ses métabolites ou de ses marqueurs dans le prélèvement corporel d'un athlète constitue un cas de violation des règles antidopage (article 2.1. des Règles antidopage du CIO).

31. En l'espèce, il n'est pas contesté que la CERA est une substance interdite.
32. Il est également admis que le National Anti-Doping Laboratory à Beijing, en Chine, le LAD et le LAAFLD sont des laboratoires accrédités par l'AMA.
33. En vertu de l'article 3.1 des Règles antidopage du CIO, *"La charge de la preuve incombera au CIO qui devra établir la réalité de la violation d'une règle antidopage. Le degré de preuve établira si le CIO a satisfait à la charge de la preuve à la satisfaction de l'instance d'audition qui appréciera le sérieux de l'allégation. Le degré de preuve, dans tous les cas, devra être plus important qu'une simple prépondérance des probabilités, mais moins important qu'une quasi-certitude. Lorsque les présentes Règles confient à un athlète ou à toute autre personne présumée avoir commis une violation des règles antidopage, la charge de renverser une présomption, ou d'établir des circonstances ou des faits spécifiques, le degré de preuve devra être fondé sur la prépondérance des probabilités."*
34. En matière de preuve en cas de dopage, les laboratoires accrédités par l'AMA sont présumés avoir effectué l'analyse des échantillons et respecté les procédures de la chaîne de sécurité conformément aux Standards internationaux pour les laboratoires. L'athlète pourra renverser cette présomption en démontrant qu'un écart aux Standards internationaux, qui aurait pu raisonnablement entraîner le résultat d'analyse anormal, est survenu. Si l'athlète parvient à renverser la présomption en démontrant qu'un écart aux Standards internationaux qui aurait pu raisonnablement entraîner le résultat d'analyse anormal est survenu, il incombera alors au CIO de démontrer que cet écart n'a pas pu être à l'origine du résultat d'analyse anormal. Tout écart aux Standards internationaux de contrôle du dopage qui n'a pas engendré de résultats d'analyse anormaux ou d'autres violations des règles antidopage, n'invalidera pas lesdits résultats. Si l'athlète établit qu'un écart aux Standards internationaux de contrôle est survenu lors du contrôle, alors le CIO aura la charge d'établir que de tels écarts ne sont pas à l'origine du résultat d'analyse anormal ou du fait à l'origine de la violation des règles antidopage (article 3.2 des Règles antidopage du CIO).
35. Il existe donc une présomption réfragable selon laquelle les laboratoires accrédités par l'AMA ont effectué les analyses dans les règles de l'art. Il appartient alors à l'athlète de démontrer qu'un écart est survenu par rapport aux Règles antidopage du CIO pour renverser cette présomption. Comme le précise la jurisprudence constante du TAS, l'athlète ne peut se contenter d'invoquer l'existence d'une erreur potentielle dans la procédure d'analyse mais doit au contraire rapporter la preuve d'une violation desdites règles (TAS 2006/A/1119, UCI c. L. & RFEC, par. 61, p. 19; TAS 2007/A/1444 & TAS 2008/A/1465, UCI c/Iban Mayo & Real Federación Española de Ciclismo, par. 111, p. 20).
36. Au vu de ce qui précède, la Formation arbitrale est appelée à examiner les questions suivantes:
 - La chaîne de sécurité a-t-elle été entachée d'irrégularités?
 - La présence de la CERA a-t-elle été valablement détectée dans les échantillons sanguins de l'Appelant?
 - Si une violation des règles antidopage est avérée, quelle en est la sanction?

- Le droit d'être entendu de l'Appelant a-t-il été violé?

A. La chaîne de sécurité a-t-elle été entachée d'irrégularités?

37. Au cours de l'audience du 17 juin 2010, l'Appelant a admis que les procédures liées à la chaîne de sécurité ont été respectées à partir du moment où les échantillons ont été réceptionnés par le LAD en date du 20 octobre 2008. Il n'y a donc pas de raison de se pencher sur la période postérieure à cette date.
38. En revanche, l'Appelant soutient que de graves anomalies ont été constatées tant en ce qui concerne la conservation des échantillons qu'en ce qui concerne l'intégrité de ces derniers entre le 5 août 2008, date des prélèvements sanguins, et le 20 octobre 2008, date de l'accusé de réception des échantillons par le LAD. Dans ces circonstances, il soutient que le CIO n'a pas démontré de manière satisfaisante le fait qu'aucune manipulation dolosive de ses échantillons n'ait pu intervenir durant ce laps de temps.
39. Le CIO conteste intégralement l'existence d'une quelconque anomalie dans le traitement des échantillons de l'Appelant.
40. Dans un premier temps, la Formation arbitrale juge opportun de déterminer si la traçabilité des échantillons de l'Appelant peut être vérifiée. Cela permettra de mettre en évidence les segments de la chaîne de sécurité au cours desquels seraient intervenues les graves irrégularités évoquées par l'Appelant. Dans un deuxième temps, il y aura lieu de déterminer la probabilité d'une manipulation dolosive.

a) Traçabilité des échantillons de l'Appelant

41. Le 5 août 2008, à 21 heures, l'Appelant s'est vu notifié un avis de sélection en vue d'un contrôle du dopage. Selon le formulaire de notification signé par l'athlète, ce dernier s'est présenté au poste de contrôle à 21 heures 15, où il a fait l'objet d'un prélèvement d'échantillons d'urine et de sang.
42. Au cours de l'audience qui s'est tenue à Lausanne en date du 17 juin 2010, l'athlète a reconnu que les tubes A et B contenant ses prélèvements sanguins avaient été placés dans des bouteilles Berlinger distinctes.
43. Le code 281841 était gravé tant sur le couvercle que sur le corps des deux bouteilles Berlinger, lesquelles ont été scellées de manière à ce que leur ouverture entraîne inévitablement des altérations visibles du couvercle.
44. A la fin de la procédure de prélèvement, l'Appelant a dû signer un formulaire de contrôle, qui contient notamment les informations suivantes :
 - le prélèvement des échantillons s'est fait entre 21 heures 45 (pour l'urine) et 22 heures 07 (pour le sang);
 - le numéro de code attribué aux échantillons sanguins A et B de l'athlète est 281841 ;
 - l'Appelant a signé une déclaration en vertu de laquelle il reconnaît que la procédure de prélèvement s'est déroulée sans incident et selon les normes applicables en la matière.

45. Les échantillons A et B numérotés 281841 ont quitté le poste de contrôle le 5 août 2008, à 23 heures 10 et sont arrivés le lendemain, à 1 heure 37, au National Anti-Doping Laboratory à Beijing, en Chine.
46. A leur réception, le laboratoire a donné aux échantillons en question un deuxième code (« Lab code »), nécessaire pour les procédures de gestion internes au laboratoire. C'est ainsi que les échantillons numérotés 281841 ont reçu le "Lab Code" 08H06B24.
47. Selon les documents présentés par l'Appelant lui-même au cours de l'audience devant le TAS du 17 juin 2010, il apparaît que les échantillons pourvus du "Lab Code" 08H06B24 ont été placés dans un réfrigérateur au milieu d'autres échantillons, comportant des codes distincts. Cette information a d'ailleurs été confirmée par l'attestation du 12 août 2009 de M. Chen Zhiyu, responsable des procédures de prélèvement et de transport des échantillons du National Anti-Doping Laboratory à Beijing, en Chine.
48. Le 14 octobre 2008, le National Anti-Doping Laboratory à Beijing, en Chine a remis à la société Schenker Suisse SA des colis renfermant les échantillons prélevés au cours des contrôles du dopage effectués à l'occasion des Jeux Olympiques d'été de 2008. Dans une attestation du 14 octobre 2008, le représentant de la société Schenker Suisse SA confirme que les échantillons A se trouvent dans les conteneurs Berlinger, dont le couvercle et le corps comportent le même numéro de code. Il certifie également que les échantillons B n'ont pas été manipulés et que les sceaux de leurs bouteilles Berlinger sont intacts. Il a également vérifié que chaque échantillon figure sur la liste qui lui a été remise. Dans ladite liste, se trouvent les échantillons avec le code 281841.
49. Le 20 octobre 2008, le LAD a accusé réception de la livraison effectuée par la société Schenker Suisse SA.
50. Chacune des étapes précitées a fait l'objet d'un formulaire bien spécifique, dûment rempli et signé par les personnes impliquées. Après un examen attentif de l'ensemble de la documentation, la Formation arbitrale arrive à la conclusion que la traçabilité des échantillons de l'Appelant est parfaitement établie et peu être aisément vérifiée. A aucun moment, il n'apparaît que la chaîne de sécurité a été interrompue.
51. Selon l'Appelant, les procédures liées à la chaîne de sécurité n'ont pas été respectées, notamment en raison de l'absence de toute donnée relative à l'analyse de son échantillon A par le "National Anti-Doping Laboratory" ainsi qu'à la re-fermeture de cet échantillon.
52. Or la Formation arbitrale rappelle que le laboratoire en question est accrédité par l'AMA, et est dès lors présumé avoir respecté toutes les procédures en la matière. Elle estime alors, que l'Appelant, en formulant ces deux griefs, ne renverse pas cette présomption et n'établit pas qu'un écart est survenu par rapport aux règles anti dopage du CIO, ni même par rapport au « Standard International pour les Laboratoires » (ci-après SIL).
53. A ce propos, la Formation arbitrale considère en effet ce qui suit :
 - D'une part, et alors que le cheminement des échantillons A et B de l'athlète est clairement identifié au sein même du laboratoire de Pékin, à partir notamment de leur numéro « Lab Code »- ainsi qu'il a été dit et expliqué à l'audience- l'Appelant

se borne à alléguer qu'il ignore comment et par qui a été manipulé son échantillon A au dit laboratoire. Cette simple affirmation, non assortie d'un moindre commencement de preuve ne saurait en effet suffire à renverser la présomption qui s'attache à la régularité des manipulations réalisées par les laboratoires agréés, au risque de rendre inopérante toute intervention de ces laboratoires.

