



# *Euro* **Reference**

*Les cahiers de la* Référence

Cahier numéro 9  
Spécial « Végétal »

Printemps 2013



## Éditorial

Ce premier numéro de 2013 d'*EuroReference* est entièrement consacré au domaine du végétal. Comme nous vous l'avions indiqué précédemment, *EuroReference* paraît dorénavant à raison de trois numéros par an : deux numéros semestriels, plus un numéro spécial, dédié à un domaine particulier, comme cela a été fait en 2012 avec le numéro 7 d'*EuroReference* consacré au domaine de la sécurité et de la sûreté. De nombreux aspects sont développés dans ce numéro : des aspects réglementaires, des présentations de réseaux, d'initiatives conjointes, ou encore de projets de recherche européens.

La réglementation phytosanitaire évolue sous l'impulsion des Organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV) pour mieux répondre au contexte phytosanitaire européen. Du fait d'un nombre croissant d'introduction d'organismes nuisibles au cours des dernières années (plusieurs centaines sont réglementées en Europe et concernent de très nombreuses espèces végétales), la hiérarchisation des organismes nuisibles pour la santé des végétaux par l'utilisation d'un outil permettant une analyse multicritères devrait permettre d'identifier ceux sur lesquels les efforts de recherche, de mise au point de méthodes et de gestion doivent être prioritairement orientés pour optimiser l'état sanitaire des plantes. Vous trouverez dans ce numéro un point d'actualité sur les évolutions nécessaires du régime communautaire de la santé des végétaux, du point de vue de la Direction générale de l'alimentation, ainsi qu'un point de vue sur une proposition de méthodologie de hiérarchisation des organismes nuisibles en santé du végétal.

La communication entre les partenaires publics et privés est un élément essentiel pour être réactif en cas d'émergence. C'est aussi un moyen d'optimiser les ressources face aux défis de la protection des plantes. La mise en place du Réseau français pour la santé végétale (RFSV) et les réseaux existants (ex : ENGL, *the European Network of GMO Laboratories*) doivent satisfaire ce besoin de communication. Ce numéro d'*EuroReference* met en avant une initiative conduite par les principales collections de micro-organismes en Europe, pour faciliter l'accès aux ressources biologiques : Q-bacco-net. Les ressources biologiques constituent, en effet, la matrice indispensable à tout processus de contrôle sanitaire.

De la fiabilité des méthodes d'analyses dépend la qualité des contrôles sanitaires, de la surveillance des organismes nuisibles, de l'évolution de leur résistance aux produits phytopharmaceutiques et du respect des réglementations qui régissent l'importation et la culture des plantes, y compris génétiquement modifiées. Le processus français d'officialisation des méthodes d'analyses dans le domaine de la santé des végétaux est présenté dans ce numéro, dans la rubrique Méthodes.

Cette fiabilité est contrôlée de façon collective par des essais inter-laboratoires d'aptitude. Un bilan des essais organisés par les laboratoires dans la région de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) est récapitulé dans la rubrique Agenda. Un retour d'expérience de près de dix ans en la matière est développé dans la rubrique Réseaux.

La protection sanitaire des végétaux est un défi qui se relève au niveau européen. L'OEPP (lire le Focus) est un catalyseur d'énergie pour ce défi dont le périmètre déborde celui de l'Union européenne qui en est néanmoins l'épicentre.

Enfin, l'amélioration de la gestion sanitaire des végétaux nécessite de combler des lacunes dans la connaissance de la biologie des organismes nuisibles et des techniques pour les identifier et les détecter. La coordination de la recherche se fait au niveau communautaire. Le projet EUPHRESKO est une des actions permettant d'accompagner les efforts de recherche des États membres. Il vous est présenté dans ce numéro. Le programme KBBE (Knowledge-Based Bio-Economy) programme est un des leviers de la Commission européenne pour dynamiser la recherche ; le projet TESTA (rubrique Recherche) est un exemple de projet qui va alimenter les laboratoires de référence dans le domaine de la qualité sanitaire des semences.

Nous espérons que ce numéro vous servira dans vos métiers de la référence. En vous en souhaitant une bonne lecture.

Le comité de rédaction

## Au sommaire



### Point de vue

**Le Projet EUPHRESKO – Protéger la santé des végétaux en Europe par la coordination de la recherche** Page 2

**Quelle méthodologie en vue d'une hiérarchisation des organismes nuisibles en santé du végétal?** Page 5



### Actualités

**Les évolutions nécessaires du régime communautaire de la santé des végétaux d'après l'ONPV française** Page 10

**Le Réseau français pour la santé végétale (RFSV) : un nouvel outil au service de la santé des végétaux** Page 11



### Focus sur un laboratoire

**Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes** Page 12



### Méthodes

**Processus français d'officialisation des méthodes d'analyses dans le domaine de la santé des végétaux** Page 16

**Méthodes de caractérisation des résistances de *Myzus persicae* aux carbamates, aux pyréthrinoides et aux néonicotinoïdes** Page 20



### Recherche pour la référence

**Le projet européen TESTA : compréhension des mécanismes de transmission des agents pathogènes à et par la semence pour un développement de méthodes de détection d'agents pathogènes et de traitements alternatifs sur semences** Page 25



### Réseaux

**Organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude : retour d'expérience de près de dix ans de l'unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux** Page 29

**ENGL, le Réseau européen de laboratoires de référence pour les OGM** Page 33

**Q-bacco-net : une initiative pour faciliter l'accès à des ressources de qualité pour la recherche, la détection et le diagnostic des bactéries de quarantaine** Page 35



### Agenda

**Comparaisons inter-laboratoires organisées par les laboratoires dans la région de l'OEPP** Page 37



## Point de vue

### Le Projet EUPHRESKO – Protéger la santé des végétaux en Europe par la coordination de la recherche

Elsbeth Steel (Elsbeth.Steel@defra.gsi.gov.uk) (1), Françoise Petter (2), Alan Inman (1)

(1) EUPHRESKO Project Office, Defra, Plant Health Policy Programme, Londres, Royaume-Uni

(2) OEPP, Paris, France

**EUPHRESKO est un réseau rassemblant les financeurs de la recherche phytosanitaire en Europe dont le but est de coordonner la recherche nationale, transnationale ainsi que la recherche financée par l'UE en appui direct au régime phytosanitaire communautaire (Community Plant Health Regime, CPHR). Les réalisations principales et les futurs défis du réseau sont présentés dans cet article.**

#### Introduction

L'agriculture, l'horticulture, la sylviculture et l'environnement de l'Europe subissent des menaces constantes et toujours croissantes dues aux maladies et organismes nuisibles nouveaux et exotiques affectant les végétaux. La globalisation accrue du commerce, aussi bien en termes de volume que de diversité, les changements climatiques et l'expansion de l'UE exacerbent ces risques. Tandis que ces risques s'accroissent, nos capacités à y faire face décroissent. Les ressources pour les services nationaux d'inspection phytosanitaire, la recherche et les programmes scientifiques diminuent. EUPHRESKO (*European Phytosanitary Research Coordination*) a été établi en 2006 pour aider à relever ces défis et atténuer les risques posés par les organismes nuisibles et les maladies grâce à la coordination de la recherche phytosanitaire.

#### Historique du réseau EUPHRESKO

EUPHRESKO est un réseau rassemblant les financeurs de la recherche phytosanitaire en Europe dont le but est de coordonner la recherche nationale, transnationale, ainsi que la recherche financée par l'UE en appui direct au régime phytosanitaire communautaire (*Community Plant Health Regime, CPHR*). L'objectif principal du CPHR est d'empêcher l'introduction, l'établissement et la dissémination d'organismes nuisibles réglementés et de quarantaine par les dispositions de la politique communautaire, les services d'inspection et l'arsenal scientifique. EUPHRESKO vise à mieux coordonner la recherche européenne qui sous-tend la politique phytosanitaire et sa mise en œuvre. Il coordonne la recherche relevant des programmes phytosanitaires nationaux et il convient de noter qu'il a d'ores et déjà apporté des conseils sur les priorités phytosanitaires pour les travaux financés par l'UE dans le cadre du 7<sup>e</sup> Programme-cadre (PC7). Ainsi, EUPHRESKO optimise le financement de la recherche, promeut la coopération, développe les programmes communs de recherche et favorise l'expertise scientifique pour améliorer la capacité phytosanitaire de l'Europe. La recherche en résultant sous-tend la politique et la réglementation phytosanitaires afin de prévenir ou minimiser les risques d'introduction d'organismes nuisibles de quarantaine et d'apporter les outils nécessaires à la surveillance et la gestion de ces organismes s'ils sont introduits. EUPHRESKO a commencé comme un réseau de 23 partenaires dans 17 pays, financé par le 6<sup>e</sup> Programme-cadre (PC6) en 2006 (EUPHRESKO-I). Ses partenaires étaient des organisations de premier plan engagées dans le financement de la recherche phytosanitaire (réglementation phytosanitaire) en Europe.

Par l'intermédiaire de liens formels, des conseils d'experts ont été fournis à des organes européens, à l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP), au Groupe sur la santé des plantes de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA-PHP) et à la DG SANCO de la Commission européenne.

#### Réalisations principales du réseau EUPHRESKO-I

Les réalisations principales du projet jusqu'en 2010 ont été :

- (1) la cartographie et l'analyse de 46 programmes nationaux de recherche phytosanitaire (35 de pays membres du réseau EUPHRESKO et 11 de pays non-partenaires en Europe et de la région de l'OEPP) débouchant sur un rapport qui identifie les lacunes et les opportunités qui pourraient être abordées à travers une collaboration et une coordination transnationales de la recherche;
- (2) le développement d'outils et de procédures pour trois mécanismes de financement différents:
  - un pot commun réel : les pays apportent des fonds dans un compte bancaire unique ; les meilleurs projets résultant d'un appel à propositions sont financés quelle que soit la nationalité des chercheurs concernés ; il y a donc un flux transnational de financement,
  - un pot commun virtuel : chaque pays participant à un appel à propositions finance seulement la contribution de ses propres chercheurs dans des projets résultant d'un appel à propositions,
  - un mécanisme non compétitif : une thématique ou un sujet scientifique ou de recherche sont répartis entre des groupes de recherches organisés en consortium dans différents pays selon leur expertise ; chaque pays finance ou apporte ses propres chercheurs pour apporter une contribution au consortium. Il n'y a pas de flux transnational de financement ; il n'y a pas de compétition (pour mettre en place une recherche transnationale) ;
- (3) le test de ces mécanismes à travers la mise en route de 11 projets-pilotes transnationaux dans un exercice d'apprentissage par la pratique. Le financement engagé pour les sept projets attribués de façon compétitive était de 1,5 million d'euros, correspondant à 8-10 % des budgets nationaux annuels. Les quatre projets non compétitifs ont apporté un montant significatif de financement supplémentaire. Six projets additionnels attribués via le mécanisme non compétitif, ont été commencés à la fin de 2009 et au début de 2010 (Figure 1) ;



## Point de vue

- (4) conseiller la Commission européenne sur les priorités de recherche phytosanitaire dans son 7<sup>e</sup> Programme-cadre à travers un mandat du Groupe de travail des chefs des services phytosanitaires du Conseil de l'UE (COPHS). Le rôle de conseil du réseau EUPHRESKO a contribué à l'inclusion de sujets stratégiques clés dans les appels à propositions du PC7 et au développement de projets sur la science sous-tendant l'analyse du risque phytosanitaire (Projet PRATIQUE), les méthodes de code-barres ADN pour les organismes nuisibles de quarantaine (Projet QBOL) et le développement d'outils de détection de terrain pour les services d'inspection phytosanitaire (Projet Q-DETECT);
- (5) le développement d'un programme commun de recherche stratégique.

La dernière réalisation à mettre en exergue est:

- (6) le développement de modalités de fonctionnement pour un réseau EUPHRESKO fort, durable et autonome.

### 5 projets ont été lancés suite à l'appel à propositions du pot commun virtuel

- DEP – Détection et épidémiologie des pospiviroides.
- AMBROSIA – Stratégies de gestion de l'*Ambrosia*.
- ERWINDECT – Outils diagnostics pour la détection du feu bactérien.
- PROPSCAPH – Risques de dissémination de *Scaphoideus titanus*, le vecteur de la flavescence dorée.
- PEKID – Efficacité phytosanitaire du séchage à l'étuve.

### 2 projets ont été lancés suite à l'appel à propositions du pot commun réel

- QAMP – Amplification de l'ADN du génome entier des organismes nuisibles de quarantaine
- DECLAIM – Contrôle des plantes aquatiques macrophytes envahissantes

### 4 projets non compétitifs ont été commencés; ils portaient sur la validation de méthodes diagnostiques d'organismes nuisibles ou de pathogènes réglementés.

- Pourriture annulaire et pourriture brune de la pomme de terre.
- Virus transmis par les aleurodes.
- Nématodes à kystes de la pomme de terre.
- Flétrissement bactérien du maïs.

### Une deuxième série de projets non compétitifs a démarré en 2009/2010

- Écologie et diagnostic des *Dickeya*.
- Méthodes de diagnostic de *Gibberella circinata* sur les semences.
- Détection et gestion du risque des *Anoplophora*.
- Détection et gestion du risque des *Meloidogyne*.
- Diagnostic des phytoplasmes (relation avec COST Action).
- Identification phylogénétique des bactéries pathogènes de quarantaine.

### EUPHRESKO-II

Depuis la fin d'EUPHRESKO-I, le réseau a continué sous la forme d'un second projet financé par le 7<sup>e</sup> Programme-cadre de l'UE; commencé en janvier 2011, il se poursuivra jusqu'en mars 2014 avec pour objectif de continuer à élargir une coopération empreinte de succès et d'assurer que le consortium se prolongera après 2014 sous la forme d'un réseau durable et autonome de financeurs de recherche phytosanitaire européenne. EUPHRESKO-II va approfondir la coopération en continuant une recherche transnationale qui optimise l'utilisation des ressources limitées, soutient d'autres initiatives phytosanitaires et favorise l'amélioration des procédés et des outils tout en réduisant les obstacles à la collaboration. Le réseau s'est élargi à 31 partenaires dans 22 pays avec 14 observateurs (Figure 2). Il a en outre élargi son secteur de couverture pour inclure maintenant la santé des forêts, et a développé les opportunités de coopération et de collaboration avec les pays non européens.

Dix projets, tous attribués par le procédé non compétitif, ont commencé à la fin de 2011 et au début de 2012. Le financement engagé pour ces projets dépasse 2,8 millions d'euros. Les projets couvrent des travaux sur les *Phytophthora* émergents, les nématodes à kystes de la pomme de terre, *Meloidogyne enterolobii*, *Synchytrium endobioticum*, les pospiviroides, les phytoplasmes de la pomme de terre et *Candidatus Liberibacter solanacearum*, la flavescence dorée de la vigne, les phytoplasmoses des arbres fruitiers, le feu bactérien, *Drosophila suzukii*.

### Futures orientations: le rôle de l'OEPP dans un réseau EUPHRESKO autonome

À la session du conseil de l'OEPP en 2011, certains pays membres de l'OEPP ont fait valoir que le secrétariat de l'OEPP pourrait servir de cadre pour un réseau EUPHRESKO durable et autonome. Cette suggestion a recueilli un soutien unanime lors de la dernière réunion annuelle de l'EUPHRESKO en 2012. Il a été notamment souligné que l'une des fonctions essentielles énoncée à l'article V de la convention sur l'OEPP est de « faciliter la coopération dans la recherche sur les organismes nuisibles et sur les procédés de lutte et de favoriser l'échange des renseignements scientifiques s'y rapportant ». Les membres du réseau EUPHRESKO ont aussi considéré que l'OEPP détient la capacité technique pour gérer l'identification de recherche d'EUPHRESKO et pour faciliter la coordination de la recherche, la collaboration et la coopération, notamment pour les raisons suivantes:

- l'OEPP a de l'expérience dans la coordination et l'administration de groupes internationaux;
- l'OEPP a de l'expérience dans l'organisation d'ateliers, etc.;
- l'OEPP a de l'expertise et une infrastructure en technologie de l'information;
- l'OEPP entretient des liens avec des organisations régionales de la protection des végétaux dans d'autres parties du monde, ce qui pourrait favoriser l'expansion du réseau;
- l'OEPP regroupe de nombreux membres avec une portée bien plus large que le projet EUPHRESKO original;
- les membres de l'OEPP sont des organisations nationales de protection des végétaux détenant une connaissance approfondie des questions phytosanitaires;
- l'OEPP et ses membres sont des parties prenantes importantes dans le domaine phytosanitaire;

Figure 1. Projets - EUPHRESKO-I



## Point de vue

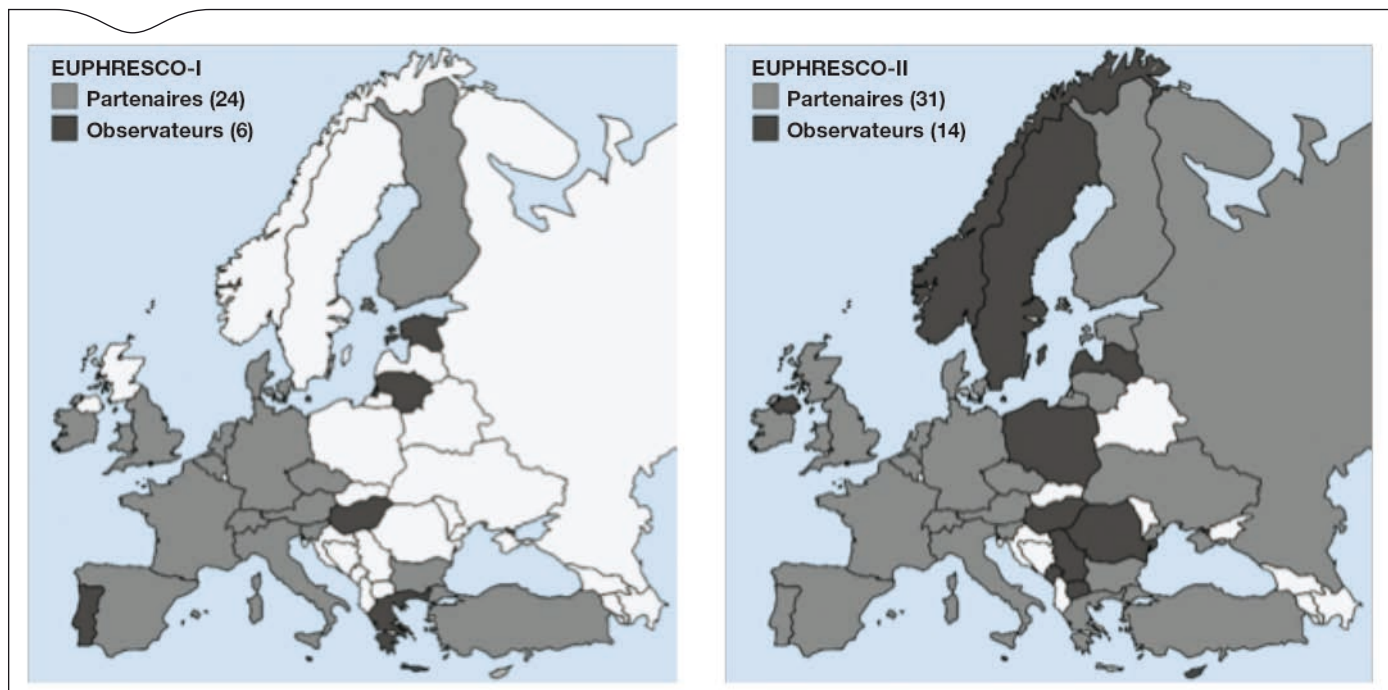


Figure 2. Cartes des partenaires et observateurs de EUPHRESKO-I (2006-2010) et EUPHRESKO-II (2011-2014).

