



Réseau info

Piloté par
le Laboratoire
de la santé
des végétaux

des laboratoires agréés

Bulletin de liaison des laboratoires agréés

Septembre 2011 / numéro 2

1. Compte rendu
de la Réunion
de restitution
des Essais inter-
laboratoires d'aptitude
(EILA) 2010 en santé
des végétaux
- Maisons-Alfort,
9 juin 2010

[Page 1](#)

2. Table ronde

[Page 10](#)

3. Actualités

[Page 11](#)

4. Agenda

[Page 11](#)

5. Dates des EILA
(Essais
inter-laboratoires)
2011-2012

[Page 12](#)

1. COMPTE RENDU DE LA RÉUNION DE RESTITUTION DES ESSAIS INTER-LABORATOIRES D'APTITUDE (EILA) 2010 EN SANTÉ DES VÉGÉTAUX - Maisons-Alfort, 9 juin 2010

Le Laboratoire de la santé des végétaux a organisé le 9 juin 2011 au siège de l'Anses à Maisons-Alfort, une réunion de bilan 2010 et de programmation (2011-2012) des EILA (Essais inter-laboratoires d'aptitude) pour le réseau des laboratoires agréés dans le domaine de la détection des organismes nuisibles aux végétaux. Cette réunion était la première depuis l'intégration du Laboratoire de la santé des végétaux à l'Anses le 1^{er} janvier dernier. Les représentants des laboratoires agréés avaient la possibilité de participer à la réunion de réflexion concernant la création d'un réseau de laboratoires en santé des végétaux/l'épidémiosurveillance organisée le lendemain au même endroit.

Résumé

Durant la matinée, la restitution des résultats obtenus aux différents EILA organisés au cours de l'année 2010 a été présentée par les responsables des unités de référence du Laboratoire de la santé des végétaux, respectivement, pour la bactériologie, la virologie, la nématologie, l'entomologie et les organismes et ravageurs tropicaux.

L'après-midi a été consacrée plus particulièrement à un échange entre les laboratoires agréés, le représentant du Bureau des semences et de la santé des végétaux – (DGAL-BSSV) (Olivier Dufour), le représentant du bureau des laboratoires et des contrôles (DGAL-BLACCO) (Denis Lucas) et les représentants de la délégation à la qualité de l'Anses, du groupe de concertation EILA en santé animale et des laboratoires de référence en santé des végétaux de l'Anses. Denis Lucas a annoncé la révision prochaine du dispositif d'agrément des laboratoires en santé des végétaux par la suppression probable des agréments génériques (ou chapeau) au profit d'agrément par méthode d'analyse.

La rationalisation de la charge de travail que constituent les EILA a également été discutée. Il est envisagé une réduction de leur fréquence avec une approche « technique/matrice » plutôt que « technique/organisme nuisible ».

Restitution des résultats des EILA programmés en 2010

Après l'ouverture de la séance par Françoise Poliakoff, chef d'unité développement de méthodes et analyses du Laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses, et un tour de table pour la présentation des participants (nombre : 42) et

des laboratoires représentés (nombre : 16), la restitution des résultats obtenus aux différents EILA programmés en 2010 a été présentée par les responsables des unités de référence cités ci-après.

Les critères d'évaluation des laboratoires dans le cadre des EILA sont définis ainsi :

- nombre d'accords positifs (PA), d'accords négatifs (NA), de déviations positives (PD) et de déviations négatives (ND) ;
- sensibilité (SE) : somme PA/N+ (*N+ : nombre de vrais positifs*) ;
- spécificité (SP) : somme NA/N- (*N- : nombre de vrais négatifs*) ;
- exactitude : (SE+SP)/2 ;
- répétabilité : (somme des accords/N) X 100, (*N : nombre d'échantillons analysés en double*) ;
- reproductibilité : (somme des accords positifs sur la série d'échantillons analysés dans les laboratoires + somme des accords négatifs/N) X 100, (*N : nombre total d'échantillons identiques analysés par les laboratoires*) ;
- faux positif : échantillon non contaminé détecté positif ;
- faux négatif : échantillon contaminé non détecté positif.

Angers

LNR Bactériologie

Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (*cmm*) sur semences de tomate par immunofluorescence – Méthode officielle française BL/06/01 Juin 2010 – 5 laboratoires participants

La difficulté réside dans l'obtention de semences contaminées en quantité suffisante pour permettre de fournir des échantillons homogènes. Aussi, le LNR a pris le parti de fournir des lames comportant des extraits fixés de semences artificiellement contaminés ou non afin d'évaluer la capacité des laboratoires à mener l'étape clé de la lecture/interprétation. Pour le prochain EILA, le nombre de lames sera réduit à la demande des participants. L'organisatrice de l'EILA reconnaît que celui-ci a été particulièrement difficile au niveau de la lecture car les extraits utilisés comportaient une flore saprophytique riche dans lesquels ont été ajoutées des bactéries non-cibles mais croisant avec l'antisérum. Ce cumul se rencontre rarement sur échantillons naturels.

De plus, lors du dénombrement des bactéries, un laboratoire a surestimé la concentration attendue, ce qui a impacté sérieusement les taux de sensibilité des opérateurs, et a conduit à considérer le résultat comme un « désaccord ». Cela signifie que le lecteur a dénombré des bactéries saprophytes sans faire la différence avec la bactérie cible. La reconnaissance des *cmm* est un élément clé dans la détermination du résultat, notamment en l'absence de méthode de confirmation avec une autre technique.