- D'autre part, la seule circonstance que l'échantillon A ait été ouvert pour procéder à la recherche de l'hormone de croissance recombinée – recherche qui s'est révélée négative- puis ensuite refermé pour être envoyé au laboratoire de Lausanne et soumis à une autre recherche, celle de l'EPO CERA, ne saurait non plus suffire à démontrer une irrégularité dès lors que cette manipulation a été faite par un laboratoire agréé et que l'Appelant n'apporte aucun élément convaincant pour renverser la présomption de régularité.
 - De même, il n'est pas contesté que l'échantillon B est resté scellé jusqu'au jour de son ouverture au LAAFLD en présence du représentant de l'Appelant. L'analyse de cet échantillon B a abouti à un résultat radicalement identique à celui de la recherche de l'EPO CERA dans l'échantillon A. Cela semble bien écarter une possible contamination à l'EPO CERA de l'échantillon A, postérieurement à son ouverture. Du moins, le contraire n'est pas rendu vraisemblable par l'Appelant.
 - Enfin, et du moment où l'Appelant confirme que les procédures liées à la chaîne de sécurité ont été respectées tant par le LAD que par le LAAFLD, il exclut toute manipulation dolosive à partir du 20 octobre 2008.
 - Dans ces circonstances, il n'établit pas qui aurait manipulé l'échantillon A et comment, alors a) qu'il fallait deviner qu'en janvier 2009, le CIO allait demander des tests complémentaires, en vue de déceler la présence éventuelle de la CERA et b) qu'il fallait intervenir sur cet échantillon A en conséquence.
54. L'Appelant estime aussi que la présence d'irrégularités commises dans le cadre de la chaîne de sécurité est illustrée par la disparition temporaire de près de 300 échantillons prélevés au cours des Jeux Olympiques d'été 2008. Selon lui, les irrégularités sont implicitement admises par le CIO qui, au cours de la procédure devant son Comité Disciplinaire, a dû demander à M Chen Zhiyu, un responsable du National Anti-Doping Laboratory à Beijing, de confirmer par écrit que les procédures de prélèvement et de transport d'échantillon avaient été respectées. L'Appelant est d'avis que le fait de devoir demander une telle attestation écrite est un aveu que la documentation de base est lacunaire et, par conséquent, non fiable. En outre, cette attestation a été établie le 12 août 2009, soit bien après les faits litigieux et ne peut donc avoir une quelconque valeur.
55. La Formation arbitrale souligne que l'Appelant a tenté d'établir la disparition présumée desdits 300 échantillons au moyen de deux articles de presse. Il n'a toutefois pas expliqué en quoi cette prétendue disparition temporaire le concerne. En particulier, il n'a pas prouvé que ses échantillons faisaient partie du lot qui aurait disparu. De même, il ne dit pas à quel moment les 300 échantillons auraient disparu et comment cette disparition s'inscrit dans les événements tels que décrits ci-dessus, en relation avec la chaîne de sécurité le concernant. Pour ce qui est de l'attestation de M. Chen Zhiu, le CIO explique que cette dernière a été demandée dans le cadre de la procédure devant sa Commission Disciplinaire. En effet, était alors litigieuse la question de savoir à quelle température étaient conservés les échantillons. A la lumière de cette indication, il apparaît

effectivement que l'attestation de M. Chen Zhiu se concentre sur cet aspect. Dans tous les cas, l'Appelant n'explique pas en quoi cette attestation remet en cause la validité de la chaîne de sécurité, telle que décrite ci-dessus. Elle n'affaiblit en rien la validité du processus.

56. Au vu de ce qui précède, et après un examen attentif de l'ensemble de la documentation produite et des arguments soumis, la Formation arbitrale en arrive à la conclusion que la chaîne de sécurité a été respectée et que l'Appelant n'a, en tout état de cause, pas su démontrer l'existence d'un écart aux standards applicables, qui aurait pu raisonnablement entraîner le résultat d'analyse anormal.

b) La probabilité d'une manipulation dolosive

57. Il reste à examiner si, malgré ce qui précède, l'Appelant a su rendre plausible l'intervention dolosive d'un tiers qui aurait été à même de manipuler ou de contaminer ses échantillons, sans laisser de traces.

58. En effet, l'Appelant suggère qu'il est la victime d'un complot. Il appartient évidemment à la personne qui allègue de tels faits de les démontrer ou, à tout le moins, de les rendre vraisemblables (CAS 2004/A/607 Galabin Boevski v/IW, p. 22; CAS 2004/A/633 IAAF v/ FFA & Mr Chouki, p. 20). Pour permettre à la Formation arbitrale de conclure à l'existence d'une telle machination, l'Appelant doit apporter des preuves concrètes, fondées sur des éléments objectifs et non sur des spéculations.

59. En l'espèce, l'Appelant n'a apporté aucun élément permettant d'identifier qui pouvait avoir un intérêt à lui nuire et pour quel motif. Il n'a pas expliqué comment une personne malveillante aurait pu avoir accès à ses échantillons et faire le rapprochement entre ses échantillons et le numéro 281841. Il n'a pas non plus apporté de preuve qu'il aurait été possible d'ouvrir l'échantillon B ou de le remplacer sans laisser de traces. Enfin et surtout, l'Appelant n'a pas donné à la Formation arbitrale une seule raison de penser qu'un tiers aurait pu contaminer ses échantillons non pas avec une substance interdite connue, facilement détectable mais avec de la CERA, une EPO de troisième génération, particulièrement confidentielle au moment des analyses effectuées par le LAAFLD.

60. Enfin, la vraisemblance d'une intervention malveillante est d'autant plus improbable que la contre-analyse requise par l'Appelant s'est faite en présence du représentant de ce dernier, M. Douwe de Boer, lequel a confirmé que le sceau de l'échantillon B était intact au moment de son ouverture.

c) Conclusion

61. Ainsi, au vu de a) la séquence documentée des événements liés au prélèvement des échantillons de l'Appelant, à leur conservation et à leur transport, b) des résultats de l'analyse menée par le LAD sur l'échantillon A, confirmés par l'analyse par le LAAFLD des échantillons A et B, c) de l'intégrité du sceau de l'échantillon B au moment de son ouverture, d) du fait que les laboratoires qui ont procédé aux analyses sont accrédités par l'AMA, e) du fait qu'il en découle une présomption que les analyses des échantillons ont été effectuées de manière respectueuse des Standards internationaux pour les laboratoires, f) que cette présomption n'a pas été renversée par l'Appelant, la Formation arbitrale est convaincue que les procédures de la chaîne de sécurité ont été respectées et

qu'il n'y a pas eu d'écart aux Standards internationaux, ayant raisonnablement pu entraîner un résultat d'analyse anormal.

B. La présence de la CERA a-t-elle été valablement détectée dans les échantillons sanguins de l'Appelant?

62. L'Appelant estime que la méthode appliquée par le LAAFLD pour détecter la CERA dans ses échantillons sanguins est une méthode nouvelle qui ne pouvait être valablement utilisée avant d'avoir été formellement validée à la suite d'une procédure d'accréditation. Cela est d'autant plus vrai que ladite méthode repose sur l'usage de l'anticorps Ac 9C21D11, dont les caractéristiques étaient méconnues au moment de l'analyse des échantillons de l'athlète.
63. L'Appelant relève que ses échantillons ont été analysés entre février et la fin mai 2009, soit bien avant que le LAAFLD ait reçu son accréditation par le COFRAC, qui lui a été délivrée le 1^{er} juillet 2009. De même, la nouvelle directive technique de l'AMA au sujet de l'EPO (TD2009EPO) a été adoptée le 9 mai 2009 et est entrée en vigueur le 31 mai 2009, soit postérieurement à l'analyse de ses échantillons A et à l'ouverture de son échantillon B. L'Appelant remet donc en cause la validité de la méthode de détection effectuée par le LAAFLD compte tenu de son absence d'accréditation par le COFRAC au moment de l'analyse. A ses yeux, le premier paragraphe de l'article 4.4.10 du SIL n'est pas applicable, l'existence d'une validation interne n'ayant jamais été établie de manière convaincante. En effet, l'existence de cette validation interne n'a fait l'objet que d'une attestation tardive (datée du 10 septembre 2009) et non désintéressée du Directeur du Département des Analyses de l'Agence Française de Lutte contre le Dopage, M. Jacques de Ceaurriz.
64. L'article 4.4.10 du SIL adopté à l'appui du Code mondial antidopage, applicable en vertu de l'article article 16.1 des Règles antidopage du CIO prévoit ce qui suit:

"4.4.10 Flexibilité de la portée d'accréditation

Les Laboratoires accrédités par l'AMA sont autorisés à modifier des méthodes scientifiques existantes ou à y ajouter des analyses pour étendre le champ de leurs activités, ou à mettre au point de nouvelles méthodes qui impliquent une technologie qui entre déjà dans le champ de leur accréditation, sans en référer à l'organisme qui a procédé à l'accréditation ISO/CEI 17025 du Laboratoire. Pour obtenir une flexibilité de son champ d'accréditation, le Laboratoire doit disposer, dans sa documentation sur le management de la qualité, de processus relatifs à la validation/acceptation des méthodes, aux compétences du personnel principal, à l'archivage et au compte rendu.

Toute nouvelle méthode ou procédure d'analyse de Contrôle du dopage exigeant des compétences et une technologie qui n'entrent pas dans le champ d'accréditation du Laboratoire devra être adéquatement validée par le Laboratoire et son adéquation à l'usage prévu devra être déterminée par l'AM avant sa première mise en oeuvre par tout Laboratoire dans le domaine du contrôle du dopage. L'AMA utilisera tout moyen considéré approprié, y compris les consultations formelles avec des groupes de travail d'experts scientifiques et/ou une ou plusieurs publications dans des revues scientifiques

appliquant un système d'évaluation par les pairs, afin de juger si la méthode est adaptée à l'usage qui en est prévu avant d'accorder son approbation. Avant d'appliquer une de ces nouvelles méthodes ou procédures à l'analyse d'Échantillons de Contrôle du dopage, mais après avoir obtenu l'approbation de l'AMA, le Laboratoire devra obtenir une extension du champ de son accréditation par l'organisme d'accréditation compétent."

65. La question qui se pose ici est de savoir si, au moment de l'analyse des échantillons de l'Appelant, le LAAFLD pouvait ou non jouir de la flexibilité de la portée de l'accréditation ISO/IEC 17025, qui lui a été octroyée depuis plusieurs années par le COFRAC pour l'analyse d'échantillons d'urine. Afin d'y répondre, il s'agit donc de déterminer si le LAAFLD s'est contenté, soit de modifier des méthodes scientifiques existantes ou d'y ajouter des analyses pour étendre le champ de ses activités, soit de mettre au point de nouvelles méthodes qui impliquent une technologie qui entre déjà dans le champ de son accréditation, ou si, au contraire, il a dû créer une nouvelle méthode ou procédure d'analyse exigeant des compétences et une technologie qui n'entraient pas dans le champ de son accréditation préalable.
66. S'agissant ici d'éléments techniquement complexes qui requièrent des connaissances scientifiques spécifiques, la Formation arbitrale estime qu'il lui appartient, pour trancher cette question, de s'appuyer avant tout sur les déclarations des différents experts auditionnés durant les débats, lesquels avaient été désignés par les Parties.
67. Le témoignage du Dr Lasne, dont l'audition a été requise par le CIO, peut être résumé comme suit:
 - L'EPO est une protéine qui est produite naturellement par le corps. Elle laisse des traces tant dans les urines que dans le sang.
 - Le LAAFLD a mis au point une méthode, la focalisation isoélectrique et immunodétection après une étape d'immunoextraction (ci-après méthode IEF), qui consiste à soumettre le liquide biologique concerné à un champ électrique, auquel réagit différemment l'EPO, selon que son origine est endogène ou exogène. En effet, l'EPO physiologique a une charge électrique (isoélectrique) différente de l'EPO de synthèse. Initialement la méthode était développée uniquement pour l'analyse de la matrice urinaire. Par la suite, elle a été étendue à l'analyse de la matrice sanguine. Quelque soit la matrice analysée (urinaire ou sanguine), la méthode est radicalement identique.
 - La méthode IEF se décompose en deux phases:
 - La première étape consiste à concentrer l'EPO. Cela est particulièrement nécessaire pour le sang qui est très riche en protéines. A ce stade du protocole, le liquide biologique est placé dans une solution où se trouve un premier anticorps (Ac 9C21D11) qui permet de retenir toutes les EPO. La solution ainsi obtenue (le rétentat) est alors purifiée de manière à ce que seules les EPO soient conservées.
 - Dans une seconde étape, le rétentat est soumis à l'IEF et à un autre anticorps (Ac AE7A5), ce qui permet d'obtenir le profil isoélectrique des EPO présentes.