- pour certains membres du réseau EUPHRESKO, il pourrait être plus facile de s'acquitter d'une contribution (par ex. des frais d'adhésion au réseau) auprès d'une organisation internationale comme l'OEPP plutôt qu'auprès d'une organisation nationale d'un autre pays;
- cette démarche pourrait permettre d'inclure de nouveaux partenaires dans le réseau EUPHRESKO.

Par conséquent, la possibilité que le secrétariat de l'OEPP puisse servir de cadre pour un réseau EUPHRESKO durable et autonome est en cours d'évaluation, en particulier les mécanismes possibles de financement pour soutenir la position de coordinateur qui sera nécessaire au sein du secrétariat. Étant donné l'appui fort des membres de l'OEPP à cette requête et le souhait exprimé par la Commission européenne que cet ERA-Net puisse continuer, on espère qu'une décision positive sera prise à la prochaine session du Conseil de l'OEPP en septembre 2013.

Il est incontestable que le réseau EUPHRESKO entretient un environnement optimal pour des efforts concertés de recherche tout en fournissant un cadre cohérent et coordonné dans lequel peuvent être atteintes les avancées scientifiques requises par les décideurs politiques et les services d'inspection dans ce secteur vital.



## Point de vue

### Quelle méthodologie en vue d'une hiérarchisation des organismes nuisibles en santé du végétal ?

Bénédicte Moignot (benedicte.moignot@anses.fr) (1), Philippe Reynaud (2)

(1) Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité Expertise des risques biologiques, Angers, France

(2) Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité Entomologie et plantes invasives, Montferrier-sur-Lez, France

**Dans le but d'optimiser l'allocation des ressources pour la prévention, la surveillance et la lutte contre les organismes nuisibles (ON), la France a choisi de se doter d'un outil pour les hiérarchiser. Cet outil est développé par le Laboratoire de la santé des végétaux depuis le premier semestre 2011. La méthode consiste à évaluer le profil invasif des ON absents ou peu présents sur le territoire métropolitain. Il s'agit d'une méthode d'évaluation multicritère basée sur les principes de l'analyse du risque phytosanitaire. Le choix d'un modèle semi-quantitatif permet d'établir rapidement un classement relatif des ON. Implémentée dans un outil informatique intuitif, l'utilisation de la méthode et l'interprétation des résultats est facilement accessible. Pour la majorité des organismes de premier rang obtenus dans le classement établi à ce jour, il s'avère que le Laboratoire de la santé des végétaux dispose de méthodes d'analyse adaptées pour les détecter. Pour autant, il met aussi en évidence des organismes qui mériteraient une attention plus particulière. Le présent article expose plus en détail le contexte réglementaire de l'étude et précise les bases de la méthodologie de hiérarchisation.**

#### Pourquoi hiérarchiser les ON en santé du végétal ?

Afin de conforter la réactivité et la compétitivité de l'agriculture française face à la mondialisation des échanges, au changement climatique et l'évolution des pratiques agricoles, la France a modernisé sa stratégie de politique sanitaire à la suite des États généraux du sanitaire en 2010. La hiérarchisation des ON en santé du végétal s'inscrit dans cette trajectoire. Un des objectifs principaux du nouveau dispositif est d'optimiser la gouvernance et le financement de la politique sanitaire. Dans ce contexte, les gestionnaires du risque prévoient d'accorder la priorité des moyens alloués aux actions de prévention, de surveillance et de lutte selon la gravité des risques sanitaires ; tel est d'ailleurs l'objet de l'ordonnance française du 23 juillet 2011 qui envisage une catégorisation des dangers sanitaires. Plus précisément, les organismes menaçant la santé des végétaux doivent être répartis en trois catégories 1, 2 et 3 de niveau de danger décroissant dont la prise en charge du financement relève de l'autorité administrative et/ou de l'initiative privée, respectivement. Pour établir cette catégorisation des dangers sanitaires, le ministère en charge de l'Agriculture a choisi de saisir l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) afin de concevoir une méthodologie de hiérarchisation objective et transparente adaptée aux spécificités des risques biologiques qui menacent la santé des végétaux.

#### Quelles sont les spécificités des risques biologiques en santé du végétal ?

La diversité taxonomique des ON (viroïdes, virus, phytoplasmes, bactéries, champignons, nématodes, arthropodes, végétaux) et la multiplicité des plantes hôtes révèlent le défi de concevoir un modèle générique de hiérarchisation. Fort heureusement, un constat biologique invariable modère cette apparente complexité : quelle que soit l'interaction hôte-bioagresseur considérée, le niveau du risque pour la santé des végétaux est fonction de certains facteurs clés pour le développement des ON. En conséquence, la méthode de hiérarchisation a consisté à établir un classement à partir de l'évaluation de ces facteurs communs aux ON dans le contexte de la France métropolitaine.

#### Quels sont les ON pris en compte pour développer la méthode de hiérarchisation ?

##### Des ON inhérents aux échanges internationaux

La mondialisation des échanges est reconnue comme le facteur majeur de contribution à l'introduction et la dissémination des espèces en dehors de leur aire de distribution native [1]. L'importation de végétaux vivants et de produits végétaux en provenance d'autres pays est une voie d'entrée majeure des ON exotiques. Les volumes accrus de produits importés à des fréquences intensifiées ainsi que le mode de vie cryptique des ON nuisent à des interceptions systématiques par les services de contrôle sanitaire [2, 3]. Parmi ces ON importés non intentionnellement, une minorité s'avère invasive avec un impact négatif sur la santé des végétaux cultivés et/ou sauvages [4]. Plus précisément, ils peuvent être responsables de dommages économiques (diminution des rendements agricoles, coûts liés à l'éradication) ou bien fragiliser les équilibres écologiques naturels, et parfois occasionner des nuisances en santé publique [5]. L'impact économique total des espèces exotiques pour l'Europe, estimée très grossièrement, est ainsi de l'ordre de 10 milliards d'euros par an [6].

##### Des ON contre lesquels des mesures phytosanitaires sont prévues par voie réglementaire

Pour empêcher l'introduction et la dissémination de ON non-natifs présentant un risque pour la santé des végétaux, l'Union européenne s'est dotée de dispositions réglementaires spécifiques. Parmi ces mesures, la directive 2000/29/CE liste plusieurs centaines d'organismes réglementés ainsi que des végétaux et produits végétaux potentiellement hôtes dont l'introduction et la dissémination sont strictement interdites. L'arrêté du 24 mai 2006 relatif aux exigences sanitaires des végétaux, produits végétaux et autres objets constitue la transcription en droit français de cette directive européenne. Son application se traduit par la mise en œuvre de mesures de prévention, de surveillance et de lutte obligatoires quel que soit le niveau de risque phytosanitaire.

Parallèlement au régime réglementaire européen, l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes



## Point de vue

(OEPP), instance sous l'égide de la Convention internationale de la protection des végétaux (CIPV), recommande, à l'appréciation volontaire de ses pays membres, la réglementation nationale d'organismes nuisibles au rang d'organismes réglementés. Ces organismes sont répertoriés sur deux listes distinctes nommées A1 et A2. Les organismes de la liste A1 sont totalement absents de la région OEPP alors que ceux de la liste A2 sont localement présents. L'OEPP a aussi établi une liste d'alerte qui comprend des organismes nuisibles présentant des caractéristiques invasives pour lesquels une surveillance est fortement recommandée. En France, les organismes de la liste d'alerte de l'OEPP font l'objet d'une lutte obligatoire sous certaines conditions depuis leur inscription lors de la révision de l'arrêté du 31 juillet 2000.

Actuellement, l'application opérationnelle de ces textes réglementaires se heurte à l'insuffisance des ressources disponibles face à la multitude des organismes réglementés. Quelques publications proposent le top 10 des agents bactériens, fongiques et viraux les plus à risque pour la santé des végétaux selon leur importance scientifique et économique à l'échelle mondiale [7-9]. Ces approches sont cependant insuffisantes pour prioriser les actions de gestion adaptées aux organismes réglementés au niveau national. Par conséquent, la méthode de hiérarchisation développée ici concerne les ON non natifs, absents ou peu présents en France métropolitaine dont la gestion actuelle repose sur une base réglementaire et pour lesquels il est nécessaire d'évaluer et de comparer leur capacité invasive et le niveau de danger qu'ils représentent pour les végétaux cultivés et sauvages.

### Quelles sont les bases de la méthode de hiérarchisation développée en santé du végétal ?

#### Une méthode qui se réfère aux procédures de l'analyse du risque phytosanitaire

Pour évaluer le risque des organismes inhérents aux échanges commerciaux de végétaux et produits végétaux, la norme internationale de l'analyse du risque phytosanitaire (ARP) fait référence [10]. Celle-ci standardise l'évaluation du risque phytosanitaire d'un organisme absent ou peu présent dans une région donnée pour apporter toutes les justifications nécessaires à l'application de mesures réglementaires qui peuvent contraindre le commerce international. Une fois la zone géographique d'étude déterminée, l'ARP intègre, sous forme de questionnaire, d'une part la probabilité d'exposition à un organisme non natif et d'autre part l'amplitude des effets négatifs potentiellement occasionnés. La probabilité d'exposition d'une région donnée à un organisme non natif tient compte de sa probabilité d'entrée, d'établissement et de dissémination. Simultanément, l'évaluateur précise l'incertitude de l'évaluation du risque au regard des données à sa disposition. Dès lors que le risque phytosanitaire est jugé comme non acceptable, des mesures de gestion sont listées et évaluées. La méthode de hiérarchisation reprend la structure générale de l'ARP pour évaluer le risque phytosanitaire.

#### Une méthode avec pour fil conducteur le concept de l'invasion biologique

Au-delà de ses applications réglementaires, l'ARP est une méthode reconnue pour intégrer le concept de l'invasion

biologique des espèces non natives [11]. Récemment ce concept a été formalisé afin d'harmoniser ses diverses applications depuis ces 20 dernières années [12]. Les auteurs distinguent quatre étapes successives pour décrire le processus de l'invasion biologique (Figure 1). L'enchaînement de ces étapes est conditionné par le succès de l'organisme à contourner une myriade de forces biotiques et abiotiques. La première étape correspond au transport de l'organisme qui lui permet de traverser des barrières biogéographiques naturellement infranchissables. L'organisme peut être maintenu en milieu maîtrisé (captivité ou culture) au cours d'une seconde étape. Toutefois, en santé des végétaux, l'entrée des ON est principalement non intentionnelle avec un passage direct de l'étape 1 (transport) à l'étape 3 (établissement). La norme ARP regroupe les étapes 1 (transport) et 2 (maintien en milieu maîtrisé) en une seule étape dénommée « entrée » [10] (Figure 1). Une fois présente dans l'environnement, une population locale viable peut s'établir avec des individus qui se multiplient et s'adaptent aux nouvelles conditions. La quatrième étape se distingue par la dissémination sur un territoire plus vaste de la descendance de la population établie. Dans ce modèle l'auteur ne prend pas en compte les impacts, considérant que ces derniers ne déterminent pas le caractère invasif d'un organisme.

### Quelles sont les caractéristiques de la méthode de hiérarchisation ?

#### Une approche multicritère

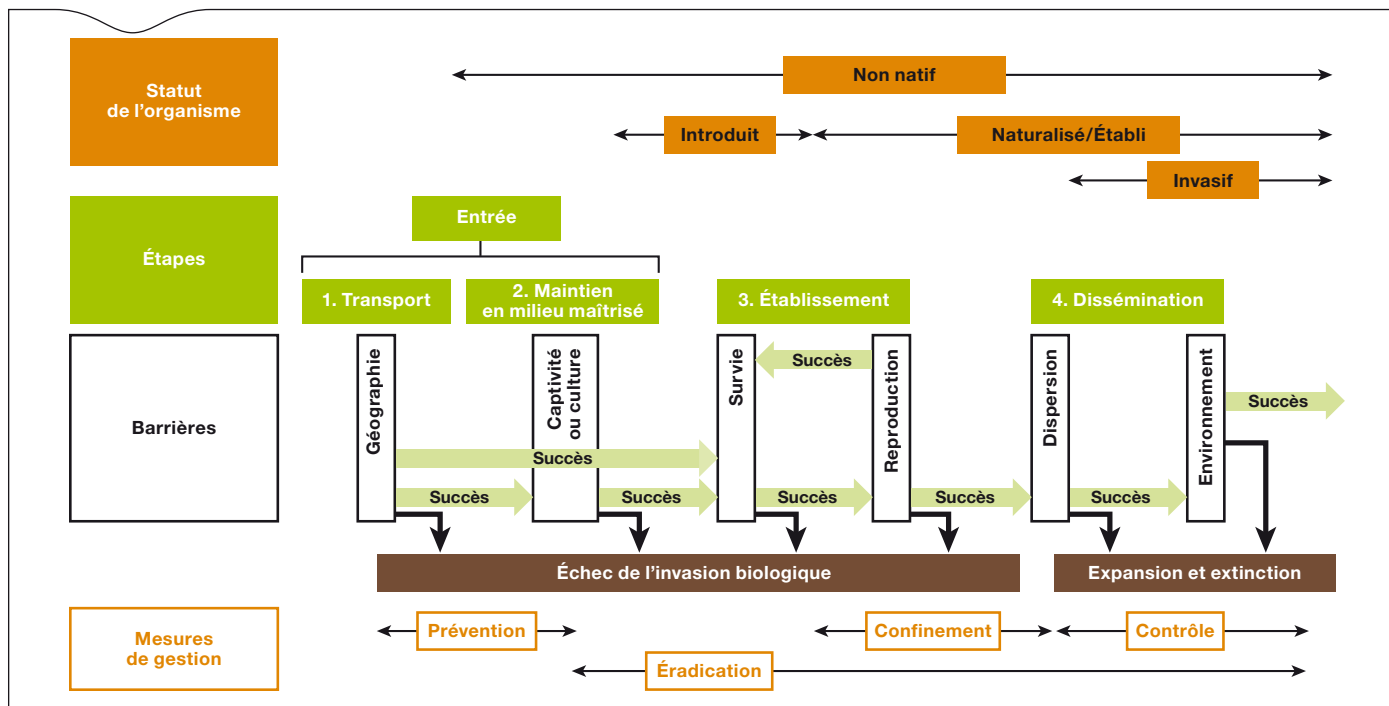
À la différence de l'ARP, la méthode de hiérarchisation développée ici a la particularité supplémentaire de produire un classement des ON à partir de l'évaluation du risque phytosanitaire. De ce fait, la structure générale de la méthode est construite autour de « critères » caractérisant le risque phytosanitaire des ON. Ils ont été définis à partir de l'adaptation des questions de l'ARP et de la consultation d'experts. Le niveau de discrimination des critères a été la première qualité recherchée pour différencier efficacement les organismes nuisibles entre eux. Au final, 24 critères ont été sélectionnés et organisés en cinq métacritères : trois métacritères correspondant aux étapes de l'invasion biologique et deux métacritères concernant les impacts (Figure 2). Les critères retenus s'avèrent être souvent des indicateurs indirects dont les données sont disponibles plutôt que des variables mesurant directement le risque phytosanitaire. Par exemple le volume d'importation des végétaux et produits végétaux est régulièrement utilisé comme un indicateur indirect du flux d'organismes potentiellement associés [11].

#### Une évaluation semi-quantitative des critères

Dans le schéma de l'ARP, l'évaluateur mesure les composantes de l'invasion biologique selon une échelle qualitative graduée à partir des termes « très improbable, improbable, modérément probable, probable, très probable » et l'incertitude associée à partir des termes « faible, modérée et élevée ». Bien que cette approche soit pragmatique, le résultat final de l'évaluation du risque phytosanitaire reste formulé sous forme de synthèses parfois complexes. Dans le cadre du projet européen de recherche PRATIQUE, l'OEPP a développé un outil permettant de convertir et d'agrégier ces mesures qualitatives en une probabilité d'entrée, d'établissement, de dissémination et d'impact [13].

