



# *Euro* **Reference**

*Les cahiers de la* **Référence**

**Cahier numéro 6**

Hiver 2012



## Éditorial

Avec ce premier numéro de 2012, *EuroReference* entre dans une phase nouvelle: trois numéros seront publiés cette année. En effet un numéro spécial consacré au bioterrorisme paraîtra à la fin du premier trimestre, en sus des deux numéros semestriels. Notre objectif est que par la suite, le journal devienne un trimestriel à partir de 2013.

Notre volonté de donner au journal une vocation européenne est réelle. Pour cela, la première étape sera d'élargir le comité de rédaction pour y accueillir des membres européens. De ce fait, l'anglais deviendra rapidement la langue d'échange pour le comité de rédaction. Les LR-UE seront systématiquement sollicités pour annoncer dans le journal, de façon volontaire bien sûr, en particulier les formations, EILA, workshops, qu'ils organisent et qui ont une vocation européenne.

En renforçant les échanges à l'intérieur de l'Union européenne tout en restant proche des préoccupations quotidiennes des laboratoires, nous espérons que cette démarche sera un succès.

### Le comité de rédaction

## Au sommaire



### Point de vue

Le rôle des laboratoires de référence de l'Union européenne lors d'une crise de sécurité alimentaire: l'expérience du LR-UE pour *Escherichia coli* lors de la récente épidémie d'*E. coli* O104:H4

Page 2



### Actualités

En France, naissance du Cnev: Centre national d'expertise sur les vecteurs des maladies humaines et animales

Page 6



### Focus sur un laboratoire

Le laboratoire de la santé des végétaux

Page 8



### Recherche pour la référence

Une nouvelle technique de typage moléculaire de la moisissure opportuniste *Aspergillus fumigatus*; application potentielle dans les couvoirs et les élevages avicoles

Page 13



### Méthodes

Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Page 16

Les méthodes de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) au moyen de peroxyde d'hydrogène sont-elles des alternatives au formaldéhyde ?

Page 19

Organisation d'essais interlaboratoires de validation à l'échelle européenne pour la détection de *Gibberella circinata* dans les semences de pins

Page 24



### Agenda

Organisation d'ateliers

Page 29

Formations

Page 30



## Point de vue

### Le rôle des laboratoires de référence de l'Union européenne lors d'une crise de sécurité alimentaire: l'expérience du LR-UE pour *Escherichia coli* lors de la récente épidémie d'*E. coli* O104:H4

A. Caprioli (1) (alfredo.caprioli@iss.it), S. Morabito (1), K. De Smet (2) \*

(1) Laboratoire de référence de l'UE pour l'*Escherichia coli*, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italie

(2) Commission européenne, Direction générale de la santé et des consommateurs (DG Sanco), 1049 Bruxelles, Belgique

A. Caprioli, S. Morabito, K. De Smet (2012). Le rôle des laboratoires de référence de l'Union

européenne lors d'une crise de sécurité alimentaire : l'expérience du LR-UE pour *Escherichia coli* lors de la récente épidémie d'*E. coli* O104:H4, EuroReference, N° 6, ER06-12P01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN2001.htm>



**Le LR-UE pour *Escherichia coli* a joué un rôle actif lors des récents foyers épidémiques d'*E. coli* O104:H4 survenus en Europe. Sur la base des activités menées au cours de l'année précédente, une méthode de détection de la souche épidémique dans les aliments a été rapidement mise au point et diffusée à l'ensemble du réseau de laboratoires nationaux de référence (LNR), accompagnée des matériaux de référence appropriés. Le LR-UE a également testé différents types d'échantillons et organisé une étude inter-laboratoires sur la détection des VTEC (*E. coli* producteurs de vérotoxines) dans les graines utilisées pour la production de germes. Pendant toute la durée de la crise, le LR-UE a fourni un soutien scientifique et technique constant à la DG SANCO. De surcroît, le LR-UE a participé à la mission d'inspection effectuée par l'Office alimentaire et vétérinaire (OAV) en Égypte et a pris part à plusieurs initiatives et groupes de travail instaurés par l'EFSA et/ou l'ECDC. L'expérience des foyers épidémiques d'*E. coli* O104:H4 a confirmé que les activités des laboratoires de référence de l'Union européenne peuvent apporter une contribution non négligeable à la préparation de la Commission européenne aux éventuelles crises de sécurité alimentaire.**

Les laboratoires de référence de l'Union européenne (LR-UE) sont instaurés et financés par la Direction générale de la santé et des consommateurs (DG Sanco) pour aider la Commission européenne (CE) à faire face à des risques spécifiques liés à l'alimentation humaine et animale ou à des maladies animales spécifiques, conformément au règlement (CE) n°882/2004 relatif aux contrôles officiels. Lorsqu'un LR-UE est instauré, les États membres (EM) doivent désigner leur propre laboratoire national de référence (LNR) relevant du même domaine de compétence, afin de créer un réseau de laboratoires de l'UE sur ce thème. Les tâches et fonctions des LR-UE et des LNR sont respectivement décrites en détail aux articles 32 et 33 du règlement (CE) n°882/2004. Dans la pratique, les LR-UE sont chargés de: (1) développer des méthodes d'analyse de référence; (2) coordonner l'application de ces méthodes par les LNR, notamment en organisant des essais d'aptitude; (3) coordonner le réseau des LNR en les informant des progrès dans le domaine, en leur fournissant des matériaux de référence et en organisant des cours de formation spécifique sur des méthodes d'analyse; et (4) apporter une assistance scientifique et technique à la Commission, en particulier à la DG SANCO et à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Les LNR sont pour leur part chargés d'assurer la collaboration avec leur LR-UE respectif, la coordination des activités des laboratoires impliqués dans les contrôles officiels

de leur propre pays, y compris l'organisation des essais d'aptitude, la diffusion des informations reçues du LR-UE, et l'assistance scientifique et technique à leurs autorités. Si tous les membres des réseaux s'acquittent de leurs tâches, les méthodes analytiques, les matériaux de référence, et les essais d'aptitude sont transmis par les LR-UE aux LNR, qui à leur tour les transmettent aux laboratoires locaux impliqués dans les contrôles officiels. L'objectif final de ces activités est qu'une quelconque denrée alimentaire produite ou importée dans un quelconque État membre de l'UE soit testée à l'aide des mêmes méthodes de pointe et avec des niveaux de maîtrise comparables. La valeur ajoutée de ces réseaux peut s'avérer particulièrement importante en cas de crise dans le domaine de la sécurité alimentaire affectant différents États membres: il est alors essentiel de pouvoir tester des aliments à l'aide de méthodes fiables, rapides et normalisées afin de fournir aux autorités compétentes les données nécessaires pour planifier des mesures de lutte adéquates et informer les consommateurs de manière appropriée.

La présente note a pour objet de décrire l'expérience du LR-UE pour *Escherichia coli* lors des récents foyers épidémiques d'*E. coli* O104:H4 survenus en Europe et d'examiner dans quelle mesure les activités effectuées aux cours des dernières années par notre réseau de laboratoires de référence pour *E. coli* ont aidé l'UE à se préparer à faire face à une telle crise.

\* Les points de vue ou positions exprimés dans ce texte sont ceux des auteurs et ne peuvent ni ne sauraient être considérés comme représentatifs du point de vue, de la position ou de la politique de la Commission européenne.



## Point de vue

### Le laboratoire de référence de l'UE pour *E. coli*

Les infections à VTEC (*E. coli* producteurs de vérotoxines) constituent un problème majeur de santé publique, parce qu'elles peuvent entraîner de graves maladies telles que la colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (SHU), et aussi en raison du nombre important de foyers se déclarant dans le monde entier (Caprioli *et al.*, 2005). En conséquence, les infections à VTEC ont été incluses dans la liste des zoonoses qui font l'objet d'une attention prioritaire dans les programmes de surveillance conformément aux dispositions de la directive 2003/99/CE; de plus, la CE a mis en place un laboratoire de référence de l'UE pour *Escherichia coli* producteur de vérotoxine en 2006.

Le LR-UE pour les VTEC est hébergé par l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) à Rome et ses caractéristiques et ses activités ont déjà été décrites dans ce Journal (Caprioli *et al.*, 2010). Le réseau des LNR coordonnés par le LR-UE pour les VTEC inclut tous les États membres de l'UE, ainsi que des laboratoires d'autres pays européens ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)).

### L'épidémie d'*E. coli* O104:H4 et ses sources possibles

Entre mai et juin 2011, une grave épidémie de diarrhée sanglante et de SHU associée à une infection à VTEC de sérotype inhabituel (*E. coli* O104:H4) s'est produite en Allemagne. De nombreux cas ont été rapportés dans d'autres pays européens, mais la plupart d'entre eux avaient contracté l'infection en voyageant en Allemagne. Le Centre européen de contrôle et de prévention des maladies (ECDC) faisait état de plus de 4000 cas, avec 786 cas de SHU et 46 décès ([http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvise/Pages/Epidemiological\\_Updates.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvise/Pages/Epidemiological_Updates.aspx)). Les premières études épidémiologiques mettaient en évidence la consommation de salades composées comme principal facteur de risque pour contracter l'infection, et les analyses microbiologiques préliminaires désignaient les concombres importés d'Espagne comme source possible. Toutefois, les analyses complémentaires ne confirmaient pas la présence de la souche épidémique dans les concombres. Début juin, d'autres études épidémiologiques ont révélé que la consommation de graines germées produites par un seul producteur allemand était à l'origine de l'épidémie. Mais toutes les études microbiologiques effectuées par les autorités allemandes sur les germes, sur les graines utilisées pour la germination et sur les structures des installations ne parvenaient pas à isoler la souche épidémique (Frank *et al.* 2011).

Le 24 juin, un foyer distinct dû à un isolat de VTEC O104:H4 similaire à la souche épidémique allemande a été signalé en France (Gault *et al.* 2011). L'épisode impliquait 16 patients adultes et aucun lien direct avec l'Allemagne n'était mis en évidence. Toutefois, les patients avaient participé à une fête d'école au cours de laquelle ils avaient mangé des graines germées crues cultivées au sein même de l'école par les enfants. Ce second foyer étayait fortement l'hypothèse selon laquelle les graines germées étaient à l'origine de l'épidémie. La seule espèce de germes cultivée à la fois par l'école française et par le producteur allemand était le fenugrec, et les analyses de traçabilité en amont coordonnées par l'EFSA ont montré que dans les deux cas les graines provenaient de la même exploitation agricole en Égypte (EFSA, 2011a).

### La souche *E. coli* responsable de ces foyers

La souche épidémique appartient au sérotype peu courant O104:H4 et, fait surprenant, ne possède pas le gène *eae*,

marqueur génétique du mécanisme d'adhésion à la muqueuse intestinale par le processus d'attachement-effacement, marqueur qui est présent dans les sérogroupes VTEC le plus souvent associés à des maladies humaines graves. Toutefois, le sérotype O104:H4 présente un mode d'adhésion caractéristique nommé adhésion entéroaggrégative, typique d'un autre groupe de souches *E. coli* diarrhéogènes (Scheutz. *et al.* 2011). Le séquençage du génome a confirmé que la souche épidémique est une souche d'*E. coli* entéroaggrégative (EAEC) qui a acquis un phage porteur de VT (Mellmann *et al.* 2011). Cette combinaison inhabituelle de gènes de virulence avait déjà été décrite dans une souche VTEC O111 isolée à partir d'un foyer de SHU (Morabito *et al.* 1998) et pourrait expliquer la forte virulence de VTEC O104:H4.

### Le rôle du laboratoire de référence de l'UE pour *E. coli*

Depuis 2007, le LR-UE coordonne l'élaboration d'une norme internationale sur la détection des VTEC dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux. La méthode est basée sur l'utilisation de la PCR en temps réel de cultures enrichies et vise à identifier les sérogroupes VTEC les plus impliqués dans les maladies humaines graves. Elle est sur le point d'être publiée en tant que spécification technique CEN ISO TDS 13136 appelée « Méthode horizontale pour la détection d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145 – Méthode qualitative » et est recommandée par l'EFSA pour la détection des VTEC non-O157 dans les échantillons de denrées alimentaires dans le cadre des programmes de surveillance (EFSA, 2009). La méthode cible aussi bien les gènes de virulence (*vtx1* et *vtx2*, et *eae*) que les gènes spécifiques de sérotype, et le LR-UE a organisé quatre séries d'essais d'aptitude sur son utilisation. Au total 31 LNR ont participé aux essais et ont reçu les souches témoins de référence. Les rapports sont disponibles sur le site Internet du LR-UE ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)).

La première étape de détection par PCR de la spécification CEN ISO TDS 13136 cible un gène *vtx2* qui est également présent dans la souche épidémique VTEC O104:H4. Par conséquent, lorsque l'épidémie s'est déclarée et qu'il est devenu urgent de rechercher des VTEC O104:H4 dans les denrées alimentaires, quasiment tous les LNR disposaient déjà d'une méthode appropriée pour contrôler les échantillons alimentaires et exclure la présence d'un quelconque type de VTEC. Toutefois, les étapes séquentielles prévues par la méthode n'ont pas pu être appliquées aux échantillons positifs pour *vtx*, puisque la souche épidémique VTEC O104:H4 ne contenait pas le gène *eae*, qui constitue la seconde cible de la méthode.

Grâce aux données de la littérature (Bugarel *et al.* 2010) et aux séquences ADN disponibles dans la banque de gènes, le LR-UE a mis au point un mode opératoire (SOP) pour la détection de la souche VTEC O104:H4 dans des échantillons d'aliments et pour le typage des souches isolées. Dans ce mode opératoire, les échantillons positifs pour *vtx* sont soumis à des PCR afin d'identifier les gènes associés aux antigènes O104 (*wzxO104*) et H4 (*fliCH4*). La méthode incluait également des protocoles détaillés pour l'isolement et la caractérisation complète de la souche VTEC O104:H4 à partir des échantillons identifiés positifs par la PCR. Une première version provisoire du SOP a été publiée sur le site internet du LR-UE le 27 mai, soit trois jours après l'annonce de la survenue de l'épidémie. La méthode



## Point de vue

a été évaluée le 1<sup>er</sup> juin, lorsqu'une souche épidémique VTEC O104:H4 de référence a été obtenue à l'Institut Robert Koch, et une seconde révision a été publiée le 2 juin, après un échange approfondi avec plusieurs LNR.

Au moyen de la souche de référence, le LR-UE a préparé et diffusé des échantillons d'ADN destinés à être utilisés comme témoins positifs dans les tests de biologie moléculaire pour la détection de la souche VTEC O104:H4. Entre le 3 juin et le 6 juin, ces préparations d'ADN de référence ont été envoyées aux LNR de 14 États membres de l'UE. Au cours des deux semaines suivantes, les échantillons ont été fournis à quatre autres LNR, à 19 autres laboratoires européens, et à cinq laboratoires en dehors de l'Europe. En outre, des scientifiques des LNR bulgare et polonais et de l'Université de Kafkas, en Turquie, se sont rendus dans le laboratoire de référence de l'UE pour les VTEC en juillet, afin d'y suivre une formation pratique sur les procédures analytiques.

La mise en cause des graines germées considérées comme source possible de l'épidémie a nécessité l'analyse des graines utilisées pour la production des germes destinés à être consommés crus. Étant donné que les essais sur les graines posent des problèmes techniques, le LR-UE a actualisé la SOP pour la détection des VTEC O104 en intégrant une annexe spécifiquement consacrée à ce sujet. La procédure actualisée a été publiée le 14 juin sur le site Internet du LR-UE. De surcroît, pour soutenir les LNR des États membres impliqués dans le RASFF (Système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux) des graines et pour harmoniser les procédures mises en œuvre dans les différents laboratoires, le LR-UE a organisé une étude inter-laboratoires sur la détection des VTEC dans les graines. L'étude, réalisée en juillet, a inclus huit laboratoires et les résultats sont disponibles sur le site Internet du LR-UE.

Pendant toute la durée de la crise, le laboratoire de référence de l'UE pour les VTEC a fourni une assistance scientifique et technique à la DG SANCO. En particulier, le LR-UE a pris part à un groupe de travail qui incluait également les unités C/3 et G/4 de la DG SANCO, les points de contact du SAPR (Système d'alerte précoce et de réaction), les points de contact du RASFF, et des représentants de l'ECDC, de l'EFSA, et du Bureau régional de l'OMS pour l'Europe. Les objectifs du groupe étaient de fournir une mise à jour régulière de la situation épidémiologique et des recherches dans les États membres et de discuter de tous les problèmes potentiels liés à l'épidémie. Le groupe s'est réuni régulièrement par audioconférences au cours de la période comprise entre le 26 mai et le 30 juin. Les scientifiques du LR-UE ont également participé aux initiatives et groupes de travail suivants instaurés par l'EFSA et/ou l'ECDC :

- préparation du rapport scientifique « Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables », consultable à l'adresse <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2274.pdf> ;
- le groupe de travail de l'EFSA mis en place pour coordonner la traçabilité en amont des graines impliquées dans l'épidémie. Le groupe de travail a produit le rapport technique « Tracing seeds [with a particular emphasis on fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*)] in relation to the O104:H4 Shiga toxin-producing *E. coli* 2011 Outbreak(s) » (EFSA, 2011a) ;

- l'évaluation conjointe EFSA/ECDC de l'épidémie VTEC O104, avec la préparation d'un document destiné à fournir une présentation générale et à servir de référence pour les mesures de gestion des risques, intitulé « STEC O104:H4 2011 Outbreaks in Europe: Taking Stock » (EFSA, 2011b) ;
- le groupe de travail « ad hoc » de l'EFSA mis en place pour émettre un avis scientifique sur « *The risk posed by Shiga toxin producing E. coli (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds* ». L'avis sera publié fin novembre 2011.

Le LR-UE a également participé à une mission d'inspection en Égypte effectuée par l'Office alimentaire et vétérinaire (OAV) pour réaliser l'exercice de traçabilité en amont des lots importés de graines de fenugrec et évaluer les systèmes de production en place, y compris les contrôles de laboratoire. La mission a été effectuée en août et le rapport est consultable à l'adresse : [http://ec.europa.eu/food/fvo/index\\_en.cfm?reptoshow=3](http://ec.europa.eu/food/fvo/index_en.cfm?reptoshow=3).

Enfin, le LR-UE a été chargé d'effectuer des essais de laboratoire sur des échantillons alimentaires et des cultures bactériennes venant d'Allemagne, et sur des échantillons de graines venant d'Égypte.