La CERA est alors facilement identifiable au vu de ses caractéristiques uniques, sa molécule d'EPO étant la seule à être liée à une molécule de polyéthylène glycol (PEG). En travaillant à partir de la matrice sanguine, la détection de la CERA est facilitée du fait que cette EPO est beaucoup plus pure puisque son profil n'a pas été modifié du fait de son passage dans les urines. Dès lors, l'EPO analysée à partir d'une matrice sanguine a un profil très proche de l'EPO injectée.

- Cette méthode appliquée aux urines a été validée par le CIO le 1er août 2000. Selon Dr Lasne, cette méthode n'est plus critiquée et a fait l'objet de plusieurs publications dans des revues scientifiques reconnues (Lasne, de Ceaurriz, Recombinant erythropoietin in urine, in *Nature* 2000; 405:635; Lasne, Double blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures, in *J Immunol Methods*, 2001; 253:125-31; Lasne, Martin, Crepin, de Ceaurriz, Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones, in *Anal Biochem* 2002;311:119-26).
- Le LAAFLD a alors procédé à une série de tests destinée à l'application de cette méthode à l'analyse de la matrice sanguine. Dr Lasne a d'ailleurs publié un article à ce sujet en 2007 dans une revue scientifique reconnue (Lasne, Martin, de Ceaurriz, Isoelectric profiles of erythropoietin are different in serum and urine, in *Int J Biol Macromol*, 2007;41:354-7). Ces démarches ont abouti à une validation interne qui a confirmé que la méthode appliquée pour la matrice urinaire pouvait être appliquée avec la même efficacité à la matrice sanguine. Cette validation interne a eu lieu le 25 septembre 2008, ce que M. Jacques De Ceaurriz a d'ailleurs encore confirmé le 10 septembre 2009.
- Le 7 février 2009, le LAAFLD a adressé une demande de validation auprès du COFRAC non pas pour obtenir la validation d'une nouvelle méthode mais pour que cette institution lui reconnaisse l'aptitude à prendre en charge les échantillons de sang et à les éliminer. Cette validation a été délivrée le 1^{er} juillet 2009. Parallèlement, Mme Lasne a encore publié un article en juin 2009 (Lasne, Martin, de Ceaurriz, Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control, in *Haematologica* 2009; 94:888-90).
- Il y a risque de cross-réactivité lorsque l'anticorps utilisé ne peut pas différencier deux protéines distinctes. L'utilisation de la méthode en question écarte tout risque de faux positif ou de cross-réactivité, puisque les anticorps utilisés dans le cadre de la méthode IEF sont dirigés spécifiquement contre les EPO (on parle alors d'anticorps spécifiques). D'une part, l'anticorps Ac 9C21D11 permet l'extraction de toute forme d'EPO du sang. Son efficacité est d'ailleurs reconnue du fait que cet anticorps a été agréé par la Food and Drug Administration, institut américain des denrées alimentaires et des médicaments qui a notamment pour mandat d'autoriser la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis d'Amérique. D'autre part, une étude scientifique a démontré que l'anticorps Ac AE7A5 n'interfère pas avec les profils isoélectriques des EPO résultant d'un test IEF. Selon Dr Lasne, la méthode IEF est d'une fiabilité absolue.
- A ce jour, la méthode a été appliquée avec succès dans une vingtaine de cas. Depuis qu'elle existe, en 2007, cette méthode n'a pas évolué ni n'a été modifiée.

68. Le témoignage du Dr Giovanni Inghilleri, dont l'audition a été requise par l'Appelant, peut être résumé comme suit:

- Il reconnaît que les explications du Dr Lasne sur la méthode IEF sont exactes. D'un point de vue technique, la méthode IEF est acceptable. Il précise toutefois qu'en raison de ses caractéristiques, la CERA est difficile à déceler dans l'urine.
- Expressément interpellé par le Président de la Formation arbitrale, Dr Inghilleri confirme que la méthode IEF n'est pas différente selon que c'est une matrice sanguine ou urinaire qui est analysée. Toutefois, il est d'avis que, en cas d'analyse de matrices sanguines, la fiabilité de la méthode IEF n'est pas encore démontrée. Cela est d'autant plus vrai que le sang contient un nombre important de protéines et qu'il existe des risques élevés que l'anticorps utilisé réagisse de manière non-spécifique avec une autre protéine que l'EPO.
- Selon lui, le degré de précision de la méthode IEF sur des matrices sanguines doit encore être évalué, ce qui n'est possible que si elle est appliquée à un nombre de cas important. En d'autres termes, la fiabilité de la méthode est encore en cours d'étude. A cet égard, il souligne qu'en mai 2009, il n'y avait pas véritablement de publication scientifique relative à l'analyse d'une matrice sanguine au moyen de la méthode IEF. L'article de Mme Lasne (Lasne, Martin, de Ceauriz, Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control, in *Haematologica* 2009; 94:888-90) a été publié au mois de juin 2009, dans la rubrique "*Letters to the Editor*", soit postérieurement aux analyses des échantillons de l'athlète. Il s'agit plus d'un courrier des lecteurs que d'une étude scientifique, laquelle requiert des conclusions fondées sur un nombre important de cas et de tests ainsi que la description très détaillée de chacune des phases du protocole applicable. Il estime que l'article de Mme Lasne est trop superficiel pour permettre de soutenir que la méthode IEF est fiable.
- Selon lui, la méthode IEF a fait l'objet d'une acceptation institutionnelle au mois de juillet 2009 par le COFRAC. Cela a également entraîné sa validation technique. En revanche, la validation scientifique de la méthode IEF n'est envisageable qu'une fois que sa fiabilité absolue aura été établie, ensuite de l'étude de nombreux cas.

69. Le témoignage du Dr Martial Saugy, dont l'audition a été requise par le CIO, peut être résumé comme suit:

- La CERA est une EPO de 3ème génération, commercialisée par les laboratoires Roche sous le nom de "Mircera". Dans le cas d'espèce, le LAD a appliqué le test "ELISA" qui est une méthode permettant de balayer (screening) un grand nombre d'échantillons.
- Dans une première étape, le test va isoler toutes les EPO au moyen d'un anticorps (Ac 9C21D11). Dans un second temps, le résultat ainsi obtenu sera alors exposé à un anticorps spécifique, fourni par la société Roche, l'auteur de la CERA. Cet anticorps est distinct de ceux utilisés dans la méthode IEF et va permettre d'identifier le PEG de la CERA.
- Le test "ELISA" donne une première indication quant à savoir si les échantillons contiennent de la CERA. Il s'agit d'un balayage (screening) qui doit être confirmé par une autre méthode.

- Au vu de trois anticorps différents utilisés dans le cadre du test "ELISA" et dans le cadre de la méthode IEF, le risque de cross-activité est absolument nul.
 - La méthode IEF a été validée depuis longtemps et le LAAFLD n'avait pas besoin d'accréditation complémentaire du COFRAC pour l'appliquer à des matrices sanguines. Le principe de la flexibilité de la portée d'accréditation (tel que défini à l'article 4.4.10 du SIL) autorisait le LAAFLD à travailler sur cette méthode. Tout au plus, une nouvelle accréditation du COFRAC permettait au LAAFLD de se mettre à l'abri de toutes critiques, telles que celles formulées par l'Appelant dans la présente procédure.
 - Le LAD n'a pas demandé une nouvelle accréditation par rapport à l'application de la méthode IEF à une matrice sanguine. Les principes liés à l'immuno-extraction sont connus et le fait de les étendre à une nouvelle matrice ne justifie pas une nouvelle validation.
 - Le rescallage des échantillons après une première analyse est essentiel pour un échantillon B, mais non pour un échantillon A, car la construction d'une machination qui permettrait que l'analyse d'un échantillon A, qui aurait été manipulé, aboutisse au même résultat que celle d'un échantillon B dont l'absence de manipulation est certifiée (le système de sceller mis en place par Berlinger étant inviolable) est extrêmement difficile.
70. Le témoignage du Dr Olivier Rabin, dont l'audition a été requise par le CIO, peut être résumé comme suit:
- Le test "ELISA", doublé de la méthode IEF, est suffisant pour garantir la fiabilité absolue du résultat positif des échantillons de l'Appelant. Les anticorps fournis par la société Roche sont très spécifiques et assurent un niveau de détection extrêmement élevé. La méthode IEF qui est en cause est validée par la plupart des laboratoires accrédités par l'AMA.
 - Il y a lieu d'exclure toute éventualité de cross-activité au motif que la CERA a une molécule qui a une structure très particulière. Elle a une composition chimique PEG + Epoetin β qui est une combinaison unique, facilement décelable.
 - Le principe applicable de la flexibilité de la portée d'accréditation (tel que défini à l'article 4.4.10 du SIL) existe également dans le cadre des normes ISO. Cette disposition vise à ce qu'une méthode connue et utilisée dans la lutte antidopage puisse être étendue. En l'espèce, la méthode n'est pas nouvelle. C'est la matrice qui est différente. Si le laboratoire est en mesure d'établir qu'il n'y a pas d'interférence matricielle lors de l'utilisation de la méthode, cette dernière peut alors être valablement appliquée. L'AMA attend d'ailleurs des laboratoires accrédités qu'ils étendent spontanément les méthodes connues aux nouvelles matrices. En l'espèce le LAAFLD est un laboratoire qui jouit d'une excellente réputation et qui est à l'origine de la mise en œuvre de la méthode IEF. Il n'y a aucun motif à remettre en cause ses résultats.
 - En l'espèce, le fait que le document technique TD2009EPO n'était pas approuvé formellement au moment de l'analyse ne joue aucun rôle. En effet, les documents techniques TD2004EPO et TD2007EPO ont été publiés et validés à une époque où seul un nombre limité d'EPO était connu. En effet, à cette époque, les EPO étaient

encore protégées par des brevets. Une fois ces derniers expirés, des EPO inconnues ont vu le jour (EPO originales, génériques, dérivées, etc.). Les documents techniques TD2004EPO et TD2007EPO ne couvraient plus toutes ces nouvelles molécules, en particulier ils ne couvraient pas la CERA. Les auteurs du document technique TD2009EPO ont pris soin de s'assurer qu'il englobe le plus d'EPO possible.