Un laboratoire tend à considérer que l'immunofluorescence est une technique facile, plus facile que la PCR. D'autres laboratoires qui pratiquent l'immunofluorescence depuis

de nombreuses années sur les végétaux ne sont pas de cet avis et notamment sur semences. En effet selon le type de semences, leur origine ou le traitement qu'elles ont subi, la lecture des lames sous microscope peut s'avérer difficile en raison de la présence de bactéries saprophytes pouvant fluorescer et présenter une morphologie proche de la bactérie cible (défaut de spécificité des antiséras polyclonaux disponibles). Dans la méthode de référence, un second antisérum doit être utilisé mais ce n'était pas demandé lors de l'EILA. L'utilisation d'antiséras monoclonaux n'étant pas souhaitée (perte de sensibilité), **l'expérience des opérateurs à la reconnaissance des bactéries cibles est actuellement le seul moyen permettant d'éliminer la plupart des réactions croisées.**

Le LNR travaille à la mise au point d'une méthode de confirmation par PCR qui malheureusement ne sera probablement pas disponible avant 2012-2013, compte tenu des difficultés techniques rencontrées.

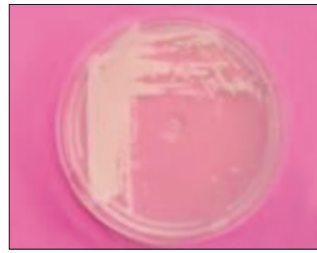


Symptômes de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

Valérie Olivier

Détection d'*Erwinia amylovora* par isolement – Méthode officielle française BL/05/07
Septembre 2010 – 4 laboratoires participants

Tous les résultats des laboratoires étaient conformes à ceux attendus mais des différences ont été observées pour des échantillons faiblement contaminés atteignant la limite de détection de la méthode. L'utilisation d'un milieu supplémentaire (milieu Levane) au milieu King B a augmenté le nombre des bactéries isolées sur des échantillons faiblement contaminés et permis de dépasser la limite de détection de la méthode par isolement pour le laboratoire qui l'a testé.



Culture en boîte de pétri d'*Erwinia amylovora*.

Détection des bactéries *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* et *Ralstonia solanacearum* sur tubercules de pomme de terre par immunofluorescence (IF) et PCR
Directives européennes 2006/56 CE et 2006/63 CE

Septembre 2010 – 10 laboratoires participants dont le laboratoire de quarantaine de Bucarest

La plupart des résultats obtenus par les laboratoires sont conformes à ceux attendus; les meilleurs résultats ont été obtenus dans les laboratoires utilisant les deux techniques: PCR et immunofluorescence.

Les résultats de PCR sont globalement meilleurs que ceux d'IF (100 % de sensibilité pour *Ralstonia solanacearum* avec la PCR).

Les résultats d'IF pour les laboratoires où une seule technique a été utilisée sont moins bons (réactions croisées, défauts d'interprétation, problèmes de frottis) que pour les laboratoires où les deux techniques ont été appliquées.

En conclusion, il est vivement conseillé d'utiliser les deux techniques.



Ralstonia solanacearum sur pomme de terre.

Angers

LNR Virologie

Détection des phytoplasmes de la flavescence dorée et du bois noir sur vigne par PCR
Méthode officielle française MOA 006 PCR multiplex gigogne (Clair *et al.*, 2003);
MOA 006 partie B PCR triplex en temps réel (Pelletier *et al.*, 2009)

Avril 2010 – 7 laboratoires participants

En ce qui concerne la détection du phytoplasme responsable de la **flavescence dorée par PCR**, la majorité des laboratoires est apte par rapport à l'ensemble des critères évalués. Un laboratoire a rencontré un problème de sensibilité, qu'il a identifié au cours de l'essai et corrigé en utilisant un lot d'amorces conforme. Un autre laboratoire est invité à rechercher les causes du manque de sensibilité.

En ce qui concerne la détection du phytoplasme responsable de la maladie du **bois noir par PCR**, l'ensemble des laboratoires est apte par rapport à l'ensemble des critères évalués.

Un laboratoire attire l'attention sur le fait que le cépage de vigne utilisé comme témoin sain est différent selon les laboratoires ce qui pourrait expliquer des variations de la courbe du témoin sain (effet « témoin sain »). L'organisatrice souligne que ce phénomène n'a pas encore été observé. Dans la mise en application de la partie B de méthode officielle MOA 006 qui concerne la PCR en

temps réel, le rôle de cette technique est de mettre en évidence de possibles problèmes de qualité de l'extrait de l'ADN avec le contrôle (ou témoin sain) vigne (quantité insuffisante, inhibition...). Or les résultats d'analyses n'ont jamais permis de souligner un problème lié au cépage et ce depuis les 4 campagnes que le Laboratoire de la santé des végétaux utilise la méthode. Le choix des témoins sains pour le système de détection par PCR n'intervient pas dans l'interprétation du résultat comme dans un test de sérologie, où l'interprétation du résultat est liée à une valeur numérique assignée à celle du témoin sain (S).

Marianne Loiseau informe les laboratoires agréés qu'elle les mettra à contribution pour lui fournir des pétioles de vigne contaminés par la flavescence dorée afin d'avoir des « témoins positifs » pour le prochain EILA « Détection des phytoplasmes de la flavescence dorée ».

Marianne Loiseau

Détection du *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) par technique sérologique ELISA sur feuilles de tomate – Méthode officielle française VHs 01/03 version a

Mars 2011 – 7 laboratoires participants

Les points critiques qui ressortent des résultats obtenus par les laboratoires concernés ont **un manque de spécificité de la méthode ELISA, des problèmes de contamination croisée entre échantillons, ainsi qu'un manque de sensibilité lié aux échantillons insuffisamment contaminés donnant des résultats en « limite de détection » de la méthode ou « indéterminés »**.