### Réflexions sur les événements

La souche épidémique VTEC O104:H4 a présenté une combinaison inhabituelle de gènes de virulence, lui conférant un degré élevé de virulence. Cela confirme que les recombinaisons au sein des bactéries entériques peuvent générer de nouveaux phénotypes qui, une fois introduits dans une population vulnérable, peuvent poser de graves problèmes de santé publique.

L'épisode a confirmé que la contamination de la chaîne alimentaire végétale par le VTEC peut déboucher sur de vastes foyers épidémiques majeurs.

Outre les coûts humains, cette épidémie a entraîné une baisse considérable de la confiance des consommateurs dans la consommation des légumes, d'où la baisse de la demande sur l'ensemble du marché des légumes, et des conflits commerciaux entre l'UE et des pays tiers tels que la Fédération de Russie et l'Égypte, respectivement pour l'exportation et l'importation de légumes.

Lorsque les foyers épidémiques sont apparus, et qu'il s'est avéré urgent de tester les aliments, le réseau des laboratoires de référence de l'UE pour l'*E. coli* disposait déjà d'une méthode de détection adaptée, éprouvée par plusieurs séries d'essais d'aptitude. La méthode a été rapidement modifiée en vue d'intégrer la spécificité de la souche VTEC O104:H4 et les matériaux de référence adéquats ont été diffusés aux LNR.

La capacité d'un réseau de laboratoires à déployer une réponse rapide et efficace en cas d'urgence dépend largement des activités menées en amont, notamment en matière d'échange de méthodes et de matériaux de référence et de participation aux études inter-laboratoires.

Les laboratoires de référence de l'UE, de par leurs activités, peuvent jouer un rôle important dans la préparation de la Commission européenne à faire face à des crises de sécurité alimentaire.



## Point de vue

### Références bibliographiques

- [1] Bugarel M., Beutin L., Martin A., Gill A., Fach P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol.*, 142: 318-29.
- [2] Caprioli A., Morabito S., Brugère H., Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.*, 36: 289-311.
- [3] Caprioli A., Morabito S., Scavia G., Tozzoli R., Graziani C., Ferreri C., Minelli F., Marziano M.L., Babbs S. 2010. The European Union Reference Laboratory for Verocytotoxin (VT)-producing *Escherichia coli* (VTEC), hosted by the Istituto Superiore di Sanità, Rome. *EuroReference*, No. 4, ER04-10F01, <http://www.anses.fr/euroreference/numero4/PN40I0.htm>
- [4] European Food Safety Authority. 2009. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food) on request of EFSA. *EFSA Journal*, 7(11):1366.
- [5] European Food Safety Authority. 2011a. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) 104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. Available at <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf>
- [6] European Food Safety Authority. 2011b. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal*, 9(10):2390.
- [7] Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Kemper M.J., Follin P., Müller L., King L.A., Rosner B., Buchholz U., Stark K., Krause G. for the HUS Investigation Team. 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365:1771-1780.
- [8] Gault G, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, Charron M, Ong N, Castor C, Macé M, Bingen E, Noël H, Vaillant V, Bone A, Vendrely B, Delmas Y, Combe C, Bercion R, d'Andigné E, Desjardin M, de Valk H, Rolland P. 2011. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Eurosurveillance*, 16(26):pii=19905. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19905>
- [9] Mellmann A., Harmsen D., Cummings C.A., Zentz E.B., Leopold S.R., Rico A., Prior K., Szczepanowski R., Ji Y., Zhang W., McLaughlin S.F., Henkhaus J.K., Leopold B., Bielaszewska M., Prager R., Brzoska P.M., Moore R.L., Guenther S., Rothberg J.M., Karch H. 2011. Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE*. 6(7): e22751. doi:10.1371/journal.pone.0022751
- [10] Morabito S., Karch H., Mariani-Kurkdjian P., Schmidt H., Minelli F., Bingen E., Caprioli A. 1998. Enterohaemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111: H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 36:840-2.



## Actualités

### En France, naissance du Cnev : Centre national d'expertise sur les vecteurs des maladies humaines et animales

P. Martin (1) (paul.martin@anses.fr), D. Fontenille (2) (didier.fontenille@ird.fr)

(1) Anses, Laboratoire de Lyon, 31, avenue Tony Garnier – 69364 Lyon Cedex 7

(2) UMR MIVEGEC, Centre IRD, 911, avenue Agropolis - BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5

[Référence article ?](#)



**Chikungunya, dengue, fièvre catarrhale ovine, fièvre du Nil occidental, paludisme, maladie de Lyme, maladie de Chagas...** Ces affections ont la particularité d'être transmises en France (y compris dans les territoires ultramarins) par des insectes ou des tiques. Ces maladies infectieuses sont une préoccupation majeure de santé publique humaine et vétérinaire. Les changements globaux (climatiques, environnementaux, sociétaux) génèrent aussi de nouveaux risques sanitaires. La lutte ou la protection contre ces vecteurs sont des stratégies majeures dans le contrôle de ces maladies infectieuses.

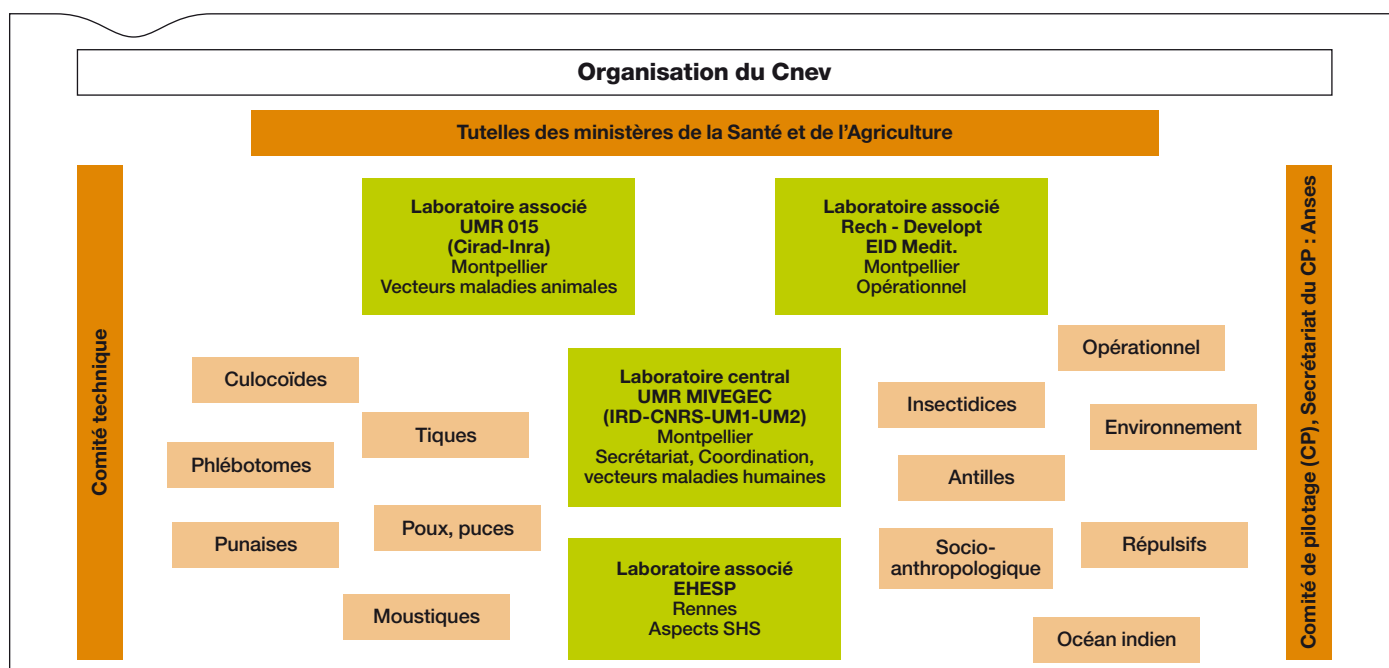
La France se dote d'une structure d'expertise dédiée aux différents aspects de la lutte antivectorielle, le Centre national d'expertise sur les vecteurs (Cnev). Mis en place pour une période de cinq ans, le Cnev est une organisation multidisciplinaire qui doit mobiliser rapidement et efficacement, dans une perspective d'aide à la décision, l'ensemble de l'expertise et des compétences françaises dans les domaines de l'entomologie médicale et vétérinaire, de la lutte antivectorielle et des sciences humaines et sociales appliquées à la santé publique. La mise en place d'un tel centre d'expertise était une des recommandations prioritaires de l'expertise collégiale « La lutte anti-vectorielle en France », qui a rendu ses conclusions en 2009. Le Cnev regroupe une grande partie des acteurs français de la recherche et des structures opérationnelles de

surveillance et de lutte impliqués dans le contrôle des vecteurs de maladies.

Le Cnev est un réseau de laboratoires et de partenaires scientifiques, coordonné par un laboratoire central. Chaque acteur du réseau que constitue le Cnev a un champ de compétence et des attributions bien définies. Les attributions sont l'expertise, l'appui scientifique et technique, la veille, les recommandations en terme de recherche et l'appui à la formation.

#### Architecture générale

L'architecture du Cnev est la suivante : un laboratoire central coordinateur, trois laboratoires associés, 35 partenaires spécialisés, suivant le schéma ci-dessous.







## Actualités

### Les missions du Cnev

#### • L'expertise entomologique:

- participation à l'élaboration, au suivi et à l'évaluation de bonnes pratiques et de recommandations concernant les techniques de surveillance entomologique et de lutte antivectorielle (LAV);
- définition et évaluation des indicateurs de surveillance entomologique;
- définition et évaluation des indicateurs de l'efficacité de la LAV;
- maintien, détention et diffusion des techniques de diagnostic et/ou d'identification et de caractérisation;
- identification et caractérisation des arthropodes hématophages adressés par les services opérationnels de l'État;
- évaluation de la sensibilité et de la résistance aux insecticides des insectes vecteurs en tant que de besoin.

#### • L'appui scientifique et technique:

- appui scientifique et technique aux ministères concernés,
- participation à l'élaboration de mesure de lutte contre les vecteurs;
- contribution à des missions d'appui à la demande des ministères concernés;
- appui sur les aspects vectoriels aux agences sanitaires chargées de la surveillance et de l'évaluation des risques sanitaires;
- représentation au niveau européen et international des ministères concernés concernant l'expertise en matière d'entomologie médicale et vétérinaire;
- participation, en tant que de besoin, aux audits des services de LAV.

#### • L'appui à l'animation technique:

- animation technique du réseau des services de LAV; appui scientifique et technique aux services de LAV;
- transfert de compétences techniques aux services opérationnels de la LAV.

#### • L'appui à la formation dans le domaine de la lutte antivectorielle:

- contribution à la politique de formation sur la lutte antivectorielle, les vecteurs et le risque vectoriel.

#### • La veille scientifique et technique:

- veille scientifique et alerte, concernant les aspects entomologiques, les risques vectoriels et les phénomènes entomologiques émergents;
- veille sur l'évolution des connaissances scientifiques et techniques et transfert d'informations vers le domaine opérationnel;
- rédaction d'une lettre périodique de veille scientifique et technique, et l'ouverture d'un site web ([www.cnev.fr](http://www.cnev.fr)).

#### • Orientation de la recherche:

- prise en compte des besoins des ministères chargés de la santé et de l'agriculture et des enjeux scientifiques pour identifier des questions de recherche dans ses domaines de compétence;
- le cas échéant, appui aux agences de programmation et de moyen pour l'identification des priorités pour les appels à projet.

### Description du Cnev

#### Un laboratoire central coordonateur

l'unité de recherche Mivegec (IRD, CNRS, Universités de Montpellier), orientée vers les vecteurs de maladies humaines, et la résistance aux insecticides. Ce laboratoire coordonateur accueille l'équipe d'ingénieurs se consacrant totalement au Cnev.

#### Trois laboratoires associés

- L'unité de recherche CMAEE (Cirad-Inra), plus particulièrement compétente sur les vecteurs de maladies animales.
- l'Entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen (EID-Méditerranée), compétente sur les aspects opérationnels de la surveillance et de la lutte antivectorielle.
- l'École des hautes études en santé publique (EHESP) pour les aspects relevant des sciences humaines et sociales.

#### Les partenaires

Ils ont été choisis *intuitu personae* en raison de leur compétence notamment dans des domaines entomologiques très spécialisés, des régions géographiques françaises, ainsi que dans certains domaines des sciences humaines et sociales. Issus de 35 équipes appartenant à différents organismes, ils regroupent 140 scientifiques spécialisés dans différents domaines de l'entomologie médicale et vétérinaire.



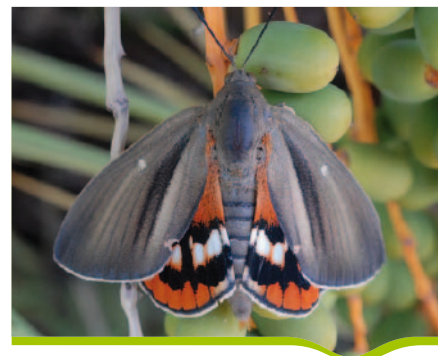
## Focus sur un laboratoire

### Le laboratoire de la santé des végétaux

V. Molinéro-Demilly (valerie.molinero@anses.fr), F. Poliakoff, P. Reynaud, G. Anthoine, R. Iloos, J.-E. Gerbault, J.-C. Streito, B. Hostachy, N. Franquet

Anses, Laboratoire de la santé des végétaux (France)

V. Molinéro-Demilly, F. Poliakoff, P. Reynaud, G. Anthoine, R. Iloos, J.-E. Gerbault, J.-C. Streito, B. Hostachy, N. Franquet (2012). *Le Laboratoire de la santé des végétaux*, EuroReference, N° 6, ER06-12F01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN4001.htm>



**Le Laboratoire national de la protection des végétaux (LNPV) a rejoint l'Anses le 1<sup>er</sup> janvier 2011 et est devenu le Laboratoire de la santé des végétaux. Son intégration dans une agence indépendante s'inscrit dans la logique de la séparation de l'évaluation et de la gestion des risques, sollicitée pour le domaine végétal lors des États généraux du sanitaire. Le LNPV, laboratoire de la Direction générale de l'alimentation du ministère en charge de l'agriculture, assumait en effet l'expertise sur les organismes nuisibles de la santé des végétaux.**

Le Laboratoire de la santé des végétaux est désormais l'organe d'appui scientifique et technique des tutelles de l'Anses en matière de veille et de maîtrise des organismes nuisibles de quarantaine du végétal. Il réunit 80 personnes sur six sites en France. Son centre administratif est implanté à Angers, au cœur d'un campus du végétal de rayonnement mondial (Vegepolys) dédié à la recherche, au développement et à l'enseignement supérieur.

#### Il a essentiellement deux missions

Il est chargé d'une part de l'expertise et de l'évaluation des risques pour la santé des végétaux et d'autre part il est responsable du développement, de la validation et de la diffusion de méthodes d'identification des organismes nuisibles<sup>(1)</sup> faisant l'objet d'une réglementation, des organismes génétiquement modifiés et des plantes invasives.

**Ces deux missions sont prises en charge par deux unités transversales:** l'unité Expertise sur les risques biologiques (ERB) et l'unité Développement de méthodes et analyses (DMA) qui animent les travaux d'expertise et d'analyse de six unités spécialisées.

Localisées à Angers, Montpellier, Nancy, Rennes et Saint-Pierre-de-la Réunion, elles couvrent respectivement la bactériologie, la virologie et les organismes génétiquement modifiés, l'entomologie et les plantes invasives, la mycologie, la nématologie, et les ravageurs et agents pathogènes tropicaux. La station de Clermont-Ferrand contribue à ces activités mais assure essentiellement la quarantaine des végétaux introduits sous dérogation.

**Angers** accueille l'unité Laboratoire de référence en bactériologie, virologie et organismes génétiquement modifiés. Elle accueille également la direction du laboratoire et les deux unités transversales : en 2009, la station a augmenté la surface de ses laboratoires et a créé une salle de niveau de confinement P3. Elle accueille des délégations étrangères et réalise des formations.

**Montpellier** accueille l'unité Laboratoire de référence en entomologie et sur les plantes invasives. La station est située,

depuis 2010, dans les locaux du Centre de biologie pour la gestion des populations où elle bénéficie d'un environnement scientifique (Inra, Cirad, IRD), de collections d'insectes et de ressources bibliographiques exceptionnelles.



Laboratoire de la santé des végétaux – Angers



Laboratoire de la santé des végétaux – Montpellier

<sup>(1)</sup> Un organisme nuisible aux végétaux est une espèce, une souche ou un biotype de végétal, d'animal ou d'agent pathogène nuisible pour les végétaux ou les produits végétaux. La nuisibilité de ces organismes peut être de type économique (perte de rendement, diminution de qualité...), environnementale (impact sur la biodiversité ou sur les écosystèmes...) ou sociétale (perte d'emplois, impacts sur le tourisme...).



## Focus sur un laboratoire



Laboratoire de la santé des végétaux – Nancy



Laboratoire de la santé des végétaux – Clermont-Ferrand



Laboratoire de la santé des végétaux – Rennes



Laboratoire de la santé des végétaux – Réunion

**Nancy** accueille l'unité Laboratoire de référence en mycologie. Ses compétences couvrent l'ensemble des champignons et oomycètes pathogènes des plantes cultivées et des essences forestières.

**Clermont-Ferrand** accueille l'unité de quarantaine des végétaux introduits en Europe sur le territoire français. Elle s'est récemment dotée d'infrastructures confinées ultra modernes de niveau NS3. Ces installations permettent de réaliser en toute sécurité un ensemble d'observations et d'analyses sur du matériel végétal de multiplication introduit sur le territoire communautaire en dérogation aux règles générales phytosanitaires.

**Rennes** accueille l'unité Laboratoire de référence en nématologie (parasites de plantes). Une attention particulière est portée sur les genres *Globodera*, *Meloidogyne*, *Ditylenchus* et *Bursaphelenchus*. Elle est accréditée (ISO 17025) depuis 2002 dans son domaine d'activité.

La création de la station de la **Réunion** en juillet 2007 a été motivée par l'existence du « 3P » ou « Pôle de protection des plantes » qui associe avec le Laboratoire de la santé des végétaux, sur un même site, le Cirad Réunion, des services de développement (FDGDON, FARRE...) et l'État. La station de la Réunion héberge l'unité Ravageurs et agents pathogènes tropicaux qui s'intéresse aux organismes réglementés ou émergents.