71. A la lumière de ces différentes explications, la Formation estime que le présent cas relève de l'article 4.4.10 alinéa 1 du SIL. Ainsi, le LAAFLD était en droit d'utiliser la méthode d'analyse préexistante pour détecter la CERA dans les échantillons de sang, après validation interne de l'extension de sa méthode à la matrice sanguine, ceci même en l'absence d'extension formelle d'accréditation par le COFRAC. Or, cette validation interne a été réalisée le 25 septembre 2008, tel qu'il en ressort de l'attestation du Dr Jacques de Ceaurriz. La procédure de validation interne a donc été achevée avant avril et mai 2009, dates des analyses des échantillons litigieux par le LAAFLD.
72. Comme cela ressort du témoignage du Dr Olivier Rabin, directeur scientifique de l'AMA, le LAAFLD s'est entièrement conformé au SIL et pouvait utiliser sa méthode de détection de la CERA à des fins antidopage.
73. Par surabondance, la Formation arbitrale est d'avis que l'extension d'accréditation par le COFRAC n'a fait que confirmer la validité scientifique de la méthode de détection de la CERA appliquée dans le cas de l'Appelant. Dans la mesure où la validité d'une méthode d'analyse est jugée suivant sa conformité avec un document technique, la question qu'il y a lieu de se poser est de savoir si le résultat de l'analyse répond aux critères du document technique. Pour cela, il est sans importance que l'analyse ait été faite avant ou après l'entrée en vigueur dudit document technique. Ce dernier présente certes la méthode à suivre par les laboratoires à partir d'une certaine date. Mais si une analyse est conforme au document technique, elle est alors parfaitement valable quelles que soient les dates respectives de l'analyse et du document. En l'espèce, l'analyse était conforme non seulement au document technique TD2007EPO, mais également au document technique TD2009EPO (TAS 2009/A/1820 Stefan Schumacher c/ UCI, par. 152, page 31).
74. En d'autres termes, l'extension d'accréditation n'était pas une condition de la validité ou de la légalité de la méthode qui a été appliquée par le LAAFLD lors de l'analyse des échantillons de l'Appelant. Elle n'en a, en réalité, que confirmé a posteriori, la validité et la légalité.
75. Dans un tel contexte, la jurisprudence du TAS a déjà pu préciser l'importance, pour la lutte antidopage, du développement des technologies nouvelles, d'une part, et la nécessité de pouvoir les appliquer sans délai dans les méthodes de détection des substances interdites, d'autre part:

"The International Standards bring with them companion documents known as Technical Documents ("TD") which are relevant to the laboratories in the fight against doping. The WADA accredited laboratories are constantly adjusting to take the most recent developments and product into account when designing and applying the analytical procedure for the detection of Prohibited Substances. EPO has been on the Prohibited List for some years and the initial

TD for EPO was based on analysis and reporting of EPO- α , EPO- β and NESP. The TD applicable to the analysis of these substances was reflected in TD2007EPO. The expiration of the patents for these substances brought with it a rapid development of new products and methods. The Panel is advised that there are presently some 80 different variations of this substance available on the market many of which are not produced by the regulated pharmaceutical industry. These developments necessitated the writing of a new TD" (CAS 2009/A/1931 Ekaterina Iourieva & Albina Akhatova v. International Biathlon Union, 5 7.7, p. 7) [le soulignement est le fait de la Formation arbitrale].

"(...) The accredited laboratories were in transition from the use of TD2007EPO to TD2009EPO at the time of testing the Athletes' samples in this case. But TD2009EPO had not become effective when the "A" samples were analysed in December 2008; nor, when the "B" samples were analysed in February 2009. The TD2009EPO is not applicable because its effective date is after the "B" sample was analysed. However, it was Dr. Rabin's opinion in his testimony that the laboratories must always use the most recent state of the art technology and knowledge to identify prohibited substances and methods. (...) Therefore, it is the opinion of this Panel that the ISL ought to indicate that the use of the most recent state of the art technology and knowledge will be used in testing, particularly in a transitional period between use of an existing and effective TD and a replacing one". (ibidem, par. 7.8, pp. 7-8; TAS 2009/A/1820 Stefan Schumacher c/ UCI, par. 153, page 31) [Le soulignement est le fait de la Formation arbitrale].

76. Force est donc de constater que le LAAFLD ne s'est nullement écarté du SIL lors de son analyse des échantillons sanguins prélevés chez l'Appelant dans la mesure où il n'a fait qu'appliquer une méthode de détection préexistante et déjà validée de façon interne, conformément à l'article 4.4.10, alinéa 1 du SIL, au moment de l'analyse.
77. La Formation arbitrale note que le témoignage du seul expert amené par l'Appelant, Dr Giovanni Inghilleri, ne permet pas de remettre en question ce qui précède. Au contraire, cet expert a admis que la méthode IEF est identique selon que c'est une matrice urinaire ou une matrice sanguine qui est analysée. Il a mis en doute la fiabilité de l'extension de la méthode IEF en exposant que cette dernière n'avait pas fait l'objet d'une étude scientifique fouillée, basée sur de nombreux cas. A lui seul, cet argument ne permet pas d'écarter les conclusions très détaillées des autres experts entendus dans la présente cause. La Formation se sent confortée dans ses conclusions par la jurisprudence très récente du TAS dans des causes similaires (CAS 2009/A/1931 Ekaterina Iourieva & Albina Akhatova v. International Biathlon Union; TAS 2009/A/1820 Stefan Schumacher c/ UCI) et du Conseil d'Etat de la République française (Décision rendue le 28 octobre 2009 dans l'affaire de M. Stefan Schumacher). A cet égard, la Formation arbitrale ne peut s'empêcher de relever que l'Appelant n'a pas cherché à expliquer en quoi son cas se distinguait des dites jurisprudences, qu'il a lui-même évoquées en cours d'audience.
78. Dans son témoignage, le Dr Giovanni Inghilleri s'est limité à des considérations théoriques et générales, non appuyées par des éléments concrets et objectifs, contrairement aux autres experts entendus par la Formation arbitrale. En particulier, il

n'a pas mis en évidence les éventuelles lacunes des rapports d'analyse du LAAFLLD confirmant la présence de la CERA dans les échantillons A et B de l'Appelant.

79. Dans ces circonstances, la Formation arbitrale n'a pas de motif de mettre en doute l'affirmation unanime des Drs Lasne, Saugy et Rabin, selon laquelle l'exactitude des résultats des analyses des échantillons de l'Appelant est garantie par l'utilisation de deux méthodes (Test "ELISA" et la méthode IEF) et de trois anticorps différents, dont l'un est très spécifique puisqu'il est fourni par l'auteur de la CERA.

C. Si une violation des règles antidopage est avérée, quelle est la sanction?

80. Au vu de ce qui précède, la Formation arbitrale arrive à la conclusion que les procédures de la chaîne de sécurité ont été respectées, qu'il n'y a pas eu d'écart aux Standards internationaux, ayant raisonnablement pu entraîner un résultat d'analyse anormal et que les échantillons de l'Appelant ont été valablement déclarés positifs à la CERA.
81. L'Appelant a donc commis une infraction aux Règles antidopage du CIO. Dans une telle hypothèse, ces dernières prévoient ce qui suit:

"9.1 Annulation des résultats aux Jeux Olympiques

Une infraction aux règles antidopage commise pendant les Jeux Olympiques ou en relation avec ces derniers peut entraîner l'annulation de tous les résultats de l'athlète obtenus aux Jeux Olympiques avec toutes les conséquences en résultant, y compris le retrait des médailles, points et prix, sauf cas prévus au paragraphe 9.1.1 ci-dessous.

9.1.1 Lorsque l'athlète parvient à démontrer qu'il n'a commis aucune faute ou négligence en relation avec l'infraction, ses résultats dans d'autres compétitions ne seront pas annulés, à moins que les résultats obtenus dans d'autres compétitions que celle au cours de laquelle l'infraction aux règles antidopage est intervenue n'aient pu être influencés par cette infraction."

82. Les conditions de l'article 9.1 sont manifestement remplies. Au vu des circonstances, l'application de l'article 9.1.1 n'entre pas en considération. Il en résulte que la décision prise le 17 novembre 2009 par le Commission Exécutive du CIO est en tout point conforme avec la réglementation applicable.

D. Le droit d'être entendu de l'Appelant a-t-il été violé?

83. L'Appelant soutient que son droit d'être entendu a été violé lors de la première instance. En effet, des pièces auraient été versées au dossier postérieurement à son audition et sans qu'il ait eu la possibilité de se déterminer sur ces dernières.
84. Conformément à l'article R57 du Code, la Formation arbitrale revoit les faits et le droit avec plein pouvoir d'examen. En l'espèce, elle a pu procéder à une nouvelle instruction des faits de la cause et la juger à nouveau dans son ensemble. Partant, vu l'effet dévolutif de l'appel, la présente sentence se substitue à la décision attaquée. A cet égard, il y a lieu de relever que, selon une règle connue dans la plupart des systèmes juridiques, une

instruction complète, devant une instance de recours qui a un pouvoir de cognition complet, répare en général les vices de procédure de l'instance inférieure, tels que la violation du droit d'être entendu (TAS 98/214 B. / Fédération Internationale de Judo (FIJ), sentence du 17 mars 1999; CAS 2004/A/607 Galabin Boevski v/IWF, p. 27; CAS 2004/A/633 IAAF v/ FFA & Mr Chouki, p. 14; TAS 2008/A/1582 FIFA c. URBSFA & W., p. 18, CAS 2009/A/1920 FK Pobeda - Prilep, Aleksandar Zabrcanec, Nikolce Zdraveski v/UEFA, p. 17).

85. Que la violation du droit d'être entendu en première instance soit avérée ou non, l'éventuel vice de procédure a été réparé dans la présente procédure d'appel. En effet, l'Appelant a eu la possibilité de s'exprimer tant sur les nouvelles pièces produites en première instance que sur tout autre élément. Il a pu le faire devant le TAS qui jouit d'un plein pouvoir d'examen. Au cours de l'audience du 17 juin 2010, il a d'ailleurs expressément reconnu que son droit d'être entendu avait été respecté et qu'il était satisfait de la manière dont il avait été traité au cours de la présente procédure arbitrale.
86. Au vu de ce qui précède, il n'y a pas lieu de s'étendre davantage sur l'existence ou non d'une violation du droit d'être entendu de l'Appelant lors de la procédure de la première instance.

V. Conclusion

87. La décision rendue le 17 novembre 2009 par le Commission Exécutive du CIO est en tout point conforme avec les Règles antidopage du CIO et doit être confirmée. Toutes requêtes et plus amples conclusions de l'Appelant doivent donc être rejetées.
88. (...)

PAR CES MOTIFS

Le Tribunal Arbitral du Sport prononce :

1. L'appel déposé par Davide Rebellin le 30 novembre 2009 est rejeté.
2. La décision rendue par la Commission Exécutive du Comité International Olympique le 17 novembre 2009 est confirmée.
3. (...)

Lausanne, le 30 juillet 2010

Le TRIBUNAL ARBITRAL DU SPORT

Bernard Foucher
Le Président de la Formation

Michele Bernasconi
Arbitre

Ulrich Haas
Arbitre

Patrick Grandjean
Greffier ad-hoc

APPENDIX 7

Effects of Exercise on the Isoelectric Patterns of Erythropoietin

Séverine Lamon, MSc,* Laurent Martin, BSc,† Neil Robinson, PhD,* Martial Saugy, PhD,* Jacques de Ceaurriz, PhD,† and Françoise Lasne, MD†

Objectives: Recombinant erythropoietin has a strong impact on aerobic power and is therefore one of the most potent doping agents in endurance sports. The anti-doping control of this synthetic hormone relies on the detection, in the urine, of its isoelectric pattern, which differs from that of the corresponding natural hormone, the latter being typically more acidic than the former. However, a small number of natural urinary patterns, referred to as "atypical patterns," are less acidic than the dominant form. Based on anecdotal evidence, the occurrence of such patterns seems to be related to particular strenuous exercises. This study aimed to demonstrate this relation using a strenuous exercise protocol.

Design: Seven athletes took part in a training protocol including a series of supramaximal short-duration exercises. Urine and blood samples were collected throughout the protocols.

Settings: World Cycling Center, Aigle, Switzerland, and research laboratories.

Participants: Seven top-level athletes (cyclists) were involved in this study.

Main Outcome Measures: Erythropoietin (EPO) isoelectric patterns were obtained by submitting blood and urine samples to isoelectric focusing. Additional protein dosages were performed.