Deux antisérums ont été utilisés lors de l'EILA: l'un de chez BIOREBA et l'autre de chez LCA. Ils ont donné des résultats variables. Dans le but de pouvoir confirmer des résultats d'échantillons faiblement contaminés se trouvant en limite de détection par cette technique, une évaluation des antisérums permettant la détection du TYLCV sera menée courant 2012 ainsi que l'évaluation de la technique de détection par biologie moléculaire.

Face au problème des résultats « indéterminés » et « faiblement positifs » les laboratoires sont mal à l'aise pour solliciter un nouvel échantillon auprès des SRAL afin de réaliser une nouvelle fois l'analyse. Olivier Dufour, du Bureau des semences et de la santé des végétaux (DGAL), rappelle que les laboratoires ne doivent pas hésiter à solliciter de nouveaux échantillons en cas de résultats « indéterminés ». Un laboratoire regrette que les résultats des échantillons soient jugés par rapport au seuil de détection de la méthode utilisée, alors qu'en condition naturelle, les échantillons symptomatiques ne sont pas si faiblement contaminés. Olivier Dufour souligne que les échantillons en provenance de pépinières sont asymptomatiques de même que les pieds-mères porteuses de greffons, leurs résultats d'analyse se situent à des niveaux de détection très bas car leur taux de contamination est faible.

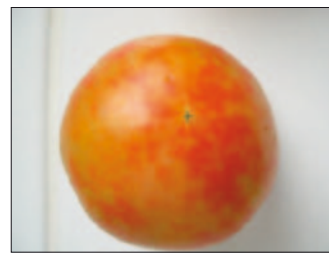
Détection du virus du Pépino (PepMV) sur semences de tomate Méthode officielle française VHS 04/06 version a

Octobre 2010 – 7 laboratoires participants

L'ensemble des laboratoires participants a atteint les critères de performance de la méthode définie dans le cadre de l'EILA PepMV d'octobre 2010. Toutefois, les échantillons fournis étaient constitués de macérats de semences préalablement préparés par le Laboratoire de la santé des végétaux. Pour le prochain EILA « détection du PepMV », il serait intéressant de travailler sur des échantillons de semences pour vérifier la capacité des laboratoires à mettre en œuvre l'opération de broyage.

Des travaux d'évaluation de sérum pour la détection du PepMV par DAS ELISA sont en cours. La méthode officielle

de type ELISA est en cours de révision, elle inclura une technique de confirmation par PCR.



Symptôme de PepMV sur fruit de tomate.

Xavier Tassus

Clermont-Ferrand

LNR Virologie

Détection du virus de la Sharka sur *Prunus* (*Plum Pox Virus*: PPV) par ELISA Méthode officielle française: VL/95/01/b et Dg ELISA 01/98/b

Juin 2010 – 15 laboratoires participants dont 4 étrangers

L'ensemble des laboratoires ont de bons résultats pour l'ensemble des critères cependant des résultats sont à améliorer en spécificité pour certains d'entre eux.

Le résultat est jugé critique pour le critère de sensibilité si celle-ci est inférieure à 80 %. Un laboratoire participant est concerné.

Le résultat est jugé critique pour le critère de spécificité si celle-ci est inférieure à 60 %. Un laboratoire participant est concerné. Il est jugé très critique si la spécificité est inférieure à 50 %, ce qui a concerné 5 laboratoires participants. Suite à une discussion-conseil, un laboratoire a reçu un nouveau lot d'échantillons avec « témoin sain » inclus. Les résultats concernant le critère de répétabilité sont jugés critiques si celle-ci est inférieure à 75 %, cela concerne deux laboratoires participants et le critère d'exactitude s'il est inférieur à < 70 %, ce qui est le cas pour 4 laboratoires participants.

Pour la réalisation de l'EILA PPV 2011, les améliorations apportées par l'organisateur au niveau de la préparation des échantillons sont les suivantes: les lots d'échantillons fabriqués seront testés pour leur statut sérologique avec en préalable des tests de vérification de l'homogénéité des densités optiques et de la stabilité de la charge virale dans le temps. L'envoi des échantillons est prévu semaine 25.

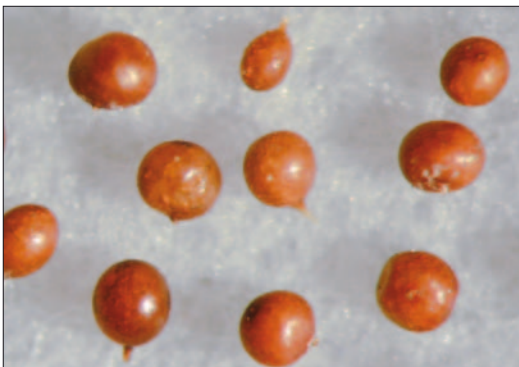


Virus de la sharka, *Plum Pox Virus* (PPV), sur indicateur pêcher.

Jean-Philippe Renvoisé

Détection de *Globodera* spp sur sol
Méthode officielle française NS 97/01 version b
Septembre 2010 – 9 laboratoires français participants et une quinzaine de laboratoires étrangers

À partir de différentes séries d'échantillons de sol artificiellement contaminés et suite à extraction et observation des kystes sous microscope, les laboratoires devaient fournir un résultat de dénombrement des kystes. Les résultats attendus sont analysés en tant que données qualitatives (détection ou non détection de kystes de *Globodera* dans les échantillons) et selon la concordance des résultats, la sensibilité, la spécificité, et l'exactitude relative ont été déterminées. L'analyse quantitative des données permet de déterminer le taux de détection des kystes dans les échantillons. La conformité des résultats obtenus par série est évaluée en utilisant les trois critères suivants: spécificité égale à 100 % et taux moyen de détection des kystes de *Globodera* dans les échantillons contaminés au moins égale à 60 %. Les résultats ont été déclarés conformes pour 9 séries sur 10.