Le Laboratoire de la santé des végétaux est accrédité et reconnu comme « **Laboratoire national de référence** » (**arrêté du 19 octobre 2011**). À ce titre, il anime le réseau de laboratoires agréés sur les domaines pour lesquels il est compétent. Il participe à des groupes de travail européens et internationaux ainsi qu'à des projets de recherche conjoints avec l'Inra, le Cirad, les universités et grandes écoles en France et à l'international. Il est fréquemment saisi par la Direction générale de l'alimentation du ministère en charge de l'agriculture pour formuler des avis sur les risques que présente tel ou tel ravageur (arthropode, nématode...) ou agent phytopathogène et réalise des expertises sur diverses problématiques du domaine phytosanitaire.

### La réforme du Laboratoire de la santé des végétaux en 2007 a conduit à son intégration à l'Anses en 2011

En 2007, le laboratoire de la santé des végétaux a été réorganisé et depuis fin 2010 il appuie son activité sur six stations spécialisées. Le site de Clermont-Ferrand est devenu l'unique station nationale équipée pour les activités de quarantaine, nécessaires pour garantir l'innocuité du matériel végétal importé sous dérogation.

Le Laboratoire de la santé des végétaux s'est donc centré sur les risques biologiques. L'analyse du risque phytosanitaire, outil au service du gestionnaire du risque et outil de négociation internationale, s'est structurée en s'appuyant sur l'unité transversale « Expertise-Risques biologiques » et sur les unités thématiques des six stations. Des expertises portant sur des analyses du risque phytosanitaire produites dans l'Union européenne ou par des pays tiers sont aussi rendues par le Laboratoire.

Le Laboratoire de la santé des végétaux s'est recentré également dès 2007 sur le développement et la diffusion de méthodes pour les analyses réglementaires demandées par les inspecteurs des services régionaux de l'alimentation du ministère en charge de l'agriculture et accompagne le développement des analyses déléguées dans les laboratoires agréés privés ou des collectivités locales.



## Focus sur un laboratoire

### Les enjeux de la veille et de la maîtrise des organismes nuisibles pour la santé des végétaux

Le contexte dans lequel évolue le Laboratoire de la santé des végétaux est lié :

- aux enjeux de la mondialisation des échanges et l'augmentation de leur volume ;
- à la variété des supports végétaux, toujours plus marquée par l'exotisme des produits qui font émerger des risques insoupçonnés ;
- à l'exportation des produits végétaux français vers des pays tiers dont les exigences sont de plus en plus pointues ;
- aux enjeux fixés par le Grenelle de l'environnement il y a 4 ans, notamment pour faire évoluer les pratiques agricoles dans le domaine de la protection des végétaux avec la mise en place du plan Ecophyto 2018 dont l'objectif est de proposer la réduction, si possible de 50 %, des traitements phytosanitaires entre 2008 et 2018 ;
- aux exigences croissantes des consommateurs vis-à-vis de la sécurité alimentaire.

Ces changements entraînent un accroissement des risques de propagation des organismes nuisibles. Ces risques doivent être anticipés par l'Anses pour être mieux maîtrisés.

### Les missions et activités du Laboratoire de la santé des végétaux

Les missions telles que définies dans l'introduction sont coordonnées par deux unités transversales qui sont présentées ci-dessous :

#### 1. Évaluation et mesure du risque phytosanitaire (coordonnée par l'unité ERB)

L'unité Expertise-Risques biologiques (ERB) du Laboratoire de la santé des végétaux (LSV) est essentiellement centrée sur l'évaluation du risque phytosanitaire et sa mesure. Suite à l'intégration du LNPV au sein de l'Agence, un important travail a été réalisé pour que le fonctionnement de l'unité ERB du LSV converge avec celui de la direction de l'évaluation des risques de l'Anses en vue d'une totale harmonisation.

#### Activité de l'unité Expertise-Risques biologiques

L'unité coordonne, mais participe aussi, à la rédaction d'avis et expertises scientifiques et techniques des six stations du laboratoire dans le domaine de la santé des végétaux. Elle s'assure, en étroite relation avec la cellule Expertise de la DER, de la qualité des prestations d'expertise, en identifiant les outils et les méthodes les plus appropriés et en formant ou informant dans son champ de compétence. Pour ces missions, elle dispose d'une équipe de quatre agents, tous situés sur le site principal d'Angers. Pour maintenir et améliorer ses techniques d'évaluation du risque phytosanitaire, elle s'investit également dans différents projets européens (point développé ci-dessous, partie « suivi méthodologique »).

L'unité ERB répond principalement à deux types de demandes :

- des expertises menant à un avis de l'Anses et portant sur l'évaluation du risque (incluant les ARP). Elles sont réalisées selon la norme NF X 50-110 ;
- un appui technique aux tutelles menant à un rapport, une note ou un avis du Laboratoire de la santé des végétaux.

### Expertises menant à un avis de l'Anses

L'unité ERB assure l'organisation et la coordination du suivi des travaux d'expertise réalisés selon la norme NF X 50-110. Elle est le garant de la traçabilité de l'expertise et de la mise en œuvre d'une méthodologie conforme aux principes d'organisation déterminés par l'agence. L'unité met actuellement en place un collectif d'experts sous la forme d'un Comité d'experts spécialisé intitulé CES « risques biologiques pour la santé des végétaux ». Ce CES sera actif à partir du premier semestre 2012 et il traitera :

- des organismes réglementés en France métropolitaine et Outre-mer, en Europe ou sur les filières d'export ;
- des organismes invasifs, nuisibles ou émergents susceptibles de faire l'objet d'une mesure de lutte obligatoire du fait de leurs impacts ;
- des organismes dits de « qualité » dont le développement serait influencé par une politique publique.

Ce CES sera appuyé autant que de besoin par des groupes de travail (GT) ou des groupes d'expertise collective d'urgence (GECU).

L'unité ERB sera garante de la compétence et de l'indépendance des experts intervenant dans ces instances, en réalisant le suivi de leurs déclarations publiques d'intérêts et de leurs *curriculum vitae*. Elle apportera également une valence scientifique en désignant pour chaque expertise un coordonnateur scientifique parmi ses agents.

Durant la période transitoire où le CES n'est pas encore actif, l'unité ERB assure les expertises en mettant en place des groupes d'experts *ad hoc* selon les besoins. Ces experts sont dès maintenant gérés selon les pratiques de l'Anses.

### L'analyse du risque phytosanitaire

L'analyse de risque phytosanitaire (ARP) est une expertise particulière consistant à évaluer (selon des normes internationales) les preuves biologiques et autres données scientifiques ou économiques pour déterminer si un organisme nuisible doit être réglementé (ou déréglémenté) et la nature des mesures phytosanitaires éventuelles à prendre à son égard. L'ARP est un processus en trois étapes : initiation, évaluation et proposition d'options de gestion du risque.

### Des normes internationales

L'ARP doit être réalisée dans le strict respect des exigences de la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV), et notamment en suivant les consignes des normes internationales NIMP n° 2 (Directives pour l'analyse du risque phytosanitaire) et NIMP n° 11 (Analyse du risque phytosanitaire pour les organismes de quarantaine, incluant l'analyse des risques pour l'environnement et des organismes vivants modifiés). Dans les faits, l'unité ERB utilise et participe activement à l'amélioration de la norme de l'OEPP (Organisation intergouvernementale responsable pour la coopération internationale en protection des végétaux dans la région européenne et méditerranéenne). Sur la base des normes 2 et 11, l'OEPP a développé et adopté un « système » d'évaluation du risque phytosanitaire complété par un « système » pour la gestion du risque phytosanitaire, finalement regroupé dans une norme unique PM 5/3(5)<sup>(2)</sup>.

(2) <http://archives.eppo.org/EPPOStandards/pr.htm>



## Focus sur un laboratoire

### L'appui technique

Face à une forte attente des tutelles, et en complément des avis Anses, l'unité ERB mobilise les agents du laboratoire pour apporter un appui technique sous forme de rapports, notes ou avis du Laboratoire de la santé des végétaux. Les demandes portent aussi bien sur des notes d'alertes que sur des évaluations du risque simplifiées, des avis sur des méthodes de gestion du risque ou sur des points scientifiques et techniques pointus liés à l'activité de référence. À la demande des tutelles, certains agents interviennent également pour des missions d'audit externe ou la participation à des groupes de travail nationaux ou internationaux. Sous convention, elle réalise des travaux à façon pour les tutelles, comme par exemple une étude sur la hiérarchisation des organismes nuisibles de quarantaine. Lorsque les compétences techniques ne sont pas disponibles au sein du laboratoire pour assurer l'appui technique attendu, l'unité ERB mobilise une expertise externe sous forme de consultations ou par mise en place de groupes informels d'experts.

### Suivi méthodologique

L'évaluation du risque phytosanitaire requiert l'usage de nombreux outils scientifiques tels que la biomodélisation (CLIMEX, MAXENT), les systèmes d'information géographique (SIG), les bases de données thématiques et autres logiciels spécialisés (CAPRA, PQR, CPC...). L'unité ERB participe à plusieurs projets européens en rapport avec l'analyse du risque phytosanitaire ce qui lui permet de maintenir un haut niveau de compétence dans le domaine de l'évaluation de risque en santé des végétaux. Le projet européen PRATIQUE (programme cadre de la Commission européenne FP7) vise à améliorer les techniques et outils d'Analyse du risque phytosanitaire. Le Laboratoire de la santé des végétaux participe aux tests et sélectionne les meilleurs outils de modélisation de la répartition potentielle d'un organisme nuisible en fonction du climat. Ces travaux enrichissent les compétences de l'unité dans les domaines des SIG et de la biomodélisation et contribuent à la reconnaissance européenne de son travail. Le projet européen PRIMA PHACIE initié par l'EFSA (European Food Safety Authority) vise à sélectionner puis tester différentes normes pour l'ARP. L'une d'entre elles (ou une combinaison de plusieurs) sera retenue par l'EFSA comme norme de référence pour ses futures analyses du risque.

### Une activité en croissance

L'activité d'expertise a pratiquement doublé entre 2009 et 2010, puisqu'entre 2009 et 2010, le nombre d'avis, études, expertises et analyses du risque qui ont été effectués/rendus par les six stations est passé de 149 à 293.

Parmi les sujets importants traités en 2010 figurent des travaux sur la Sharka (Plum Pox Virus), maladie virale sur *Prunus*, en particulier pêchers et abricotiers, qui fragilise les exploitations fruitières du sud-est de la France. Ces expertises ont été demandées par le ministère en charge de l'agriculture en appui à la révision de l'arrêté national de lutte. La Chrysomèle du maïs (*Diabrotica virgifera*), un coléoptère nord américain particulièrement invasif en Europe, est un autre sujet sensible qui a donné lieu à des expertises et avis dans le cadre de la révision des méthodes de lutte. Enfin, le secteur de la nématologie est spécialement sollicité sur plusieurs nématodes phytophages (*Meloidogyne* spp.) sur grandes cultures.

**« Un pessimiste voit le risque dans chaque opportunité, un optimiste voit une opportunité dans chaque risque »**

Winston Churchill

### Pour en savoir plus

- Présentation du Laboratoire de la santé des végétaux : <http://www.anses.fr/PNRC01.htm>
- NIMP n° 2, cadre de l'analyse du risque phytosanitaire (2007) (PDF - 154,2 Ko).
- NIMP n° 5, glossaire des termes phytosanitaires (2007) (PDF - 204,9 Ko).
- NIMP n° 11, analyse du risque phytosanitaire pour les organismes de quarantaine, incluant l'analyse des risques pour l'environnement et des organismes vivants modifiés (2004) (PDF - 200,7 Ko).

### Versions anglaises

- ISPM 2, Framework for pest risk analysis (2007) (PDF - 131,7 Ko).
- ISPM 5, Glossary of phytosanitary terms (2007) (PDF - 171,9 Ko).
- ISPM 11, Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks and living modified organisms (2004) (PDF - 349,9 Ko).

### 2. Activités de développement de méthodes et analyses (coordonnées par l'unité DMA)

Le Laboratoire de la santé des végétaux conduit des travaux d'évaluation et de développement de méthodes d'analyses pour les organismes nuisibles et il est Laboratoire national de référence. Les agents pathogènes et ravageurs concernés sont principalement des champignons, des bactéries, des virus, des phytoplasmes, nématodes, insectes, acariens. Le laboratoire travaille également sur l'identification des organismes génétiquement modifiés, les adventices et les plantes invasives en milieu cultivé. Le Laboratoire de la santé des végétaux assure aussi le contrôle sous quarantaine des végétaux prohibés sur le territoire européen, introduits à des fins de recherche ou de sélection variétale.

En lien avec les stations thématiques concernées, l'unité Développement de méthodes et analyses (DMA) coordonne l'harmonisation des pratiques, entre autres dans le cadre de l'accréditation et la délégation des analyses vers les laboratoires agréés (à ce jour au nombre de 19 sur le domaine végétal) par transfert des méthodes et du savoir-faire. Par l'animation dynamique du réseau et l'organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA), le laboratoire veille à la qualité et à la fiabilité des prestations d'analyses.

Relais entre la direction et les stations pour ce qui concerne les aspects scientifiques, l'unité Développement de méthodes et analyses impulse de nombreux travaux scientifiques, techniques et la participation des équipes du Laboratoire de la santé des végétaux à des projets collaboratifs de niveau national ou international.

En effet, le laboratoire de la santé des végétaux a participé activement à des programmes européens :

- dans le cadre du projet européen EUPHRESKO I, la station de Nancy a assumé le leadership pour l'organisation d'un ring test pour le protocole de diagnostic pour l'identification et la détection de *Gibberella circinata* sur semences de pins (13 partenaires européens), la station de Rennes, le leadership pour un essai inter-laboratoire de validation pour la méthode de détection et d'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* par PCR en temps réel et l'animation d'ateliers de travail sur cette thématique. En bactériologie, l'unité a participé au ring test ILT2 (*Ralstonia* et *Clavibacter* sur pomme de terre) et à un programme sur *Dickeya solani* est en cours ;
- l'ensemble des stations ont participé fin 2011 au programme QBOL, « Development of a new diagnostic tool using DNA barcoding to identify quarantine organisms in support of plant health », en tant qu'évaluateurs de méthodes



## Focus sur un laboratoire

proposées. Les stations d'entomologie, de mycologie et de nématologie ont déjà été impliquées dans la constitution de la collection d'organismes de quarantaine de référence: fournir des spécimens (échanges avec des laboratoires étrangers, missions de terrains pour récolter les organismes introuvables), confirmer l'identification des spécimens de référence;

- dans le cadre du Programme européen COST 873 relatif aux fruitiers à noyaux, un agent a pu suivre une formation à la détection de la bactérie *Xylella fastidiosa*.

En 2010, le Laboratoire de la santé des végétaux a réalisé 15284 analyses biologiques dans les domaines de la bactériologie, mycologie, virologie, entomologie, nématologie et organismes génétiquement modifiés. Parmi ces analyses 88 % étaient des analyses réglementaires. Son activité analytique représente 13 % de l'ensemble des analyses officielles en santé des végétaux (environ 102000 analyses officielles réalisées au sein du réseau des laboratoires agréés et du Laboratoire de la santé des végétaux). Depuis 2007, 55 méthodes officielles ont été déléguées. Le laboratoire oriente son activité vers les pathogènes et ravageurs en émergence (voir encadré) et les plantes invasives.

Le renforcement du rôle de laboratoire de référence du Laboratoire de la santé des végétaux s'est effectué dans le cadre d'une démarche qualité. En 2009, 13 audits croisés de différents secteurs d'activité, du management de la qualité ou encore de la traçabilité d'essais ont été réalisés sur cinq des six stations. Les cinq stations visitées par le Cofrac sur 2009 et 2010 sont désormais accréditées au titre de la norme 17025 pour des activités de nématologie (Rennes), mycologie (Nancy), bactériologie et OGM (Angers), virus (Angers et Clermont-Ferrand) et bactéries et virus tropicaux (la Réunion). La station d'entomologie est en attente d'un audit Cofrac au printemps 2012.

### Pour en savoir plus

- Liste des méthodes officielles d'analyse dans le cadre de la santé des végétaux: <http://www.anses.fr/PNTC01.htm>
- Liste des méthodes en consultation publique: <http://www.anses.fr/PNR201.htm>
- Présentation du Laboratoire de la santé des végétaux: <http://www.anses.fr/PNRC01.htm>
- <http://agriculture.gouv.fr/ecophyto-2018>

### Pathogènes et ravageurs en émergence en 2010

- Bactériose du kiwi (*Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*), mouche du noyer (*Rhagoletis cingulata* - un cas en PACA), mouche drosophile (*Drosophila suzukii*) sur fruits rouges qui a généré 469 analyses d'identification, l'hyménoptère dénommé cynips du chataigner (*Dryocosmus kuriphilus*) découvert en Rhône-Alpes, la cicadelle émergente (*Orientalus ishidae*) vectrice de phytoplasmes sur vigne (un cas en Alsace); premier signalement à la Réunion de la cochenille polyphage *Paracoccus marginatus* et en France de la cochenille *Rhizoecus amomorphalli* (ravageur des plantes ornementales): tels sont les principaux ravageurs des plantes en émergence.
- Une surveillance renforcée est mise en œuvre par les services de l'État pour *Bursaphelenchus xylophilus* (nématode du pin menaçant les peuplements de pins français, après le Portugal, puis les quelques foyers localisés espagnols). *Meloidogyne fallax* et *M. chitwoodi* (vers microscopiques s'attaquant principalement aux légumes) présents en foyers dans différentes régions sont surveillés et nécessitent une jachère sur plusieurs années pour assurer leur contrôle.
- Enfin, il faut noter l'apparition de la Cercosporiose noire sur bananiers (*Mycosphaerella fijiensis*) en Martinique, maladie fongique dont le premier cas concernant les territoires français d'outre-mer a été détecté en Guyane en 2009.



## Recherche pour la référence

### Une nouvelle technique de typage moléculaire de la moisissure opportuniste *Aspergillus fumigatus*; application potentielle dans les couvoirs et les élevages avicoles

S. Thierry (1,2) (simon.thierry@anses.fr), D. Wang (1,3), P. Arné (4), M. Deville (4), B. De Bruin (4), A. Nieguitsila (4), C. Pourcel (5), K. Laroucau (2), R. Chermette (4), F. Botterel (6), J. Guillot (4)

(1) Anses, UMR BIPAR, Ecopham, Maisons-Alfort, France

(2) Anses, unité Zoonoses bactériennes, Maisons-Alfort, France

(3) Parasitology department, College of Animal Science and Technology, Université du Guangxi, Nanning, Chine

(4) ENVA, UMR BIPAR, Ecopham, Maisons-Alfort, France

(5) Institut de génétique et de microbiologie, Université Paris-Sud 11, Orsay, France

(6) UPEC, UMR BIPAR, Ecopham, Créteil, France

S. Thierry, D. Wang, P. Arné, M. Deville, B. De Bruin, A. Nieguitsila, C. Pourcel, K. Laroucau, R. Chermette, F. Botterel, J. Guillot (2012).