Results: Supramaximal short-duration exercises induced the transformation of typical urinary natural EPO patterns into atypical ones. None of the obtained atypical patterns fulfilled the 3 criteria mandatory for reporting an adverse analytical finding. Serum EPO patterns were not affected by the exercises that caused the transformation of urinary patterns.

Conclusion: An exercise-induced transient renal dysfunction is proposed as a hypothetical explanation for these observations that rely on parallel investigations of proteinuria in the same samples.

Submitted for publication August 20, 2008; accepted March 28, 2009.

From the *Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage, Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, University of Lausanne, Epalinges, Switzerland; and †Département des Analyses, Agence Française de Lutte contre le Dopage, Châtenay-Malabry, France.

The authors state that they have no financial interest in the products mentioned within this article.

Reprints: Séverine Lamon, MSc, Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage, Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Ch des Croisettes 22, 1066 Epalinges, Switzerland (e-mail: severine.lamon@chuv.ch).

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

Key Words: effort, erythropoietin, doping, urine

(*Clin J Sport Med* 2009;19:311–315)

INTRODUCTION

Erythropoietin (EPO) is a 30.4-kDa human glycoprotein hormone produced primarily by the kidney¹ and to a small extent by the liver.² Its production is stimulated by tissue hypoxia, and its main physiological effect is the stimulation of erythropoiesis.³ By increasing the number of circulating erythrocytes, EPO improves the oxygen-carrying capacity of blood, leading to an increased oxygenation of tissues.⁴

Because of these biological effects, EPO acts as a potent enhancer of athletic performance in endurance sports. Unsurprisingly, human recombinant erythropoietin (rHuEPO) has been used as a doping agent to improve aerobic power⁵ ever since it has become available in 1987. In 1990, the International Olympic Committee Medical Commission banned the misuse of this drug, even though rHuEPO detection was not possible at that time. It is only in 2000 that an rHuEPO detection method became available as part of anti-doping control.⁶ This method relies on the differentiation of isoelectric patterns generated by natural endogenous and recombinant forms of the hormone that are excreted in the urine. The difference in the isoelectric patterns owes to the fact that the most acidic isoforms of natural EPO are absent in the recombinant hormone because of nonidentical posttranslational modifications.

However, important variabilities in isoelectric patterns can also be observed for natural EPO when different urine samples are compared. Although most samples yield typical acidic patterns, other patterns, referred to as "atypical," present a shift of their isoforms toward a more basic isoelectric point (pI). Such atypical natural patterns are taken into account in anti-doping control procedures: To demonstrate the presence of rHuEPO,⁷ a strict distribution of the basic isoforms of the hormone must be present. Based on the observations of Paris and Lausanne anti-doping laboratories, atypical patterns seem to occur in urine samples collected after strenuous exercise. Accordingly, such samples are commonly referred to as "effort urines."

The objective of this study was to positively demonstrate that atypical patterns can indeed be induced in urine by strenuous effort. To this aim, an exercise protocol was set up with top-level athletes performing exercises on a cycling track in a controlled manner. The evolution of urinary EPO patterns

was followed throughout the protocol. In addition, serum EPO and urinary proteins were also measured in an attempt to understand how such atypical patterns were generated.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

All the investigations were conducted according to the Declaration of Helsinki as amended by the 41st World Medical Assembly (Hong Kong 1989) and were approved by the local ethical committee. All participants gave their informed consent and agreed to blood tests and urine collection. The training protocol included 7 top-level cyclists, 5 men and 2 women aged between 18 and 26 years, and took place in the frame of the World Cycling Center (Aigle, Switzerland).

Training Protocol

Before the strenuous exercises, which took place in the morning, the 7 subjects performed an appropriate 60-minute warm-up, followed by 15 minutes of active recovery and 15 minutes of complete rest. After that, each male athlete had to perform an intensive exercise composed of four 500-m rides on the cycling track (rolling start) at maximum speed, separated by 25 minutes of active recovery. One female athlete had to perform three 500-m rides and the other one to perform three 600-m rides, separated by 25 minutes of active recovery. The same training session was repeated in the afternoon by the second female athlete only (subject 2).

Sample Collection

Ideally, 4 urine samples were collected at different times for all subjects: the first morning urine (a), 1 urine sample collected before the warm-up training (b), 1 urine sample collected in the middle of the effort (c), and 1 urine sample collected directly at the end of the effort (d). Two hours separated the collection of the a-urine and the b-urine, whereas about 3 hours separated the collection of the b-urine and the d-urine. In the case of the female athlete who performed a second training session (subject 2), 2 additional urine samples were collected: the first one 3 hours after the end of the morning session (e) and the second one at the end of the afternoon session (f). These 2 last sample collections were separated by 3 hours.

At each collection time, the athletes were asked to completely empty their bladder. The samples were immediately aliquoted and frozen at -20°C until analysis.

In addition, 2 blood samples were collected using Serum Gel monovettes (Sarstedt, Numbrecht, Germany): the first one before (b) and the second one after the training session (d). Blood samples were immediately centrifuged. The resulting serum samples were then aliquoted and frozen at -80°C until analysis.

Total Protein, EPO, and Retinol-Binding Protein Quantification

Total protein content in urine samples was measured using a Coomassie Blue Plus Protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, Illinois). Erythropoietin levels were determined in the retentates obtained from ultrafiltration of urine using

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (human EPO Quantikine IVD; R&D Systems, Inc, Minneapolis, Minnesota). To estimate EPO levels in the original urine samples, the results obtained by ELISA were divided by the concentration factor of ultrafiltration. Retinol-binding protein (RBP) levels in urine were directly determined by ELISA (RBP4 ELISA kit; Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). In all cases, the results were corrected according to the specific gravity of the urine samples assayed.

Analysis of EPO Isoelectric Patterns

Erythropoietin isoelectric patterns were determined as previously described by Lasne et al⁶ with an additional preliminary step to extract EPO by immunoaffinity,⁸ as summarized below. Although this step was absolutely required only for serum samples, because of their very high protein content, it was also applied to the urine samples.

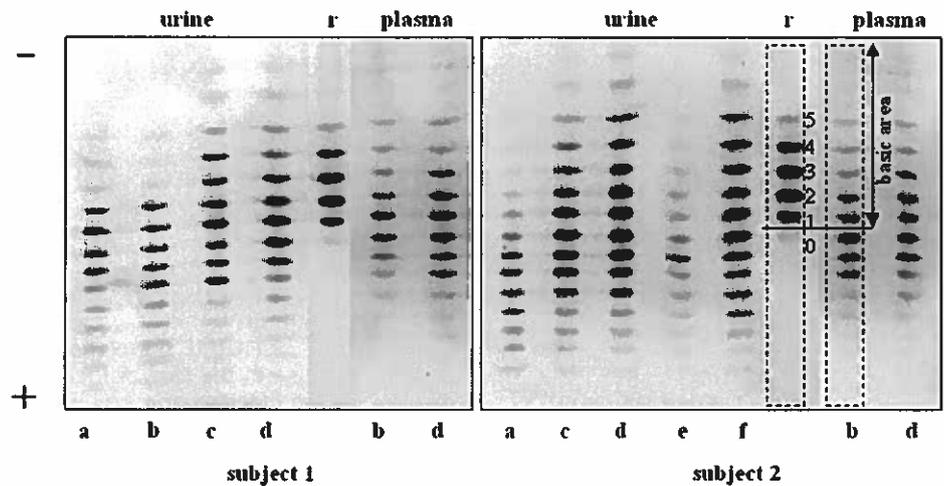
The samples were first subjected to an immunoaffinity step using monoclonal anti-human EPO antibodies (clone 9C21D11 from R&D Systems) coupled to Affi-Gel Hz hydrazide gel (Bio Rad). This step was followed by ultrafiltration through membranes with a molecular weight cutoff of 30,000 Da to concentrate the hormone in the retentate. The retentates were then submitted to isoelectric focusing in a pH gradient of 2 to 6, and the EPO isoforms were specifically revealed by the double-blotting method,⁹ using monoclonal anti-human EPO antibodies (clone AE7A5 from R&D Systems). Chemiluminescent imaging of the EPO isoforms was carried out with an LAS-1000 plus CCD camera (Fuji). Advance image data analyzer ID (v. 3.44) software was used to analyze the images and generate corresponding isoelectric profiles. A reference sample, consisting of an equimolecular mixture of recombinant epoetins α and β [the Biological Reference Preparation (BRP) from the European Pharmacopoeia Commission], was systematically included in the different isoelectric focusing runs as a position marker. The bands obtained with the BRP were numbered from 0 to 5 (counting from the anode to the cathode). The relative intensities of the different isoforms were evaluated for each sample using a fixed densitometer window (5 mm width) that included all the bands of any given lane. Baselines of the different lanes were drawn valley to valley for each peak in a profile, and the relative intensity was calculated as the percentage of the peak integral reduced by the background intensity in comparison with the sum of all the peaks of the profile. A "basic area" was defined from the cathode edge of the window up to and including band 1 of BRP (Figure 1). The percentage of basic isoforms (PBI) was calculated as the sum of the relative intensities of the isoforms situated in the basic area.

RESULTS

EPO Isoelectric Patterns Prior, During, and After the Effort

A clear shift of the urinary EPO isoforms toward a more basic pI was induced by exercise in all 7 subjects. The evolution of the EPO pattern from the first morning urine to

FIGURE 1. IEF patterns of urine and serum EPO from 2 distinct subjects (1 and 2) participating in the protocol: first morning sample (a), immediately before the warm-up training (b), middle (c), and end of exercise (d) and 3 hours after the end of the morning session (e) and end of the afternoon session (f). Lane r corresponds to BRP. Band 1 of BRP is used to define the basic area of the densitometer window (dotted rectangle). Note that b-sample was not collected for subject 2. Note the shift of the bands toward the cathode (top of the figure) induced by exercise. BRP, Biological Reference Preparation; EPO, erythropoietin; IEF, isoelectric focusing.



the sample collected at the end of the exercise is illustrated in Figure 1 for 2 of the 7 subjects tested. Similar results were obtained for all the subjects. Whereas the 2 urine samples collected in the morning before the exercise were very similar (note that no pre-exercise urine was collected for subject 2), a striking shift toward a more basic pI (resulting in more elevated PBI) was observed in the sample collected in the middle of the morning exercise, with no further significant changes at the end of exercise. The observed increase in PBI at the end of exercise compared with the initial values is highly significant ($P < 0.008$, using the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test).

Whenever an additional urine sample was collected 3 hours after the end of the morning session (subject 2 only), a reversal of the pattern to the initial state was clearly initiated but was not completed. A new striking shift toward a more basic pI was observed after the afternoon training session for this particular subject.

In contrast to the urine samples, the corresponding serum samples did not show any shift induced by exercise. The EPO patterns did not undergo any significant change before and after physical exercise (Figure 1).

Before the effort, the isoelectric patterns in all subjects were more acidic for the urine samples than for the serum samples. A significant positive correlation ($r = 0.85$, $P = 0.0158$) was observed between the values of PBI in serum and urine (Figure 2). This correlation, illustrated by the results obtained with the 7 subjects of the experiment, was confirmed by our findings using 47 paired urine and serum samples from other subjects at rest (data not shown).

This correlation remained after exercise ($r = 0.94$, $P = 0.0013$). Moreover, because of the shift toward basic pI, the urine patterns became almost identical to the corresponding serum patterns, as shown by the y intercept at zero point of the regression line in the plot of PBI in serum and urine (Figure 2).