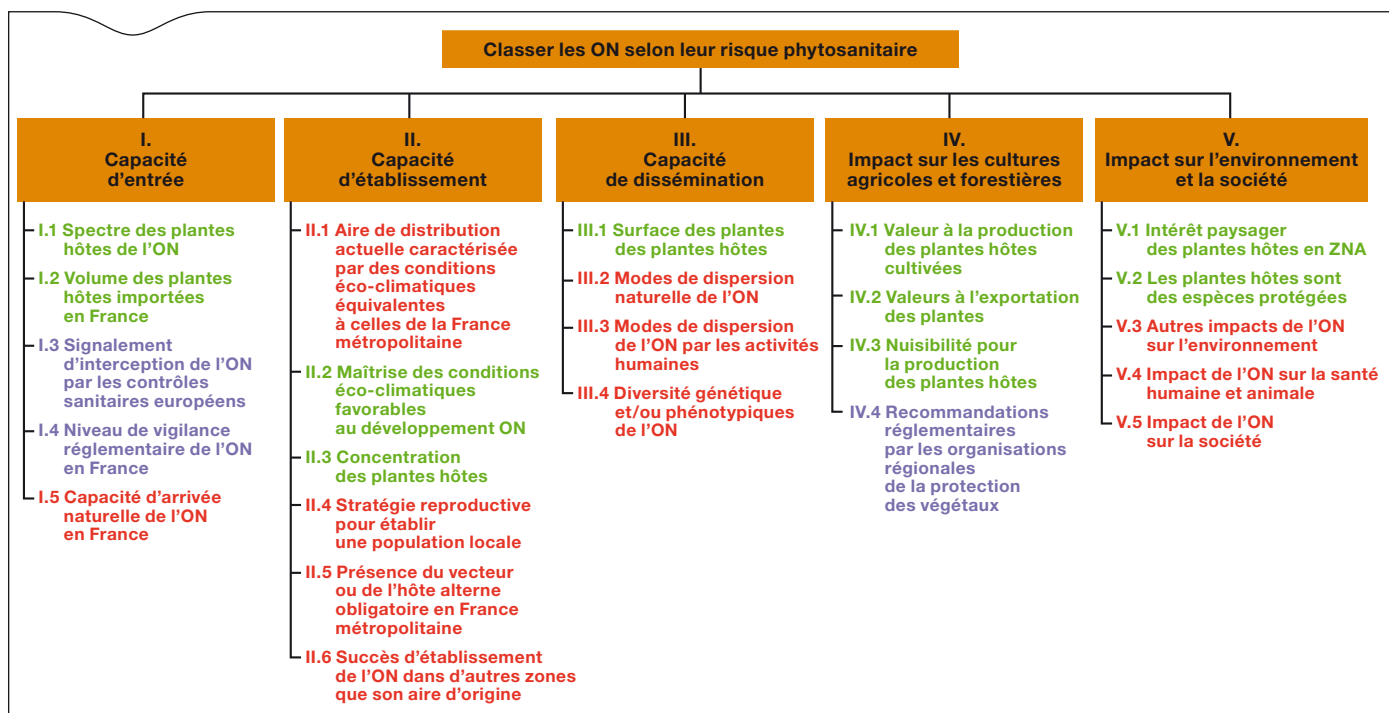


## Point de vue



**Figure 1. Concept de l'invasion biologique formalisé par Blackburn.**

Un organisme est considéré invasif dans une nouvelle aire d'introduction dès lors qu'il réussit à contourner plusieurs barrières au cours de quatre étapes successives. En santé des végétaux, l'entrée des ON est principalement non intentionnelle avec un passage direct de l'étape 1 (transport) à l'étape 3 (établissement). La norme ARP regroupe les étapes 1 (transport) et 2 (maintien en milieu maîtrisé) en une seule étape dénommée « entrée » [10] (modifié d'après Blackburn et al., 2011).



**Figure 2. Diagramme des métacritères (cadres en orange) et des critères (en couleurs) sélectionnés pour la méthode de hiérarchisation.** Les intitulés rouges, verts et violets des critères se réfèrent à la biologie de l'organisme, les plantes hôtes et les mesures réglementaires respectivement.



## Point de vue

Pour une ARP donnée, cette méthode d'évaluation innovante facilite la lecture globale du risque phytosanitaire. Toutefois, cet outil ne permet pas de classer plusieurs organismes nuisibles dont le risque a été évalué au travers d'ARP réalisées indépendamment les unes des autres.

Dans l'optique de concevoir un outil simple et opérationnel permettant de hiérarchiser de nombreux ON à partir de multiples critères, la méthode d'évaluation retenue ici est un modèle semi-quantitatif. Cette approche a été appliquée dans plusieurs modèles de priorisation d'espèces invasives [14]. Le principe est d'évaluer des critères hétérogènes en assignant des scores numériques quantifiant le niveau de risque. Ainsi malgré la diversité des critères, ces derniers sont agrégés à partir d'une formule mathématique unique. Dans la méthode de hiérarchisation développée, les scores sont compris entre la valeur nulle pour l'absence d'information et une valeur maximale pour le risque majeur. L'agrégation des critères d'un même métacritère est additive alors que l'agrégation des métacritères entrée, établissement, dissémination et impact est multiplicative. L'index global du risque phytosanitaire ainsi calculé est non seulement en accord avec la notion du risque phytosanitaire comme explicitée précédemment, mais surtout détermine le rang de classement des ON.

### Un système d'évaluation des critères basé sur une étude préalable des données disponibles

Dans le modèle de hiérarchisation développé, l'assignation des scores des critères est corrélée à la sélection de classes de risque préalablement définies. L'intérêt de sélectionner des classes de risque explicites plutôt que d'attribuer une note comprise entre deux valeurs est de conserver une notation homogène entre les différents ON évalués mais aussi entre différents évaluateurs. La clarté des intitulés des critères et des classes de risque a été tout particulièrement soignée pour limiter des disparités d'interprétation sémantique. C'est pourquoi quatre à cinq classes de risque croissant ont été définies pour chaque critère. Par exemple pour le critère « Spectre des plantes hôtes de l'ON », quatre classes de risque croissant ont été définies : (1) la plante hôte de l'ON est une seule espèce ; (2) les plantes hôtes de l'ON sont des espèces appartenant au même genre ; (3) les plantes hôtes de l'ON appartiennent à plusieurs des genres de la même famille ; (4) les plantes hôtes de l'ON appartiennent à plusieurs familles. Pour les critères quantitatifs tels que les volumes importés, les surfaces de production, les valeurs à la production et à l'exportation, des données statistiques spécifiques ont été préalablement recueillies pour le maximum de plantes hôtes référencées. À partir de ce jeu de données, cinq classes d'effectifs égaux ont été établies pour chacun de ces critères. Les classes de risque correspondent alors respectivement aux cinq intervalles des classes d'effectifs égaux. L'intérêt de cette approche est de discriminer les attributs des classes de manière homogène. De plus l'évaluateur peut aisément sélectionner la classe correspondante aux données disponibles.

### Une évaluation déterministe du profil invasif des ON qui tient compte de l'incertitude des données

Étant donné que l'évaluation des critères est basée sur des données connues, la méthode de hiérarchisation est déterministe. Elle a pour qualité principale de mettre en exergue les différences relatives des capacités invasives des ON réglementés. Le point essentiel est par conséquent la robustesse des groupes de ON dans le classement plutôt

que leur rang de classement au sens strict. Par ailleurs, cette approche implique des mises à jour régulières des données afin que le classement des ON reste pertinent au regard des nouvelles connaissances décrites par la communauté scientifique et technique. En effet, l'objectif de la méthode de hiérarchisation est de fournir une base scientifique structurée soutenant la réflexion des décideurs et autres parties prenantes pour la catégorisation des ON en santé du végétal.

Par ailleurs, au cours de l'évaluation des critères, il s'avère que les données disponibles sont parfois contradictoires ou insuffisamment pertinentes : c'est toute la notion d'incertitude. Celle-ci est prise en compte et évaluée dans notre méthode en sélectionnant plusieurs classes de risque pour un même critère. Les scores des classes de risque minimal et maximal sélectionnées définissent dès lors les bornes d'un intervalle quantifiant l'incertitude de l'évaluation. Plus l'amplitude de l'intervalle est importante, plus l'incertitude de l'évaluation du critère est notable. Le rang de classement exprimé à partir de ces intervalles permet de ce fait de distinguer les ON avec des profils invasifs plus incertains.

### Une méthode implémentée dans un outil informatique opérationnel et didactique

Afin de classer un panel important de ON tout en traçant l'évaluation de leur profil invasif, la méthode de hiérarchisation a été implémentée sur un support informatique à partir du logiciel Microsoft Excel®. L'avantage de cette interface est d'offrir la possibilité d'automatiser l'agrégation des critères une fois toutes les données renseignées par l'évaluateur. De plus, une macro met à jour le classement final dès lors qu'un nouveau bioagresseur est évalué. L'organisation de l'évaluation des critères a été développée dans le souci d'une prise en main rapide et autonome. Ainsi une notice intégrée détaille les procédures d'évaluation des critères. La lisibilité de la méthode de hiérarchisation et l'ergonomie du support informatique ont été confirmées par plusieurs évaluateurs sollicités. De ce fait, la méthode de hiérarchisation développée permet non seulement une interprétation facilitée des résultats mais aussi une consultation transparente des évaluations grâce à un outil didactique.

### Quelles sont les caractéristiques principales du classement obtenu avec la méthode de hiérarchisation ?

#### Des résultats préliminaires validés à dire d'experts

La pertinence du classement des ON établi à partir de la méthode de hiérarchisation a été évaluée à partir de dire d'experts. Tout d'abord vingt-cinq ON non-natifs et natifs regroupant tous les taxons et ciblant les filières végétales majeures ont été sélectionnés. Ensuite, le profil phytosanitaire de ces ON a été qualifié à dire d'expert de fort, moyen ou faible sans aucune consigne d'attribution. Puis ces vingt-cinq ON ont été classés à partir de la méthode de hiérarchisation. Les résultats ont montré une nette corrélation entre le rang de classement de ces ON et le profil de risque à dire d'expert. Plus précisément, la méthode de hiérarchisation a permis de discriminer sans ambiguïté les ON au profil de risque fort des ON au profil de risque faible. Par exemple *Diabrotica virgifera virgifera*, *Tilletia indica* et *Meloidogyne chitwoodi* classés en premier rang sont qualifiés de profil de risque fort par les experts ; alors qu'*Aculops fuchsiae* et *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* qualifiés de profil de risque faible par les experts



## Point de vue

sont classés en dernier rang. Par contre les ON avec un profil de risque moyen ont des rangs de classement plus dispersés tels que *Phytophthora ramorum* et *Erwinia amylova*. Ce résultat n'est pas surprenant au regard de la subjectivité du terme « moyen » pour qualifier le risque.

### Une corrélation évidente entre le rang des ON et la disponibilité en méthode d'analyse

Dans une optique de prioriser le développement des méthodes d'analyses au sein du Laboratoire de la santé des végétaux, la disponibilité des méthodes d'analyses officielles, des protocoles de diagnostic de l'OEPP et des méthodes internes validées au laboratoire a été vérifiée pour chaque bioagresseur parallèlement à l'évaluation des critères décrits précédemment. Cette analyse a mis en évidence que les ON pour lesquels des méthodes d'analyse sont disponibles ont des rangs de classement élevés. Par conséquent, ce résultat conforte la pertinence des priorités de travail actuelles du laboratoire de la santé des végétaux et réciproquement, renforce la confiance dans la méthode de hiérarchisation.

### Les limites de la méthode de hiérarchisation

La méthode de hiérarchisation comprend cinq métacritères d'évaluation qui sont pertinents uniquement pour les ON qui n'occupent pas toute leur niche écologique potentielle en France. Autrement dit, l'évaluation des métacritères entrée, établissement et dissémination n'est pas appropriée pour les ON autochtones à notre pays ou bien naturalisés en France sur la totalité de leur aire potentielle d'établissement. De ce fait, la définition du statut<sup>(1)</sup> du bioagresseur en France métropolitaine est un pré-requis indispensable.

La méthode de hiérarchisation est basée sur un modèle semi-quantitatif n'incluant ni la dynamique temporelle ni l'hétérogénéité spatiale de l'invasion biologique à l'échelle de la France métropolitaine. Pour pallier cette limite, de nombreuses études proposent l'évaluation quantitative des facteurs clés de l'invasion biologique à partir d'équations modélisant leur évolution dans le temps et dans l'espace [11]. Toutefois, comme le soulignent ces auteurs, une telle approche mobilise des ressources spécifiques complexes qui limitent des utilisations généralisées.

### Conclusion

Cet outil de hiérarchisation des ON fournit une base scientifique primordiale à l'évolution de la politique phytosanitaire française. Au-delà de la catégorisation des dangers sanitaires en santé du végétal, la méthode de hiérarchisation offre aussi d'autres perspectives. Dans une dynamique d'anticipation des risques phytosanitaires, cette approche est un support judicieux pour identifier des ON qui mériteraient des évaluations de risque plus approfondies, et à plus long terme des méthodes d'analyse adéquates. De plus, la flexibilité de cette méthode est une opportunité pour d'autres contextes biogéographiques. Ainsi depuis le second semestre 2012, une adaptation de la méthode de hiérarchisation est en cours de déploiement pour les départements d'outre mer afin de tenir compte de leurs spécificités insulaires. Enfin, la démarche amorcée est un atout indéniable pour conforter les positions de la France lors de la révision du régime de la protection des végétaux au niveau européen.

### Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement Raphaëlle Mouttet pour sa contribution à l'étude des données statistiques et Florian Ouvrard pour la programmation des fonctions en code VBA sous Excel®, ainsi que les partenaires ARVALIS, Cirad, Cetiom, Ctifl, DGAI, FNLN, FranceAgriMer, France Nature Environnement, GEVES, Inra, Irstea, UFS (Union française des semenciers) sollicités pendant l'étude.

### Références bibliographiques

1. Hulme, P.E., Trade, transport and trouble: Managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 2009. 46(1): p. 10-18.
2. Liebhold, A.M., et al., Live plant imports: The major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2012. 10(3): p. 135-143.
3. Paini, D.R. and D. Yemshanov, Modelling the Arrival of Invasive Organisms via the International Marine Shipping Network: A Khapra Beetle Study. *PLOS ONE*, 2012. 7(9).
4. Brasier, C.M., The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology*, 2008. 57(5): p. 792-808.
5. Pimentel D., Biological invasions Economic and Environmental costs of Alien Plant, Animal and Microbe Species, ed. P. David 2002: United States of America.
6. Hulme, P.E., et al., Will threat of biological invasions unite the European union? *Science*, 2009. 324(5923): p. 40-41.
7. Dean, R., et al., The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2012. 13(4): p. 414-430.
8. Mansfield, J., et al., Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2012. 13(6): p. 614-629.
9. Scholthof, K.B.G., et al., Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2011. 12(9): p. 938-954.
10. FAO, Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks and living modified organisms. *International Standards for Phytosanitary Measures No. 11, IPPC-FAO*, Editor 2004: Rome.
11. Leung, B., et al., TEASing apart alien species risk assessments: A framework for best practices. *Ecology Letters*, 2012. 15(12): p. 1475-1493.
12. Blackburn, T.M., et al., A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 2011. 26(7): p. 333-339.
13. Holt, J., et al., Tools for visualizing and integrating pest risk assessment ratings and uncertainties. *EPPO Bulletin*, 2012. 42(1): p. 35-41.
14. Heikkilä, J., A review of risk prioritisation schemes of pathogens, pests and weeds: Principles and practices. *Agricultural and Food Science*, 2011. 20(1): p. 15-28.

(1) Par exemple: organisme nuisible exotique récemment introduit ou bien autochtone.



## Actualités

### Les évolutions nécessaires du régime communautaire de la santé des végétaux d'après l'ONPV française

Laurence Bouhot-Delduc (laurence.bouhot-delduc@agriculture.gouv.fr), Nicolas Canivet (nicolas.canivet@agriculture.gouv.fr)

Bureau des semences et de la santé des végétaux, sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux, service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire, Direction générale de l'alimentation, Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, Paris, France

Le régime communautaire de la santé des végétaux (CPHR) a pour objectif de protéger le territoire européen contre l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles aux végétaux. Cette protection vise les cultures et la flore sauvage, quel que soit le milieu (terres cultivées, forêts, espaces publics, environnement naturel...). Ce régime repose essentiellement sur la directive 2000/29/CE qui reprend notamment les dispositions d'une directive communautaire de 1977. Or ces dernières décennies ont été marquées par une évolution importante du contexte :

- accentuation des facteurs de risque (augmentation importante des échanges internationaux, élargissement de l'Union européenne, changements climatiques) ;
- moyens humains et financiers des autorités compétentes de plus en plus limités ;
- environnement en forte évolution (nouvelles normes mondiales et régionales, nouvelles organisations dont l'Autorité européenne de sécurité des aliments, nouvelles attentes sociétales...).

Sous l'impulsion de la présidence française, le Conseil de l'Union européenne (UE) a conclu dès novembre 2008 à la nécessité de réviser le dispositif réglementaire actuel. L'évaluation du CPHR a été menée de juin 2009 à mai 2010 et a débouché sur la formulation de 15 recommandations qui montrent notamment le besoin de moderniser le régime de la santé des végétaux via :

- un plus grand accent mis sur la prévention ;
  - des risques mieux ciblés via leur priorisation ;
  - une solidarité accrue pour permettre une meilleure action possible pour les problèmes d'importance communautaire.
- Cette évaluation et ces recommandations ont servi de base de réflexion et de discussion aux États membres et à la Commission européenne dans le cadre notamment de « *Tasks forces* » mises en place en 2010 et 2011, avec pour objectif de dégager de façon consensuelle parmi les 27 États membres les évolutions souhaitables.

Parallèlement, les États généraux du sanitaire (EGS) se sont tenus en France de janvier à avril 2010 à la demande du ministre en charge de l'agriculture, avec l'objectif de rassembler les différents acteurs de la santé animale et végétale dans une réflexion commune sur le bilan et les perspectives du dispositif sanitaire français et communautaire. Ces travaux ont permis à l'Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) française de définir dix priorités qui, pour la nouvelle stratégie communautaire de la santé des végétaux, sont dans leur grande majorité en phase avec les voies d'amélioration envisagées par nos partenaires européens :

- définir des organismes nuisibles prioritaires en fonction du risque phytosanitaire ;
- exercer une surveillance générale de l'état phytosanitaire du territoire de l'UE ;

- renforcer les exigences et les contrôles à l'importation des pays tiers pour empêcher l'entrée et l'établissement des organismes nuisibles dans l'UE ;
- renforcer le contrôle des échanges intra-communautaires pour empêcher la dissémination des organismes nuisibles à l'intérieur du territoire de l'UE ;
- placer la prévention au cœur du régime phytosanitaire en associant et en responsabilisant les professionnels ;
- renforcer la prise en compte du volet économique ;
- adapter continuellement la réglementation à l'évolution de la situation phytosanitaire et améliorer sa lisibilité ;
- harmoniser et améliorer l'efficacité des pratiques d'inspection ;
- soutenir et développer la recherche ;
- articuler la stratégie de santé des végétaux avec les autres politiques européennes.

Dans ce cadre, l'ONPV française défend plus particulièrement certaines évolutions qui lui paraissent nécessaires pour une stratégie communautaire de la santé des végétaux véritablement efficace.

Tout d'abord, le renversement de la stratégie de l'UE à l'importation lui semble indispensable pour une réelle protection du territoire communautaire. Il s'agirait de passer du système actuel, où tout ce qui n'est pas explicitement interdit est autorisé, à un système où, au moins pour les nouveaux commerces de végétaux destinés à la plantation, une analyse du risque phytosanitaire (ARP) préalable devrait être réalisée avant que l'importation soit autorisée (ou non). Les produits végétaux importés seraient ainsi soumis à des exigences plus strictes et surtout mieux adaptées aux risques qu'ils présentent, ce qui permettrait de véritablement garantir leur qualité phytosanitaire. En outre, l'ONPV française est favorable à l'élargissement du champ du CPHR afin qu'il couvre également certaines plantes exotiques envahissantes qui sont nuisibles aux végétaux et qui ont un impact économique ou environnemental important. En effet, le CPHR doit s'inscrire dans le cadre de la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV) et de sa définition des organismes nuisibles au sens large (« toute espèce, souche ou biotype de végétal, d'animal ou d'agent pathogène nuisible aux végétaux ou produits végétaux »).