Une nouvelle technique de typage moléculaire de la moisissure opportuniste *Aspergillus fumigatus*; application potentielle dans les couvoirs et les élevages avicoles, EuroReference, N° 6, ER06-12R01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN5001.htm>



**La méthode de typage moléculaire MLVA (Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) s'est révélée très utile pour le génotypage de nombreux micro-organismes et a permis d'apporter de nombreuses informations notamment dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques.**

**Dans cette étude, nous avons développé cette technique pour le champignon filamentueux *Aspergillus fumigatus*. La méthode a été testée sur un panel d'isolats d'origine aviaire prélevés dans des élevages français et chinois. La méthode développée s'est révélée très discriminante, rapide et facile d'utilisation. De plus, elle a aussi démontré une capacité à regrouper les génotypes en fonction de l'origine géographique des isolats. De ce fait, cette méthode se révèle être un outil épidémiologique d'importance dans l'étude de la circulation de ce pathogène dans les élevages.**

*Aspergillus fumigatus* est une moisissure ubiquiste qui se développe habituellement sur la matière végétale en décomposition et dans le sol. Cette moisissure produit une grande quantité de spores asexuées, ou conidies, qui sont ensuite dispersées dans l'air. Les populations humaines et animales sont constamment exposées à des conidies aspergillaires mais les défenses immunitaires de l'appareil respiratoire sont généralement suffisantes pour détruire les spores avant qu'elles ne germent. Chez les patients qui présentent un déficit majeur de l'immunité cellulaire, *A. fumigatus* peut être à l'origine d'une infection redoutable appelée aspergillose invasive. La neutropénie (ou des anomalies fonctionnelles intéressant les neutrophiles et les macrophages) demeure le facteur de risque principal. Les oiseaux, et plus particulièrement les oiseaux d'élevage comme la dinde, sont très sensibles à l'infection par *A. fumigatus*. Même si l'on ne connaît pas avec précision l'impact économique de l'aspergillose en élevage aviaire, ce type d'infection respiratoire est à l'origine de pertes de production par diminution de la croissance, de mortalités et de saisies à l'abattoir (Arné *et al.*, 2011). Pour mettre en place des mesures de lutte pertinentes en élevage ou en milieu hospitalier, il est de première importance de disposer d'outils permettant de comprendre la circulation de la moisissure *A. fumigatus* au sein des populations animales ou humaines et de leur environnement. La méthode MLVA, pour *Multiple Locus Variable number tandem repeat Analysis*, est basée sur la détection de petites séquences répétées en tandem sur le génome appelées VNTR (Figure 1) (Vergnaud *et al.*, 2000). Cette technique a déjà été développée pour de nombreuses bactéries et pour la levure

*Candida glabrata* (Laroucau *et al.*, 2008; Grenouillet *et al.*, 2007). La méthode s'est révélée très discriminante et a permis, dans certains cas, de regrouper les isolats en fonction de leur origine géographique.

L'objectif de cette étude a été de développer une nouvelle méthode de typage moléculaire basée sur la détection de VNTR pour la moisissure *A. fumigatus*. Tous les VNTR présents sur le génome de la souche Af293 ont été analysés et un panel final de dix marqueurs a été retenu. Ce panel a ensuite été testé sur un grand nombre d'isolats provenant d'élevages avicoles de France et de Chine.

#### Matériels et Méthodes

##### Origine des isolats

Afin de tester et de sélectionner des marqueurs discriminants, un échantillon composé de 57 isolats d'*Aspergillus fumigatus* géographiquement et chronologiquement indépendants a été sélectionné. Il regroupe 53 isolats obtenus à partir de prélèvements d'organes ou d'écouvillons pharyngés effectués sur des animaux (des oiseaux principalement), trois isolats provenant de patients du CHU Henri-Mondor et la souche de référence CBS 144-89.

Par la suite un second groupe de 277 isolats a été testé avec la méthode. Ces isolats correspondent à cinq situations épidémiologiques différentes: deux élevages de canards à gaver situés dans le département de la Sarthe, un élevage de poulets ainsi qu'un élevage de canards situés dans la province du Guangxi en Chine, et enfin un couvoir de dindes situé dans le département du Maine-et-Loire en France.



## Recherche pour la référence

### Typage moléculaire

Le typage moléculaire des isolats a été effectué par amplification par PCR des marqueurs VNTR. Par la suite, la taille des séquences a été déterminée par électrophorèse conventionnelle. À partir de ces données, le nombre de répétitions présentes a été déterminé pour chaque VNTR.

### Analyse bioinformatique

Les résultats obtenus ont été synthétisés sous la forme d'une suite numérique représentant le nombre de répétitions obtenu pour chaque VNTR et ce pour chaque isolat testé. Les profils MLVA ainsi générés ont été analysés à l'aide du logiciel Bionumerics®. Les profils ont été comparés par la méthode UPGMA puis exprimés sous la forme d'un algorithme graphique appelé *Minimum Spanning Tree* (MST).

### Résultats

#### Sélection des marqueurs VNTR

Le logiciel Tandem Repeat Finder (Benson, 1999) a permis d'identifier 77 marqueurs potentiels répartis sur les huit chromosomes composant le génome d'*A. fumigatus*. Ces 77 marqueurs ont été testés sur le premier échantillon de 57 isolats indépendants; une sélection des VNTR a été effectuée sur la base de la taille des marqueurs permettant une bonne détection par électrophorèse conventionnelle, leur capacité à produire un résultat exploitable (amplification effective) ainsi que leur capacité à mettre en avant des profils différents selon les isolats testés (polymorphisme). Cette sélection a permis de retenir un panel final de dix marqueurs répartis sur quatre des huit chromosomes du champignon (1, 5, 6 et 8).

#### Analyse bioinformatique

Le panel de dix marqueurs VNTR a été testé sur 330 isolats. Cette analyse a permis d'identifier 255 profils MLVA différents.

Seuls 33 génotypes sont partagés par deux isolats ou plus. La comparaison des génotypes par UPGMA puis leur représentation par MST a permis d'identifier trois principaux groupes (Figure 2). Le premier groupe comprend 91 des 95 isolats aviaires (95 %) provenant des deux élevages de canards de la Sarthe en France. Le second groupe comprend 42 des 62 isolats aviaires (70 %) provenant des élevages de la province du Guangxi en Chine. Enfin, le dernier groupe comprend 90 des 120 isolats environnementaux (75 %) collectés dans le couvoir de dinde du Maine-et-Loire en France.

#### Pouvoir discriminant

Le pouvoir discriminant de la méthode a été déterminé grâce au calcul de l'indice de diversité de Simpson (Hunter et Gaston, 1988). Cet indice peut varier de 0 à 1 (la valeur 1 signifiant que la méthode est capable de différencier tous les isolats testés). L'indice calculé à partir de l'échantillon testé par MLVA est égal à 0,9994, ce qui en fait une des méthodes les plus discriminantes décrites à l'heure actuelle sur la moisissure *A. fumigatus*.

#### Base de données

Afin de faciliter le transfert de la méthode à d'autres laboratoires, une base de données a été créée sur internet (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVANet/>). Cette base de données permet de comparer des profils VNTR à plus de 300 profils déjà référencés.

#### Discussion

Typier les isolats d'*A. fumigatus* devrait permettre d'améliorer la compréhension de la distribution et de la circulation de cet agent pathogène au sein de certains environnements, comme les élevages avicoles. Cette approche moléculaire peut aussi permettre une meilleure compréhension de la contamination et de l'infection des hôtes.

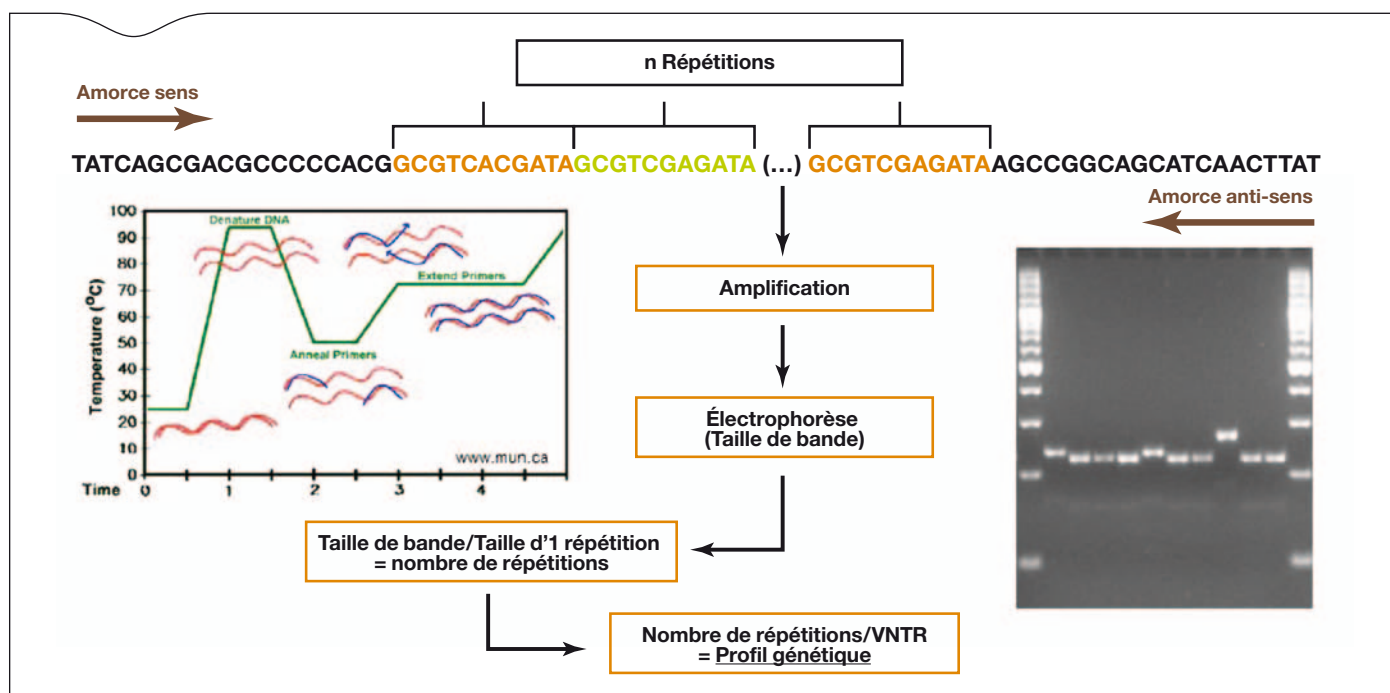
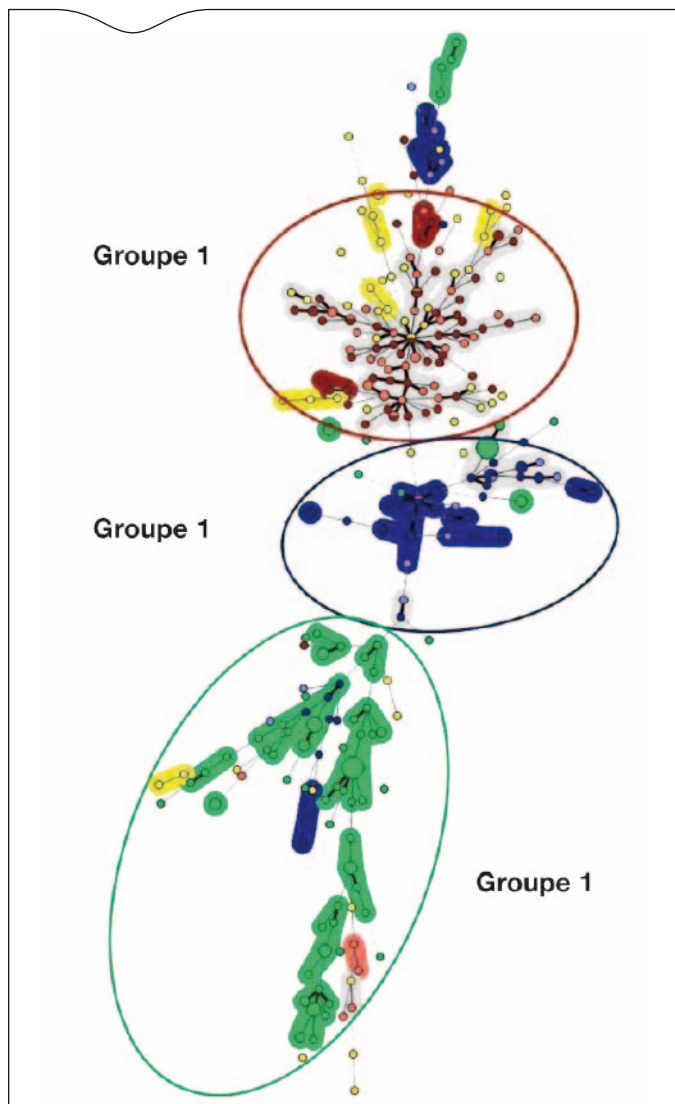


Figure 1. Principe de la technique MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis)



## Recherche pour la référence



**Figure 2. Nuage de points (Minimum spanning tree) représentant 330 isolats testés à l'aide de 10 marqueurs VNTR.** Chaque cercle représente un génotype unique. Le diamètre du cercle est proportionnel au nombre d'isolats partageant ce génotype. Les génotypes sont reliés par une droite représentant le nombre de différences entre eux. Une ligne pleine et épaisse signifie une différence entre les génotypes, alors qu'une ligne pleine et fine en signifie deux, une ligne en pointillé épais représente trois différences et enfin une ligne en pointillé fin représente quatre différences ou plus. Les génotypes sont aussi reliés par un fond coloré représentant les groupes d'isolats séparés par deux différences ou moins. La longueur des branches est aussi proportionnelle au nombre de différences. Chaque situation épidémiologique est représentée par une couleur spécifique : le rouge pour les isolats collectés dans le premier élevage de canard de la Sarthe en France en 2007 et 2008, rose pour les isolats collectés dans le second élevage de canard de la Sarthe en 2007 et 2008, bleu foncé pour les isolats collectés dans l'élevage de poulets de la province du Guangxi en Chine en 2008, bleu clair pour les isolats collectés dans l'élevage de canards de la province du Guangxi en Chine en 2008, vert pour les isolats environnementaux collectés en 2009 dans le couvoir de dindes de Maine-et-Loire et enfin jaune pour le groupe d'isolats indépendants composé de 57 isolats d'*Aspergillus fumigatus* géographiquement et chronologiquement indépendants dont 53 isolats aviaires, trois isolats humains et la souche de référence CBS 144-89.

De multiples méthodes de typage moléculaire ont été proposées pour l'agent pathogène opportuniste *A. fumigatus*. L'analyse du polymorphisme des microsatellites demeure la méthode la plus utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques en milieu hospitalier. Elle bénéficie d'un pouvoir discriminant très élevé (De Valk *et al.*, 2008). Une étude a aussi montré la capacité de cette technique à regrouper les génotypes en fonction de leur origine (Balajee *et al.*, 2008). Le CSP-typing est une méthode plus récemment décrite qui, bien que moins discriminante que les microsatellites, s'est révélée capable de regrouper les génotypes en fonction de leur origine épidémiologique (Balajee *et al.*, 2007). Cette méthode se base sur la détection d'une séquence répétée en tandem sur le gène d'une protéine de surface cellulaire. Cependant, contrairement à la MLVA, la séquence exacte de chaque répétition est systématiquement déterminée. Un numéro d'allèles est attribué à chaque séquence unique de répétitions et le génotype est alors défini par une suite d'allèles de composition et de nombre différents.

La technique MLVA, testée ici sur 330 isolats d'*A. fumigatus*, s'est révélée très discriminante, rapide et facile à mettre en œuvre. Cette méthode a aussi démontré une stabilité et une reproductibilité excellentes (Thierry *et al.*, 2010). Une standardisation et une « automatisation » de la méthode pourraient être envisagées dans le futur en développant un système multiplex en électrophorèse capillaire ainsi qu'en mettant au point un marqueur de taille interne pour chaque VNTR. Ceci permettrait une meilleure échangeabilité de la méthode entre les laboratoires en améliorant encore la reproductibilité et la facilité d'exécution. L'avantage principal de la technique MLVA demeure sa facilité d'utilisation. La migration des produits de PCR se fait sur un gel d'agarose et les résultats obtenus peuvent être facilement comparés à ceux correspondant à d'autres isolats examinés dans d'autres laboratoires.

### Références bibliographiques

- Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J. 2011. *Aspergillus fumigatus* in poultry. International Journal of Microbiology. 2011;2011:746356. Epub 2011 Jun 14.
- Balajee SA, HA de Valk, BA Lasker, JF Meis, and CH Klaassen. 2008. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Microbiological Methods 73:252-256.
- Balajee, SA, ST Tay, BA Lasker, SF Hurst, and AP Rooney. 2007. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. Eukaryot Cell 6:1392-1399.
- Benson G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, 27(2):573-580.
- de Valk HA, CH Klaassen, and JF Meis. 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. Mycoses 51:463-476.
- Grenouillet F, Millon L, Bart JM, Roussel S, Biot I, Didier E, Ong AS, Piarroux R. 2007. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of *Candida glabrata*. Journal of Clinical Microbiology, 45(11):3781-3784.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. Journal of Clinical Microbiology, 26(11):2465-2466.
- Laroucau K, Thierry S, Vorimore F, Blanco K, Kaleta E, Hoop R, Magnino S, Vanrompay D, Sachse K, Myers GS, Bavoil PM, Vergnaud G, Pourcel C. 2008. High resolution typing of *Chlamydomonas psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). Infection, Genetics and Evolution, 8(2):171-181.
- Thierry S, Wang D, Arne P, Deville M, De Bruin B, Nieguitsila A, Pourcel C, Laroucau K, Chermette R, Huang W, Botterel F, Guillot J. 2010. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. BMC Microbiology 10:315.
- Vergnaud G, Denoëud F. 2000. Minisatellites: mutability and genome architecture. Genome Research, 10(7):899-907.



## Méthodes

### Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

A.-C. Martel (anne-claire.martel@anses.fr), C. Lair

Anses, Laboratoire de Sophia-Antipolis (France)

A.-C. Martel, C. Lair (2012). Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), EuroReference, N° 6, ER06-12M01.