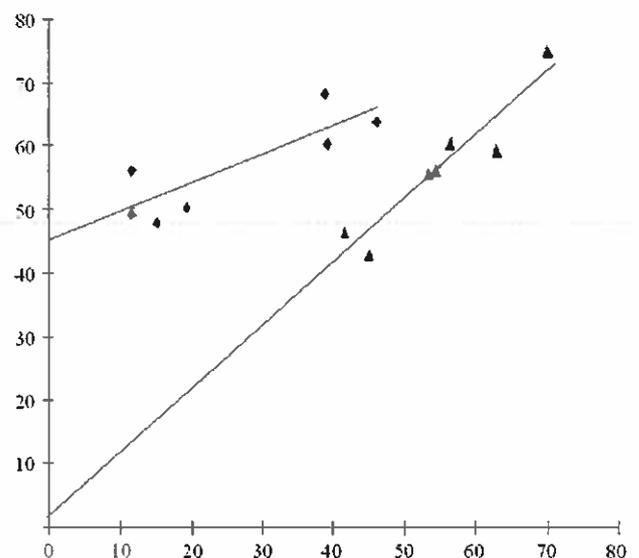
Finally, all generated atypical patterns met at least one of the World Anti-Doping Agency (WADA) positivity criteria. However, none of them fulfilled the 3 criteria mandatory for reporting an adverse analytical finding.

Total Protein, RBP, and EPO Concentrations Prior, During, and After the Effort

A slight increase of EPO concentration was measured in the pre-exercise samples compared with the first morning urine, with no significant changes in total protein and RBP concentrations. A very important increase of the 3 concentrations was observed in the midexercise samples. This increase was even more pronounced in the samples collected at the end of the effort.

Total protein and EPO concentrations increased 8.5- and 10-fold, respectively, compared with the initial values. The

PBI serum



PBI urine

FIGURE 2. Relationship between serum and urine PBI: The regression lines show that PBI is lower in urine before exercise (a-samples) (◆) and becomes equivalent to serum PBI after exercise (d-samples) (▲). PBI, percentage of basic isoforms.

most dramatic rise was observed in the case of RBP, with more than a 300-fold increase at the end of exercise, which incidentally coincided with the maximal shift of the urinary EPO patterns (maximal PBI) (Table 1).

The return to the initial state of the EPO pattern in subject 2, initiated 3 hours after the morning session, was accompanied by a marked decrease in total protein and RBP levels. A second increase in total protein and RBP concentrations was observed again after the afternoon session, which also caused a new shift of the pattern toward a more basic pI. Figure 3 illustrates the similar evolution of the 3 parameters for this particular subject.

DISCUSSION

Based on the observations made by Paris and Lausanne anti-doping laboratories, effort EPO patterns are typically observed in urine samples collected after short and intense efforts. Both laboratories have been regularly involved in analyses of samples collected at the completion of stage cycling races. Notably, the occurrence of effort urines increases strikingly after short stages against the clock. Athletics events such as 400 to 3000 m races also seem to frequently generate effort patterns. For example, of the 68 urine samples collected for EPO anti-doping control during the International Association of Athletics Federation indoor world championships 2008 (at the completion of the 400, 800, 1500, and 3000 m races), 55 samples (80%) yielded EPO patterns with PBI above 54% (mean PBI in 38 samples from control subjects at rest: 28.6%; SD, 12.4%), presenting the shift that is characteristic for effort urine. However, it cannot be excluded that other types of effort can also lead to similar shifts. For that reason, the presented explanations should be considered as a hypothesis limited to the range of our observations.

The first goal of this study was to mimic this type of strenuous exercise to produce effort urines under controlled conditions. The protocol we devised was clearly effective in that respect for all the tested subjects who accomplished 3 to 4 series of 30-second effort at their maximal possibilities. In

TABLE 1. Relative Increases of PBI, RBP Levels, Urinary Total Protein, and EPO Levels in Urine: First Morning Urine Sample (a), Immediately Before the Warm-up Session (b), Middle (c), and End of the Exercise (d)

	b/a	c/a	d/a	
μ	0.90	2.04	2.31	PBI
SD	0.11	0.74	0.93	
μ	1.54	143.17	332.64	RBP
SD	0.39	113.28	311.24	
μ	2.34	6.06	8.50	Total protein
SD	1.25	3.39	3.94	
μ	2.09	5.19	10.02	EPO
SD	0.67	5.49	3.99	

For each subject, relative increases are calculated as the ratio of the observed values at different times to the corresponding basal values in (a).

EPO, erythropoietin; PBI, percentage of basic isoforms; RBP, retinol-binding protein; μ , mean ratios.

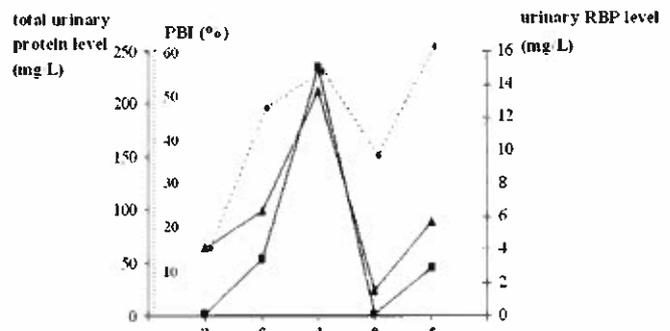


FIGURE 3. Evolution of PBI, urinary total protein, and RBP levels in the case of the athlete who performed 2 training sessions during the day (subject 2). Note that no b-sample was collected. Analogous variations in PBI (\blacklozenge), urinary RBP (\blacksquare), and total protein (\blacktriangle) are observed throughout the entire day. Note the similar evolution of the 3 parameters. PBI, percentage of basic isoforms; RBP, retinol-binding protein.

fact, a switch in the EPO patterns was already observable after 2 series. This striking EPO transformation in the urine is clearly related to postexercise proteinuria, as shown by the dramatic increase in urinary protein concentration correlated with increase in PBI. These findings corroborate the fact that postexercise proteinuria is affected by the intensity of exercise rather than its duration and that intermittent effort has a particularly significant impact.^{10,11} To our knowledge, the observed quantitative and qualitative variations of urinary EPO have never been described previously. The relation between EPO and total urinary protein is particularly well illustrated in the case of the cyclist who performed 2 training sessions. In this case, EPO concentration and isoelectric patterns evolved in parallel with urinary protein concentration throughout the entire day. The clear return to the basal state of both EPO and protein concentrations initiated 3 hours after the end of the first training session seems to reflect a rapid normalization process that will be investigated in the future.

The important increase in urinary RBP highlights the tubular component of the mixed-type proteinuria associated with strenuous exercise.¹² The concomitant increase in the levels of urinary EPO, which is also a low-molecular weight (30.4 kDa) protein, is probably related to the same mechanism involving both an increase in glomerular permeability and an inhibition of proximal tubular reabsorption. The striking transformation of its isoelectric pattern induced by exercise is, however, more surprising. Clearly, as shown by the stable isoelectric patterns, exercise does not modify the isoforms of serum EPO. Based on isoelectric patterns obtained in earlier work⁸ and the present study, physiological urinary and serum EPOs seem to differ at rest, the former being systematically more acidic than the latter. Strenuous exercise obliterates this difference, yielding urinary patterns that are very similar to serum patterns. This finding may be explained by the fact that under resting conditions, most of postglomerular filtered EPOs are absorbed by proximal tubule cells. Indeed, the recognition and the binding of low-molecular weight proteins by the brush border membranes of tubule cells have been shown to be strongly influenced by the electrical charge of proteins.¹³ Other

experiments using different modified albumin molecules have shown that the binding to brush border membranes increases with the pI.¹⁴ Thus, it is conceivable that the most basic isoforms of serum EPO, after filtration by the glomerulus, are preferentially removed from the urine by tubular cells, thus yielding a more acidic isoelectric pattern in the collected sample. If so, and if the tubular reabsorption process is saturated, such as after a strenuous exercise, the basic isoforms cannot be removed anymore and the serum EPO isoelectric pattern remains unchanged in the urine.

Whatever the reason of the basic shift observed in EPO isoelectric patterns is, this phenomenon has to be taken into account when interpreting the result of an anti-doping control. To prevent any misinterpretation that could lead to a false-positive result, the current positivity criteria for urinary rhEPO, as referenced in the last version of the WADA technical document (TD2007EPO),⁷ take into account the existence of effort urines and are therefore very conservative. Hence, the fact that all atypical patterns met at least one of them constitutes a complete justification of the use of these criteria. The drawback in such a careful approach is that low doses of recombinant EPO in urine cannot be reported, yielding false-negative results.¹⁵ It should be possible to use criteria that are more flexible, with reliable reporting of lower doses of recombinant EPO, in cases where the opportunity of a shift due to physical exercise can be categorically ruled out. Finally, our results indicate that it might be possible to use the urinary RBP level as a marker to identify urine samples in which the positivity criteria can be relaxed. This RBP dosage could be possibly combined with complementary methods, such as a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis test. Indeed, this last recently seemed to be beneficial and reliable in relation to active and effort urines.^{16,17} Further investigations are, however, necessary to test this possibility.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the WADA and the Swiss Federal Office for Sport who supported this research and

Dr. Mario Zorzoli for his work and technical support. Special recognition is due to the subjects who volunteered for this study.

REFERENCES

1. Donnelly S. Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critometer. *Am J Kidney Dis.* 2001;38:415-425.
2. Katz R, Cooper GW, Gordon AS, et al. Studies on the site of production of erythropoietin. *Ann N Y Acad Sci.* 1968;149:120-127.
3. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228:1-14.
4. Berglund B, Ekblom B. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med.* 1991;229:125-130.
5. Ekblom B, Berglund B. Effect of erythropoietin administration on mammal aerobic power. *Scand J Med Sci Sports.* 1991;1:88-92.
6. Lasne F, Martin L, Crepin N, et al. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 2002;311:119-126.
7. Catlin DH, Nissen-Lie G, Howe C, et al. WADA Technical Document TD2007EPO. 2007. <http://www.wada-ama.org>.
8. Lasne F, Martin L, Martin JA, et al. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41:354-357.
9. Lasne F. Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods.* 2003;276:223-226.
10. Poortmans JR, Labilloy D. The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1988;57:260-263.
11. Poortmans JR, Mathieu N, De PP. Influence of running different distances on renal glomerular and tubular impairment in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1996;72:522-527.
12. Poortmans JR, Brauman H, Staroukine M, et al. Indirect evidence of glomerular/tubular mixed-type postexercise proteinuria in healthy humans. *Am J Physiol.* 1988;254:F277-F283.
13. Just M, Habermann E. Interactions of a protease inhibitor and other peptides with isolated brush border membranes from rat renal cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1973;280:161-176.
14. Purtell JN, Pesce AJ, Clyne DH, et al. Isoelectric point of albumin: effect on renal handling of albumin. *Kidney Int.* 1979;16:366-376.
15. Ashenden M, Varlet-Marie E, Lasne F, et al. The effects of microdose recombinant human erythropoietin regimens in athletes. *Haematologica.* 2006;91:1143-1144.
16. Kohler M, Ayotte C, Desharnais P, et al. Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med.* 2008;29:1-6.
17. Reichel C, Kulovics R, Jordan V, et al. SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control. *Drug Test Anal.* 2009;1:43-50.