Enfin, l'ONPV française estime indispensable de passer à un système d'agrément préalable des établissements qui mettent en circulation des végétaux soumis au passeport phytosanitaire européen (PPE) et qui sont autorisés à auto-éditer des PPE. Cet agrément serait délivré après vérification des compétences de l'établissement notamment en termes de système interne de maîtrise des risques (bonnes pratiques, traçabilité, contrôles internes...). En effet, un contrôle d'établissement dans le cadre du PPE devrait consister non seulement en un examen des matériels présents le jour de l'inspection (contrôle PPE actuel), mais aussi et surtout en un contrôle de second niveau de la



## Actualités

bonne conduite de l'établissement, c'est-à-dire des conditions de production des végétaux en vue de la prévention des problèmes phytosanitaires. La pression de contrôle serait modulée en fonction du type d'établissement et de l'analyse du risque réalisée par les autorités phytosanitaires, c'est-à-dire notamment en fonction de la formalisation par l'entreprise d'un plan de maîtrise phytosanitaire. Ce système d'agrément favoriserait une plus grande efficacité des contrôles officiels et permettrait d'atteindre un meilleur niveau global de qualité phytosanitaire grâce à une responsabilisation accrue des professionnels.

Du fait de la charge conséquente prévisible pour certains petits établissements (secteur ornemental notamment), le choix pourrait être laissé aux opérateurs de ne pas rentrer dans ce système d'agrément, auquel cas ils feraient l'objet de contrôles officiels renforcés. Dans tous les cas néanmoins, toutes les entreprises, qu'elles soient autorisées ou non à auto-éditer des PPE, devraient respecter des obligations générales de maîtrise interne des risques phytosanitaires à définir au niveau communautaire et qui devraient aller au-delà de la simple obligation de traçabilité des produits végétaux.

Telles sont les voies d'amélioration que porte l'ONPV française dans les discussions sur la nouvelle réglementation européenne, dont la proposition officielle de texte par la Commission européenne est attendue pour 2013.

### Le Réseau français pour la santé végétale (RFSV): un nouvel outil au service de la santé des végétaux

Jean-Charles Bocquet (jcbocquet@uipp.net)

Directeur général, Union des industries de la protection des plantes (UIPP), Boulogne-billancourt, France

Les États généraux du sanitaire organisés en 2010 par le ministre de l'agriculture ont démontré l'importance stratégique de la maîtrise de la santé des cultures et des forêts pour concilier les enjeux économiques et environnementaux de notre agriculture. Ainsi, la Direction générale de l'alimentation (DGAI) a confié à l'Acta (Réseau des instituts techniques), l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), l'Inra (Institut national de recherche agronomique) et l'UIPP (Union des industries de la protection des plantes) composant, ensemble, le secrétariat, le lancement du nouveau Réseau français pour la santé végétale (RFSV). Ce réseau réuni pour la 1<sup>re</sup> fois en octobre 2011 à l'initiative de l'Anses a depuis pris son essor et rassemble une centaine de membres. Le rôle de ce réseau est de permettre l'amélioration des connaissances en santé des végétaux.

Dans cet objectif, le RFSV a pour mission de favoriser les partenariats de recherche entre les acteurs du public et du privé, tout au long de la chaîne, du terrain au laboratoire d'analyse et cherche prioritairement à renforcer les capacités diagnostiques, sans écarter les méthodes de contrôle des bio-agresseurs.

Sur cette base, le réseau a identifié des objectifs prioritaires et **dix groupes de travail** sont engagés sur des thématiques variées :

- meilleure lisibilité de l'offre en matière d'analyses, de compétences et de recherche; des annuaires seront constitués et confrontés aux besoins. Un dispositif pour le développement des compétences est aussi envisagé;
- recensement des besoins en nouvelles méthodes d'analyses de laboratoires et méthodes de lutte relatives aux organismes nuisibles; des outils novateurs et des initiatives seront proposés et expérimentés. Il conviendra d'établir également des canaux de transfert de méthodes des laboratoires de la recherche publique et privée vers les laboratoires de routine;
- amélioration des connaissances en matière d'évolution des bio-agresseurs, de leur caractérisation, ainsi qu'en matière de résistance et tolérance des végétaux à ceux-ci. Elles seront développées également en épidémiologie en s'appuyant sur les données issues des laboratoires et du terrain.

Pour toute information : [www.rfsv.fr](http://www.rfsv.fr)



## Focus sur un laboratoire

### Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes – l'un des objectifs : répondre aux besoins des laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles aux plantes

Françoise Petter (petter@epo.int), Muriel Suffert, Anne-Sophie Roy, Damien Griessinger, Madeleine McMullen  
Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes, Paris, France

**L'OEPP est une organisation intergouvernementale en charge de la coopération européenne en matière de protection des végétaux. Ses objectifs sont de protéger la santé des plantes dans les domaines de l'agriculture, de la sylviculture et dans l'environnement non cultivé, de bâtir des stratégies internationales permettant de lutter contre l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles dangereux, d'encourager l'harmonisation des réglementations phytosanitaires et de tout autre type d'actions officielles dans le domaine de la protection des plantes, ainsi que de promouvoir des méthodes de lutte sûres et efficaces. Cet article présente les différentes activités déployées dans ce cadre.**

#### Introduction

L'OEPP est une organisation intergouvernementale responsable la coopération européenne en matière de protection des végétaux. En vertu de la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV), l'OEPP est l'Organisation régionale de la protection des végétaux (ORPV) de la région Europe et Méditerranée. Fondée en 1951 par 15 États européens, l'OEPP compte aujourd'hui 50 membres (Figure 1) qui couvrent la quasi-totalité des pays de la région euro-méditerranéenne. Les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV) sont les points de contact de l'OEPP. L'OEPP a pour objectif de protéger la santé des plantes dans les domaines de l'agriculture, de la sylviculture et dans l'environnement non cultivé, de bâtir des stratégies internationales permettant de lutter contre l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles dangereux, d'encourager l'harmonisation des réglementations phytosanitaires et de tout autre type d'actions officielles dans le domaine de la protection des plantes, ainsi que de promouvoir des méthodes de lutte sûres et efficaces. En tant qu'Organisation régionale de la protection des végétaux, l'OEPP prend également part aux réflexions internationales sur la protection des végétaux qui sont organisées par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et le Secrétariat de la CIPV. L'encadré 1 présente l'OEPP de manière plus détaillée.

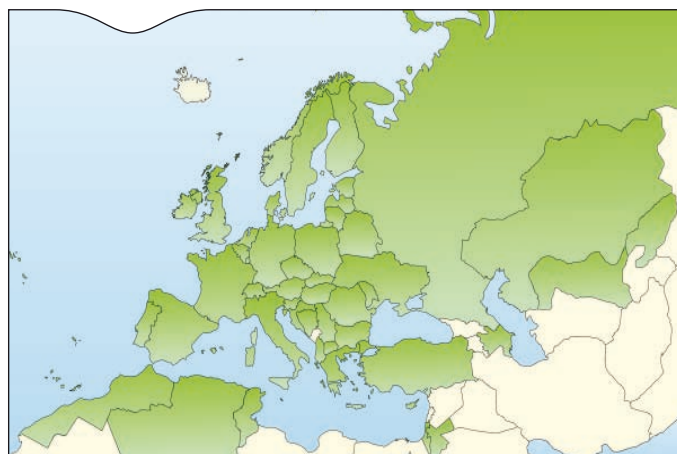


Figure 1. Carte des États membres de l'OEPP

L'un des principaux objectifs de l'OEPP est d'aider ses membres à prévenir l'introduction ou la dissémination d'organismes nuisibles dangereux. L'organisation s'est ainsi vue confier les missions suivantes :

- identifier les organismes nuisibles pouvant présenter un risque pour la région (alerte précoce) ;
- évaluer leur risque pour la région et formuler des propositions concernant les mesures pouvant être prises (analyse du risque phytosanitaire).

Lorsqu'un organisme nuisible a été évalué et que les États ont convenu qu'il devait être ajouté aux listes de l'OEPP relatives aux organismes nuisibles recommandés pour réglementation, l'OEPP peut élaborer des recommandations relatives aux méthodes de détection et d'identification de l'organisme nuisible en question (protocoles de diagnostic et méthodes d'inspection phytosanitaire) ainsi que les méthodes d'éradication et de lutte contre celui-ci. Outre ses activités spécifiquement liées aux organismes nuisibles, l'OEPP élabore également des recommandations concernant l'assurance qualité dans les laboratoires, afin de favoriser l'harmonisation des procédures au sein de la région OEPP. Pour cela, une grande quantité de données sur les organismes nuisibles présentant un risque phytosanitaire pour la région OEPP doit être collectée, données que l'organisation met à la disposition de ses membres. Différentes bases de données ont ainsi été élaborées, parmi lesquelles le système informatique pour l'information sur la quarantaine végétale (*Plant Quarantine data Retrieval system*, PQR) et la base de données de l'OEPP sur le diagnostic. Les différentes activités déployées dans ce cadre et présentant un intérêt pour les laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles aux végétaux sont présentées ci-après.

#### Activités de l'OEPP répondant aux besoins des laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles aux végétaux

##### Alerte précoce

Le secrétariat de l'OEPP a mis en place différents systèmes d'alerte précoce afin d'identifier les risques émergents :

- la Liste d'alerte attire l'attention des États membres de l'OEPP sur certains organismes nuisibles pouvant présenter un risque sur leur territoire. Elle est mise à jour régulièrement : [http://www.epo.int/QUARANTINE/Alert\\_List/alert\\_list.htm](http://www.epo.int/QUARANTINE/Alert_List/alert_list.htm) ;



## Focus sur un laboratoire

### L'organisation de l'OEPP

L'OEPP est administrée par un Comité exécutif (sept États élus sur un principe rotation se réunissant deux fois par an), sous le contrôle de son Conseil (représentants de tous les États membres, réunissant une fois par an en général les chefs des ONPV) dirigé par un président et par un vice-président élus *intuitu personae*.

Le secrétariat (personnel permanent de l'OEPP travaillant au siège social, à Paris) est composé de 13 personnes (dont 8 scientifiques). L'OEPP est directement financée par les contributions annuelles de ses États membres. Ses langues officielles sont l'anglais, le français et, dans certains cas, le russe.

Les activités techniques de l'OEPP dans le domaine des mesures phytosanitaires (souvent appelées « quarantaine végétale ») sont pilotées par le groupe de travail sur les réglementations phytosanitaires. Ce groupe de travail se réunit une fois par an (en juin). Les réunions se tiennent dans les États membres, dans toute la région OEPP. Le groupe de travail élabore ses programmes et les soumet pour approbation au Comité exécutif et au Conseil; il confie des tâches spécifiques aux groupes ou panels d'experts (dans le cadre d'activités ponctuelles). Les panels sont constitués de spécialistes issus des États membres, nommés *intuitu personae* par leur ONPV respective. Ils préparent des projets de norme détaillés qui seront recommandés à tous les États membres (après approbation formelle du Conseil). Chaque année, 20 à 25 réunions de panels se tiennent à Paris ou dans des centres scientifiques de la région OEPP. Chaque panel se réunit généralement une fois par an, cette fréquence pouvant être réévaluée en fonction des priorités et du programme de travail de l'organisation. Les réunions de certains panels peuvent avoir des intervalles plus longs. Les activités techniques de l'organisation dépendent de la participation active et constante des experts des États membres aux réunions du groupe de travail et des panels.

### Recommandations de l'OEPP à ses États membres

À partir des travaux menés à bien par les différents organes techniques de l'organisation, l'OEPP émet des recommandations aux ONPV de ses États membres (y compris la recommandation concernant les organismes nuisibles devant être réglementés). Ces recommandations constituent des normes régionales en vertu de la CIPV révisée. Pour garantir une adhésion internationale, les projets de norme suivent une procédure d'approbation complexe, au cours de laquelle tous les États membres ont l'opportunité d'exprimer leur point de vue. Les décisions finales sont prises de façon consensuelle et les normes de l'OEPP sont officiellement adoptées par le Conseil de l'OEPP. L'OEPP élabore des normes dans les deux principaux domaines d'activité de l'organisation: produits phytosanitaires et mesures phytosanitaires.

Toutes les normes sont également disponibles en accès libre sur le site Internet de l'OEPP:

<http://archives.eppo.int/index.htm>

Pour toute information complémentaire, rendez-vous sur le site de l'OEPP: <http://www.eppo.int/>

- un bulletin d'information mensuel gratuit (service d'information de l'OEPP) reprend les données collectées auprès des Organisations nationales de la protection des végétaux ou issues de la littérature scientifique et de recherches réalisées sur Internet: [http://www.eppo.int/PUBLICATIONS/reporting/reporting\\_service.htm](http://www.eppo.int/PUBLICATIONS/reporting/reporting_service.htm);
  - la liste des plantes exotiques envahissantes devant être gérées en priorité dans les États membres de l'OEPP est établie selon un processus de priorisation: [http://www.eppo.int/INVASIVE\\_PLANTS/ias\\_lists.htm#IAPList](http://www.eppo.int/INVASIVE_PLANTS/ias_lists.htm#IAPList).
- Grâce à ces listes, les laboratoires peuvent être alertés sur les nouveaux organismes nuisibles potentiels pour lesquels ils peuvent être amenés à mettre au point ou valider des tests diagnostiques.

### Évaluation des risques potentiels: analyse du risque phytosanitaire

Les mesures prises par les différents États pour protéger leur territoire de l'introduction de nouveaux organismes nuisibles doivent être techniquement justifiées. Un système a été mis en place pour effectuer des Analyses de risque phytosanitaire (ARP) au niveau de l'OEPP et des groupes d'experts se réunissent pour procéder à des ARP sur certains organismes nuisibles. Cinq ARP sont réalisées chaque année; chacune comprend une phase d'identification des mesures possibles pour prévenir l'introduction de ces organismes nuisibles. Des experts issus de laboratoires implantés dans la région OEPP participent souvent à ces évaluations et l'OEPP souhaite renforcer cette collaboration.

### Recommandations concernant les organismes nuisibles devant être réglementés en tant qu'organismes de quarantaine

Les organismes nuisibles qui ont été évalués selon le système de l'OEPP et dont la réglementation en tant qu'organismes de quarantaine a été recommandée pour la région OEPP sont placés sur les listes A1 et A2 de l'OEPP. L'OEPP tient à jour la documentation requise sur les organismes nuisibles portés sur ces listes. Ces listes permettent de définir des priorités pour l'élaboration de protocoles de diagnostic.

### Recommandations concernant les méthodes de détection et d'identification des organismes nuisibles: protocoles de diagnostic

Le programme d'élaboration de protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés de la région OEPP a été lancé en 1998. Les travaux sont menés à bien par différents panels sur le diagnostic et le programme de travail est supervisé par un panel horizontal (panel sur le diagnostic et l'assurance qualité). La liste des panels existant au sein de l'OEPP est disponible à l'adresse suivante: [http://www.eppo.int/ABOUT\\_EPPO/panels.htm](http://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/panels.htm). Les protocoles de diagnostic sont rédigés par des auteurs désignés en suivant un format commun, puis sont révisés par les panels sur le diagnostic. Ils sont approuvés suivant la procédure habituelle d'approbation des normes de l'OEPP. Les toutes premières normes de l'OEPP pour le diagnostic ont été publiées en 2001. À ce jour, plus de 100 normes de diagnostic spécifiques aux organismes nuisibles ont été approuvées, pour tous les groupes d'organismes nuisibles; plus de dix autres sont en préparation. Les protocoles de diagnostic sont en accès libre à l'adresse suivante: <http://archives.eppo.int/EPPOStandards/diagnostics.htm>.



## Focus sur un laboratoire

Afin de garantir la qualité des diagnostics effectués au sein des laboratoires, des normes d'assurance qualité ont également été élaborées et deux normes d'assurance qualité ont été adoptées pour les laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles aux végétaux :

- PM 7/84 : exigences de base pour la gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles aux végétaux ;
- PM 7/98 : exigences spécifiques pour les laboratoires se préparant à l'accréditation pour une activité de diagnostic phytosanitaire.

La norme PM 7/98 est actuellement en phase de révision pour que soit prise en compte l'expérience récente des laboratoires en matière de validation des tests.

Pour déployer ces activités, l'OEPP doit collecter une grande quantité de données sur les organismes nuisibles présentant un risque phytosanitaire pour la région OEPP, données qu'elle met à la disposition de ses membres. Différentes bases de données ont ainsi été élaborées, parmi lesquelles le système informatique pour l'information sur la quarantaine végétale (*Plant Quarantine data Retrieval system*, PQR) et la base de données de l'OEPP le diagnostic. Un système destiné à l'Organisation nationale de la protection des végétaux est également en cours d'élaboration pour la transmission de signalements d'organismes nuisibles.

### Système informatique pour l'information sur la quarantaine végétale (PQR)

PQR est la base de données de l'OEPP sur les organismes de quarantaine. Le secrétariat de l'OEPP a commencé à développer ce système en 1984. La toute première base de données est sortie en 1990, mais il s'agissait d'un outil interne destiné au secrétariat de l'OEPP. Il a alors été suggéré que cet outil pourrait être utile aux États membres de l'OEPP et la première version de PQR pour les ONPV a été éditée en 1991. Entre 1991 et 2007, plusieurs versions de PQR ont été distribuées aux ONPV, sur des disques ou des CDROM. En avril 2007, le Comité exécutif a décidé que cette base de données devait être mise à disposition gratuitement, sur le site Internet de l'OEPP (sous la forme d'un système informatique téléchargeable). La dernière version de PQR (5.0) a été lancée en 2011 ; son interface a été largement retravaillée pour permettre un accès plus rapide aux données et une mise à jour « en temps réel » des contenus.

Cette base de données est développée et mise à jour par le secrétariat de l'OEPP. Elle donne accès à des informations sur :

- tous les organismes nuisibles figurant sur les listes A1 et A2 de l'OEPP et mentionnés dans la directive européenne 2000/29 ;
- les organismes nuisibles figurant sur la Liste d'alerte de l'OEPP ;
- les végétaux figurant sur la liste des plantes exotiques envahissantes de l'OEPP ;
- de nombreux autres organismes de quarantaine et plantes envahissantes présentant un intérêt pour d'autres régions du monde (données obtenues auprès de la FAO, du CABI ou d'autres ORPV, mais moins détaillées que celles concernant les organismes nuisibles présentant un intérêt pour l'OEPP et l'Union européenne (UE)).