Kystes de *Globodera* sp.

Laurent Ladeveze

Détection et identification de *Ditylenchus dipsaci* (D.d.)
Méthode officielle française MOA 13 partie B
Octobre 2010 – 7 laboratoires participants

Cinq critères sont pris en compte avec les seuils de conformité suivants: taux de détection de *D.d.* dans les échantillons contaminés au moins égal à 60 %, spécificité égale à 100 %, sensibilité égale à 100 % dans les échantillons contenant 10 nématodes de *D.d.*, sensibilité au moins égale à 75 % dans les échantillons contenant 5 *D.d.*, sensibilité au moins égale à 50 % dans les échantillons contenant 2 *D.d.* Les résultats ont été déclarés conformes pour 5 séries sur 8.

Les laboratoires soulignent la difficulté pour obtenir des échantillons positifs afin de s'exercer. Alain Buisson mentionne que l'on peut s'exercer sur des échantillons négatifs, les témoins positifs devant être conservés pour les analyses d'identification dans un premier temps. La production de témoins positifs sera mise en œuvre dès que possible pour approvisionner les laboratoires agréés.



Tête de *Ditylenchus dipsaci*.

Alain Buisson

Détection de *Meloidogyne* sp – Méthode officielle française NS/04/06 version a
Mars 2011 – 7 laboratoires participants

À partir d'échantillons constitués de pelures provenant de pommes de terre contaminées par *Meloidogyne arenaria* (*M.a.*) au Laboratoire de la santé des végétaux, soumis à une digestion enzymatique, les laboratoires déterminent le nombre de femelles de *M.a.* Pour chaque série d'échantillons transmis, les résultats obtenus étaient considérés conformes si le critère « exactitude » était égal à 100 %, c'est-à-dire, qu'aucun nématode de *Meloidogyne* sp. n'avait été détecté dans les 5 échantillons non contaminés (critère de spécificité égale à 100 %) et qu'au moins une femelle de *Meloidogyne* sp. avait été détectée dans chacun des échantillons contaminés (sensibilité égale à 100 %). Les résultats ont été déclarés conformes pour 5 séries sur 7.



Tranche de tubercules de pomme de terre avec femelles de *Meloidogyne* sp.

Alain Buisson

Nancy

Renaud loos

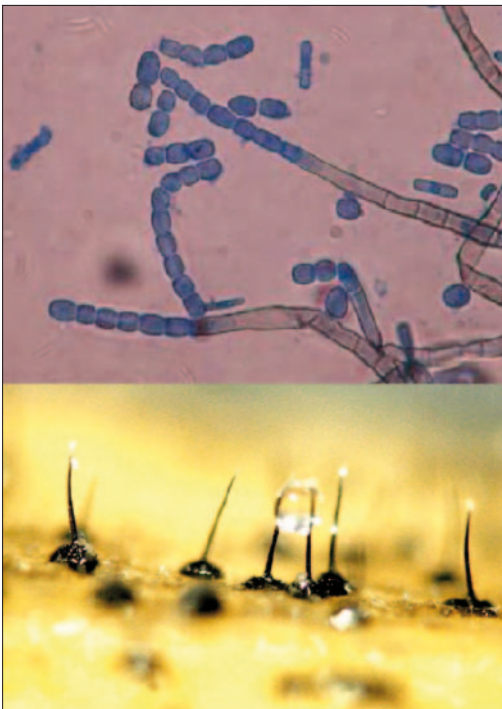
LNR Mycologie

Renaud loos a introduit la présentation des résultats d'EILA aux 5 méthodes officielles d'analyses par un descriptif rapide des maladies causées par les pathogènes concernés.

Méthodes morphométriques

Détection de *Ceratocystis platani* sur platane
Méthode officielle française MOA015
08/11/2010 au 04/02/2011
2 laboratoires participants

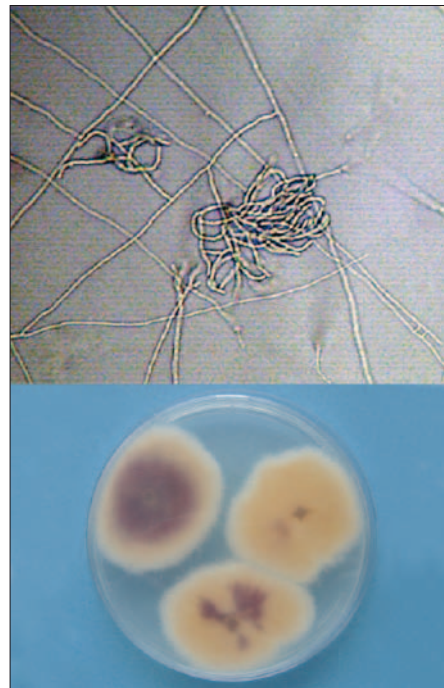
La méthode employée est une méthode qualitative consistant en un test de détection par piégeage biologique et observation des structures fongiques à la loupe binoculaire et au microscope. Une analyse critique des causes pour le laboratoire ayant délivré des résultats faux positifs ne parvient pas à mettre en évidence l'origine du problème de l'auto-contamination, d'où la décision de proposer une nouvelle formation par le Laboratoire de la santé des végétaux. À l'avenir, l'aptitude sera évaluée par des tests d'une série d'échantillons contenant une faible fréquence d'échantillons positifs.