APPENDIX 8

blood

2006 108: 1778-1780
doi:10.1182/blood-2006-03-007922

No doubt about the validity of the urine test for detection of recombinant human erythropoietin

Françoise Lasne, Monique Beullens, Joris R. Delanghe and Mathieu Bollen

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



To the editor:

False-positive Epo test concerns unfounded

The brief report by Beullens et al¹ is misleading regarding the urine test that the World Anti-Doping Agency (WADA) uses to detect recombinant human erythropoietin (rhEpo). The WADA-recommended test is based on immunoelectrophoresis and double blotting (IEF/DB), and was developed by Lasne and de Ceaurriz in 2000.²

Our WADA-accredited laboratory has performed the IEF/DB test for rhEpo on more than 6800 urine samples, including more than 2600 doping control samples from athletes. Of the latter, we have reported 9 positive cases for rhEpo: 3 of these have publicly confessed to using rhEpo, 3 have accepted penalties, the physician of a seventh has been indicted for distribution of rhEpo, and 2 maintained their innocence but lost on appeal.

We take issue with Beullens's use of the term "false positive" because, as the authors emphasize, the compound they are discussing is not rhEpo. If the compound detected can be identified as not rhEpo, then it cannot cause a false positive. This term sensationalizes an otherwise interesting case report that could in due course contribute to the body of science.

The criteria used by the WADA laboratories are well known and readily available.³ Beullens et al do not state the criteria they used to make the "false-positive" claim. Using the WADA criteria, the "false-positive" electropherogram^{1(Fig 1A)} is clearly negative. Moreover, they do not include a negative or a positive urine quality-control sample. Forensic testing results are normally accompanied by a comprehensive documentation package that supports the conclusion. A report such as this that raises a profound issue (false accusations against an athlete) at a minimum requires far more documentation.

Another important but unexplained issue is the nature of the compound that appears to migrate in the same general region as rhEpo and is characterized by bands. The pH range of the ampholytes is needed in order to fully interpret the data. In the left panel of their Figure 1A, the epoetin- β lane shows 3 faint bands and possibly a very weak fourth band. The bands in the darbepoetin lane are overly dense. Knowing the pH range of the ampholytes might explain why the darbepoetin region seems closer to the rHuEPO region than we customarily observe (compare with Figure 1 here).

The right panel of their Figure 1A shows an apparent protein with bands, but it does not look like a typical rhEpo positive (Figure 1 here). Further, 1 and maybe 2 of the bands migrate more

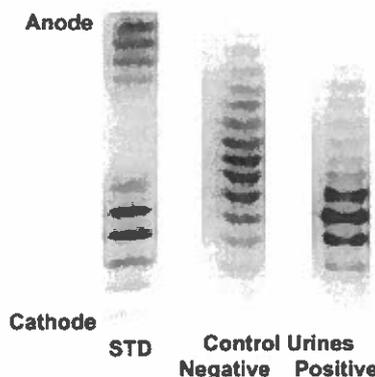


Figure 1. Electropherogram showing a darbepoetin alfa/rhEpo standard (left lane) and human quality control urines. The darbepoetin alfa/rhEpo standard is on the left, the negative human quality control urine (from a known rhEpo-free donor) is in the middle, and the positive human quality control urine (pooled from known donors on rhEpo) is on the right.

basically than the most basic epoetin- β band. Under the WADA rules, the identification criteria are not met.

Finally, the athlete has a puzzling renal disease characterized by a concentrating defect and an excessive number of casts that apparently does not interfere with his athletic prowess. He should have a full nephrology evaluation.

Don Catlin, Gary Green, Michael Sekera, Paul Scott,
and Borislav Starcevic

Correspondence: Don Catlin, Department of Molecular and Medical Pharmacology, UCLA Olympic Analytical Laboratory, University of California, Los Angeles, Los Angeles, CA 90025; e-mail: dcatlin@ucla.edu.

References

1. Beullens M, Delanghe JR, Bollen M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood*. 2006;107:4711-4713.
2. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*. 2000;405:635.
3. Catlin D, Nissen-Lie G, Howe C, et al. Harmonization of the method for the identification of epoetin alfa and beta (EPO) and darbepoetin alfa (NESP) by IEF, double blotting, and chemiluminescent detection. WADA technical document TD2004EPO. October 15, 2004. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/td2004epo_en.pdf. Accessed July 6, 2006.

To the editor:

No doubt about the validity of the urine test for detection of recombinant human erythropoietin

Beullens et al report the "false-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise."^{1(p4711)} This report, based on observations conducted on urine from 1 single subject, relies in fact on serious errors of interpretation of poor-quality images. A first sample, collected just after exercise and analyzed by double-blotting following isoelectric focusing of the retentate from ultrafiltrated urine,^{2,3} gives rise to a

banding pattern interpreted as unrelated to Epo based on the argument that this pattern is missing in a second sample collected 1 hour later. A simple routine assay (using other antibodies than the AE7A5 used for immunoblot) of the Epo level in these 2 ultrafiltered samples before IEF would have probably shown that a high concentration of this hormone was present in the first one but not in the second one. It is quite surprising that this basic control

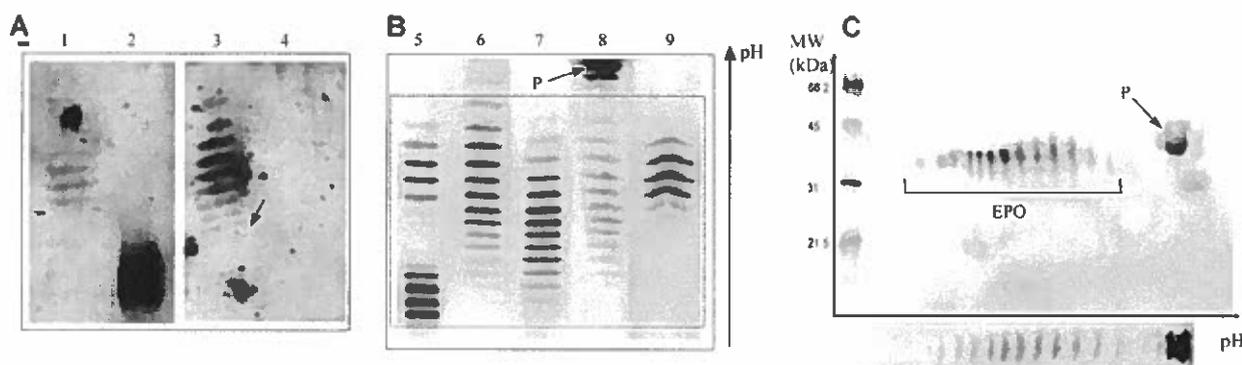


Figure 1. Epo profiles obtained by double-blotting. Panel A is reproduced from Beullens et al.^{1(Fig 1A)}, and panels B and C are results from our laboratory. (A) Lane 1 shows epoetin β ; lane 2, darbepoetin α ; lane 3, urine sample considered as “false positive” (the arrow shows a white hole corresponding to ineffective transfer of proteins in this area); and lane 4, the same sample as in lane 3 1 hour later. (B) Lane 5 shows a mixture of epoetin β and darbepoetin α ; lane 6, natural urinary Epo from a sample taken after strenuous exercise (note some shift toward the cathode of the banding pattern); lane 7, natural urinary Epo; lane 8, urine sample showing the protein (P) unrelated to Epo outside the window of integration (dotted box) used for interpretation of an antidoping control result; and lane 9, urine sample in case of epoetin administration (note the difference with the natural urinary Epo pattern even in the case of the post-strenuous exercise sample). (C) Two-dimensional electrophoresis of a urine sample showing both Epo and protein P.

was not performed. Did the authors fail to obtain an image of natural urinary Epo for comparison with their “interfering protein”? The SDS electrophoresis results are entirely misinterpreted due to the very different conditions chosen for preparation of the same urine sample before SDS (10-fold concentration) and IEF (200-fold concentration). Under such distorted conditions, the absence of a band corresponding to the molecular weight of Epo (39 kDa) in SDS electrophoresis cannot, in any account, be considered as a proof that there was no EPO in the sample submitted to IEF. The only band detected (42 kDa) by SDS has been incorrectly related to the bands detected by IEF. Why isn't a 2-dimensional electrophoresis shown to demonstrate such an assertion? In fact, the bands shown in the IEF figure cannot be detected in the SDS experiment due to the insufficient concentrating step. From our experience, the 42-kDa band corresponds to a protein very often present in urine in high concentrations after strenuous exercise and detected by the AE7A5 antibody used for immunoblotting. This protein is known not to interfere with the Epo pattern of an antidoping control due to a more basic isoelectric point (pI). It is unfortunate that the IEF image shown in this article has been cut just below the area corresponding to this protein. The subsequent investigations of deglycosylation were very interesting and corroborate our results about this 42-kDa protein. It is unfortunate that they were arbitrarily attributed to the bands shown by IEF.

In summary, the IEF pattern shown by Beullens et al has been interpreted as unrelated to Epo, whereas it corresponded to a bad-quality

image (such a result would have been categorically rejected from any interpretation in antidoping control) of a well-known Epo pattern observed after particular conditions of strenuous exercise. The figure enables one to compare the IEF results of Beullens et al¹ with well-identified Epo patterns as observed in our laboratory from several hundreds of samples. A 2-dimensional electrophoresis has been introduced to support our statements.

It is disappointing that such poor-quality experiments and misinterpreted results led the authors to believe that the validity of the Epo antidoping test could be questioned.

Françoise Lasne

Correspondence: Laboratoire National de Dépistage du Dopage, 143, avenue Roger Salengro, Châtenay-Malabry, 92290, France; e-mail: f.lasne@lndd.com.

References

1. Beullens M, Delanghe JR, Bollen M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood*. 2006;107:4711-4713.
2. Lasne F. Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods*. 2001;253:125-131.
3. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem*. 2002;311:119-126.

Response:

False-positive detection of rhEpo remains a real concern

Epo test results are clearly not always interpreted identically by all WADA-accredited laboratories. For example, the athlete we examined was initially found guilty of rhEpo abuse by 2 WADA-accredited laboratories. During the ensuing appeal procedure, it was disclosed by a third WADA-accredited laboratory that the original data leading to the suspension of this athlete had been interpreted wrongly by the former 2 WADA laboratories, and that the tests were actually negative for rhEPO.