Pour chaque organisme nuisible, il est possible d'obtenir la liste des plantes hôtes, la liste des marchandises pouvant servir de filières dans les échanges internationaux, ainsi que des informations détaillées sur la répartition géographique de l'organisme nuisible en question (avec des cartes). Inversement, il est également possible d'obtenir des listes

spécifiques d'organismes nuisibles en indiquant une espèce hôte, une marchandise et un pays concerné. PQR contient des détails relatifs à la nomenclature générale et la taxonomie sur les organismes nuisibles et leurs hôtes.

À ce jour, PQR contient des informations étayées sur plus de 1 400 organismes nuisibles. Néanmoins, comme indiqué précédemment, les données sont plus complètes pour les organismes nuisibles figurant sur les listes de l'OEPP/EU que pour d'autres types d'organismes nuisibles.

PQR peut être téléchargé gratuitement à l'adresse suivante : <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.

Une base de données en ligne (interface web) est en cours de développement.

### Système informatisé de l'OEPP pour les signalements d'organismes nuisibles

En septembre 2011, le Conseil de l'OEPP a adopté un nouveau formulaire PM 1/5(1) pour les signalements d'organismes nuisibles. Depuis lors plusieurs États membres de l'OEPP déclarent utiliser ce format pour signaler l'apparition de foyers d'organismes nuisibles sur leur territoire. Le secrétariat de l'OEPP élabore actuellement un format informatique reposant sur cette norme. En 2012/2013, tous les États membres de l'OEPP seront invités à utiliser et à donner leur avis sur ce format. Il est également prévu d'organiser des réflexions techniques avec le secrétariat de la Convention internationale pour la protection des végétaux, afin d'élaborer un format XML commun qui permettra aux États de transmettre leurs signalements d'organismes nuisibles au portail phytosanitaire international via l'OEPP, s'ils souhaitent le faire ainsi.

### Base de données de l'OEPP sur le diagnostic

En 2004, le Conseil de l'OEPP a souligné que la mise en œuvre des réglementations phytosanitaires pour les organismes de quarantaine était menacée par une érosion de l'expertise dans le domaine phytosanitaire et a déclaré un état d'urgence pour la Santé des plantes, plus généralement connu sous le nom de « déclaration de Madère » (OEPP, 2004). À la suite de cette déclaration, plusieurs initiatives régionales ont vu le jour.

Au niveau de l'UE, l'idée d'un réseau phytosanitaire, ERA-Net, destiné à coordonner les programmes nationaux et régionaux de recherche phytosanitaire a été émise en 2005 et a abouti à la mise en œuvre du projet EUPHRESKO (*European Phytosanitary Research Coordination*, <http://www.euphresco.org> (Inman, 2006)). Une autre initiative régionale a été lancée par le groupe d'experts sur le diagnostic de l'OEPP en 2005 : ce groupe d'experts a décidé d'identifier des actions pratiques permettant d'améliorer la collaboration en matière de diagnostic en Europe et d'assurer un bon appui scientifique pour les activités de diagnostic des ONPV. Il a recommandé que le secrétariat de l'OEPP procède à un inventaire de l'expertise existante en matière de diagnostic dans sa région, ainsi que des moyens de formation disponibles dans le domaine du diagnostic. C'est ainsi que la base de données de l'OEPP sur le diagnostic a vu le jour. Cette base de données recense l'expertise disponible dans la région OEPP. Elle a pour but de couvrir les domaines d'expertise suivants : organismes nuisibles réglementés (à savoir, organismes nuisibles figurant sur les listes A1 et A2 de l'OEPP et organismes nuisibles visés par les normes PM4 de l'OEPP : production de végétaux sains destinés à la plantation), organismes nuisibles pouvant présenter un risque pour les États membres de l'OEPP (liste d'alerte de l'OEPP), et plantes





## Focus sur un laboratoire

figurant sur la liste des plantes exotiques envahissantes de l'OEPP. Cette base de données n'inclut pas les organismes nuisibles courants largement répandus dans la région OEPP. Le Secrétariat de l'OEPP tient cette base de données à jour, mais il convient de souligner que toutes les informations qui y figurent reposent sur les déclarations personnelles de chaque expert quant à leur expertise.

En décembre 2012, une nouvelle rubrique intitulée « validation des données pour les tests diagnostiques » a été ajoutée, à la demande des laboratoires qui s'engagent dans une démarche d'accréditation. En effet, étant donné que les laboratoires qui se préparent à l'accréditation doivent exclusivement utiliser des tests validés, il a été considéré que le partage des données de validation au niveau de l'OEPP permettrait d'économiser des ressources et de favoriser la collaboration. Les informations contenues dans la base de données ont été produites par différents laboratoires des États membres de l'OEPP. Les données de validation sont présentées dans un format commun, élaboré par le groupe d'experts de l'OEPP sur le diagnostic et l'assurance qualité. Ces données de validation peuvent être fournies par tout laboratoire enregistré dans la base de données de l'OEPP sur le diagnostic.

Cette base de données est accessible à l'adresse suivante: <http://dc.eppo.int/>

Enfin, depuis 1985, l'OEPP propose un programme régulier de conférences et d'ateliers sur le diagnostic. Les actes de ces différents événements sont accessibles sur la page suivante: [http://archives.eppo.int/MEETINGS/EPPO\\_workshops.htm](http://archives.eppo.int/MEETINGS/EPPO_workshops.htm). Ces rencontres sont, pour les experts, des occasions uniques de rencontre et d'échanges sur le diagnostic des organismes nuisibles réglementés.

### Conclusion

L'une des conséquences du développement du commerce international ces dernières années est l'introduction de plusieurs organismes nuisibles à laquelle doivent faire face les pays européens (par exemple, *Bursaphelenchus xylophilus*; *Drosophila suzukii*; *Tuta absoluta*; *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*...). En fournissant des informations et des alertes rapides aux Organisations nationales de la protection des végétaux et en favorisant l'harmonisation des diagnostics phytosanitaires, l'OEPP s'efforce de prévenir l'introduction de nouveaux organismes nuisibles provenant d'autres parties du monde et susceptibles de provoquer des dégâts au niveau des cultures ou de l'environnement et, en cas d'introduction, à la limitation de leur dissémination au sein de la région.

### Références bibliographiques

Inman A (2006) EU initiatives in the framework of the Madeira declaration. Communication présentée lors du colloque OEPP « Maintien de la capacité de diagnostic dans la région OEPP » (Prague, 21/09/2006), disponible à l'adresse <http://www.euphresco.org/public/publications/index.cfm?id=30> (consulté en janvier 2010).

OEPP/EPPO (2004) Plant Health Endangered – State of Emergency. Site Internet de l'OEPP (consulté le 03/03/2013), [http://www.eppo.org/STANDARDS/position\\_papers/madeira.htm](http://www.eppo.org/STANDARDS/position_papers/madeira.htm).



## Méthodes

### Processus français d'officialisation des méthodes d'analyses dans le domaine de la santé des végétaux

Vincent Hérau (vincent.herau@anses.fr), Géraldine Anthoine

Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité Développement de méthodes et analyses, Angers, France

**L'objet de l'article est de présenter les modalités selon lesquelles les méthodes officielles sont élaborées et validées en France dans le domaine de la santé des végétaux. Le processus s'est établi conjointement entre le ministère de tutelle (agriculture) et le laboratoire national de référence de l'Anses, le Laboratoire de la santé des végétaux, pour permettre d'intégrer les contraintes et objectifs de chaque partenaire. Tout en demeurant évolutif, notamment afin de prendre en compte de nouvelles modalités de caractérisation de méthodes ou de nouvelles techniques, ce processus s'organise désormais autour de plusieurs grandes étapes qui sont présentées successivement. L'une des composantes originales de ce dispositif spécifique au domaine de la santé des végétaux est sa transparence à travers la phase de consultation externe.**

#### Introduction

Pour protéger et surveiller le territoire national vis-à-vis des organismes nuisibles de quarantaine, et conformément aux dispositions réglementaires communautaires en vigueur (notamment la Directive 2000/29/CE et les textes pris pour son application), l'État français réalise divers plans de surveillance et de contrôle. Ces plans de surveillance concernent des végétaux ou produits de végétaux à l'importation ou sur le territoire national (en pépinière, au champ...). Pour garantir la qualité des produits exportés, des analyses peuvent également être effectuées dans le cadre du passeport phytosanitaire européen (PPE) ou pour la délivrance d'un certificat sanitaire (vers les pays tiers).

Les analyses réalisées pour le compte des services de l'État (Direction générale de l'alimentation –DGAI–, Services régionaux de l'alimentation –SRAI–, Service d'inspection vétérinaire et phytosanitaire aux frontières –SIVEP–...) sont dites « officielles ». Ces analyses ne peuvent être réalisées, sauf cas particuliers, que par des laboratoires agréés, des laboratoires nationaux de référence (LNR) ou des laboratoires dits « reconnus » (Code rural et de la pêche maritime –CRPM–, article R202-8). En tant que prescripteur, la Direction générale de l'Alimentation définit les méthodes qui doivent être utilisées pour la réalisation de ces analyses (article R202-17 du CRPM). Même si l'utilisation de méthodes alternatives est possible dans les conditions définies par ledit article, le recours à ces méthodes permet d'assurer une cohérence du dispositif de surveillance et une fiabilité des analyses rendues par les 20 laboratoires agréés en France (voir liste sur la page <http://agriculture.gouv.fr/la-liste-des-laboratoires-agrees>) que compte actuellement le réseau.

L'objet est ici de présenter le processus d'officialisation des méthodes d'analyses dans le domaine de la santé des végétaux tel que mis en œuvre actuellement en collaboration entre le Laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses et la Direction générale de l'alimentation (DGAI) du ministère français chargé de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Pêche.

#### Présentation générale

Les définitions des termes utilisés dans le présent article et sur lesquels s'appuie le Laboratoire de la santé des végétaux sont données dans l'Encadré 1 (définitions générales relatives à la caractérisation et la validation) et Encadré 2 (critères

de performance des méthodes). Le processus complet d'officialisation d'une méthode dans le domaine de la santé des végétaux est présenté Figure 1. Il peut être résumé en quatre grandes phases qui sont :

- expression d'un besoin de méthode ;
- sélection/développement d'une méthode ; caractérisation et validation intra-laboratoire (parfois inter-laboratoires, lorsque c'est nécessaire) de la méthode ;
- consultation externe sur le projet de méthode, dont consultation publique ;
- officialisation par l'autorité compétente.

Ces différentes étapes vont être successivement présentées en mettant l'accent sur les particularités ou spécificités du domaine de la santé des végétaux vis-à-vis d'autres domaines d'activité.

#### Expression du besoin et sélection/développement d'une méthode

Parmi les missions des laboratoires nationaux de référence telles que listées dans le CRPM (article R202-5), figurent notamment le développement de méthode et l'appui scientifique et technique à la tutelle. Dès lors, les besoins méthodologiques à des fins analytiques officielles de l'État sont adressés aux LNR.

Partant du principe que les méthodes (officielles) doivent être aptes à l'usage attendu pour pouvoir être validées (voir ci-dessous), la phase de concertation préalable entre le LNR et le commanditaire est une phase indispensable à la réussite de tout projet. Il convient, lors de cette première étape, de définir précisément les attentes explicites et implicites du client (i.e. la DGAI).

Dans le domaine de la santé des végétaux, les besoins généraux de la DGAI sont exprimés à travers un cahier des charges pour la validation des méthodes d'analyse officielles signé conjointement avec le LNR qui intervient comme prestataire pour la sélection et le développement de la méthode. Si le contenu reste adaptable à chaque cas particulier en fonction de l'organisme nuisible concerné, sa situation épidémiologique, l'urgence de la demande, etc. il fixe un cadre général précisant les critères de choix des méthodes à sélectionner selon leur usage.



## Méthodes

### Méthode d'analyse

Procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour détecter et/ou [identifier] [...] l'analyte, c'est-à-dire: domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, fidélité, rapport d'essai.

### Méthode d'analyse alternative

Méthode d'analyse utilisée par le laboratoire à la place d'une méthode d'analyse de référence.

### Méthode d'analyse de référence

Méthode d'analyse reconnue par des experts ou prise comme référence par accord entre les parties, qui donne, ou est supposée donner, la valeur de référence acceptée de la grandeur de l'analyte à mesurer.

### Méthode officielle

Méthode d'analyse rédigée par le LNR publiée au Bulletin officiel du ministère chargé de l'Agriculture, à mettre en œuvre pour la réalisation d'analyses officielles.

### Évaluation d'une méthode (= caractérisation des critères de performance d'une méthode)

Détermination des valeurs des critères de performance caractéristiques d'une méthode.

#### Encadré 1. Définitions générales liées aux méthodes

### Sensibilité (d'une méthode)

Probabilité de détecter un organisme cible (réponse positive) dans un matériel soumis à l'essai, infecté ou contaminé. En d'autres termes, c'est la capacité d'une méthode à détecter l'analyte lorsqu'il est présent dans l'échantillon.

La notion de sensibilité inclut celle d'inclusivité et de détectabilité (ou sensibilité analytique):

- inclusivité: capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir d'un large éventail de souches. Elle peut s'exprimer en pourcentage de souches détectées ou par le risque connu (dans l'état des connaissances au moment de l'évaluation) causé par l'évaluation de variabilité intra-taxon cible;
- détectabilité: capacité d'une méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir de gammes de dilutions.

### Spécificité

Propriété d'une méthode d'analyse, de convenir exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte avec la garantie que le résultat de la méthode d'analyse ne provient que de l'analyte. En d'autres termes, c'est:

- la capacité d'une méthode à ne pas détecter l'analyte lorsqu'il n'est pas présent dans l'échantillon;
- ou encore l'aptitude d'un test à fournir une réponse négative pour un échantillon sain.

Note: la spécificité est quasiment équivalente à l'**Exclusivité**: Absence d'interférences par un éventail approprié de souches, isolats, populations... non-cibles de la méthode.

À titre d'exemples:

- une méthode destinée à être utilisée pour des analyses en gestion de foyers sera d'autant plus adaptée à son usage qu'elle permet d'obtenir des résultats rapides, peu onéreux. L'objectif est ici de pouvoir obtenir des résultats sur des grands nombres d'échantillons et assez rapidement afin de définir le périmètre d'infection;
- une méthode destinée à être utilisée dans le cadre de l'importation de produits végétaux pour la détection d'un organisme nuisible de quarantaine non présent sur le territoire devra être la plus sensible possible pour éviter l'introduction d'un organisme de quarantaine et donner des résultats relativement rapides pour permettre une libération des lots de marchandises consignées.

Ce travail de discussion entre la DGAI et le LNR vise donc à traduire en objectifs précis les critères de performance cibles attendus, notamment en ce qui concerne les taux de faux négatifs (sensibilité) et faux positifs (spécificité) acceptables a priori. Toutefois, comme les exemples précédents ont pu le montrer, au-delà des critères de performance techniques, d'autres critères (rapidité, coûts, délais, simplicité...) entrent en ligne de compte dans la définition de l'aptitude d'une méthode à son usage. Cet usage peut d'ailleurs orienter le LNR vers une méthode plus qu'une autre, dans un contexte où il est souvent amené à faire un choix et un compromis entre les critères de sensibilité et de spécificité.

### Exactitude

Étroitesse de l'accord entre un résultat d'essai et la valeur de référence acceptée. En d'autres termes, c'est le nombre d'accords entre les résultats obtenus et ceux attendus rapporté au nombre total de résultats.

Elle intègre à la fois la sensibilité et la spécificité de la méthode.

### Limite (ou seuil) de détection

C'est la « plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée [...] dans les conditions expérimentales décrites de la méthode ». Elle correspond à la sensibilité analytique.

### Répétabilité

Étroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions identiques (appareillage, opérateur, laboratoire et intervalles de temps courts, c'est-à-dire des conditions de répétabilité).

### Reproductibilité (accordance)

Étroitesse d'accord entre des résultats d'essai individuels effectués sur un matériau d'essai identique en utilisant la même méthode et obtenus par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent (c'est-à-dire des conditions de reproductibilité).

Un essai de reproductibilité consiste en l'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes. Dans ce cas, le coefficient de variation est une expression simplifiée de la reproductibilité de la méthode.

#### Encadré 2. Définitions liées aux critères de performance des méthodes



## Méthodes

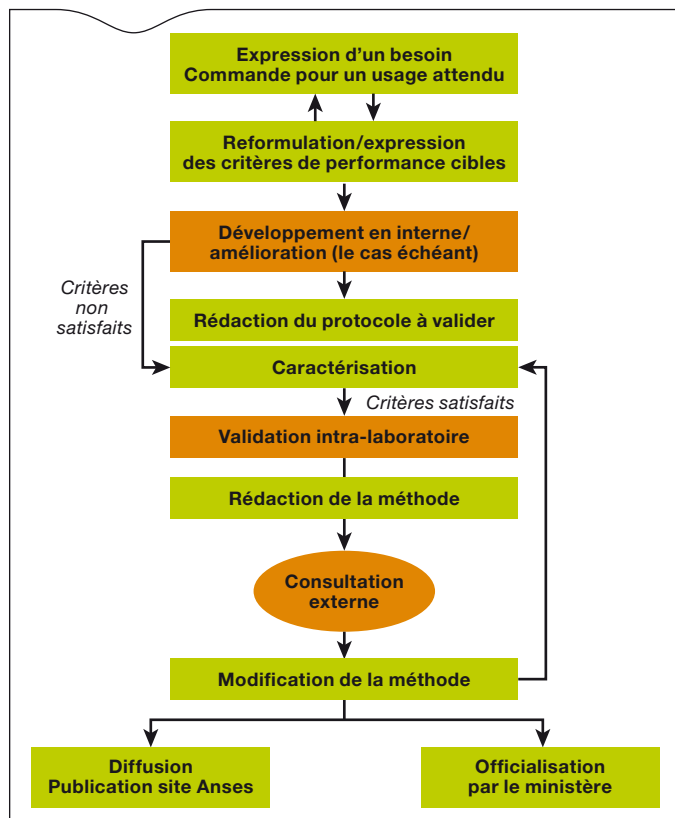


Figure 1. Processus de préparation et d'officialisation des méthodes en santé des végétaux

Une fois les objectifs et les attentes définis, le laboratoire de référence va, selon l'état de l'art vérifié par étude bibliographique, i) développer en interne une méthode, ou ii) procéder à une première comparaison de méthodes existantes (publications scientifiques...), ou iii) sous-traiter son développement. À l'issue de ces travaux, le laboratoire doit disposer d'une méthode qu'il va soumettre à un processus de caractérisation des critères de performance. Il est à noter que certaines données collectées lors de la phase de développement peuvent servir à alimenter le rapport de caractérisation.