Observation de structures microscopiques asexuées et sexuées qui sont diagnostiqués: réponse du type « présence/absence »

Détection de *Gibberella circinata* sur pins
Méthode officielle française MOA003C
22/09 au 19/11/2010
4 laboratoires participants

Les quatre laboratoires participants sont jugés aptes à générer des résultats fiables et répétables en suivant la méthode. Ils ont démontré leur aptitude à reconnaître spécifiquement les critères diagnostiques du champignon *Gibberella circinata* sur implants calibrés de culture fongique produite sur milieu de culture, prélevés à l'emporte-pièce. Un phénomène de mutation phénotypique a été observé lors de la préparation des échantillons. Il se traduit par un retard voire une absence de production d'hyphe circinés, critère diagnostic obligatoire. De ce fait, il a été demandé de renvoyer au Laboratoire de la santé des végétaux les cultures jugées négatives pour confirmation de l'absence d'hyphe.



Hyphe stériles circinés diagnostiques et culture sur PDA.

Méthodes moléculaires

Détection de *Gibberella circinata* sur semences pins Méthode officielle française MOA003B 29/09 au 06/12/2010 4 laboratoires participants

Les quatre laboratoires participants sont jugés aptes à générer des résultats fiables et répétables en suivant la méthode par PCR en temps réel et PCR conventionnelle au vu des critères de sensibilité, spécificité et répétabilité obtenus de 100 %. Les résultats ont également montré l'aptitude des laboratoires à extraire de l'ADN de bonne qualité.

Détection de *Chalara fraxinea* sur frêne Méthode officielle MOA001 04/11/2010 au 26/01/2011 4 laboratoires participants

Trois laboratoires participants sont jugés aptes à générer des résultats fiables et répétables en suivant la méthode par PCR en temps réel au vu des critères de sensibilité, spécificité, et répétabilité obtenus avec des taux de 100 %. Un laboratoire effectue une analyse critique des causes de sa non-conformité (résultats « indéterminés » au lieu de résultats « négatifs ») qui pourrait être liée à la qualité des réactifs ou aux critères de paramétrage du thermocycleur.



Symptômes typiques et conséquences d'attaque par *C. fraxinea*

Détection de *Plasmopara halstedii* sur semences tournesol Méthode officielle française - MHs/07/24 27/09 au 13/12/2010 4 laboratoires participants

Il est difficile de contaminer *in vivo* des graines de tournesol par *Plasmopara halstedii* et de produire des échantillons stables et homogènes. Pour l'essai, chaque échantillon est constitué de tissus végétatifs artificiellement contaminés par la cible du test PCR chez l'organisme cible. Celle-ci est stabilisée dans un plasmide bactérien qui peut être multiplié et calibré. Trois laboratoires participants sont jugés aptes à générer des résultats fiables et répétables en suivant la méthode de PCR conventionnelle. Celle-ci a été répétée deux fois avec cinq jours d'intervalle entre les deux essais. Un laboratoire a effectué une analyse critique des causes de sa non-conformité (risque de résultats faux positifs) et a obtenu 100 % de résultats conformes suite à un nouvel essai d'aptitude.



Attaque de *P. halstedii* sur cotylédons et capitules de tournesol

Montpellier

Jean-Claude Streito
LNR Entomologie

Détection de *Bemisia tabaci* et *Trialeurodes vaporariorum* par identification morphologique des pupariums 13/04 au 13/05/2011 – 4 laboratoires participants

L'EILA organisé pour la méthode officielle française MOA007 a été présenté. Il concernait :

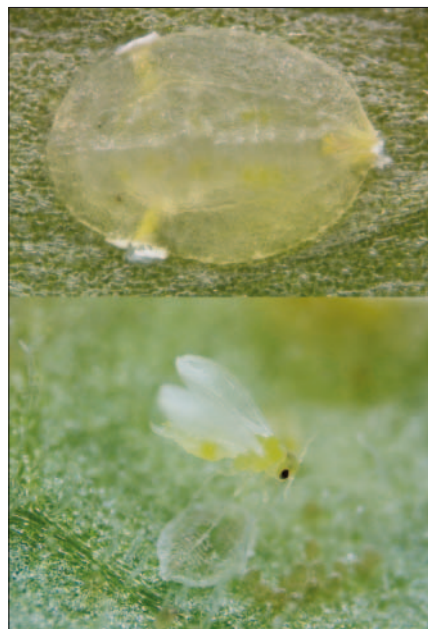
- partie A : identification d'aleurodes d'intérêt agronomique ;
- partie B : identification de *Bemisia tabaci* ;
- partie C : identification de *Trialeurodes vaporariorum*.

Il s'agissait du premier EILA en entomologie pour lequel les laboratoires recevaient leurs premiers échantillons longtemps après la formation (2010). Les résultats ont néanmoins été satisfaisants.

Pour *Bemisia tabaci*, l'EILA a été réussi. Pour *Trialeurodes vaporariorum*, un laboratoire a réalisé une mauvaise observation et eu un défaut de traçabilité, erreurs qu'il fut facile de rectifier pour celui-ci.

Il est prévu, une confirmation systématique des analyses déléguées en 2011 par photographies ou envoi des lames des laboratoires agréés au Laboratoire de la santé des végétaux.

Il est à noter un point faible pour cet EILA : l'insuffisance d'échantillons pour fournir des espèces vraiment proches (*Bemisia afer* et *Trialeurodes abutilonea*). La nécessité de voir de nombreuses espèces permet de bien comprendre les différents critères d'identification morphologiques et d'éviter les confusions entre espèces. Le laboratoire de la santé des végétaux est confronté au problème de la rareté des autres espèces d'aleurodes.