According to the official WADA identification criteria for rhEPO (Figure 1A), the third lane of our IEF immunoblot² is

positive for rhEpo, and the fourth lane is negative (Figure 1B). We disagree with the interpretation of these data according to other ad-hoc “WADA rules.” Strikingly, lane 6 of Dr Lasne's figure is presented as endogenous Epo but should be interpreted according to the official WADA criteria as rhEpo (Figure 1C). As for the required controls, our IEF data show a negative urine sample as well as samples of purified rhEpo, which served as positive controls (Figure 1B).³ We are surprised by the criticism that we did not detect endogenous Epo, since a WADA report indicates that up to 20% of the analyzed specimens do not contain endogenous Epo.³

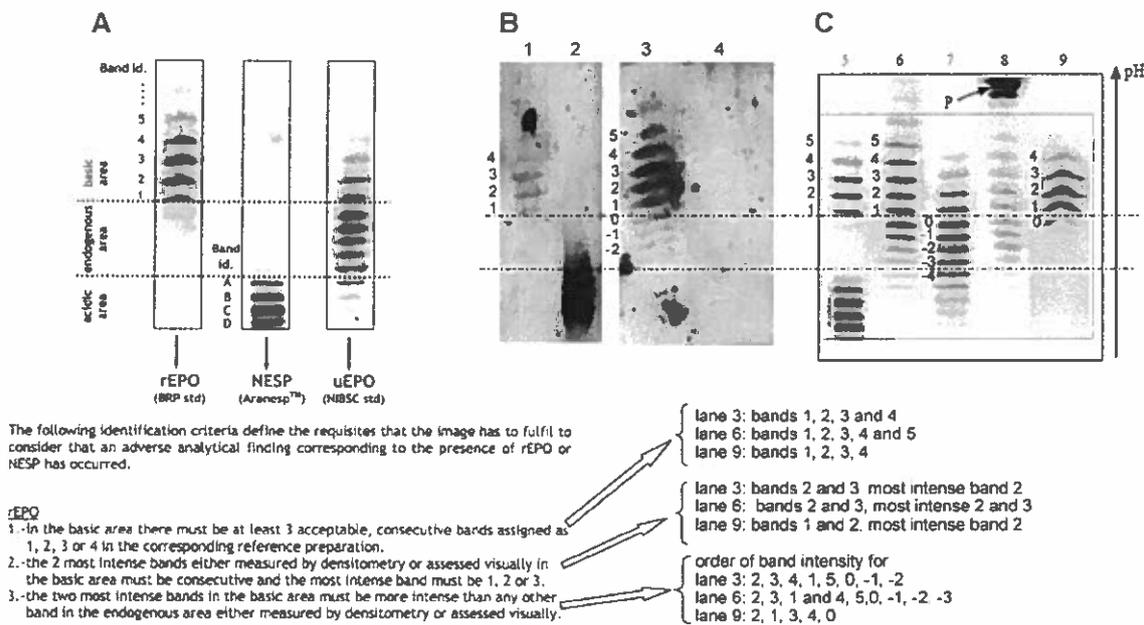


Figure 1. Epo profiles obtained by double immunoblotting. (A) Acceptance criteria for rEpo, as defined by WADA.¹ (B) Figure 1A from Beullens et al.² Lane 1, epoetin β ; lane 2, darbepoietin α ; lane 3, "false-positive" urine sample collected immediately after exercise; lane 4, negative urine sample collected 1 hour after the sample in lane 3. (C) Figure 1 from Lasne. Lane 5, mixture of epoetin β and darbepoietin α ; lane 6, urine sample after strenuous exercise; lane 7, natural urinary Epo; lane 8, urine sample showing protein P, unrelated to Epo; lane 9, urine sample in case of epoetin administration. Bands in panels B and C are numbered according to the criteria defined in panel A. Using the acceptance criteria of panel A, lanes 3 (panel B), 6, and 9 (panel C) should be considered as an adverse analytical finding corresponding to the presence of rhEpo.

The background staining in Figure 1B does not interfere with the application of the Epo identification criteria and, hence, we do not understand why our data should be rejected because they are "poor-quality images." As a recent *Nature* editorial puts it: "Slightly dirty images reflect the real world."⁴(p892) A WADA report furthermore acknowledges that protein-rich samples cause background staining.³

We have used the term "false positive" according to the current terminology in diagnostic medicine in the sense of a type I error (ie, when a test incorrectly reports that it has found a positive result when none really exists). The same terminology has been used in a WADA report.³ Lasne argues that our "false-positive" result stems from endogenous Epo that under particular conditions of strenuous exercise migrates more basally. This is a speculation not supported by any evidence. In fact, a WADA-supported study concluded that strenuous exercise does not affect the Epo pattern in such a way as to require changes in the identification criteria.⁵ Lasne apparently did not understand the problem generated by the detection of urinary "rhEpo" immediately after exercise but not in a sample that was obtained 1 hour later (Figure 1B). As the half-life of Epo is about 8 hours, this indicates that the detected signals at 0 hours are not derived from Epo itself.

We believe that the lack of specificity of the anti-Epo antibody (clone AE7A5) lies at the heart of the false-positive detection of rhEpo. This issue has also been raised by Khan et al.⁶ and is not unexpected since this antibody is sold for research use only. We note that Lasne is the first WADA-supported investigator admitting to the nonspecificity of this antibody. It is very surprising that this cross-reactivity has not been noted in the thousands of Epo tests that have been performed so far. Lasne claims that this lack of specificity does not interfere with the Epo test because the interfering signals are from "a" protein that migrates more basally than the Epo isoforms. However, Figure 2 of our study² shows that the AE7A5 antibody binds to multiple polypeptides during immu-

noblotting, even at much lower protein concentrations than those used for the Epo test. It is incorrect that this cross-reactivity is only detected after SDS-PAGE. Lane 8 of Lasne's figure proves that this also applies to IEF. Lasne's claim that we attributed the false-positive rhEpo-signals to the 42-kDa cross-reacting band is also incorrect. Any cross-reacting protein(s) can be responsible for this.

We firmly maintain our conclusion that, in the examined athlete, strenuous exercise did result in the false-positive detection of rhEpo. The diagnostic use of an antibody that is not monospecific and the evident use of ad-hoc interpretation criteria by the WADA-accredited laboratories are worrisome and difficult to reconcile with the claim that the rhEpo test is infallible.

Monique Beullens, Joris R. Delanghe, and Mathieu Bollen

Correspondence: Mathieu Bollen, Division of Biochemistry, Department of Molecular Cell Biology, Faculty of Medicine, Catholic University of Leuven, B-3000 Leuven, Belgium; mathieu.bollen@med.kuleuven.be.

References

1. WADA Technical document-TD2004EPO. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/a3_2002_results.pdf. Accessed March 6, 2006.
2. Beullens M, Delanghe J, Bollen M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood*. 2006; 107:4711-4713.
3. Peltre G, Thormann W. Evaluation report of the urine epo test. Paris and Bern: Council of the World Anti-Doping agency (WADA), March 11, 2003. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/ttd2004epo_en.pdf. Accessed March 6, 2006.
4. Not picture-perfect [editorial]. *Nature*. 2006;439:891-892.
5. Council of the World Anti-Doping agency (WADA). The effects of factors such as exercise and disease on the distribution of urinary erythropoietin isoforms. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/a3_2002_results.pdf. Accessed March 6, 2006.
6. Khan A, Grinyer J, Truong ST, Breen EJ, Packer, NH. New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 2005;358:119-130.



Letter to the Editor

New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis

Dear editor,

Two-dimensional gel electrophoresis (2D) of urine samples prepared by acetonitrile precipitation is presented by the authors as a reliable method to detect the presence of recombinant EPO in urine [1]. Many references are made to the current one-dimensional (1D) IEF based urinary EPO test used in anti-doping control and imply that this latter method may be unreliable. On the assumption that the same monoclonal anti-EPO antibody (AE7A5) was used in the 2 methods, it is speculated that the non-specific binding observed in the 2D method may affect the results of the 1D method.

It is very surprising that the authors, who have not tested the 1D method, have extrapolated some problems observed with *their* method to another one without showing any comparative results to support their statements. Yet it is well known that the specificity of antibodies may be heavily affected by the experimental conditions. In particular, the denaturation of proteins both by the treatment of urine (precipitation, reduction-alkylation before isoelectric focusing) and the SDS electrophoresis, as performed in the 2D method, exposes buried domains that may then react unspecifically with antibodies. Whatever the causes for non-specific binding in the 2D method, the specificity of the AE7A5 antibody has been, of course, thoroughly investigated in the 1D system. As demonstrated by the total absence of any bands in the window used for interpretation of the isoelectric profiles, in the case of samples devoid of EPO, no cross reaction occurs. The intensity of the image inside this window is always consistent with the EPO level in the retentate applied onto the IEF gel. Since the ELISA used for quantitative estimation of EPO in retentates involves a capture antibody and a detecting antibody that are both different from the AE7A5 used for blotting, the isoforms used for the interpretation of a result are identified as EPO by three different antibodies. The only signal not related to EPO (and not detected by ELISA) appearing with some retentates is observed outside the window and cannot interfere with the result of the analysis. Unlike the results of the 2D method, no interference with α -1-anti-chymotrypsin, α -2-thiol proteinase

inhibitor, α -2-HS glycoprotein precursor, the pI of which overlap with the pI of rHuEPO (which is not the case of Tamm-Horsfall glycoprotein), actually occurs in the 1D method (Fig. 1). High concentrations of these proteins largely exceeding their usual levels in urine don't give rise to any bands. In conclusion, the 2D method does not highlight any issue in relation to the 1D method used for anti-doping controls, and in particular, does not show any antibody specificity issue. It is regrettable that an article creating a false impression on the 1D method based on erroneous extrapolation was published without due scientific considerations.

References

- [1] Khan A, Grinyer J, Truong ST, Breen EJ, Packer NH. New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2005;358:119–30.

Olivier Paul Rabin*

The World Anti-Doping Agency Montreal, Quebec, Canada
E-mail address: olivier.rabin@wada-ama.org.

* Corresponding author.

Francoise Lasne
Laboratoire National de Depistage du Dopage,
Chatenay-Malabry, France

Jose A. Pascual
Pharmacology Research Unit,
Municipal Institute of Medical Research,
Barcelona, Spain

Martial Saugy
Laboratory for Doping Analysis, Lausanne, Switzerland

Frans J. Delbeke
Peter Van Eenoo
Doping Control Laboratory, Ghent University,
Ghent, Belgium

18 February 2006

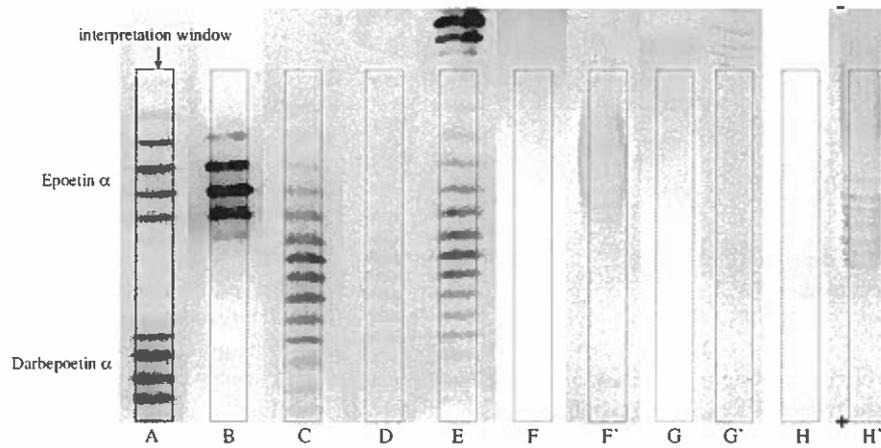


Fig. 1. Isoelectric banding patterns of EPO obtained by the 1D method used in anti-doping controls. (A) mixture of recombinant EPO Epoetin α and Darbepoetin α , (B) urine sample positive for the presence of Epoetin α (800 IU/l in the retentate), (C) and (D) urine samples negative for the presence of recombinant EPO and presenting typical patterns of natural urinary EPO (800 and 144 IU/l in the respective retentates), (E) urine sample giving rise to an additional signal unrelated to EPO outside the interpretation window, (F) α -2-HS glycoprotein precursor, (G) α -2-thiol proteinase inhibitor, (H) α -1-anti-chymotrypsin. These proteins were analysed by the 1D method at concentrations of 0.5 g/l. Their IEF patterns obtained by protein staining without immunodetection are shown in F', G' and H' respectively.