<http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN8001.htm>



La méthode de détermination des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles a été mise au point et validée en 2008 par le Laboratoire de Sophia-Antipolis (Laboratoire national de référence associé (LNR) sur les pesticides dans les denrées alimentaires d'origine animale et produits à forte teneur en matière grasse et LNR associé pour les résidus de pesticides selon les méthodes monorésidus). Le laboratoire dispose ainsi d'une méthode très sensible et rapide pour la recherche d'une éventuelle implication de ces insecticides dans les cas d'affaiblissements et de pertes de colonies d'abeilles.

#### Principe de la méthode

Les pesticides recherchés (thiaméthoxam, clothianidine, acétamipride, thiaclopride et imidaclopride) sont des substances chimiques utilisées en agriculture et font partie de la famille des néonicotinoïdes (Figure 1). L'enrobage des semences à l'aide de pesticides de contact ou systémiques est employé en agriculture pour lutter contre les ravageurs du sol et pour protéger les plantules et les plantes contre les parasites. D'autres pesticides sont appliqués sur les cultures par pulvérisation foliaire. Des résidus de néonicotinoïdes peuvent se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement. Par conséquent, les abeilles, bio-marqueurs de l'environnement, peuvent entrer en contact avec ces résidus (Rapport Afssa, 2008).

La méthode de dosage de ces cinq insecticides toxiques pour l'abeille (Tableau 1) repose sur une extraction avec l'acétonitrile et une séparation liquide/liquide avec l'hexane suivie d'une purification en phase solide sur cartouche Florisil®. L'extrait obtenu après évaporation est récupéré avec de l'eau ultrapure afin d'être injecté et analysé en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS/MS). Cette méthode d'analyse multirésidus permet d'identifier et de quantifier les résidus de néonicotinoïdes dans la matrice « abeilles ». La limite de quantification (LQ) est de 0,05 ng/abeille pour tous les pesticides sauf pour l'acétamipride dont la LQ est de 0,1 ng/abeille.

#### Appareillage et réactifs

L'appareillage spécifique consiste, en, (1) un homogénéiseur type Ultra-Turrax® T25 (IKA) pour le broyage des abeilles; (2) une station d'évaporation sous flux gazeux type TurboVap II (Caliper LifeSciences) pour concentrer les extraits; (3) un chromatographe en phase liquide avec injecteur automatique et boucle d'injection de 20 µl (Surveyor HPLC System, ThermoFinnigan) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle équipé d'une source ESI (TSQ Quantum, ThermoFinnigan).

Tous les solvants utilisés (acétone, hexane, éther de pétrole et dichlorométhane) sont de qualité « pour analyse de traces ».

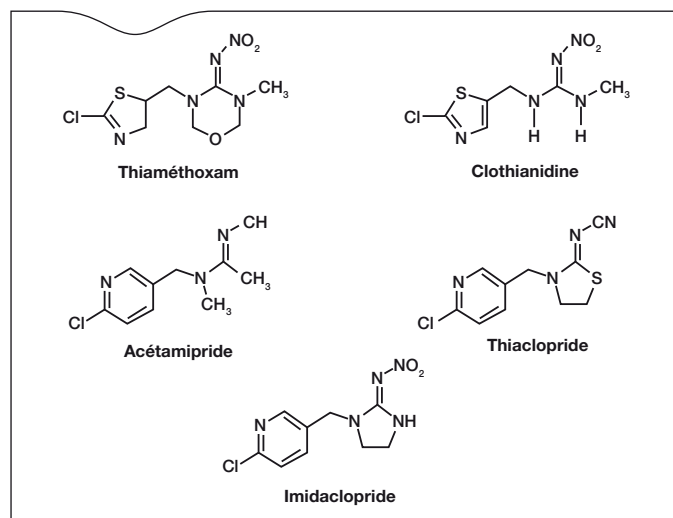


Figure 1. Structures chimiques des pesticides étudiés

Tableau 1. Toxicité des pesticides étudiés vis-à-vis des abeilles (Agritox, 2011)

Pesticide	DL <sub>50</sub> (contact)	DL <sub>50</sub> (orale)
Thiaméthoxam (N° CAS: 153719-23-4)	24 ng/abeille	5 ng/abeille
Clothianidine (N° CAS: 210880-92-5)	44,26 ng/abeille	3,79 ng/abeille
Acétamipride (N° CAS: 135410-20-7)	8,09 µg/abeille	14,53 µg/abeille
Thiaclopride (N° CAS: 111988-49-9)	38,82 µg/abeille	17,32 µg/abeille
Imidaclopride (N° CAS: 138261-41-3)	81 ng/abeille	3,7 ng/abeille



## Méthodes

Pour l'analyse en LC-ESI-MS/MS, le méthanol de qualité LC-MS et l'acide formique (98 %) sont utilisés. Les étalons sont préparés à partir des matières actives certifiées commandées chez CIL Cluzeau Info Labo : thiaméthoxam (99 % de pureté), clothianidine (99,5 %), acétamipride (99 %), thiaclopride (99,5 %) et imidaclopride (98 %). La solution certifiée de diméthoate-D6 (99,8 % de pureté, 100 mg/l dans l'acétone) provient également de CIL Cluzeau Info Labo.

### Mode opératoire

#### Extraction

L'échantillon d'abeilles (2 g, soit 20 insectes) est pesé dans un tube à centrifuger de 50 ml et 100 µl de l'étalon interne d'extraction (diméthoate-D6) sont ajoutés dans l'échantillon d'abeilles. L'échantillon d'abeilles est ensuite homogénéisé avec 30 ml d'acétonitrile à l'aide d'un Ultra-Turrax®. L'extrait est filtré sur Büchner. L'échantillon est ré-extrait avec 30 ml d'acétonitrile et filtré. L'extrait final est transféré dans une ampoule à décanter de 500 ml. La séparation liquide/liquide est réalisée en ajoutant 50 ml d'hexane dans l'ampoule à décanter. Après agitation, deux phases sont obtenues : la phase inférieure (acétonitrile) est récupérée dans la fiole à vide et la phase supérieure (hexane) est éliminée. La séparation liquide/liquide est renouvelée sur la phase inférieure en ajoutant à nouveau 50 ml d'hexane. Après agitation, la phase acétonitrile est récupérée dans un tube Zymark (200 ml) et évaporée à sec à 40 °C, sous flux d'air, à l'aide de la station d'évaporation (TurboVap II). L'extrait est repris par 2 ml de dichlorométhane pour la purification.

#### Purification

La cartouche de Florisil® (1 g, 6 ml, Phenomenex) est conditionnée avec 10 ml de dichlorométhane. L'échantillon est ensuite déposé puis un lavage avec 20 ml d'un mélange éther de pétrole/dichlorométhane 80:20 (v/v) est appliqué. L'élution des pesticides est réalisée avec 20 ml d'un mélange acétonitrile/dichlorométhane 95:5 (v/v). L'éluat est transféré dans un tube Zymark et évaporé jusqu'à 0,2 ml à 40 °C, sous flux d'air, à l'aide du TurboVap II. Le volume de l'extrait final est ajusté à 1 ml avec de l'eau ultra-pure. Après agitation au vortex, l'extrait est filtré sur un filtre Millex (PVDF, 0,45 µm, Millipore) puis injecté en LC-ESI-MS/MS.

#### Dosage

##### Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La séparation chromatographique est réalisée sur colonne chromatographique Pursuit PFP, 100 x 3 mm (3 µm) (Varian). La phase mobile est composée d'eau ultra-pure (A) et de méthanol (B), chaque solution étant acidifiée avec 0,02 % d'acide formique. Les insecticides sont séparés à l'aide d'un gradient d'élution dont le programme est le suivant : gradient linéaire de 80 % A (à t=0 min) à 0 % (à t=13 min), puis gradient linéaire de 0 % A (à t=13 min) à 80 % (à t=16 min) et palier à 80 % A pendant 9 min. La colonne et le passeur d'échantillons sont thermostatés à 25 °C, le débit est de 0,4 ml/min et le volume d'injection est de 20 µl.

##### Spectrométrie de masse

La source d'ionisation utilisée est l'électrospray en mode positif (ESI +). La vanne de dérivation (divert valve) est réglée pour permettre l'admission de la phase mobile dans la source entre 4,50 min et 12 min. L'analyseur de masse est un triple quadripôle

et le gaz de collision est l'argon. Le mode d'acquisition mis en œuvre est le mode SRM (Selected Reaction Monitoring). Les transitions ainsi que les temps de rétention sont présentés dans le Tableau 2 et les chromatogrammes obtenus en Figure 2.

### Résultats et conclusion

L'étalonnage est réalisé au moyen d'une gamme extraite dans la matrice « abeilles » (échantillons témoin et supplémentés). Le domaine de linéarité est défini comme étant le domaine d'étalonnage et a été validé jusqu'à 20 µg/l pour chaque pesticide et jusqu'à 40 µg/l pour l'acétamipride.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont respectivement de 0,015 ng/abeille (0,15 µg/kg) et 0,05 ng/abeille (0,5 µg/kg) pour le thiaméthoxam, la clothianidine, le thiaclopride et l'imidaclopride. Les LD et LQ sont respectivement de 0,03 ng/abeille (0,3 µg/kg) et 0,1 ng/abeille (1 µg/kg) pour l'acétamipride.

En l'absence de matériau de référence, le taux de récupération a été déterminé à l'aide d'un échantillon d'abeilles (blanc matrice) supplémenté avec les analytes à doser à deux niveaux de concentration (LQ et 5LQ). Pour chaque niveau de concentration, cinq échantillons d'abeilles ont été extraits et analysés. Deux autres séries de cinq échantillons ont également été réalisées. Les taux d'extraction moyens obtenus sont satisfaisants au regard des exigences réglementaires (Document SANCO, 2010) car, à la LQ, ils sont compris entre 93,3 % et 102,7 %, et entre 94,7 % et 104,0 % pour les échantillons supplémentés à 5LQ (Martel, 2011). La méthode est répétable et reproductible car les coefficients de variation (CV) sont ≤ 20 % pour chaque niveau de concentration.

Une série d'analyses supplémentaires a été réalisée pour déterminer la valeur du taux de récupération « réel », valeur indépendante de la matrice. Ce test a été réalisé à 3 niveaux de concentration (LQ, 2LQ et 5LQ) en comparant la surface du pic de l'analyte et celle de l'étalon interne obtenues dans une série (série 1 correspondant à une supplémentation avant extraction) par rapport à celles obtenues dans une autre série (série 2 correspondant à une supplémentation après extraction des échantillons). Les rendements ont été déterminés par comparaison des rapports obtenus dans les séries 1 et 2 (Matuszewski, 2003). Les rendements d'extraction obtenus sont compris entre 70 et 120 %.

Cette méthode permet donc de quantifier des résidus à des niveaux inférieurs aux DL50 de chaque pesticide pour l'abeille. Elle peut ainsi être appliquée sur des échantillons d'abeilles prélevés lors des problèmes de pollution environnementale, d'affaiblissements et de mortalités de colonies.



## Méthodes

Tableau 2: Transitions des pesticides étudiés et temps de rétention associés (à titre indicatif)

Pesticide	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Énergie de collision (V)
Thiaméthoxam	6,39	291,9	210,9 180,9	20 31
Imidaclopride	8,16	256,2	208,9 175,0	22 23
Diméthoate-D6	8,39	236,0	177,1 131,0	17 32
Clothianidine	8,47	250,0	169,0 131,9	18 19
Acétamipride	9,38	222,9	125,9 99,1	28 43
Thiaclopride	10,57	252,9	126,0 90,1	28 44

Paramètres de la source d'ionisation et de l'analyseur de masse : électrospray en mode positif (ESI +); température du capillaire = 350 °C; sheath gas (azote) = 40; auxiliary gas (azote) = 20; spray voltage = 4000 V; pression gaz de collision (argon) = 1mTorr.

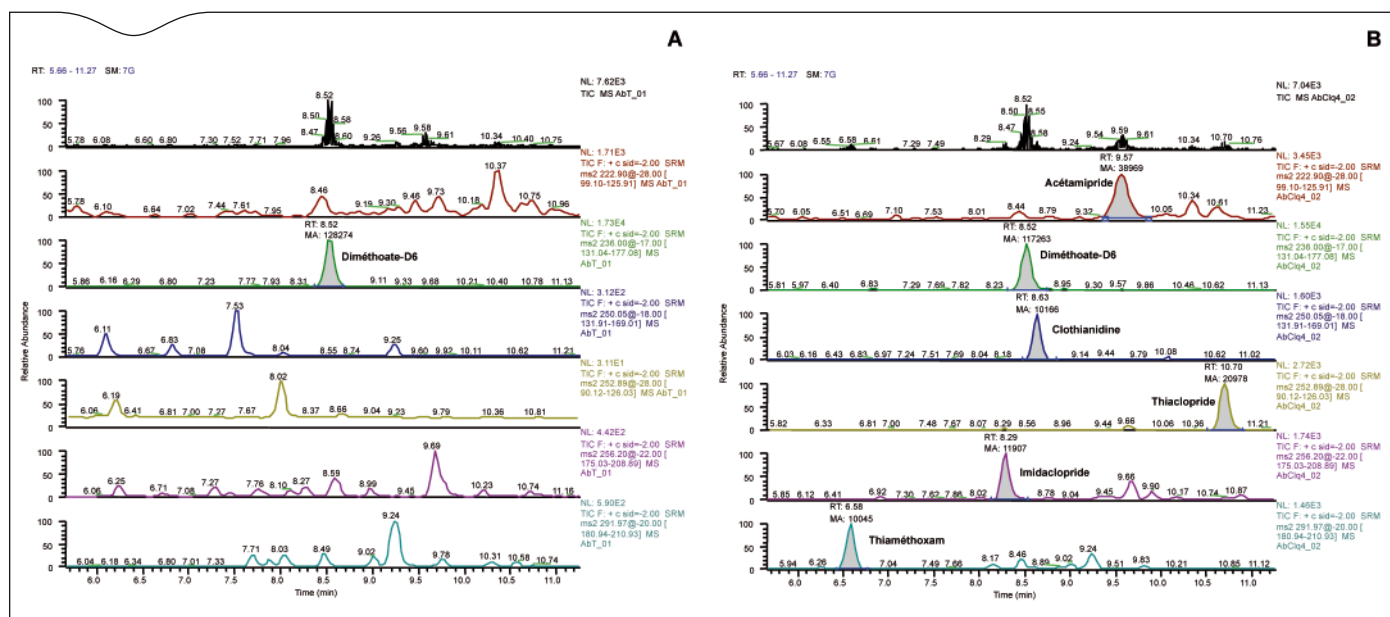


Figure 2. Chromatogrammes (courant ionique total et ions extraits) obtenus en LC-MS/MS pour (A) l'échantillon d'abeilles témoin et pour (B) l'échantillon d'abeilles supplémenté avec les pesticides à la LQ

### Références bibliographiques

Afssa. 2008. Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. Rapport, France: 218 p. [consulté le 13 mai 2011]. <http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/094000076/0000.pdf>

AGRITOX, 2011, Base de données sur les substances actives phyto-pharmaceutiques. [consulté le 13 mai 2011] <http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>

European Commission. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document N° SANCO/10684/2009 (01/01/2010). [consulté le 13 mai 2011] [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)

Martel A.C., Lair C. 2011. Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 91 (10): 978-988.

Matuszewski B.K, Constanzer M.L, Chavez-Eng C.M. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.



## Méthodes

### Les méthodes de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) au moyen de peroxyde d'hydrogène sont-elles des alternatives au formaldéhyde ?

P. Maris (pierre.maris@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Fougères, Fougères, France

P. Maris (2012). *Les méthodes de désinfection des surfaces par voie aérienne au peroxyde d'hydrogène sont-elles des alternatives au formaldéhyde ?*, EuroReference, N° 6, ER06-12M02. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PNB001.htm>



L'utilisation des propriétés bactéricides des gaz remonte à des temps très anciens. C'est Ulysse qui, de retour d'Ithaque après vingt ans d'absence, adresse à sa nourrice Eurycle les vers suivants « *Vieille femme, apportez le soufre, remède des maux, apportez aussi le feu pour que je purifie le palais* », puis, après qu'il eût massacré, avec l'aide de son fils Télémaque, les prétendants à son trône en train de festoyer dans son palais Eurycle raconte : « *Maintenant tous ces corps sont rassemblés sous les portiques de la cour; votre époux, qui vient d'allumer un grand feu, purifie avec le soufre ses superbes demeures* » (Torck, 1985). Au Moyen-Âge, lors d'épidémies de peste, à côté des quarantaines, les maisons contaminées étaient traitées à l'aide de fumée de paille, de soufre, d'antimoine et d'arsenic. À la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, le premier procédé de désinfection des surfaces par voie aérienne est codifié par Guyton-Morveau qui eut l'idée de faire dégazer l'acide chlorhydrique par l'action de l'acide sulfurique sur le sel marin (Chaigneau, 1977). Ce procédé très utilisé pendant les guerres de la Révolution et de l'Empire pour la désinfection des prisons et hôpitaux, disparut progressivement du fait de son agressivité alors qu'on assistait à l'apparition du formaldéhyde dont les propriétés bactéricides furent découvertes par Loew en 1888 et confirmées plus tard par Buchner et Segall. À partir de là, les publications d'inventions de procédés de diffusion pour le « traitement de l'air » n'ont pas arrêté.

La contagion aéroportée de maladies fut suspectée depuis fort longtemps et confortée depuis une cinquantaine d'années par la connaissance qu'il y a dans l'atmosphère un grand nombre de particules inertes (diamètre de 10 à 20 µm) portant quelques micro-organismes vivants (Noble, 1963). Pour faire face à cela, aujourd'hui les procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne sont d'application très large notamment dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, hospitaliers, élevages, couvoirs, laboratoires, isolateurs, stations expérimentales... Ce sont le plus souvent les mêmes procédés utilisés dans ces environnements aussi divers, d'où cette difficulté de pouvoir transposer des conditions d'applications d'un domaine à l'autre. En conséquence, la contrainte qui s'impose aux utilisateurs est de devoir mettre en place des procédures de validation adaptées à leur environnement propre. Aujourd'hui, les procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) et les méthodes d'évaluation de leur efficacité sont décrits dans une norme française (NF T 72-281), seule norme en Europe traitant de ce sujet. Deux types de procédés sont couverts par cette norme :

- les procédés automatiques de désinfection, réalisés hors présence humaine, utilisant la dispersion de gouttelettes ou de gaz;
  - les procédés manuels, ou dispersats dirigés, réalisés en présence humaine à l'aide d'un pulvérisateur manuel, pneumatique et, ou électrique manœuvré par un opérateur.
- Ce début du XXI<sup>e</sup> siècle est marqué par une série d'évolutions très significatives impactant sur les choix et les conditions d'application de ces procédés de DSVA :
- une évolution réglementaire en Europe sur les produits chimiques et leurs impacts sur la santé humaine;
  - des préoccupations sanitaires liées à l'abandon du formaldéhyde;

- l'émergence de méthodes de décontamination apparues dans les années 1990, en premier lieu dans le milieu de l'industrie pharmaceutique.