### Caractérisation et validation (intra-laboratoire) des méthodes

Différents référentiels proposent des méthodologies de caractérisation des méthodes: certains sont relativement généraux (ISO 16140, ISO5725...), d'autres plus techniques et spécifiques au domaine de la santé des végétaux (OEPP PM7/98). Sur la base de ces différents référentiels ainsi que du cahier des charges établi avec la DGAI, le Laboratoire de la santé des végétaux a élaboré un guide interne relatif à la caractérisation des critères de performance des méthodes. De manière générale, les méthodes utilisées par le LNR ou destinées à être officialisées font l'objet d'une caractérisation des critères de performance techniques suivants (voir définitions, Encadré 2):

- sensibilité (au sens inclusivité), spécificité et exactitude;
- seuil de détection;

- répétabilité;
  - fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire).
- D'autres critères non techniques tels que le coût, la simplicité... sont évalués au cas par cas.

Début 2013, une révision de ce guide a amené le laboratoire:

- à introduire le calcul d'une incertitude pour les paramètres de sensibilité, spécificité et exactitude;
- et à prévoir, dans le cas particulier des méthodes destinées à être déléguées, des études de robustesse en faisant varier de manière faible mais délibérée des paramètres importants pour la fiabilité globale des résultats.

L'ensemble des résultats de ces tests de caractérisation fait l'objet d'un rapport. L'ensemble de ces données est ensuite comparé aux critères de performance cibles prédéterminés afin de statuer sur la potentialité de la méthode à satisfaire à l'usage attendu:

- dans l'hypothèse où les critères cibles définis par le client ne peuvent être atteints du fait des limites des techniques, il est alors procédé à:
  - des travaux d'optimisation de la méthode ou de développement d'une nouvelle méthode,
  - ou à une modification du cahier des charges par le client,
  - ou à la mise en place de combinaisons de méthodes et/ou de restriction de conditions dans lesquelles les méthodes peuvent être utilisées;
- si les critères de performance cibles sont atteints, la méthode:
  - peut être validée si elle est utilisée en interne au sein du LNR,
  - fait l'objet d'une consultation externe si elle est destinée à être déléguée à un réseau de laboratoires agréés.

Au final, cette démarche de caractérisation intra-laboratoire des critères de performance est très similaire à celle qui peut être conduite dans les autres domaines d'activité de l'Anses (santé animale ou sécurité sanitaire des aliments). Il est à noter toutefois que le nombre d'échantillons testés reste généralement modéré (selon les organismes nuisibles concernés) comparativement aux autres domaines du fait du faible nombre d'échantillons naturellement infectés disponibles. Ceci est particulièrement vrai pour les organismes nuisibles non cultivables ou difficiles à entretenir en collection.

### Consultation externe

En accord avec le ministère de l'Agriculture, le laboratoire de la santé des végétaux a instauré dans le processus de validation des méthodes une phase de consultation externe avec deux composantes:

- une revue par des pairs scientifiques;
- et une consultation publique.

La consultation par des pairs concerne *a minima* les méthodes destinées à être déléguées mais peut également être entreprise pour les méthodes utilisées par le LNR. Elle se fait en général auprès de deux experts francophones du domaine considéré. La consultation publique est quant à elle une phase de mise à disposition sur le site Internet de l'Anses (<http://www.anses.fr/fr/content/m%C3%A9thodes-danalyse-dans-le-domaine-de-la-sant%C3%A9-v%C3%A9g%C3%A9tale>) du projet de méthode éventuellement amendé à l'issue de la consultation des pairs scientifiques. Cette consultation est d'une durée normale de deux mois. L'objectif de cette phase de consultation est de recueillir l'avis du public, *a minima* des futurs utilisateurs, des éventuels problèmes d'application que le projet de méthode est susceptible de générer du point de vue technique ou plus simplement de la compréhension du mode opératoire.



## Méthodes

L'ensemble des commentaires reçus permet ainsi d'élaborer une version finale du mode opératoire plus consensuelle et applicable en vue d'un transfert auprès de laboratoires autres que celui ayant développé et caractérisé les critères de performance de la méthode.

Calquée sur des processus administratifs ou normatifs existants, la démarche de consultation publique sur un projet de méthode reste cependant originale et spécifique à la santé des végétaux dans le panorama français d'élaboration des méthodes officielles.

### Officialisation

Tel qu'évoqué en introduction, une méthode ne devient officielle que dans la mesure où la DGAI, gestionnaire du risque, stipule par écrit que celle-ci doit être utilisée pour la réalisation des analyses officielles.

Dès lors, une fois la version définitive rédigée à l'issue du processus de consultation publique, le LNR soumet à la DGAI la méthode incluant l'ensemble des éléments ayant abouti à sa validation, notamment les critères de performance obtenus. Au vu des éléments fournis, sauf évolution des éléments de contexte ou spécifications complémentaires, la DGAI peut alors procéder à son officialisation.

Par le passé, l'officialisation des méthodes se faisait uniquement par avis aux responsables de laboratoires et publication au *Journal Officiel de la République française*. Certaines références de méthodes non encore révisées selon le processus actuel n'ont pas fait l'objet de rectificatif. Cette officialisation se fait dorénavant par publication de « Notes de service » de la DGAI mises à la disposition des utilisateurs mais également de manière plus générale de l'ensemble du public au *Bulletin officiel* du ministère en charge de l'agriculture (<http://agriculture.gouv.fr/bulletin-officiel>). Ces notes de service précisent en particulier les conditions d'utilisation de ces méthodes (import, surveillance...).

Les méthodes (modes opératoires techniques) sont quant à elles mises à disposition des laboratoires agréés mais plus généralement du public, gratuitement, sur le site de l'Anses <http://www.anses.fr/fr/content/m%C3%A9thodes-danalyse-dans-le-domaine-de-la-sant%C3%A9-v%C3%A9g%C3%A9tale>.

### Conclusion

Le processus français d'officialisation des méthodes d'analyses dans le domaine de la santé des végétaux s'est construit progressivement entre le laboratoire national de référence et le gestionnaire de risques. Ce dialogue entre commanditaire et prestataire a permis d'élaborer un schéma couvrant à la fois les besoins de la DGAI de fiabilisation et d'homogénéisation des résultats d'analyses rendus mais également ceux du LNR en termes d'explicitations des attentes ou pour des besoins d'accréditation (méthodes dites reconnues). Ce dispositif se singularise à ce jour des autres domaines de l'Anses par plusieurs phases notamment celle de consultation des futurs utilisateurs (consultation publique) et constitue une alternative intéressante au processus classique de normalisation.

### Références bibliographiques

Anonyme. Code rural et de la pêche maritime, notamment les articles L202.1 à 5 et R202-2 à 21 disponibles à l'adresse <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?dateTexte=20130213&cidTexte=LEGITEXT000006071367&fastReqId=173830114&fastPos=1&oldAction=rechCodeArticle>.

Anonyme. Arrêté du 19 octobre 2011 JORF n°0251 du 28 octobre 2011 page 18206, texte n° 48.

Ministère chargé de l'Agriculture. Liste des laboratoires agréés pour la réalisation d'analyses officielles dans le domaine de la protection des végétaux. Disponible à l'adresse <http://agriculture.gouv.fr/reseau-de-laboratoires-agrees>.

ISO. 2005. ISO/IEC 17025 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Second Edition. Geneva, Switzerland. 34 pp.

ISO. 2003. ISO/IEC 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. First Edition. Geneva, Switzerland. 70 pp.

EPPO 2010. PM7/98. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity Bulletin de l'OEPP, Volume 40, Issue 1, pages 5-22, avril 2010.

EPPO 2010. PM7/76 Use of EPPO diagnostic protocols. Bulletin de l'OEPP. Volume 40, Issue 3, pages 350-352, décembre 2010.



## Méthodes

### Méthodes de caractérisation des résistances de *Myzus persicae* aux carbamates, aux pyréthri-noïdes et aux néonicotinoïdes

Séverine Fontaine (severine.fontaine@anses.fr), Laetitia Caddoux, Annie Micoud  
Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Résistances aux produits phytosanitaires, France

**Le puceron vert du pêcher est un ravageur de nombreuses espèces végétales. L'utilisation des produits phytosanitaires, afin de limiter la prolifération de ce puceron dans les différentes cultures, peut conduire à la sélection d'individus résistants. Parmi les phénomènes de résistance, la modification de la protéine ciblée par l'insecticide est l'un des mécanismes le plus aisément mis en évidence via des tests reposant sur des méthodes de biologie moléculaire. Cet article vise à présenter trois méthodes permettant de détecter différentes mutations responsables de résistances à trois insecticides très couramment utilisés contre le puceron: les carbamates, les pyréthri-noïdes et les néonicotinoïdes.**

#### Introduction

Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, se caractérise par une très grande polyphagie puisqu'il est capable de coloniser plus de 400 espèces végétales sauvages ou cultivées (plantes herbacées, arbres fruitiers, arbustes...). Cet insecte phytophage provoque des dégâts directs via ses piqûres d'alimentation qui affaiblissent la plante et déforment les feuilles. Il occasionne également des dégâts, dits indirects, très dommageables. En effet, via ses piqûres, c'est un vecteur de viroses capable de transmettre plus de 120 virus phytopathogènes de diverses plantes ou arbres (CMV: Cucumber Mosaic Virus, CaMV: Cauliflower Mosaic Virus, Plum Pox virus affectant les arbres fruitiers à noyaux). De plus, l'excrétion de miellat par les pucerons favorise le développement d'un champignon (*Fumago salicina*) responsable de la fumagine qui rend les organes touchés impropres à la commercialisation. *Myzus persicae* se caractérise également par un cycle biologique dont la complexité résulte de sa capacité à se reproduire de façon sexuée ou asexuée et, également, par le fait que ce cycle varie selon les plantes colonisées et la situation géographique.

De par ses caractéristiques (mode de reproduction asexuée ou sexuée, polyphagie, vecteur de viroses), *Myzus persicae* est un ravageur très dommageable pour de nombreuses productions agricoles. L'utilisation d'insecticides est un moyen de lutte contre ce ravageur. Or l'application répétée de substances actives peut engendrer l'apparition de phénomènes de résistance à ces produits. Ainsi, chez l'espèce *Myzus persicae*, des résistances à plusieurs familles d'insecticides ont été décrites. Plusieurs mécanismes de résistance, affectant quatre familles d'insecticides homologués en France contre ce ravageur (les organophosphorés, les pyréthri-noïdes, les carbamates, les néonicotinoïdes) ont été décrits. Les résistances aux insecticides chez le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*) reposent sur deux grands types de mécanismes:

- **des résistances de type métabolique** qui sont induites par la duplication d'un gène qui engendre une synthèse accrue de la protéine correspondante. La protéine surexprimée est une enzyme capable de dégrader une ou des substance(s) active(s). Ainsi, chez *M. persicae*, des carboxylestérases (E4 ou FE4) sont impliquées dans une résistance modérée vis-à-vis d'un large spectre d'insecticides (carbamates, pyréthri-noïdes, organophosphorés) (Devonshire *et al.*, 1982) et un cytochrome à P450 (Puinean *et al.*, 2010) est

impliqué uniquement dans une résistance modérée aux néonicotinoïdes;

- **des résistances dites de cible**, dues à une modification de la protéine ciblée par l'insecticide ont également été décrites. Ces mécanismes de résistance sont généralement responsables d'une très forte baisse d'efficacité des insecticides concernés. Trois grandes familles d'insecticides sont concernées par ce type de résistance: les pyréthri-noïdes, les carbamates et plus récemment les néonicotinoïdes.

Concernant les carbamates, une mutation, responsable d'un fort niveau de résistance, a été identifiée sur le gène codant pour l'acétylcholinestérase 2 (Nabeshima *et al.*, 2003), cible de cette famille d'insecticide. Cette mutation, nommée Mace pour « *Modified acetylcholinesterase* », se traduit au niveau protéique par la substitution d'une sérine par une phénylalanine au niveau de l'acide aminé 431 de l'acétylcholinestérase 2 (S431F).

Pour les pyréthri-noïdes, trois mutations peuvent être en cause, chez *M. persicae*, dans la résistance de cible à cette famille. Elles affectent la cible de l'insecticide: le canal sodium voltage dépendant. Ces résistances sont nommées kdr (*knock-down resistance*) et s-kdr (super kdr). La mutation kdr se traduit au niveau protéique par le remplacement d'une leucine par une phénylalanine en position 1014 de la protéine (L1014F). Les mutations dites s-kdr affectent le codon 918 et elles se traduisent par la mutation de la méthionine. Différentes substitutions ont été décrites. Ainsi, la méthionine peut être substituée par une théonine (M918T) (Martines-Torres *et al.*, 1999). Cette mutation est toujours trouvée en association avec la mutation kdr (L1014F). La seconde substitution décrite plus récemment se traduit par le remplacement de la méthionine par une leucine (M918L) (Fontaine *et al.*, 2011). À ce jour, cette dernière a toujours été trouvée en l'absence de kdr.

Pour les néonicotinoïdes, la mutation se traduit par la substitution d'une arginine par une thréonine en position 81 (R81T) de la sous-unité  $\beta 1$  du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), protéine cible de cette famille d'insecticides (Bass *et al.*, 2011)

Dans le cadre de plans de surveillance élaborés par la DGAI (Direction générale de l'alimentation), l'unité Résistance aux produits phytosanitaire (Rpp) réalise des suivis de l'évolution et de la dispersion des résistances des bioagresseurs des cultures aux produits phytosanitaires. Ainsi, pour *M. persicae*, différents outils d'analyses ont été développés afin de rechercher quatre des mutations entraînant des résistances aux insecticides chez



## Méthodes

cet insecte. L'un de ces outils permet de détecter simultanément la résistance aux carbamates causée par la mutation Mace de l'acétylcholinestérase et la résistance aux pyréthriinoïdes liée à la mutation *kdr*. Un second outil vise à rechercher la mutation M918L affectant le canal sodium impliquée dans une forte résistance aux pyréthriinoïdes. Enfin, la dernière méthode présentée permet la recherche de la mutation R81T, de la sous-unité  $\beta 1$  du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), responsable d'une résistance aux néonicotinoïdes.

### Méthodes de caractérisation des résistances de *Myzus persicae* aux carbamates, aux pyréthriinoïdes et aux néonicotinoïdes

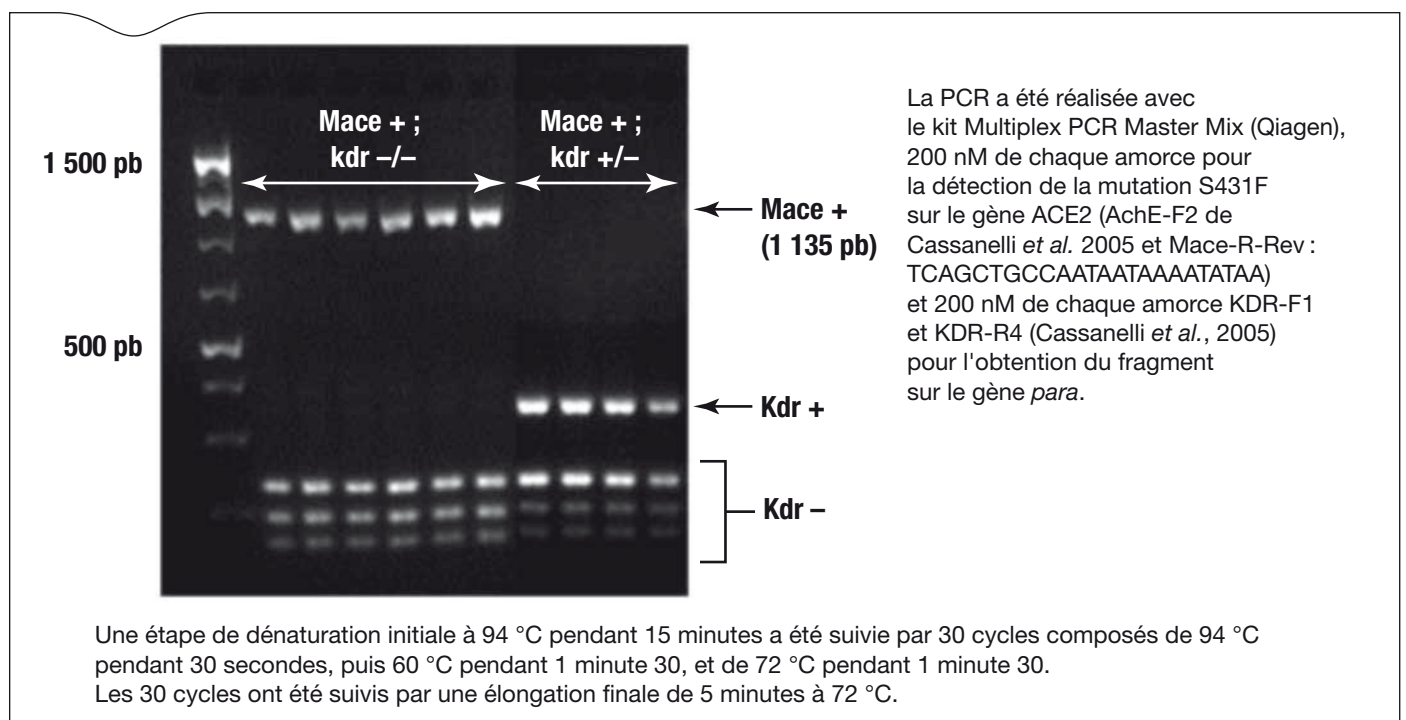
#### Recherche conjointe des mutations Mace de l'acétylcholinestérase et *kdr* du canal sodium impliquées respectivement dans une résistance aux carbamates et aux pyréthriinoïdes

Cette technique repose sur une PCR multiplexe qui permet, d'une part, l'amplification d'un fragment du gène canal sodium (*para*) comprenant le codon 1014 et d'autre part, l'amplification d'un fragment du gène de l'acétylcholinestérase 2 (*ace2*) uniquement lorsque la mutation S431F est présente. Le succès de l'amplification du gène *para* représente un contrôle d'extraction d'ADN positif dans le cas où l'allèle muté du gène *ace2* est absent. Pour la mutation *kdr*, la présence ou l'absence de la mutation est ensuite déterminée par une digestion enzymatique qui permet de différencier l'allèle sauvage (deux sites de restriction, trois fragments de 159 pb, 193 pb et 256 pb) de l'allèle muté (un site de restriction, deux fragments

de 256 pb et 352 pb) (Cassanelli *et al.* 2005). La recherche de l'allèle *kdr* permet de savoir si le puceron est hétérozygote, homozygote sensible ou homozygote résistant (Figure 1). La méthode pour rechercher l'allèle Mace permet uniquement de savoir si l'allèle est présent ou non et elle ne fournit donc pas d'information sur l'hétérozygotie ou l'homozygotie. Ces deux allèles de résistance Mace et *kdr* étant dominants, la présence de ces allèles à l'état hétérozygote est donc responsable d'un phénotype résistant, respectivement, vis-à-vis des carbamates et des pyréthriinoïdes.