Bemisia tabaci
au stade larvaire

Aleurode

Réunion

Bruno Hostachy
LNR pour les ravageurs et parasites tropicaux

Autres points techniques

Les laboratoires souhaitent bénéficier de témoins sains qui soient équivalents pour l'ensemble des participants de manière à assurer l'homogénéité des résultats si les témoins de kit ne sont pas disponibles.

Les LNR tendent à développer de plus en plus des méthodes de confirmation à partir de techniques complémentaires aux méthodes de screening de première intention qui pourront soit être appliquées par le laboratoire agréé soit par le laboratoire de référence. Des indications à ce sujet seront reportées dans la prochaine mise à jour du tableau des analyses officielles de la DGAL.

Les laboratoires s'interrogent sur les exigences attendues en ce qui concerne la conception des protocoles utilisés lors des EILA et la nécessité de leur harmonisation, en particulier en ce qui concerne le critère de la sensibilité. Ils proposent :

- soit d'imposer une exigence du critère de sensibilité de 100 %, ce qui permet de répondre à l'objectif d'absence de résultats qui soient des faux positifs ;
- soit de pouvoir abaisser le critère de sensibilité, en utilisant des échantillons contaminés par l'agent pathogène cible dilué et en acceptant que le résultat soit indéterminé ou positif, ce qui permet de comparer la sensibilité entre les laboratoires.

Détection du *Banana bunchy top virus* (BBTV) – Méthode officielle française MOA 014

Novembre 2010 – 12 laboratoires (7 agréés, 3 fournisseurs d'antisera, 2 LNR)

Pour le BBTV, les résultats sont globalement très satisfaisants: 95 % d'exactitude, 0 % de faux positifs et au plus 9 % de faux négatifs.

90 % des laboratoires atteignent le niveau de performance attendu. Seul 1 laboratoire n'atteint pas ce niveau mais en est très proche (un résultat « indéterminé » de trop...).



Symptômes de *Banana bunchy top virus* sur bananier transmis par un puceron vecteur (*Pentalonia nigronervosa*).



Détection du *Cucumber mosaic virus* (CMV) – Méthode officielle française MOA009

Novembre 2010 - 19 laboratoires (7 agréés, 8 fournisseurs, 2 zone Océan indien, 2 LNR)

Les résultats sont globalement assez satisfaisants: 91 % d'exactitude et au plus 2 % de faux positifs et 16 % de faux négatifs. 58 % des laboratoires atteignent le niveau de performance attendu (dont 5 des 7 laboratoires agréés).

Pour les laboratoires n'atteignant pas le niveau de performance escompté, deux catégories:

- catégorie 1, $80\% \leq \text{exactitude} \leq 90\%$: la situation est peu problématique car des résultats indéterminés ont été comptabilisés de façon défavorable aux laboratoires. L'hypothèse de l'analyse trop tardive des échantillons dont la stabilité est imparfaite a été émise;
- catégorie 2, exactitude $< 80\%$: la situation est plus problématique et concerne des laboratoires déjà identifiés pour leur problème de détermination de TMc (témoin malade) qui permet de définir le seuil de positivité. Le problème de sensibilité est lié à des choix de lecture et de mode de calcul des seuils de positivité non adaptés (cela concerne les laboratoires étrangers).

Bruno Hostachy propose de fournir les témoins sains en cours d'année et non lors de l'EILA.

Pour le prochain EILA concernant la détection du *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) sur bananier, seront introduits des pseudo-troncs.

Pour la prochaine réunion de restitution des EILA, la station de la Réunion propose de modifier le programme des présentations en intégrant les EILA de la station aux thématiques par discipline.

La station de la Réunion envisage une demande d'accréditation en tant qu'organisateur d'EILA. Pour ce faire, les réclamations et les dysfonctionnements relatifs à l'organisation de l'EILA sont enregistrés et feront l'objet d'actions d'améliorations. Notamment pour:

- le BBTV, où la stabilité est imparfaite;
- le CMV, où l'homogénéité est imparfaite, d'autres modes de conservation et de conditionnement seront testés pour y palier.



Symptômes de *Cucumber mosaic virus* sur bananier.

2. TABLE RONDE

Les méthodes officielles

Vincent Héreau, adjoint au chef d'unité développement des méthodes et analyses du laboratoire de la santé des végétaux a présenté certains points critiques de la délégation des analyses officielles et les sujets de réflexion du Laboratoire de la santé des végétaux en vue de proposer une amélioration du dispositif :

- chronologie et cohérence actuelle entre agréments chapeau⁽¹⁾, « opérationnalité » des laboratoires agréés et accréditation de ceux-ci en lien avec la mise à jour des différentes listes des analyses officielles ;
- type de méthodes (générales ou spécifiques) et réflexions en cours qui y sont liées en matière d'accréditation ;
- programmation initiale des EILA, réflexion 2011 pour un allègement (rythme biannuel en phase de routine) et/ou regroupements (équivalence technique de différents EILA), (voir tableau de nouvelles propositions présenté par Françoise Poliakkoff).

La DGAL rappelle que les laboratoires agréés doivent réaliser les analyses officielles conformément aux méthodes officielles (article R. 202-17 du code rural et de la pêche maritime).

Un laboratoire a demandé s'il était possible d'extrapoler au domaine de la santé des végétaux le fonctionnement d'Afnor certification actuellement utilisé en microbiologie alimentaire⁽²⁾.

Le principe d'Afnor certification n'est pas réservé au domaine de la microbiologie alimentaire, mais à ce jour, les intervenants des autres domaines n'ont pas manifesté leur volonté de participer à un système de validation équivalent.