#### Dispositions réglementaires

- Les dispositions du décret n° 2001-97 du 1<sup>er</sup> février 2001, établissant les règles particulières de prévention des risques cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction et modifiant le code du travail, s'appliquent pour le formaldéhyde et toute préparation qui en contient plus de 0,1 %. L'arrêté du 13 juillet 2006 (modifiant l'arrêté du 5 janvier 1993 fixant la liste des substances, préparations et procédés cancérigènes au sens du deuxième alinéa de l'article R.231-56 du code du travail) inclut le formaldéhyde. Il est classé en groupe 1 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et reste classé cancérigène de catégorie 3 avec la phrase de risque R 40 au niveau européen. Cette position française, et peut-être future position européenne, a relancé le regain d'intérêt pour la DSVA alors qu'il est fait obligation en France de recherche d'alternatives au formaldéhyde.
- La directive Biocides 98/8/CE du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides : la mise en application de cette directive a, entre autres objectifs, celui d'évaluer les effets dangereux des substances et produits biocides ainsi que leurs risques en terme d'exposition, tout cela en relation avec leur efficacité. De plus, à cette directive il faut associer le règlement européen REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) n° 1907/2006 du 18 décembre 2006 dont la mise en œuvre date du 1<sup>er</sup> juin 2007.
- Afin d'apprécier l'efficacité potentielle des procédés de DSVA préalablement à leur mise sur le marché, la méthode



## Méthodes

de référence est la norme AFNOR NF T 72-281 « Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne - Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide et sporicide », récemment proposée au niveau européen dans le cadre du CEN TC 216 en ce début d'année 2011.

- Pour les laboratoires, il ne faut pas oublier non plus l'arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, pour les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

Aujourd'hui, très peu de substances chimiques sont utilisables comme gaz pour la stérilisation chimique ou en application désinfectante. Sur la base de leur mode d'action, elles se regroupent parmi les agents alkylants (formaldéhyde, oxyde d'éthylène, oxyde de propylène, bêta-propionolactone) et les agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, acide peracétique, dioxyde de chlore, ozone) (Block, 2001).

### Quelques fondamentaux

Classiquement, dans une démarche de sélection de produits pour ce type d'application dite DSVA, les propriétés à considérer sont les suivantes (Block, 2001):

- **sûr**: ne pas présenter de risque pour le personnel. S'il est souhaitable que de tels produits puissent être non toxiques, cela est malheureusement incompatible avec un bon niveau d'efficacité bactéricide, sporicide, fongicide, tuberculocide et virucide. En conséquence, des moyens de prévention doivent pouvoir être mis en place pour éviter les expositions, et il devra être possible de réduire le niveau de résidus à un niveau acceptable pour la sécurité du personnel;
- **contrôlable**: des mesures chimiques ou, et biologiques doivent pouvoir être mises en place afin d'assurer des contrôles sur différents plans: des contrôles lors du déroulement de l'opération de DSVA (indicateurs biologiques et chimiques) et lors de l'élimination du gaz après traitement permettant ainsi de pouvoir réinvestir les lieux en toute sécurité. Ces contrôles permettent dans le même temps d'optimiser les conditions d'application de ces traitements;
- **stabilité des molécules**: si lors du traitement proprement dit, la substance doit conserver sa stabilité, sa dégradation en sous-produits non nocifs est souhaitable lors de son élimination;
- **compatibilité avec les matériaux**: ces substances sont par nature chimiquement très réactives, raison de leur efficacité, et devraient être appliquées dans des conditions optimales limitant leur agressivité vis-à-vis de matériaux souvent nombreux et variés. De plus, de nouveaux matériaux apparaissent régulièrement, en conséquence de quoi une réflexion régulière doit être conduite;
- **action rapide et réoccupation des locaux rapide**: suivant les secteurs dans lesquels ces procédés sont appliqués (industries alimentaires ou pharmaceutiques, élevages, couvoirs, laboratoires, stations expérimentales...) les contraintes d'organisation du travail ne sont pas les mêmes; le choix des procédés et leurs conditions d'utilisation doivent donc intégrer ces contraintes;
- **perméabilité et diffusion**: les environnements à traiter peuvent être très différents en termes de volumes, de géométries et d'encombrements. D'une part, les matériels

ne sont pas toujours démontables, créant des obstacles pour une bonne diffusion du produit, d'autre part, il peut être nécessaire d'atteindre des recoins, véritables niches à micro-organismes, difficiles d'accès par les techniques d'application classique comme la pulvérisation. Dans ces cas, favoriser le brassage du produit diffusé pourrait s'avérer nécessaire afin d'homogénéiser le traitement en tout point du local. Une autre conséquence importante sera la mise en place et la répartition d'indicateurs biologiques ou, et chimiques permettant de valider l'efficacité d'une procédure de DSVA;

- **émissions dans l'environnement**: suivant la capacité de diffusion, le degré de décomposition des produits et le type d'environnement dans lequel se déroulent ces opérations, une vigilance particulière doit être assurée sur les risques d'émissions hors du local.

### La fumigation de formaldéhyde

Paradoxalement, la bibliographie accessible sur ce mode d'application du formaldéhyde, si elle est riche et ancienne, elle est moins fournie ces vingt dernières années que celle concernant le peroxyde d'hydrogène et fait moins l'objet de controverses. La très longue utilisation du formaldéhyde trouve son origine dans la connaissance empirique de son efficacité depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Cependant, plus récemment et après les événements du 18 septembre 2001 concernant l'envoi, par voie postale, de lettres contaminées par *Bacillus anthracis*, un certain nombre de travaux ont été relancés (Rogers, 2007).

Cette substance active agit comme un agent alkylant des groupements amine et sulfhydryle des protéines, et des atomes d'azote des noyaux des bases puriques de l'ADN (Block, 2001). La fumigation peut être obtenue par chauffage de formaldéhyde en solution aqueuse à 30-35 % m/v contenant du méthanol évitant sa polymérisation, ou de paraformaldéhyde, polymère de formaldéhyde se présentant sous forme solide sublimable par effet de la chaleur, au de-là de 150 °C. Un autre procédé, découvert de façon accidentelle en 1906, consiste en la production de gaz formaldéhyde par réaction du permanganate de potassium sur une solution de formol. Par mètre cube du local à traiter, il convient d'ajouter 20 g de permanganate de potassium à 40 ml de formaldéhyde en solution à 37 % (Cadirci, 2009; Furuta, 1977).

En dépit de son usage très large, le formaldéhyde présente des dangers du fait:

- qu'il provoque une irritation de la peau, des yeux et des muqueuses;
- qu'il provoque, inhalé en petites quantités, toux et nausées;
- qu'il est suspecté de produire, à long terme, par voie aérienne, un cancer du naso-pharynx.

À côté de sa toxicité, ce procédé souffre d'autres inconvénients: la nécessité de temps de contact de plusieurs heures, le dépôt de résidus sur les surfaces par repolymérisation du monomère formaldéhyde, le besoin d'un haut niveau d'humidité (70 à 80 % HR), une température optimale de 18 à 22 °C, de fortes concentrations (4 à 10 g/m<sup>3</sup>) (Hoffmann, 1970) et un long temps d'élimination avant la réintroduction du personnel ou des animaux.

Citons, pour illustration, un exemple des différentes phases de mise en œuvre de ce procédé:

- (1) rendre étanche le local et le conditionner (température et humidité);
- (2) vaporisation du formaldéhyde (20 à 30 min);



## Méthodes

- (3) temps de contact : 8 à 10 heures pour obtenir une réduction forte de la population bactérienne ou virale, dans les conditions optimales de doses, de température et d'humidité relative;
  - (4) neutralisation du formaldéhyde par l'ammoniac (environ 2 heures) produit par chauffage à 120 °C de carbonate d'ammonium (7,5 g/m<sup>3</sup>) (Abraham, 1997);
  - (5) élimination de l'ammoniac résiduel (environ 1 heure).
- Ces phases (4) et (5), suivant le type d'environnement à traiter, ne sont pas toujours réalisées et il faudra attendre alors plusieurs heures voire plus de 24 heures pour l'élimination du formaldéhyde permettant la réoccupation du local.

### Indicateurs biologiques

Abraham (1997) rapporte sept ans d'expérience de décontamination de laboratoires (325 m<sup>3</sup>) et de postes de sécurité microbiologique (1,7 m<sup>3</sup>), représentant 2308 décontaminations en routine. Utilisant la sublimation du paraformaldéhyde dans un bain d'huile de silicone à 160 °C à la dose de 5 g/m<sup>3</sup> (zones laboratoires) ou la vaporisation de solution de formol à 8,5 g/m<sup>3</sup> (postes de sécurité microbiologique, PSM), et l'indicateur biologique *Geobacillus stearothermophilus* (10<sup>4</sup> spores sur coupon d'aluminium), il observe l'absence de spores survivantes dans 91 % et 81 % des situations, respectivement pour les salles et les PSM. Nous pouvons noter cependant dans ces travaux, comme dans beaucoup d'autres, que d'une part les virus n'ont pas été pris en compte et que d'autre part l'absence d'études confirmant la pertinence du choix de cet indicateur au regard des objectifs.

De son côté Munro *et al.* (1999) comparent la résistance de trois indicateurs commerciaux (*Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus subtilis*) avec *Mycobacterium bovis*, Poliovirus type 1 et *Bacillus* spp. En sublimant du paraformaldéhyde (10,6 g/m<sup>3</sup>) sous 57 % HR et à 28 °C, seul un indicateur sur les trois s'est révélé représentatif des micro-organismes testés. D'un autre côté, Rogers (2007) voulant vérifier la destruction de *Bacillus anthracis* conclut que les deux indicateurs commerciaux testés, *Bacillus subtilis* et *Geobacillus stearothermophilus*, étaient représentatifs. Citons enfin l'exemple d'Harvey (2011) qui conclut en la faible corrélation entre d'une part les virus de la fièvre aphteuse et de la maladie vésiculeuse du porc en présence de sérum de veau foetal, et d'autre part un indicateur commercial, ce dernier étant totalement inactivé alors que des chutes de titres viraux étaient de trois log<sub>10</sub>.

Un autre phénomène qu'il faut avoir présent à l'esprit est l'absorption du formaldéhyde par divers matériaux. Il est démontré que le coton et le papier ont plus d'affinité avec le formaldéhyde que des surfaces non poreuses comme le verre ou l'acier inoxydable, de sorte que l'efficacité induite est supérieure vis-à-vis des mêmes micro-organismes. Ce point doit attirer l'attention non seulement sur la nature des indicateurs biologiques mais aussi sur la nature de leur support, que ces indicateurs soient préparés dans le laboratoire lui-même ou qu'ils proviennent de fournisseurs. Cette prise en compte lors de la mise en place des essais de validation des procédés de DSV permettra d'éviter de faux résultats négatifs par excès de formaldéhyde et en conséquence une fausse sécurité (Braswell *et al.*, 1970; Spiner et Hoffmann, 1971).

### Procédés alternatifs

Le plus étudié aujourd'hui est le peroxyde d'hydrogène. Cette substance active se présente sous la forme d'un liquide incolore

à la concentration de 30 % m/m, soluble dans l'eau et de point d'ébullition de 106 °C. Sa dégradation en eau et oxygène est un argument de poids dans le choix de ce désinfectant. Quant à son mode d'action, cette substance est un oxydant qui agit en générant des radicaux libres, dont le radical hydroxyle HO<sup>•</sup>. En effet ce groupement hydroxyle produit une action létale en détruisant les membranes cellulaires par peroxydation des lipides, et agit sur les fonctions thiols des enzymes et des protéines structurales (Denyer et Stewart, 1998; Russel et Chopra, 1996).

Les modes d'action et utilisation : les technologies proposées sur le marché se différencient majoritairement en technologies dites « sèches » et « humides » :

- procédé de nébulisation (ou brouillard) : le produit est propulsé au travers d'une buse permettant d'obtenir des gouttelettes de quelques µm à 10 µm. Le volume est alors rapidement saturé par ce brouillard homogène puis les gouttelettes sédimentent sur les surfaces pour agir ;
- procédé dit « vapeur sèche » : ici, la vaporisation brutale du produit sur une plaque chaude est précédée d'une déshumidification du local. Celle-ci est telle que l'humidité relative est au-dessous du point de condensation, limitant ainsi l'effet de corrosion lié à une condensation forte. L'humidité relative du local est au départ, avant l'injection du peroxyde d'hydrogène, entre 20 % et 40 % ;
- procédé dit de « microcondensation » : dans ce cas, l'humidité relative est celle ambiante, et la vaporisation brutale produit une augmentation forte de l'humidité relative et une condensation plus prononcée.

La littérature scientifique sur les conditions optimales d'utilisation du peroxyde d'hydrogène révèle des controverses (Unger-Bimzcok *et al.*, 2008), aussi bien sur l'humidité relative et la concentration en peroxyde d'hydrogène que sur l'effet de la température. Plusieurs publications établissent une corrélation directe entre la concentration du produit dans l'air et l'efficacité antimicrobienne (Graham *et al.*, 1992; Hultman *et al.*, 2007). D'autres démontrent des vitesses de décontamination fortes à de faibles concentrations en peroxyde d'hydrogène (Sigwarth et Stärk, 2003; Wattling, 2002).

Lors de la vaporisation brutale, alors que l'humidité relative est faible, le peroxyde d'hydrogène atteint une concentration finale en gaz plus forte lorsque la condensation commence à apparaître sur les surfaces. Toutefois, la condensation est jugée incontrôlable et non souhaitée puisqu'elle accentue les problèmes de corrosion et prolonge les temps d'aération. Ce phénomène de corrosion est cependant peu étudié avec précision. Un article très récent (Hassan *et al.*, 2011) rapporte une étude sur l'effet de cette condensation sur une qualité d'acier inoxydable, en constatant que des concentrations de vapeurs à 500 et 1 000 ppm ne produisent pas d'effet sur le métal, pas plus que l'application directe d'une solution à 35 %. Par contre à une concentration de 1 600 ppm, une condensation significative se produit en altérant le métal. Ce phénomène est expliqué par l'effet de concentration qui se produit lors de cette condensation amenant le peroxyde d'hydrogène à un niveau de concentrations de l'ordre de 60-70 %.

Deux études, théoriques et pratiques, très poussées (Unger-Bimzcok *et al.*, 2008; Wattling, 2002) vont dans le même sens. Ces études évaluent le suivi des concentrations du peroxyde d'hydrogène et de l'eau dans l'air, ainsi que les microcondensations sur les surfaces. En travaillant avec des doses usuelles de peroxyde d'hydrogène (400, 600 et 800 ppm),

## Méthodes

ils concluent à une activité optimale soit à 800 ppm avec une faible humidité ou à 400 ppm avec une forte humidité. De plus, il est conclu que la condensation visible n'est pas nécessaire pour obtenir une bonne inactivation. Une trop faible microcondensation ( $1 \mu\text{g}$  de liquide/ $\text{mm}^2$ ) diminue notablement l'activité. Lorsque la microcondensation se situe entre 1 et  $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ , il se produit à 400 ppm une diminution forte de la valeur de D (temps nécessaire pour diviser par dix la population de micro-organismes), celle-ci passant de 14 min à 4 min. Mais au-dessus d'une microcondensation de  $2,9 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ , il n'y a plus d'amélioration de l'inactivation.

Au final, sur la base des connaissances actuelles, les différentes approches en matière de cycles de DSVa peuvent être envisagées avec des niveaux de performances comparables, avec l'observation que la microcondensation subvisible peut être suffisante pour obtenir une forte inactivation, réduire les difficultés d'aération et limiter les risques de corrosion.

Les applications potentielles de ces procédés sont aussi larges que celles du formaldéhyde, sachant que les domaines pharmaceutiques, laboratoires voire hospitaliers ont été jusqu'à présent davantage concernés. Dans le domaine avicole, notamment pour la décontamination des œufs, relativement peu de travaux ont été réalisés sachant que le mode d'application est essentiellement sous forme de brouillard. Suivant les auteurs, la concentration utilisée varie de 1,5 % à 5 % de peroxyde d'hydrogène, sans affecter l'éclosabilité (Bailey *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 1999; Sander et Wilson, 1999; Sheldon et Brake, 1991).

D'autres études méritent d'être signalées, comme celles de Heckert (1997) rapportant des essais sur l'efficacité d'un procédé « vapeur sèche » ciblant des virus des animaux. La résistance d'agents viraux représentatifs de différentes familles (Orthomyxoviridae, Réoviridae, Flaviviridae, Paramyxoviridae, Herpétoviridae, Picornaviridae) a été évaluée. Des inoculum ont été déposés sur des coupons de verre ou d'acier en présence de diverses matières interférentes, puis exposés au peroxyde d'hydrogène après vaporisation brutale d'une solution à 30 % (2 g de solution par minute et pendant 30 min). Ces conditions se sont révélées très efficaces avec toutefois la remarque suivante : à la différence du sérum de veau comme matière organique interférente, la présence d'érythrocytes affecte notablement l'efficacité du peroxyde d'hydrogène ; une explication avancée est la présence de catalase et peroxydase dans ces cellules. Par ailleurs ce type de procédé a démontré son intérêt pour l'inactivation, autant *in vitro* qu'*in vivo*, de différents souches du prion (Fichet *et al.*, 2007).

À l'instar de ce qui a été développé précédemment pour le formaldéhyde, la validation des conditions d'application de la procédure de DSVa par le peroxyde d'hydrogène est une étape essentielle lors de la mise en place de ces traitements. Cette étape de validation suppose un choix d'indicateurs biologiques pertinents, c'est-à-dire représentatifs des contaminants biologiques rencontrés dans des souillures diverses, à des températures et des hygrométries judicieuses. De plus, leur nombre et leur positionnement doivent faire l'objet d'une stratégie adaptée au volume, à la géométrie, à l'agencement et à l'encombrement de chaque local.