#### Recherche de mutations M918L du canal sodium impliquée dans une résistance aux pyréthriinoïdes

La recherche de la mutation M918L est réalisée par qPCR (PCR quantitative) avec des sondes Taqman. Les amorces et les sondes ont été conçues selon des séquences nucléiques et des conseils aimablement fournis par M. Williamson (Rothamsted Research). La sonde pour la détection de l'allèle sauvage (918M) est liée au fluorochrome Cy3 à l'extrémité 5 « et à BHQ2 à l'extrémité 3 ». La sonde pour la détection de l'allèle résistant (918L) est liée au fluorochrome à FAM à l'extrémité 5 « et à BHQ1 à l'extrémité 3 ». Pour augmenter la spécificité, chaque sonde a été conçue avec trois LNA (Locked Nucleic Acids). Cette technique permet de rechercher deux allèles du canal sodium voltage dépendant. Elle permet de déterminer si le puceron est homozygote [MM], hétérozygote [ML] ou homozygote [LL] pour le codon 918. À l'issue de la qPCR, après vérification des courbes d'amplification, les ratios de fluorescence en point final pour chacune des sondes sont comparés entre eux (Figure 2) afin de définir le génotype de chaque puceron.



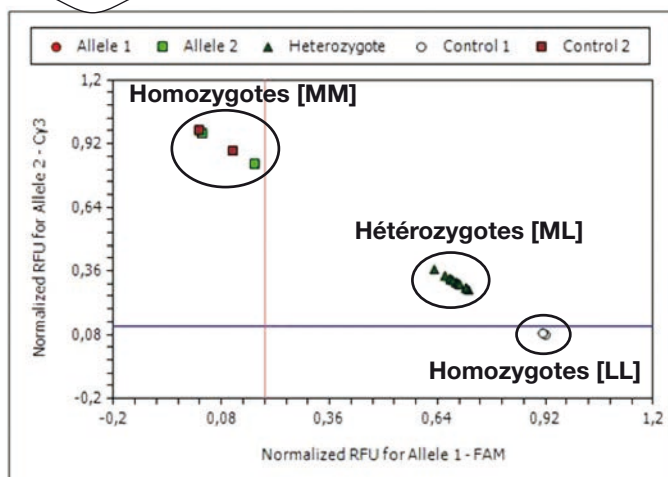
**Figure 1. Profils de migration, sur gel d'agarose à 2,5 %, des produits de digestion pour la recherche conjointe des mutations Mace de l'acétylcholinestérase et *kdr* du canal sodium.**

**Mace + ; *kdr* -/- :** individus possédant l'allèle Mace et ne possédant pas l'allèle muté « *kdr* ».

**Mace - ; *kdr* +/- :** individus ne possédant pas l'allèle Mace et hétérozygotes pour l'allèle muté « *kdr* ».



## Méthodes



Amorces et sondes pour la PCR Taqman, les nucléotides entre crochets sont des Locked Nucleic Acids (LNA) :

**qMP SKDR-F :**  
GTGGCCCACACTGAATCTTTTAAT

**qMP SKDR-R :**  
ACAAACGTTAGGTTACCCAAAGCA

**Probe MPskdr-SBIS :**  
Cy3-ATGGTTCGACCC[+A][+T][+T]AT-[BHQ2]

**Probe MPskdr-R- 918L :**  
FAM-ATGGTTCGACC[+A][+A][+T]AT-[BHQ1]

La qPCR est réalisée dans un volume final de 25 µL avec 12,5 µL de Jumpstart Taqman (Sigma-Aldrich), 200 nM de chacune des amorces, 400 nM de chacune des sondes, 4,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 µL d'ADN. Le cycle PCR est composé d'une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C puis de 40 cycles avec une dénaturation à 94 °C pendant 15 secondes, une hybridation à 55 °C pendant 30 secondes, puis une élongation à 60 °C pendant 45 secondes.

**Figure 2. Résultat du génotypage des pucerons pour le codon 918 par sonde Taqman pour détecter l'allèle sauvage et l'allèle muté 918L.** En abscisse et en ordonnée sont représentées les intensités de fluorescence des deux fluorochromes FAM et Cy3 permettant de distinguer les trois génotypes : **Homozygote [MM]** : puceron ne présentant pas de mutation au niveau du codon 918 ; **Hétérozygote [ML]** : puceron avec un seul allèle muté au niveau du codon 918 (substitution de la méthionine par une leucine) ; **Homozygote [LL]** : puceron avec les deux allèles mutés au niveau du codon 918.

### Séquence sens d'individu sauvage

5' - TAGTTCTAACTTATTGCCTGCAGCTATTAATATCCAATTAATAATGT  
GTCTTAATATTGTTTTATTGTTTAATGAAAAGAGTCAAATAATGAAATCAAAC  
3' - AAAAGAGTCAAATAATGAAATCAAAC

Amorce sens **MPB1F-SmII** →

GTTTG**G**TTG**A**CTTGTGAGTAACCTACTTAATATATATATATATATATA  
GTTTGCTTGA - 5'

← Base dégénérée pour créer le site de restriction

TTTATTTTCAGTTTGTAACCTATAAAATTAATAAATAACAGTTTCCTTTCTA

← Amorce anti-sens **MPB1TMR**

3' - ATAATCTGAAGGACTGGCG - 5'  
ACGATTAGACTTCCTGACCGC - 3'

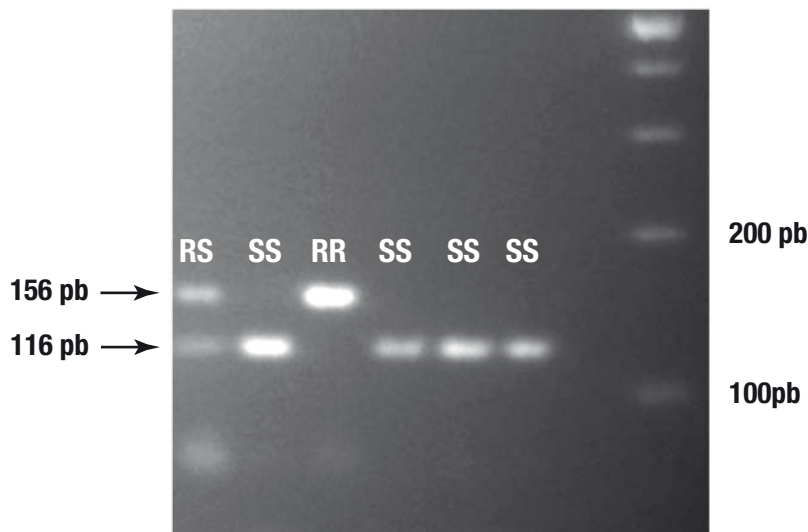
**Figure 3. PCR-dCAPS, position des amorces MPB1F-SmII et MPB1TMR sur la sous-unité β1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) comprenant le codon 81.**

En rouge, la base mutée pour l'amorce dCAPS : C. En bleu, la base concernée par la mutation R81T.





## Méthodes



La PCR est réalisée dans un volume final de 25  $\mu$ L, avec 200  $\mu$ M de dNTPs, 300 nM de chacune des amorces, 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA, 1,5 unité de Taq et 1  $\mu$ L d'ADN.

Le cycle PCR est composé d'une dénaturation initiale de 5 minutes à 94 °C, puis 35 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, une hybridation à 55 °C pendant 1 minute puis une élongation à 72 °C pendant 30 secondes. La PCR se termine par une élongation finale de 5 minutes à 72 °C. La digestion de 10  $\mu$ L de produits PCR est réalisée avec 5 unités enzyme SmlI à 55 °C pendant une nuit.

Figure 4. Profils de migration, sur gel d'agarose à 3%, des produits de digestion de la PCR-dCAPS pour détecter le mutation R81T affectant l'unité  $\beta$ 1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR).

**Homozygote SS**: puceron ne présentant pas de mutation au niveau du codon 81; **Hétérozygote RS**: puceron avec un seul allèle muté au niveau du codon 81 (substitution de l'arginine par une thréonine); **Homozygote RR**: puceron avec les deux allèles mutés au niveau du codon 81.

L'allèle de résistance 918L étant dominant, la présence de cet allèle à l'état hétérozygote est donc responsable d'un phénotype résistant vis-à-vis des pyréthrinoides.

La méthode présentée ici ne permet pas de mettre en évidence l'autre mutation pouvant affecter le codon 918 (M918T). Une méthode de qPCR existe pour détecter cette dernière mutation (Anstead *et al.*, 2004). Les essais de multiplexage avec les trois sondes pour détecter simultanément les trois codons possibles en position 918 (responsables de la présence des acides aminés méthionine, leucine ou thréonine) n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. De plus, récemment, d'autres mutations affectant le codon 918 ont été mises en évidence (données non publiées). De ce fait, lors des analyses réalisées avec les deux sondes spécifiques des allèles 918M et 918L, pour les individus ne donnant pas de mesure de fluorescence ou présentant un résultat ambigu, un séquençage d'une portion du gène du canal sodium contenant le codon 918 est réalisé afin de déterminer précisément le génotype.

### Recherche de mutations R81T de la sous-unité $\beta$ 1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) impliquée dans une résistance aux néonicotinoïdes

La méthode utilisée est une PCR dCAPS (*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*). Elle repose sur la création d'un site de restriction lorsque l'allèle est non muté. La création de ce site est réalisée grâce à une amorce placée à proximité du codon 81 et dont l'une des bases, non complémentaire

de la séquence à amplifier, entraîne la création d'un site de restriction lorsque l'allèle est non muté (Figure 3). La digestion enzymatique permet de discriminer l'allèle sauvage (116 pb et 37 pb) de l'allèle muté sans site de restriction (156 pb) (Figure 4). Chez les individus hétérozygotes, la présence de la mutation R81T se traduit par une baisse de sensibilité aux néonicotinoïdes mais à un niveau moindre que celui observé chez les individus homozygotes. Cet allèle semble donc être co-dominant (données non publiées).

### Conclusion

*Myzus persicae* est une espèce de choix pour l'étude des résistances aux insecticides. Présent sur de nombreuses cultures, il est soumis à des pressions phytosanitaires variées. Son cycle biologique, au cours duquel peuvent alterner une reproduction sexuée (permettant des recombinaisons génétiques) et des cycles de reproduction asexuée (offrant une multiplication rapide des génotypes les plus avantageux) représente un avantage d'un point de vue évolutif. Les outils présentés ici permettent une recherche ciblée de quelques-uns des mécanismes de résistance connus chez ce puceron. Ils ont été conçus pour répondre au besoin d'étudier des allèles de résistance chez *Myzus persicae* à trois grandes familles d'insecticides. Cependant, l'absence de l'allèle de résistance recherché n'indique pas forcément que l'individu est sensible à l'insecticide. Le puceron peut avoir d'autres mécanismes de



## Méthodes

résistance non détectés par l'une des méthodes développées ici. Seuls les tests de sensibilité aux insecticides réalisés en laboratoire, par pulvérisation ou ingestion de l'insecticide en conditions contrôlées, permettent de déterminer de façon exhaustive le phénotype sensible ou résistant du puceron. Les outils moléculaires, moins fastidieux à mettre en œuvre, conduisent à déterminer la présence ou l'absence d'un allèle reconnu comme responsable d'une résistance à une ou des substances actives. Leur avantage est de détecter, chez un même individu, plusieurs mécanismes vis-à-vis de différentes substances actives. Noter néanmoins que compte tenu des capacités évolutives de ce ravageur et des changements dans l'utilisation des familles d'insecticides, ces méthodes d'analyses sont amenées à être modifiées ou à être remplacées par de nouvelles méthodes. Ainsi, pour la résistance aux pyréthriinoïdes, le développement d'une méthode d'analyse par HRM visant à identifier les différentes mutations affectant le codon 918 du gène *para* est en cours de réflexion afin d'être plus exhaustif dans la recherche des différents allèles impliqués dans la résistance aux pyréthriinoïdes.

### Références bibliographiques

- Anstead JA, Williamson MS, Eleftherianos I and Denholm I. 2004. High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochem Mol Biol*; 34(8): 871-877
- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crossthwaite AJ, Denholm I, Field LM, Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R. 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience*, 31: 12-51.
- Cassanelli S, Cerchiari B, Giannini S, Bizzaro D, Mazzoni E and Manicardi GC. 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 61(1): 91-96.
- Devonshire AL and Moores GD. 1983. A carboxylesterase with Broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 18: 235-246.
- Fontaine S, Caddoux L, Brazier C, Bertho C, Bertolla P, Micoud A and Roy L. 2011. Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. *Pest Management Science*, 67(8): 881-885.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Williamson MS and Devonshire AL. 2005. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and insecticides in the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Molecular Biology*, 8: 339-346.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T and Kono Y. 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307: 15-22.
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS and Bass C. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genetique*, 6(6): e1000999. doi: 10.1371.
- Vorburger C, Lancaster M, Sunnucks P. 2003 - Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two 'superclones' in Victoria, Australia.



## Recherche pour la référence

### Le projet européen TESTA (*Treatment methods, Evidence for Seed Transmission and Assessment of seed health*): compréhension des mécanismes de transmission des agents pathogènes à et par la semence pour un développement de méthodes de détection d'agents pathogènes et de traitements alternatifs sur semences

Aurélia Luciani (aurelia.luciani@geves.fr)(1), Geoffrey Orgeur (2), Valérie Grimault (2), Jean-François Guimbaud (3), Marie-Agnès Jacques (3)

(1) GEVES, Beaucouzé, France

(2) GEVES, Station nationale d'essai de semences (SNES), Beaucouzé, France

(3) Inra, UMR 1325, Institut de recherche en horticulture et semences, Beaucouzé, France

**Le GEVES et l'Inra d'Angers participent depuis 2012 au projet européen TESTA. Ce projet vise à développer et valider des méthodes d'analyses de la qualité sanitaire des semences plus globales, plus rapides et plus efficaces. D'une durée de quarante mois et financé à hauteur de trois millions d'euros, ce projet associe treize partenaires européens (voir encadré) et a pour objectifs de mieux connaître les mécanismes associés à la transmission des pathogènes à et par la semence, d'améliorer les méthodes d'échantillonnage et de détection de pathogènes et d'évaluer l'efficacité de traitements sanitaires alternatifs sur semences.**

Le volume et la fréquence du commerce des semences ont énormément progressé et se sont mondialisés depuis les années 1970 (Figure 1). Cette situation augmente le risque de dissémination des pathogènes portés par les semences. La réglementation européenne conduisant à une diminution progressive de produits phytosanitaires disponibles pour le traitement des semences, la question de la qualité sanitaire des semences devient prégnante pour limiter la propagation des maladies des plantes.

Le nombre de pathogènes et de ravageurs transmis via les semences est élevé et les méthodes de contrôle de la qualité

sanitaire doivent être aussi génériques et peu coûteuses que possible. Le développement de connaissances sur la biologie de la transmission des pathogènes à la semence est nécessaire pour progresser sur l'amélioration de la qualité sanitaire des semences. Les questions de qualité sanitaire doivent être discutées aussi bien au niveau européen qu'au niveau mondial, et les travaux doivent être menés en commun en Europe, afin de garantir que les semences importées et utilisées soient de haute qualité.

Le projet TESTA s'attache à développer un panel de nouvelles méthodes de contrôle de la qualité sanitaire des semences tout en contribuant à l'étude du mode de transmission des pathogènes à la semence et de la semence à la plantule. Seront notamment développées au cours du projet TESTA, des méthodes d'échantillonnage adaptées à la détection d'une faible qualité de pathogènes dans un lot important de semences,

#### Liste des partenaires du projet TESTA

- The Food, Environment and Rural Affairs (FERA), Royaume-Uni
- Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO), Pays-Bas
- Institut national de la recherche agronomique (INRA), France
- Università degli studi di Torino, Italie
- University of Pretoria, Afrique du Sud
- Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Royaume-Uni
- Aarhus Universitet, Danemark
- National Institute of Agricultural Botany (NIAB), Royaume-Uni
- Stichting Nederlandse Algemene Kwaliteitsdienst Tuinbouw (NAKT), Pays-Bas
- Università degli studi di Modena e reggio Emilia, Italie
- Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences (GEVES), France
- Organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes (OEPP), France
- Videometer A/S, Danemark

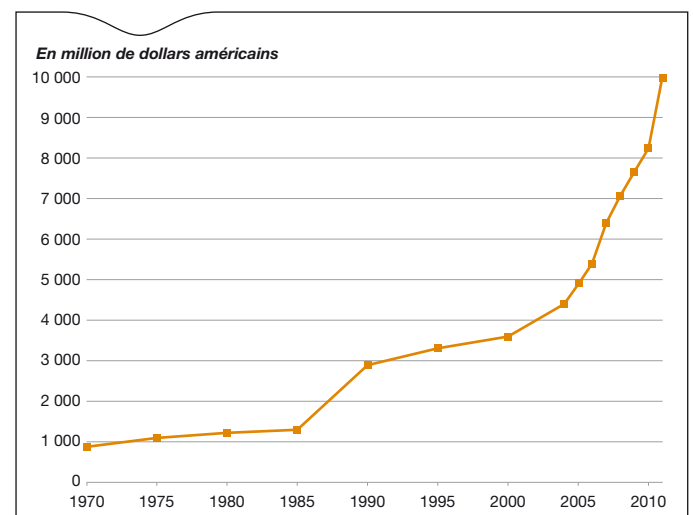


Figure 1. Évolution des échanges commerciaux mondiaux de semences (source: International Seed Federation)

## Recherche pour la référence

des méthodes innovantes et génériques de détection des pathogènes, et des méthodes de désinfection de semences non destructives, efficaces et alternatives aux techniques actuelles qui utilisent des produits phytopharmaceutiques susceptibles de ne plus être autorisés et disponibles.

Le projet est structuré en sept axes opérationnels (Figure 2) :

- transmission des agents phytopathogènes à la semence ;
- échantillonnage ;
- détection des agents pathogènes ;
- désinfection des semences ;
- validation des méthodes ;
- diffusion des résultats ;
- gestion du projet.