Françoise Poliakkoff fait part des discussions qui ont eu lieu avec Mme Florence Simonutti du Cofrac concernant la définition de portées d'accréditation plus adaptées aux problématiques du végétal. Le Cofrac a en projet de créer un groupe de travail visant la révision des programmes d'accréditation relatifs à la santé des végétaux. Il souhaite également travailler sur un guide technique d'accréditation pour la santé des végétaux à partir de septembre.

Périmètre de l'agrément pour les analyses officielles en santé des végétaux et exigences réglementaires en matière d'agrément : DGAL

Une réflexion est en cours à la DGAL pour supprimer les « agréments chapeau » au profit d'agrément plus précis, intégrant la technique, le type d'analyte et la matrice (octobre 2011). L'agrément chapeau, créé initialement pour éviter la multiplication des lignes d'agrément, liés à la multiplicité des pathogènes et des matrices dans le domaine végétal, ne permet pas de déterminer précisément les aptitudes à l'analyse des laboratoires. Il peut même être un élément bloquant pour de nouvelles délégations d'analyses.

La DGAL souhaite que les agréments des laboratoires correspondent à terme à la « liste des analyses officielles de détection d'organismes nuisibles réglementés, déléguées ou non déléguées ».

Cependant il n'y aura pas de modifications concernant les laboratoires déjà agréés pour des analyses déléguées.

En ce qui concerne la nématologie, un représentant des laboratoires agréés interroge les membres de la table ronde sur la possibilité de réaliser un agrément par matrice car la méthode d'extraction est identique.

Cette proposition ne semble pas répondre aux besoins des services déconcentrés du ministère en charge de l'agriculture, qui ont besoin de pouvoir identifier le laboratoire capable d'analyser tel ou tel pathogène dans telle ou telle matrice.

Planification des EILA

La DGAL rappelle que la participation aux EILA est obligatoire pour les laboratoires agréés. Par ailleurs, elle demande à ce que le planning des EILA puisse être harmonisé avec ceux des LNR des autres domaines et dans un objectif de rationalisation de la charge en EILA pour les laboratoires agréés, la DGAL demande également à ce que la fréquence des EILA soit, dans la mesure du possible, réduite et après avis des LNR concernés. Une autre question concerne la participation des laboratoires agréés à des EILA organisés par le BIPEA⁽³⁾ en plus de ceux organisés par le LNR. Il est répondu que la participation aux EILA du BIPEA ne dispense pas les laboratoires agréés de participer aux EILA organisés par le LNR.

Formations

Un représentant de laboratoire propose que le nombre de formations soit réduit car leur coût est une charge pour les laboratoires. La DGAL/SDQPV/BSSV rappelle la nécessité des formations pour acquérir les méthodes dans des conditions optimales et que le ministère en charge de l'agriculture a besoin d'être assuré de la parfaite maîtrise des analyses par les laboratoires. La fiabilité des résultats et la qualité de l'analyse réalisée pour les services officiels de contrôle, en dépendent.

Volumes d'analyses

La question est à nouveau posée, sur la possibilité de connaître à l'avance les volumes d'analyses qui seront demandés aux laboratoires. La SDQPV/BSSV répond que ce n'est pas toujours possible, notamment lors des contrôles réalisés dans le cadre des importations ou des exportations. Ces contrôles sont soumis aux variations de flux commerciaux, à la facilité de pouvoir ou non identifier la maladie à partir de l'observation directe des symptômes sur végétaux (cela dépend des conditions climatiques) et de l'incidence de la maladie ciblée. Dans certains cas concernant la délivrance du passeport phytosanitaire européen (PPE), les inspecteurs peuvent se

(1) Agréments chapeau : (agrément génériques recouvrant la possibilité pour un laboratoire de réaliser pour un type de technique donné (ex : analyses par ELISA) plusieurs analyses hôtes/pathogènes).

(2) Pour information, Afnor Certification a mis en place un système de validation des kits commerciaux pour assurer que les résultats obtenus avec ces kits sont équivalents aux résultats obtenus avec les méthodes normalisées. Afnor Certification comprend une Commission de Validation composée de représentants de toutes les parties intéressées (utilisateurs, laboratoires publics et privés, organisme d'accréditation des laboratoires, centre technique des industries concernées, agence de sécurité sanitaire..., pouvoirs publics et fabricants mondiaux de kits).

(3) Organisme qui organise des circuits d'essais d'aptitude dans les trois domaines suivants : céréalières et dérivés, agro-alimentaires, environnement et contaminants.



baser uniquement sur des observations de symptômes pour statuer sur l'état sanitaire du végétal. Par ailleurs, la DGAL rencontre des difficultés pour agréger les données relatives au nombre d'échantillons prélevés au niveau national alors que ces données sont connues au niveau régional.

Méthodes d'analyses

À la question du Laboratoire de la santé des végétaux quant aux possibilités de développement de méthodes d'analyses visant à cibler plusieurs organismes nuisibles (ex : PCR multiplexe, puce à ADN...) et à intégrer ces projets dans la programmation annuelle du laboratoire, le BLACCO a répondu que cela pouvait être envisagé uniquement pour des analyses de première intention. Les résultats positifs des échantillons devant être confirmés par des méthodes permettant de détecter un seul organisme nuisible.