Ces difficultés sont bien mises en évidence par les travaux de Quanten (2011). Dans une expérimentation comparant les deux types de procédés (« sec » et « humide »), ces deux technologies se sont montrées de performance équivalente. Cependant, suivant la nature de la souillure, l'indicateur commercial retenu

(*Geobacillus stearothermophilus*) était pertinent pour les bactéries (*Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*) mais moins pour les virus et notamment les virus de la fièvre aphteuse et de la peste porcine. D'autres micro-organismes, tels les mycobactéries ou *Staphylococcus aureus*, ont également montré une plus grande résistance en comparaison avec l'indicateur commercial *Geobacillus stearothermophilus* lors d'un traitement au peroxyde d'hydrogène à la concentration de 750 ppm (Bennett, 2011).

### Conclusion

Au-delà des raisons qui justifient pleinement la remise en cause de l'utilisation du formaldéhyde et la recherche d'alternatives, l'emploi en désinfection des surfaces par voie aérienne du peroxyde d'hydrogène et du formaldéhyde présente beaucoup de similarités au niveau de la nécessaire maîtrise de paramètres essentiels à la réussite de ces opérations, mais révèle aussi un certain nombre d'interrogations pour la garantie d'un maximum de sécurité.

Les procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne utilisant le peroxyde d'hydrogène sont des procédés performants et il n'a pas été identifié de réelles différences entre les deux grands procédés sur le marché aujourd'hui (« vapeur sèche » et « vapeur humide »). Chaque environnement à traiter étant particulier, il faut prendre conscience du fait que la recette universelle n'existe pas et qu'une démarche de validation des conditions d'application s'impose. Au préalable, l'environnement doit être conditionné en termes de température et d'hygrométrie en évitant un différentiel trop important entre la température de l'air et celle des surfaces. Pour que la distribution du gaz soit homogène, la géométrie des locaux étant plus ou moins complexes et ceux-ci plus ou moins encombrés, un brassage de l'air par des ventilateurs peut s'avérer nécessaire. Une réflexion poussée doit être conduite sur le choix et le nombre des indicateurs biologiques nécessaires à la validation ou au suivi du niveau de performance de ces opérations. Ceux classiquement employés (*Bacillus atropheus* et *Geobacillus stearothermophilus*) sont les indicateurs de référence pour suivre les opérations de stérilisation par la chaleur humide ou la chaleur sèche, mais ne sont pas toujours pertinents pour ce type d'application. Enfin, ils ne tiennent pas compte de la large diversité des souillures dans lesquelles ces micro-organismes peuvent être retrouvés.

### Références bibliographiques

- Abraham G, Le Blanc Smith PM, Nguyen S. 1997. The effectiveness of gaseous formaldehyde decontamination assessed by biological monitoring. *J of the American Biological Safety Association*, 2 (1): 30-38.
- Bailey JS, Cox NA, Berrang ME. 2001. Bactericidal treatment of hatching eggs III: Effect of organic contaminants on efficacy of egg sanitizers. *J App. Poult Res*, 10: 117-120.
- Bennett A. 2011. Assessment of the limitations of gaseous disinfectants for containment and animal laboratories. Workshop Formaldehyde Replacement – Epizone. Lelystad, Pays-Bas. 11-12 janvier 2011.
- Block SS. 2001. Gaseous chemical sterilization. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 337-359.
- Braswell JR, Spiner DR, Hoffmann RK. 1970. Adsorption of formaldehyde by various surfaces during gaseous decontamination. *Appl Microbiol*, 20 (5): 765-769.
- Cadirci S. 2009. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation – a review. *Archiv für Efflugkunde*, 73, 2: 116-123
- Chaigneau M. 1977. Stérilisation et désinfection par les gaz. *Maisonnette éd.*, 344 p.





## Méthodes

Cox NA, Berrang ME, Buhhr RJ, Bailey JS. 1999. Bactericidal treatment of hatching eggs – II: Use of chemical disinfectants with vacuum to reduce *Salmonella*. J Appl Poultry Res 8: 321-326.

Denyer SP, Stewart GSAB. 1998. Mechanisms of action of disinfectants. International Biodeterioration and Biodegradation, 41: 261-8.

Fichet G, Antloga K, Comoy E, Deslys JP, McDonnell G. 2007. Prion inactivation using a new gaseous hydrogen peroxide sterilization process. J of Hospital Infection, 67: 278-286.

Furuta K, Sato S. 1977. Studies on the disinfection of hatching eggs. Japan Poultry Sci 14 (1): 27-32.

Graham GS, Rickloff JR, Dalmasso JP. 1992. Sterilization of isolators and lyophilisers with hydrogen peroxide in the vapour phase. In: Proceedings of the Parenteral Drug Association, Basel, Switzerland: 32-51.

Hassan M, Overfelt RA, Haney RL, Fergus JW. 2011. Hydrogen embrittlement of 4340 steel due to condensation during vaporized hydrogen peroxide treatment. Materials Science and Engineering A, sous presse.

Harvey Y. 2011. Experience and studies on formaldehyde fumigation at the Institute for Animal health. Workshop Formaldehyde Replacement – Epizone. Lelystad, Pays-Bas. 11-12 janvier 2011.

Heckert RH, Best M, Jordan LT, Dulac GC, Eddington DL, Steritt WG. 1997. Efficacy of vaporized hydrogen peroxide against exotic animal viruses. Appl and Envir Microbiol, 63, 10: 3916-3918.

Hoffmann RK, Spiner DR. 1970. Effect of relative humidity on the penetrability and sporicidal activity of formaldehyde. Applied Microbiol, 20: 616-619.

Hultman C, Hill A, McDonnell G. 2007. The physical chemistry of decontamination with gaseous hydrogen peroxide. Pharm Eng, 27(1):22-32

Munro K., Lanser J, Flower R. 1999. A comparative study of methods to validate formaldehyde decontamination of biological safety cabinets. Appl and Applied and Environ Microbiol, 65, 2: 873-876

Noble WC, Lidwell OM, Kinston D. 1963. The size distribution of airborne particles carrying microorganisms. J Hyg Camb, 1963, 61: 385-391

Quanten K et Koenen F. 2011. Vaporised hydrogen peroxide: a promising alternative for formaldehyde fumigation? Workshop Formaldehyde Replacement – Epizone. Lelystad, Pays-Bas. 11-12 janvier 2011.

Rogers JV. 2007. Formaldehyde gas inactivation of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus* spores on indoor surface materials. J of Applied Microbiol, 103: 1104-1112

Russel AD, Chopra I. 1996. Understanding antibacterial action and resistance, 2nd ed, Ellis Horwood, Chichester, UK.

Sander JF, Wilson JL. 1999. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. Avian Diseases, 43: 227-233

Sheldon BW, Brake J. 1991. Hydrogen peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. Poultry Sciences, 70 (5): 1092-1098

Sigwarth V, Stärk A. 2003. Effect of carriers materials on the resistance of spores of bacillus stearothermophilus to gaseous hydrogen peroxide. PDA J Pharm Sci Technol, 57(1):3-11

Spiner DR, Hoffmann RK. 1971. Effect of relative humidity on formaldehyde decontamination. Appl Microbiol, 22 (6): 1138-1140

Torck M. 1985. L'oxyde d'éthylène: agent de stérilisation. Bull Soc Pharm, 1: 103-127

Unger-Bimzcok B, Kottke V, Hertel C, Rauschnabel J. 2008. The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor. J Pharm Innov, 3: 123-133

Wattling D. 2002. Theoretical analysis of the condensation of hydrogen peroxide gaseous and water vapour as used in surface decontamination. PDA J Pharm Sci Technol, 56(6):291-9



## Méthodes

### Organisation d'essais interlaboratoires de validation à l'échelle européenne pour la détection de *Gibberella circinata* dans les semences de pins

R. Ios (renaud.ios@anses.fr), C. Fourrier

Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité de mycologie, Nancy, France

R. Ios, C. Fourrier (2012). Organisation d'essais interlaboratoires de validation à l'échelle européenne pour la détection de *Gibberella circinata* dans les semences de pins, EuroReference, N° 6, ER06-12M03. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PND001.htm>

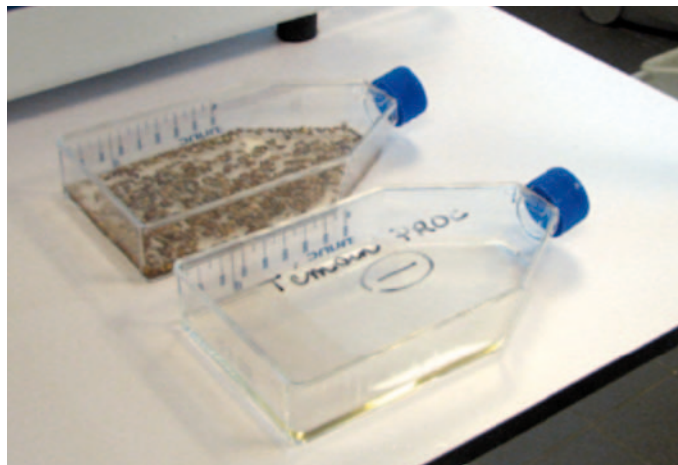


***Gibberella circinata* est un champignon parasite des pins faisant l'objet de mesures d'urgences phytosanitaires européennes depuis 2007. Les semences de pins sont les principaux moyens de dissémination à longue distance de ce champignon et des outils de détection fiables et pratiques sont requis pour contrôler la qualité sanitaire des lots de semences importés et commercialisés en Europe. Le Laboratoire de la santé des végétaux a pris le leadership d'un projet européen EUPHRESKO visant à sélectionner et évaluer par essai interlaboratoires un ou plusieurs protocoles de détection ciblant ce parasite, ainsi qu'une méthode d'échantillonnage appropriée. Ce projet permettra aux états membres, aux laboratoires de référence ainsi qu'aux acteurs de la filière de disposer d'un ou plusieurs protocoles consensuels et validés dont le niveau de performance aura été déterminé par le biais d'une collaboration internationale.**

*Gibberella circinata* (anamorphe *Fusarium circinatum*) est un champignon phytopathogène responsable de la maladie du chancre résineux des pins (pine pitch canker). Cette maladie affecte exclusivement les espèces de *Pinus* mais a été aussi décrite sur pin douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Cette maladie constitue une menace sérieuse sur les pins forestiers, causant des taux de mortalité important en cas d'attaque sévère, mais induisant *a minima* une réduction de la croissance et de la qualité du bois. Ce champignon peut en outre contaminer de façon cryptique les semences de pins, et causer des fontes de semis en pépinière. *G. circinata* est officiellement décrit aux USA, Mexique, Haïti, Afrique du Sud, Japon, Chili (Anonymous, 2005) et a été récemment rapporté en Europe, principalement dans des pépinières espagnoles, françaises et portugaises, mais aussi dans des zones limitées de milieu naturel en Italie et en Espagne (Wingfield *et al.*, 2008). *G. circinata* est

principalement un parasite de blessure et pénètre dans l'hôte par le biais de morsures d'insectes foreurs, les pratiques de taille, et les blessures liées aux événements climatiques. Le champignon se propage d'arbre en arbre par la dispersion aérienne de propagules asexuées (micro- ou macro-conidies), ou bien être véhiculé par les insectes (Gordon *et al.*, 2001). Néanmoins, sa dispersion à longue distance résulte de transport de matériel végétal infecté, comme les semences (Storer *et al.*, 1998). En effet, des semences de *Pinus* infectées sont très probablement responsables de l'introduction de l'agent du Pitch Canker en Californie (Gordon *et al.*, 2001) et en Afrique du sud (Britz *et al.*, 2001). Ce parasite est actuellement soumis à des mesures d'urgences réglementaires au niveau européen (Anonymous, 2007) et les pays membres ont l'obligation de conduire des plans de surveillance à son égard. L'EFSA a récemment présenté un avis concernant l'évaluation du risque phytosanitaire et des options de gestion de la maladie. Ses conclusions suggéraient que les semences de pin constituaient le facteur de risque le plus important pour la dissémination du parasite (EFSA Panel on Plant Health, 2010).

Il existe actuellement plusieurs méthodes morphologiques et moléculaires pour confirmer l'identité du champignon isolé en culture pure ou pour le détecter directement *in planta*. Les méthodes qui ont été décrites dans le protocole de diagnostic OEPP PM 7/91(1) (Anonymous, 2009) incluent des tests PCR-RFLP (Polymerase Chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), des tests PCR conventionnels et en temps réel. Plusieurs de ces protocoles utilisent en partie ou totalement des techniques développées par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des végétaux (Ios *et al.*, 2009). L'objectif majeur de ce projet consistait à évaluer différents de ces protocoles sur des semences de pins *via* des essais interlaboratoires de validation impliquant des laboratoires de référence européens. *In fine*, l'analyse des résultats obtenus devrait permettre de produire des valeurs de performances pour ces protocoles afin d'aider les laboratoires de référence européens et les organisations phytosanitaires des pays



Semences de pins et contrôle négatif en cours d'enrichissement biologique



## Méthodes

membre à choisir et utiliser le protocole qui correspond le mieux à leur attente en matière de seuil de détection, et de sensibilité et spécificité relatives.

### Le projet EUPHRESKO

EUPHRESKO (<http://www.euphresco.org/>) est un projet financé par le réseau EU FP6 ERA-NET (European Research Area - Network) sur la période 2006-2010. EUPHRESKO vise à améliorer la coopération et la coordination des programmes de recherche phytosanitaire (phytopathogènes et ravageurs réglementés ou émergents) au niveau européen à travers la mise en place de réseaux d'activités de recherche et l'ouverture mutuelle de programmes nationaux. Pour ce projet spécifique d'essais interlaboratoires sur *Gibberella circinata*, le mécanisme financier qui a été retenu par les pays partenaires était le système non compétitif, dans lequel chaque organisation de recherche de chaque pays est responsable de son propre financement.

L'unité de mycologie du Laboratoire de la santé des végétaux a proposé de prendre en charge l'organisation et le suivi de ce projet: i) préparation et rédaction du projet soumis aux pays membre pour demande d'accord de partenariat, ii) préparation d'un calendrier pour le projet, iii) préparation de l'organisation générale des essais interlaboratoires (définition de la nature et du nombre d'échantillons) et coordination de son déroulement, iv) traitement statistique des résultats et rédaction du rapport final.

### Recrutement des laboratoires participants et sélection des protocoles

Un appel à participation a été lancé fin 2010 via le réseau EMN (*European Mycological Network*) qui rassemble les unités de mycologie de nombreux laboratoires européens de référence en charge de la santé réglementaire des végétaux. Douze laboratoires représentant 11 pays ont au final manifesté leur intérêt à participer à ce projet (Tableau 1).

Un total de neuf protocoles est disponible dans la littérature (Tableau 2). Afin de réduire les coûts pour les participants et d'augmenter la puissance statistique des essais, une première étape a consisté pour les 12 partenaires à voter pour trois protocoles parmi les neuf, en motivant leur choix par i) la maîtrise actuelle du protocole, ii) la facilité de mise en œuvre du protocole, ou encore iii) la perspective d'utiliser en routine le protocole. Les trois protocoles ayant remporté le plus de suffrages ont été retenus pour les essais interlaboratoires (Tableau 2). Les participants devant par la suite choisir de tester individuellement un, deux ou trois de ces protocoles.

### Taille des échantillons

La norme ISPM N°31 (International Plant Protection Convention, 2008) traite de façon complète le problème de l'échantillonnage. Dans le domaine des affaires phytosanitaires, et d'après ces normes, un échantillonnage statistiquement fondé est basé sur un certain pourcentage d'infection avec un niveau de confiance

Tableau 1. Liste des partenaires impliqués dans le projet « *Gibberella circinata* »

Belgique (Wallonie)	Portugal	France
Anne Chandelier [chandelier@cra.wallonie.be] Walloon Agricultural Research Centre (CRAW) Department of Life Science Marchal Building, rue de Liroux, 4 B-5030 Gembloux	Eugénio Luís de Fraga Diogo [eugenio.diogo@inrb.pt] Instituto Nacional de Recursos Biológicos, IP/L-INIA, Unidade de Investigação de Proteção de Plantas (UIPP), Laboratório de Micologia Edifício 1 – Tapada da Ajuda 1349 - 018 Lisboa	Céline fourrier [celine.fourrier@anses.fr] Anses Laboratoire de la santé des végétaux Unité de Mycologie Domaine de Pixérécourt, BP 90059, 54220 Malzéville
Belgique (Flandres)	Irlande	Italie
Sven Inghelbrecht [sven.inghelbrecht@ilvo.vlaanderen.be] Institute for Agricultural and Fisheries Research Plant Sciences Unit - Crop protection Burg. van Gansberghelaan 96 bus 2, 9820 Merelbeke	James Choiseul [James.Choiseul@agriculture.gov.ie] Department of Agriculture, Fisheries and Food DAFF Laboratory Complex, Backweston, Celbridge, Co. Kildare	Luca Riccioni and Tiziana Annesi [luca.riccioni@entecra.it] Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura. Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale (CRA-PAV) Via C.G. Bertero 22, I-00156 Rome
Royaume-Uni	Espagne	Danemark
Victoria Barton [Victoria.Barton@fera.gsi.gov.uk] The Food and Environment Research Agency 04GA08/09, Sand Hutton YO41 1LZ	Ana M <sup>a</sup> Pérez Sierra [aperesi@eaf.upv.es] Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos Instituto Agroforestal Mediterráneo Universidad Politécnica de Valencia Camino de Vera s/n - 46022 Valencia	Henrik Jørskov Hansen [hjh@pdir.dk] Seed and Plants, Diagnostic Laboratory in Plants, Seed and Fodder, Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Plantedirektoratet Skovbrynet 20, 2800 Kgs. Lyngby
Lettonie	Roumanie	Pays-Bas
Kristine Paruma [kristine.paruma@vaad.gov.lv] State Plant Protection Service National Phytosanitary Laboratory Lielvārdes str. 36/38, Rīga, LV-1006, Latvia	Adam Mariana [adam.mariana@lccf.ro] Central Laboratory for Phytosanitary Quarantine. 11 Afumati. 077190 Bucharest	Patricia van Rijswijk [p.van.rijswijk@minlnv.nl] Plant Protection Service Wageningen, The Netherlands



## Méthodes

spécifique, et requiert donc que les « clients » potentiels des analyses (e.g. organisations nationales chargées de la protection des plantes, ONPP) déterminent *a priori* certains des paramètres interdépendants suivants: niveau acceptable de contamination, niveau de détection, degré de confiance, efficacité de détection, et taille de l'échantillon analysé. Certains de ces paramètres sont déterminés par la performance de la méthode, d'autres sont des choix assumés du « client »; et *in fine*, la taille appropriée d'échantillon à analyser peut en être déduite.