Groupe de concertation

Cécile Beck du laboratoire de santé animale, animatrice du « groupe de concertation EILA en santé animale » était présente en qualité d'observatrice. Son objectif était d'identifier des thèmes communs entre les groupes « animal » et « végétal » et d'évaluer la possibilité de fusionner les deux groupes. Le groupe végétal ayant ses spécificités, il n'y aurait pas lieu de regrouper ces deux thématiques. Néanmoins, il serait intéressant d'organiser une réunion préparatoire entre les animateurs des deux groupes, un représentant de la DGAL et un délégué à la qualité afin d'harmoniser en amont les thématiques abordées aux deux réunions de concertation animale et végétale (ex : planning, communications avec la DGAL...).

Jean-Christophe Hernandez a présenté l'Adilva, association des directeurs de laboratoires départementaux publics d'analyses (au nombre de 138). L'association a un référent désigné pour chaque EILA en santé animale qui prend contact avec l'organisateur de l'EILA afin de s'assurer de son bon déroulement. Un autre représentant de l'ADILVA synthétise les difficultés rencontrées et participe à la réunion de concertation EILA en santé animale. À cette réunion, les représentants des fournisseurs de réactifs sont aussi invités.

En ce qui concerne la santé des végétaux, il n'est pas nécessaire d'avoir un référent par EILA car le nombre de laboratoires est restreint. Ce système n'améliorerait pas l'efficacité et la réactivité.

Diagnostic

Un tour de table des laboratoires au sujet du diagnostic, met en évidence que certains d'entre eux développent des activités d'analyses « niches » dans le domaine de la forêt par exemple, pour compenser le chiffre d'affaires non atteint avec le seul volume d'activité lié aux analyses officielles. D'autres laboratoires ne font pas la démarche d'aller chercher des clients mais développent progressivement un rôle de conseil, rôle qu'avaient les laboratoires d'État auparavant.

Programmation des EILA pour 2011-2012 : Françoise Poliakoff

Un nouveau programme vous est proposé tenant compte des propositions de programmation d'EILA par les différents LNR, de la nécessité d'alléger le programme global en santé des végétaux et d'adopter un rythme bi-annuel en routine.

3. ACTUALITÉ

Depuis le 1^{er} septembre, Françoise Poliakoff a quitté ses fonctions de responsable de l'unité Développement de méthodes et analyses pour être remplacée par Géraldine Anthoine. Françoise Poliakoff reste au Laboratoire de la santé des végétaux et devient responsable de l'unité « bactériologie-virologie-OGM » sur le site d'Angers.

4. AGENDA

Les 15 et 16 novembre 2011 une formation concernant la détection de *Globodera* spp. sera proposé sur le site de Rennes.

Directeur de publication : Marc Mortureux
Comité de rédaction : Pascale Parisot, Nathalie Franquet, Françoise Poliakoff, Renaud Ioos, Jean-Emmanuel Gerbault, Bruno Hostachy, Jean-Claude Streito, Laurent Ladeveze
Rédacteur en chef : Pascale Parisot / **Rédactrice en chef adjointe :** Nathalie Franquet
Secrétaire de rédaction : Valérie Molinero-Demilly
Responsable d'édition : Fabrice Coutureau / **Assistante d'édition :** Céline Leterq

Anses - www.anses.fr
27-31 avenue du général Leclerc - 94701 Maisons-Alfort Cedex
Courriel : lsv@anses.fr
Conception et réalisation : Parimage
Dépôt légal à parution/ISSN en cours

3. DATES DES EILA (ESSAIS INTER-LABORATOIRES) 2011-2012

Pathogènes	Établissement	2011												2012											
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Virus (<i>PepMV</i>) sur semences de tomate par ELISA	Angers																								
Virus (<i>BNYVV</i>), virus de la Rhizomanie sur plantes par ELISA																									
Virus (<i>TYLCV</i>) Tomato Yellow Leaf Curl par ELISA																									
Virus de la vigne par ELISA																									
Viroïde <i>PSTVd</i> par PCR temps réel	Angers																								
Phytoplasmes de la vigne : flavescence dorée, bois noir par PCR																									
<i>Ralstonia solanacearum</i> et <i>Clavibacter m. sepedonicus</i> sur pomme de terre - IF et PCR																									
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> sur semences de tomate par IF																									
<i>Erwinia amylovora</i> sur végétal symptomatique par isolement	Clermont-Ferrand																								
Virus de la Sharka (PPV) sur prunus par ELISA																									
Virus de la Tristeza (CTV) sur agrumes par ELISA	Montpellier																								
Identification de <i>Bemisia tabaci</i>																									
Lecture des pièges <i>Diabrotica</i> et identification	Nancy																								
<i>Plasmopara halstedii</i> par PCR sur semences de tournesol																									
<i>Ceratocystis platani</i> par analyse morphométrique par piégeage biologique																									
<i>Gibberella circinata</i> sur semences par qPCR																									
<i>Gibberella circinata</i> sur tissus végétatifs par isolement																									
<i>Monilinia fructicola</i> par PCR																									
<i>Phytophthora ramorum</i> par PCR																									
<i>Mycosphaerella dearnessii</i> + <i>Dothistroma pini</i> et <i>D. septosporum</i> par qPCR																									
<i>Mycosphaerella fijensis</i> par qPCR sur bananier																									
<i>Chalara fraxinea</i> par qPCR sur tissus végétatifs																									
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , détection par PCR temps réel	Rennes																								
<i>Globodera</i> sp, détection par observation morphologique																									
<i>Globodera pallida</i> et <i>rostochiensis</i> , identification par observation morphologiques et PCR																									
<i>Meloidogyne</i> sp, détection par PCR temps réel sur sol																									
<i>Ditylenchus dipsaci</i> , détection et identification sur végétal	Réunion																								
Virus du bananier CMV ou BBTB par ELISA																									
Virus du BBrMV sur bananier par PCR																									
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> sur anthurium																									