De plus, la méthode d'échantillonnage la plus appropriée doit être choisie. Étant donné l'épidémiologie du parasite et sa nature cryptique dans les semences qu'il infecte (pas de symptôme externe visible), la distribution de – et le taux de contamination par – *G. circinata* dans un lot de semence est imprédictible. La méthode d'échantillonnage aléatoire simple est donc la plus appropriée dans ce cas de figure.

Un autre des objectifs de ce projet EUPHRESKO « *Gibberella circinata* » est de questionner les différentes ONPP afin de recenser les différentes valeurs envisageables des paramètres cités plus haut. Une proposition d'homogénéisation de ces derniers sera proposée par le laboratoire de la santé des végétaux, ce qui permettra de définir une taille d'échantillon statistiquement valide. Dans l'attente de ce retour d'enquête, la taille de 400 graines/lot, déjà proposée par la norme ISTA (International Seed Testing Association, 2002) a été retenue, pour des raisons pratiques. Cette taille pourra donc être réévaluée à l'issue du processus de consultation des ONPP.

### Nature et préparation des échantillons

En accord avec les recommandations de l'OEPP (Anonymous, 2010) et de la norme ISO 16140 (International Standardization Organization, 2003), chaque série d'échantillons à tester devait à minima comporter trois types de statut :

- i) lots témoins négatifs (semences indemnes de *G. circinata*);
- ii) lots contaminés légèrement au-dessus de la limite de détection (supposée correspondre à une semence contaminée parmi 400, à minima pour le protocole par isolement mycologique);
- iii) lots contaminés à un niveau correspondant à dix fois la limite de détection (i.e. 10 semences contaminées parmi 400).

De plus, iv) des contrôles négatifs de spécificité ont été introduits par l'organisateur. Ces lots de semences ont été contaminés avec d'autres espèces de *Fusarium* spp., proches de *Fusarium circinatum* d'un point de vue morphologique (permet de vérifier la spécificité du protocole utilisant l'identification morphologique), ou phylogénétique (permet de vérifier la spécificité du protocole utilisant des tests moléculaires). En revanche, afin de réduire les coûts pour les participants, le nombre de réplicats à tester par type de contamination a été réduit de huit à trois. Au final, pour chaque protocole testé, chaque participant aura à tester quatre types de contamination x 3 réplicats, soit 12 échantillons de 400 semences.

La préparation des échantillons artificiellement contaminés a été confiée à l'institut Italien CRA PAV, partenaire du projet (Tableau 1). Le coût de la préparation et de l'expédition des échantillons de graines était à la charge de chaque participant. Pour l'importation de lots de semences artificiellement contaminés par *G. circinata*, organisme réglementé, chaque

**Tableau 2. Liste des protocoles disponibles pour la détection de *Gibberella circinata* dans des semences de pins. Les protocoles en gras ont été finalement retenus après vote de sélection par les partenaires du projet.**

	Protocole	Technique	Référence
1	Isolement / identification morphologique	Isolement mycologique sur milieu Komada + identification par caractérisation morphologique	Protocole EPPO <i>G. circinata</i> PM 7/91(1)
2	<b>Isolement / identification morphologique</b>	Isolement mycologique sur milieu DCPA + identification par caractérisation morphologique	Protocole EPPO <i>G. circinata</i> PM 7/91(1)
3	Isolement / analyse PCR-RFLP*	Isolement mycologique sur milieu DCPA + amplification du gène H3 par PCR + analyse RFLP	Steenkamp <i>et al.</i> (1999)
4	<b>Isolement / test PCR conventionnel (ou SybrGreen) sur IGS**</b>	Isolement mycologique sur milieu DCPA + PCR conventionnelle (ou SybrGreen) ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS à partir d'extraits d'ADN de culture pure	Protocole EPPO <i>G. circinata</i> PM 7/91(1) et Schweigkofler <i>et al.</i> (2004)
5	Incubation sur papier-filtre	Incubation sur papier-filtre aspergé de milieu liquide PCNB et caractérisation morphologique	ISTA (2002)
6	Enrichissement biologique / test PCR conventionnel (IGS)	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test PCR conventionnel ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS	Schweigkofler <i>et al.</i> (2004) et loos <i>et al.</i> (2009)
7	Enrichissement biologique / test qPCR SybrGreen (IGS)	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test qPCR SybrGreen ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS	Schweigkofler <i>et al.</i> (2004) et loos <i>et al.</i> (2009)
8	Enrichissement biologique / test PCR conventionnel duplex	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test PCR conventionnel duplex ciblant des marqueurs SCAR** spécifiques de <i>G. circinata</i>	Ramsfield <i>et al.</i> (2008) et loos <i>et al.</i> (2009)
9	<b>Enrichissement biologique / test qPCR à sonde d'hydrolyse</b>	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test qPCR à sonde d'hydrolyse ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS	loos <i>et al.</i> (2009)

\* Restriction fragment length polymorphism. \*\* InterGenic Spacer. \*\*\* Sequence Characterized Amplified Region.



## Méthodes

partenaire a dû produire une lettre officielle d'autorisation, en accord avec la directive 2008/61/CE (Anonymous, 2008) attestant qu'il disposait des infrastructures de biosécurité, de personnel formé et averti, et de procédures de travail appropriées. La contamination des semences a été réalisée par trempage dans des solutions calibrées de microconidies de *Fusarium* spp. produites en culture pure, puis séchage en conditions stériles pour stabiliser la contamination. Le succès de contamination (100 %) a été ensuite vérifié par isolement mycologique sur des graines prises aléatoirement dans les lots contaminés.

### Calendrier prévisionnel du projet et diffusion des résultats

Le Tableau 3 présente le calendrier prévisionnel du projet. Ce dernier a été officiellement lancé le premier janvier 2011 et devrait s'achever en mars 2012. Un meeting sera programmé début 2012 afin de faire un bilan de ce projet avec les partenaires. Une publication dans une revue scientifique à comité de lecture est prévue pour synthétiser les résultats de ce projet : obtention de critères de performances pour plusieurs protocoles et comparaison objective des performances des trois protocoles retenus, définition d'une taille consensuelle d'échantillon à analyser fondée statistiquement.

### Références bibliographiques

- Anonymous, 2005. *Gibberella circinata*. EPPO Bulletin 35, 383-6.
- Anonymous, 2007. Commission Decision of 18 June 2007 on provisional emergency measures to prevent the introduction into and the spread within the Community of *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (2007/433/EC). In: O.J.E.U., ed. 161. 66-9.
- Anonymous, 2008. Commission Directive 2008/61/EC of 17 June 2008 establishing the conditions under which certain harmful organisms, plants, plant products and other objects listed in Annexes I to V to Council Directive 2000/29/EC may be introduced into or moved within the Community or certain protected zones thereof, for trial or scientific purposes and for work on varietal selections. In: Union OJOTE, ed. L157.
- Anonymous, 2009. PM 7/91(1): *Gibberella circinata*. EPPO Bulletin 39, 298-309.
- Anonymous, 2010. PM 7/98 (1): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin 40, 5-22.
- Britz H, Coutinho TA, Gordon TR, Wingfield MJ, 2001. Characterisation of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. South African Journal of Botany 67, 609-14.
- Efsa Panel on Plant Health, 2010. Risk assessment of *Gibberella circinata* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. EFSA Journal 8, 1620.
- Gordon TR, Storer AJ, Wood DL, 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85, 1128-39.
- International Plant Protection Convention, 2008. ISPM N° 31. Methodologies for sampling of consignments. In. International Standards for phytosanitary measures. Rome, It.: FAO, 19. (ISPM N° 31; vol.).
- International Seed Testing Association, 2002. International rules for testing. 7-009: Detection of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. & Reinke on *Pinus taeda* and *P. elliotii* (Pine) In. Basseldorf, Switzerland.
- International Standardization Organization, 2003. ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. In. Geneva, Switzerland.

loos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR, 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. Phytopathology 99, 582-90.

Ramsfield TD, Dobbie K, Dick MA, Ball RD, 2008. Polymerase chain reaction-based detection of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker disease. Molecular Ecology Resources 8, 1270-3.

Schweigkofler W, O'donnell K, Garbelotto M, 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. Applied And Environmental Microbiology 70, 3512-20.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, 1999. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini by Histone Gene Sequence Data. Applied And Environmental Microbiology 65, 3401-6.

Storer, Gordon, Clark, 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f.sp. pini, with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathology 47, 649-56.

Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, et al., 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. Australasian Plant Pathology 37, 319-34.



## Méthodes

Tableau 3. Calendrier prévisionnel du projet EUPHRESKO *Gibberella circinata*

Étape	Implication	Date de fin de réalisation
Questionnaire adressé aux participants potentiels : choix par ces derniers des trois protocoles parmi les neuf possibles	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Questionnaire envoyé avant le 01/01/2011 Réponse avant le 31/01/2011
Préparation des échantillons de semences artificiellement infectés (nombre total dépendant du nombre de participants et du nombre de protocoles testés par chacun)	CRA-PAV	Février – avril 2011
Études préliminaires de stabilité et d'homogénéité des échantillons artificiellement contaminés	CRA-PAV	Février – avril 2011
Questionnaire destinés aux NPPO sur la procédure d'échantillonnage	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie et tous les partenaires	Mars 2011
Préparation des lettres officielles d'autorisation (Directive CE/2008/61) et envoi au laboratoire de production des semences	Tous les partenaires	Avant mai 2011
Présentation d'un poster sur le projet durant la réunion annuelle du réseau EMN à Dublin	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie et tous les partenaires	Mai 2011
Test de pré-évaluation pour tous les participants afin de vérifier leur capacité à réaliser le test principal (un échantillon avec un niveau de contamination équivalent à dix fois la limite de détection pour chaque protocole testé)	CRA-PAV + tous les partenaires	Mai 2011
Préparation et distribution à tous les participants d'une feuille de résultats pour les protocoles choisis	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Mai 2011
Résultats du test de pré-évaluation à envoyer au leader du projet	Tous les partenaires	Juin 2011
Expédition aux participants des séries d'échantillons pour les tests inter-laboratoires choisis (une série de 12 échantillons par participant et par protocole testé)	CRA-PAV	Septembre 2011
Résultats des tests interlaboratoires à envoyer au leader du projet	Tous les partenaires	Novembre 2011
Résultat du questionnaire « échantillonnage » pour les ONPP à envoyer au leader du projet	ONPP respective de chaque partenaire	Novembre 2011
Analyse statistique des données des essais interlaboratoires pour les trois protocoles	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Décembre 2011
Préparation d'un rapport provisoire	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Décembre 2011
Meeting de fin de projet Présentation et discussion des résultats Accord sur le rapport définitif (recommandation du protocole le plus performant ?)	Tous les partenaires + CRA-PAV + Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Janvier 2012
Préparation d'un article scientifique Préparation d'un rapport final à destination du bureau des projets EUPHRESKO	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Février 2012
Soumission d'une l'article scientifique de synthèse des résultats	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie + CRA PAV	Mars 2012



## Agenda

### Organisation d'ateliers

#### 1<sup>er</sup> trimestre 2012, Ploufragan, France (dates non encore déterminées)

- Workshop du réseau des laboratoires « Influenza aviaire/Newcastle »  
Contact: Véronique Jestin ([veronique.jestin@anses.fr](mailto:veronique.jestin@anses.fr))

#### Premier semestre, Maisons-Alfort, France (dates non encore déterminées)

- Workshop des quatre réseaux français de laboratoires « Analyse des résidus de pesticides dans les denrées alimentaire ».  
Contact: Frédéric Hommet ([frederic.hommet@anses.fr](mailto:frederic.hommet@anses.fr))

#### 20 janvier 2012, Maisons-Alfort, France

- Workshop du réseau des laboratoires pour le dispositif pilote de surveillance « Fièvre Q »  
Contact: Élodie Rousset ([elodie.rousset@anses.fr](mailto:elodie.rousset@anses.fr))

#### (Dates et lieu non encore déterminés)

- Réunion du LR-UE « Santé des abeilles » avec les pays sélectionnés dans le cadre du projet pilote de la Commission sur la surveillance de la mortalité des abeilles.  
Contact: M.-P. Chauzat ([marie-pierre.chauzat@anses.fr](mailto:marie-pierre.chauzat@anses.fr))

#### Fin mars ou début avril 2012, Fougères, France (dates non encore déterminées)

- Atelier du LNR « Résidus de médicaments vétérinaires et colorants dans les denrées alimentaires d'origine animale et aliments pour animaux ».  
Contact: Brigitte Roudaut ([brigitte.roudaut@anses.fr](mailto:brigitte.roudaut@anses.fr))

#### Les 28-30 mars 2012, Maisons-Alfort, France

- Atelier annuel du LR-UE *Listeria monocytogenes*.  
Contact: Bertrand Lombard ([bertrand.lombard@anses.fr](mailto:bertrand.lombard@anses.fr)) ou Adrien Asséré ([adrien.assere@anses.fr](mailto:adrien.assere@anses.fr))

#### Les 23-25 mai 2012, La Valette, Malte

- Atelier annuel du LR-UE Staphylocoques à coagulase positive.  
Contact: Bertrand Lombard ([bertrand.lombard@anses.fr](mailto:bertrand.lombard@anses.fr)) ou Adrien Asséré ([adrien.assere@anses.fr](mailto:adrien.assere@anses.fr))

#### Juin 2012, Fougères, France

- Workshop organisé par le LR-UE Anses-Laboratoire de Fougères à l'attention des analystes et responsables du réseau de LNR de l'UE (25-30 participants attendus): l'atelier traitera des résidus de médicaments vétérinaires antibiotiques dans les aliments d'origine animale incluant une session de formation technique à l'analyse par CL-SM/SM des résidus de substances interdites (carbadox et olaquinox) chez les animaux de rente et dans leur alimentation (Fougères, France).  
Contact: Éric Verdon ([eric.verdon@anses.fr](mailto:eric.verdon@anses.fr))

#### Les 19 et 20 septembre 2012 à Nancy, France

- Atelier annuel des LNR européens et des pays Balkans sur la rage. Le 20 septembre sera dédié à une formation à la technique de détermination de la tétracycline à partir des prélèvements osseux de renards.  
Contact: Florence Cliquet ([florence.cliquet@anses.fr](mailto:florence.cliquet@anses.fr))



## Agenda

### Formations

#### Premier semestre 2012, Ploufragan, France

- Formation à la technique de neutralisation virale différentielle pour le diagnostic sérologique de la peste porcine classique (sous réserve d'un nombre suffisant de participants).

Contact : Françoise Pol ([francoise.pol@anses.fr](mailto:francoise.pol@anses.fr))

#### 17-19 janvier, 24-26 janvier, 31 janvier-2 février 2012, Maisons-Alfort, France

- Trois sessions organisées par le LNR pour le contrôle des biotoxines marines : Dosage des phycotoxines lipophiles par LC-MS/MS (Méthode Anses Maisons-Alfort CAT/NAT/07).

Contact : Sophie Trotereau ([sophie.trotereau@anses.fr](mailto:sophie.trotereau@anses.fr))

#### Du 16 au 20 janvier 2012, Nancy, France

- Formation au titrage des anticorps antirabiques sérologie rage.

Contact : Florence Cliquet ([florence.cliquet@anses.fr](mailto:florence.cliquet@anses.fr))

#### Stages organisés par le LNR Parasites transmis par les aliments

##### Les 7 et 8 février, Maisons-Alfort, France

- Formation au diagnostic réglementaire des trichinelloses animales.

Contact : Sandrine Lacour ([sandrine.lacour@anses.fr](mailto:sandrine.lacour@anses.fr))

##### Le 9 février, Maisons-Alfort, France

- Formation à l'autocontrôle de la trichinellose porcine.

Contact : Sandrine Lacour ([sandrine.lacour@anses.fr](mailto:sandrine.lacour@anses.fr))

##### Du 9 au 13 janvier 2012, Nancy, France

- Formation aux techniques de diagnostic de rage.

Contact : Florence Cliquet ([florence.cliquet@anses.fr](mailto:florence.cliquet@anses.fr))

#### Du 16 au 20 janvier 2012 en Macédoine (déplacement d'un expert du laboratoire de Nancy Faune sauvage, France)

- Formation à une des techniques de diagnostic de rage.

Contact : Florence Cliquet ([florence.cliquet@anses.fr](mailto:florence.cliquet@anses.fr))

#### Du 13 au 17 février 2012 en Macédoine (déplacement d'un expert du laboratoire de Nancy Faune sauvage, France)

- Formation à une technique de titrage des anticorps antirabiques.

Contact : Florence Cliquet ([florence.cliquet@anses.fr](mailto:florence.cliquet@anses.fr))

#### Mai 2012, Dozulé, France

- Stage organisé par le LNR « Métrite contagieuse équine » : Formation aux techniques diagnostiques de la Métrite contagieuse équine.

Contact : Sabrina Ribard ([sabrina.ribard@anses.fr](mailto:sabrina.ribard@anses.fr)) et Sandrine Petry ([sandrine.petry@anses.fr](mailto:sandrine.petry@anses.fr))

#### Juin 2012, Dozulé, France

- Stage organisé par le LR-UE pour les LNR Européens « Maladies équines » : formation aux techniques diagnostiques de la métrite contagieuse équine.

Contact : Cécile Beck ([cecile.beck@anses.fr](mailto:cecile.beck@anses.fr)) et Sandrine Petry ([sandrine.petry@anses.fr](mailto:sandrine.petry@anses.fr))

#### Juin 2012, Dozulé, France

- Formation aux techniques diagnostiques de Dourine.

Contact : Cécile Beck ([cecile.beck@anses.fr](mailto:cecile.beck@anses.fr)) et Julien Cauchard ([julien.cauchard@anses.fr](mailto:julien.cauchard@anses.fr))

#### Juin 2012, Fougères, France

- Formation à l'attention des analystes et responsables du réseau de LNR de l'UE sur l'analyse par CL-SM/SM des résidus de substances interdites (carbadox et olaquinox) chez les animaux de rente (muscle, foie) et dans leur alimentation (session intégrée au workshop LR-UE organisé sur Juin 2012).

Contact : Éric Verdon ([eric.verdon@anses.fr](mailto:eric.verdon@anses.fr))

#### Réalisation graphique et éditoriale

Directeur de la publication : M. Mortureux

Rédacteur en chef : P. Martin

Rédacteur en chef adjoint : B. Gouget

Comité de rédaction : M.-L. Boschioli, D. Calavas, V. Carlier, S. Delannoy, B. Lombard, J.-Y. Madec, V. Molinero-Demilly, B. Pouyet (SCL), E. Repérant, R. Saunier, E. Verdon

#### Ont contribué à ce numéro

Création/réalisation : L. Lelyon, C. Leterq, Parimage

Crédits photos : Anses, C. Lepetit

ISSN 2110-5294