TESTA débouchera sur :

- la compréhension de la transmission du pathogène du porteur-graine à la semence et de la semence à la plantule ;
- la construction d'une base de données internet répertoriant toutes les maladies et tous les ravageurs connus transmis par les semences ;
- de nouvelles méthodes d'évaluation des taux de transmission à la semence et à la culture, et l'évaluation du risque associé.
- des méthodes d'échantillonnage améliorées ;
- des méthodes génériques de détection nouvelles et efficaces
- des méthodes non destructives d'analyse de la qualité sanitaire des semences ;
- des méthodes opérationnelles pour les laboratoires officiels
- des méthodes de désinfection des semences ;
- des protocoles d'évaluation de l'efficacité des méthodes de désinfection.

L'équipe Emersys de l'Institut de recherche en horticulture et semences (Inra d'Angers) coordonne l'axe opérationnel 1 « Transmission des agents phytopathogènes à la semence ». Elle développera, dans cet axe, des travaux visant à étudier les voies, les mécanismes de transmission d'un panel de bactéries phytopathogènes à la semence et de la semence à la plantule.

Le laboratoire de pathologie de la Station nationale d'essai de semences (GEVES) réalisera quant à lui dans le cadre de ce projet :

- l'étude de la transmission de *Tilletia caries* de la semence à la plantule et au sol ;
- l'évaluation de l'efficacité de la thermothérapie pour désinfecter les semences de luzerne vis-à-vis du nématode *Ditylenchus dipsaci* ;
- la validation de méthodes de détection sur semences de *Ditylenchus dipsaci*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et *Phoma lingam* ;
- la diffusion des résultats à travers l'organisation d'un atelier en 2015.

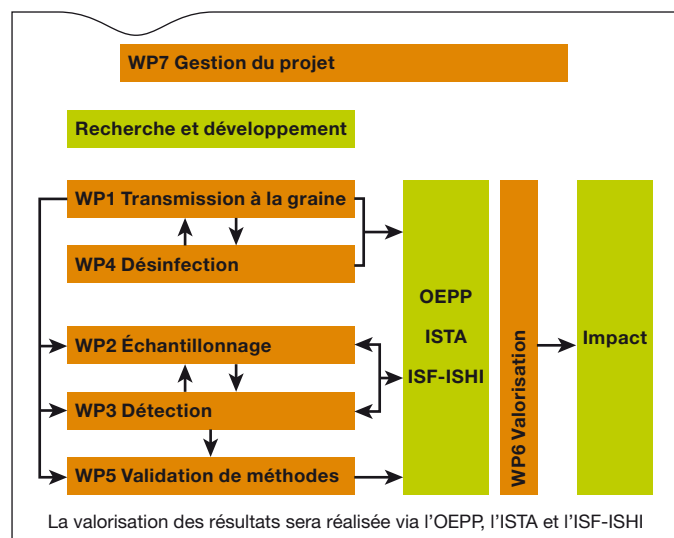


Figure 2. Organisation du projet TESTA.



Figure 3. Extraction du nématode *Ditylenchus dipsaci*



## Recherche pour la référence

### Transmission des agents pathogènes à et par la semence

Pour de nombreuses bactéries phytopathogènes, les voies et mécanismes de contamination des semences ne sont pas encore connus. La transmission des bactéries aux semences peut se faire selon trois voies : le système vasculaire du porte-graine, les organes floraux, ou par contact avec des tissus contaminés ou infectés, essentiellement lors des opérations de récolte et battage. Il a été montré que la contamination des fleurs joue un rôle important dans la contamination des semences pour différentes bactéries phytopathogènes, dont des *Xanthomonas* et *Acidovorax* (Darsonval *et al.*, 2008 ; Lessl *et al.*, 2007). Elle peut, ou non, être associée à une contamination interne par la voie vasculaire (Darsonval *et al.*, 2008, 2009). Peu d'informations sont disponibles concernant la localisation (interne ou externe) des bactéries au niveau de la semence et les mécanismes de transmission de la semence à la plantule (Darrasse *et al.*, 2010). La connaissance des voies de contamination, qui déterminent la localisation future des bactéries dans les organes de multiplication, est primordiale pour la sélection de nouvelles variétés et pour le contrôle visant à éviter ou réduire la contamination des semences par les agents pathogènes.

Du fait de la réduction des traitements de semences et avec l'apparition de méthodes de traitements alternatives, se pose la question des niveaux de contamination des semences par *Tilletia* spp. pouvant entraîner une contamination de la plante ou du sol. Des méthodes de détection de *Tilletia* spp. ont été décrites sur semences (Anses, 2012), mais aucune ne permet d'évaluer rapidement la transmission à la plantule et la viabilité des spores.

La transmission des agents pathogènes à et par la semence sera étudiée sur des couples hôtes/pathogène mettant en œuvre différents types de transmission (bactéries sur tomate, crucifères et cucurbitacées, champignons et viroïdes sur tomate, *Tilletia* spp. sur blé). Les questions de recherche à résoudre sont les suivantes : quel est le lien entre le taux de contamination des semences et l'incidence de la maladie au champ ? Comment le pathogène pénètre-t-il dans la semence ? Comment le pathogène se déplace-t-il de la semence à la plantule ? Le lien entre la localisation du pathogène au niveau de la semence et sa transmission de la plante mère à la semence, et de la semence à la plantule sera mis en évidence. Ces nouvelles connaissances permettront aux industriels semenciers et aux pouvoirs publics d'adapter leurs procédures de désinfection des semences et de détection des pathogènes considérés.

### Méthodes d'échantillonnage

Des méthodes d'échantillonnage adaptées aux semences ont été développées par des organisations internationales en particulier l'ISTA (*International Seed Testing Association*) et l'AOSA (*Association of Official Seed Analysts*). Cependant, certains pathogènes ne sont présents dans les lots de semences qu'à de très faibles fréquences, mais leur présence même en faible quantité dans un lot de semences entraîne des pertes économiques notables, ou bien est rédhibitoire pour la commercialisation du lot quand il s'agit d'agents pathogènes de quarantaine et d'organismes nuisibles non réglementés mais d'impact grave sur les cultures. Les règles d'échantillonnage et de taille d'échantillons nécessaires pour détecter la présence de ces pathogènes sont peu étudiées. Très peu d'études ont été réalisées sur la distribution des pathogènes du sol dans les lots de semences (Whitaker *et al.*, 2001), et elles concernent uniquement des pathogènes du blé.

Le projet TESTA mettra en œuvre des approches statistiques afin d'améliorer la pertinence de l'échantillonnage, notamment pour des grands lots de semences dans lesquels le niveau d'inoculum est susceptible d'être faible. La procédure d'échantillonnage mise au point dans le projet sera adoptée par l'ISTA et utilisable par les laboratoires officiels et par les industriels.

### Détection multicibles des pathogènes

La détection des pathogènes sur semences constitue une étape importante de l'analyse de la qualité sanitaire afin de limiter l'introduction et la diffusion des pathogènes aux cultures végétales. L'ISHI (*International Seed Health Initiative*), l'ISTA et l'OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes) ont développé, validé et publié des méthodes au sein de leurs comités « Qualité sanitaire », mais toutes ces méthodes sont basées sur la détection d'un seul pathogène.

TESTA a pour but d'améliorer les procédures de détection des pathogènes sur semences de tomate, céréales, chou et cucurbitacées en développant des méthodes génériques basées sur les technologies de multiplexage et de séquençage de l'ADN. Les méthodes d'extraction d'ADN/ARN et de PCR en temps réel seront également améliorées. Le projet évaluera aussi de nouvelles méthodes non destructives basées sur la réflexion de la lumière, utilisables sur des lots de taille réduite ou à grande valeur ajoutée pour lesquels les méthodes moléculaires ne sont pas adaptées.



Figure 4. Teliospores de *Tilletia caries*



Figure 5. Inoculation artificielle de boutons floraux



Figure 6. Lots de semences de haricot sain/contaminé



## Recherche pour la référence

### Désinfection des semences

Les traitements chimiques de lots de semences commerciaux sont utilisés depuis des décennies, mais depuis quelques années, la disponibilité des traitements chimiques diminue. Des méthodes de désinfection physiques et biologiques seront mises au point dans le projet TESTA. Ces méthodes feront appel à des traitements thermiques, et feront intervenir des micro-organismes ou des extraits de plantes. L'aptitude des micro-organismes et extraits de plantes à contrôler les maladies et ravageurs, et à améliorer la germination des semences sera évaluée. Des procédures d'évaluation de la viabilité des pathogènes concernés seront mises au point. Un guide de choix de la méthode de désinfection la plus appropriée selon le pathogène considéré sera réalisé à la fin du projet.

### Valorisation des résultats

Les résultats du projet seront largement diffusés auprès des scientifiques, pouvoirs publics, industriels et autres acteurs de la filière semences. La participation de l'ISHI au projet assurera l'adéquation des résultats produits aux besoins de la filière et leur large diffusion auprès des laboratoires d'analyses de la qualité sanitaire des semences. L'implication d'ISHIVeg permettra le transfert des méthodes vers les industriels. Les informations concernant les pathogènes de quarantaine seront diffusées via l'OEPP. Des actions de formation auprès des pathologistes et analystes de la qualité des semences seront entreprises.

Les livrables du projet consisteront en une base de données des maladies et ravageurs transmis par les semences, des méthodes de détection de pathogènes sur semences, un protocole d'évaluation de l'efficacité des traitements des semences et de nombreuses publications scientifiques.

Via le projet TESTA, de nouvelles méthodes et connaissances sur la qualité sanitaire des semences seront ainsi apportées aux services de santé des végétaux et laboratoires d'analyses de semences européens.

Le projet TESTA est soutenu financièrement par l'Union européenne dans le cadre du septième Programme-cadre de recherche et développement de l'Union européenne (FP7-KBBE-2012-1.2-05, grant agreement n° 311875).

### Références bibliographiques

ANSES, 2012. Méthode officielle d'analyse MOA 017 version 2a relative à la détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal), *Tilletia caries*, *Tilletia controversa* et *Tilletia foetida* par filtrations sélectives et identification morphologique. Note de service DGAL/SDQPV/N2012-8061 du 15 mars 2012.

Darrasse A., Darsonval A., Boureau T., Brisset M. N., Durand K., Jacques M. A., 2010. Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. Appl. Environ. Microbiol. October 2010 vol. 76 no. 20 6787-6796.

Darsonval A., Darrasse A., Meyer D., Demarty M., Durand K., Bureau C., Manceau C., Jacques M. A., 2008. The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. Appl. Environ. Microbiol. May 2008 vol. 74 no. 9 2669-2678.

Darsonval A., Darrasse A., Durand K., Bureau C., Cesbron S., Jacques M. A., 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 22, No. 6, 2009, pp. 747-757.

Lessl J.T., Fessehaie A., Walcott R.R., 2007. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. J. Phytopathology 155, 114-121 (2007).

Whitaker T.B., Hagler W.M.Jr, Johansson A.S., Giesbrecht F.G., Trucksess M.W., 2001. Distribution among sample test results when testing shelled corn lots for fumonisin. Journal of AOAC International, 84 (3): 770-776.

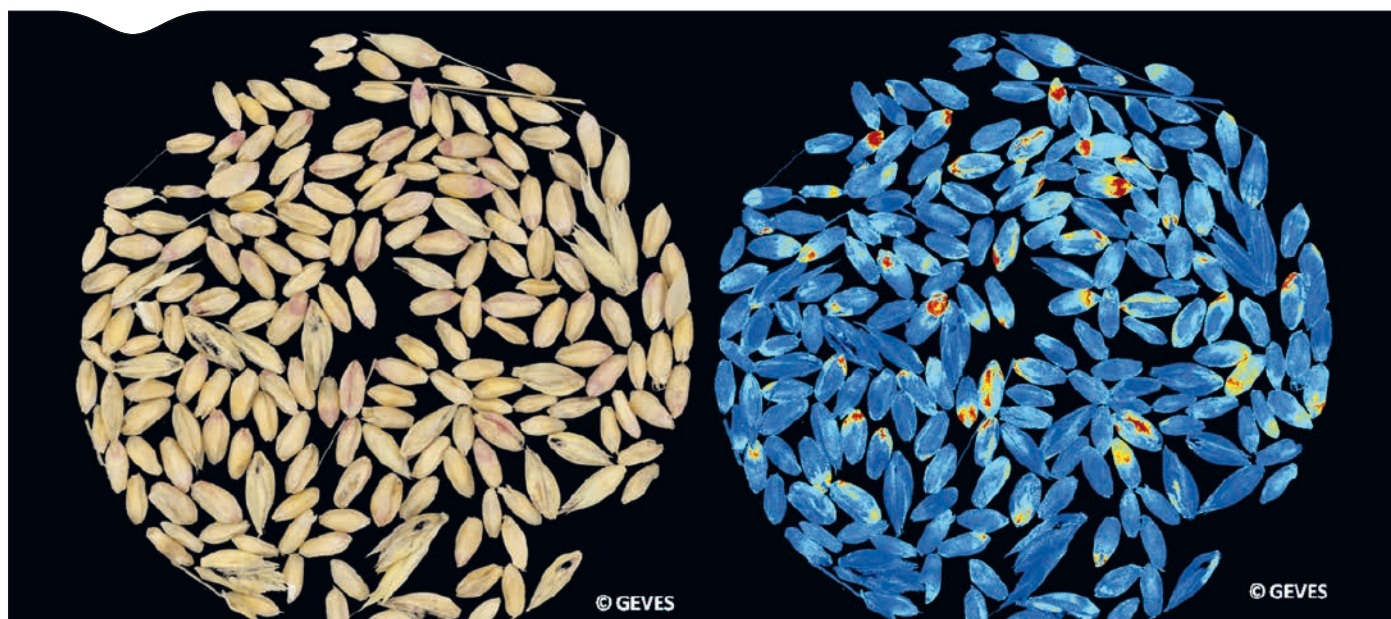


Figure 7. Détection de *Fusarium* sp. sur blé par l'appareil VideometerLab



## Réseaux

### Organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude: retour d'expérience de près de dix ans de l'unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux

Elsa Rulliat (elsa.rulliat@anses.fr) (1), Renaud Ios (renaud.ios@anses.fr) (2), Laurent Folcher (laurent.folcher@anses.fr) (1)

(1) Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Laboratoire national de référence, Unité de nématologie, Rennes Le Rheu, France.

(2) Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Laboratoire national de référence, Unité de mycologie, Malzéville, France.

**Le présent article restitue un exemple d'organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) en santé des végétaux à travers les EILA de détection et d'identification portant sur les nématodes à kyste de la pomme de terre *Globodera pallida* (Stones) Behrens et *G. rostochiensis* (Wollenweber) Behrens. Les évolutions des participations au niveau français et européen sont d'abord présentées puis les modalités d'organisation d'un tel essai inter-laboratoires décrites. Les principaux retours d'expérience de l'unité organisatrice sont ensuite exposés. Enfin la problématique des essais inter-laboratoires d'aptitude en santé des végétaux est élargie au travers d'autres disciplines.**

#### Introduction

La surveillance des organismes nuisibles aux végétaux en France, en particulier ceux considérés comme de quarantaine, repose sur un réseau de laboratoires agréés chargés de la réalisation d'analyses officielles pour le compte du ministère en charge de l'Agriculture. Une des principales missions du laboratoire national de référence (LNR) consiste à fiabiliser les analyses par (i) l'encadrement de ce réseau, (ii) le développement de méthodes d'analyses fiables et adaptées en termes de performances pour l'usage attendu et (iii) l'organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitudes (EILA) auxquels sont tenus de participer les laboratoires agréés ou candidats à un agrément. L'objectif premier d'un EILA est donc d'évaluer des laboratoires

en s'assurant qu'ils disposent des compétences requises (leur aptitude) pour mener à bien les analyses qui leur sont confiées. Ainsi, les EILA portent, pour tous les laboratoires participants, sur des supports de comparaison (« échantillons » ou prises d'essai) identiques et les résultats obtenus sont comparés à des critères de satisfaction (réussite) établis avant l'envoi des échantillons.

• L'organisation et la participation aux EILA s'inscrivent par ailleurs dans une double démarche qualité. La participation aux EILA était historiquement fondée sur la base du volontariat et avait vocation à aider les laboratoires français et européens pour la mise sous assurance qualité. Au niveau français, le document prescriptif du Comité français d'accréditation,

#### *Globodera pallida* et *G. rostochiensis*, deux nématodes de quarantaine

Ces deux nématodes sont des parasites obligatoires spécifiques des Solanées et de la pomme de terre en particulier. Originaires des Andes et notamment du Pérou (Picard *et al.*, 2004), ils ont été largement disséminés via la diffusion de la culture de pomme de terre et sont aujourd'hui présents sur tous les continents. Protégées à l'intérieur d'un kyste (Photo 1), forme de conservation de ces parasites, les larves (Photo 2) peuvent survivre dans le sol une dizaine d'années en l'absence de plante hôte (Wright et Perry, 2006). Cette forme de conservation leur donne un avantage dispersif en particulier via les échanges commerciaux, les outils agricoles ou tout autre moyen physique de transport.

De sévères pertes de rendements (Greco *et al.*, 1982), liées aux dégâts engendrés par ces parasites sur les cultures de pommes de terre, justifient leur classification en parasites de quarantaine au titre de la directive 2000/29/CE du 8 mai 2000 (Anonyme, 2000) et, ainsi l'adoption de mesures de lutte obligatoire. Spécifiquement, cette réglementation européenne stipule (i) que les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) destinés à la plantation doivent provenir de champs exempts de ces deux nématodes et, (ii) que les plants de pommes de terre doivent être produits dans des parcelles non contaminées.

Ainsi, le respect de la réglementation en vigueur suppose nécessairement l'utilisation d'une part de techniques d'extraction des nématodes à partir d'échantillons de sol et d'organes végétaux souterrains et d'autre part de techniques d'identification des espèces présentes. En France, le laboratoire national de référence est chargé du développement de telles méthodes qui font l'objet d'une publication officielle et sont appliquées par les laboratoires français agréés.

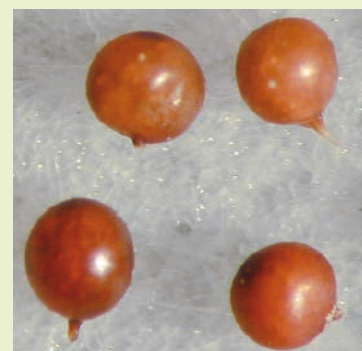


Photo 1. Kystes de nématode du genre *Globodera* (Source: LNPV).



Photo 2. Partie antérieure de larve de *Globodera* (Source: LNPV).



## Réseaux

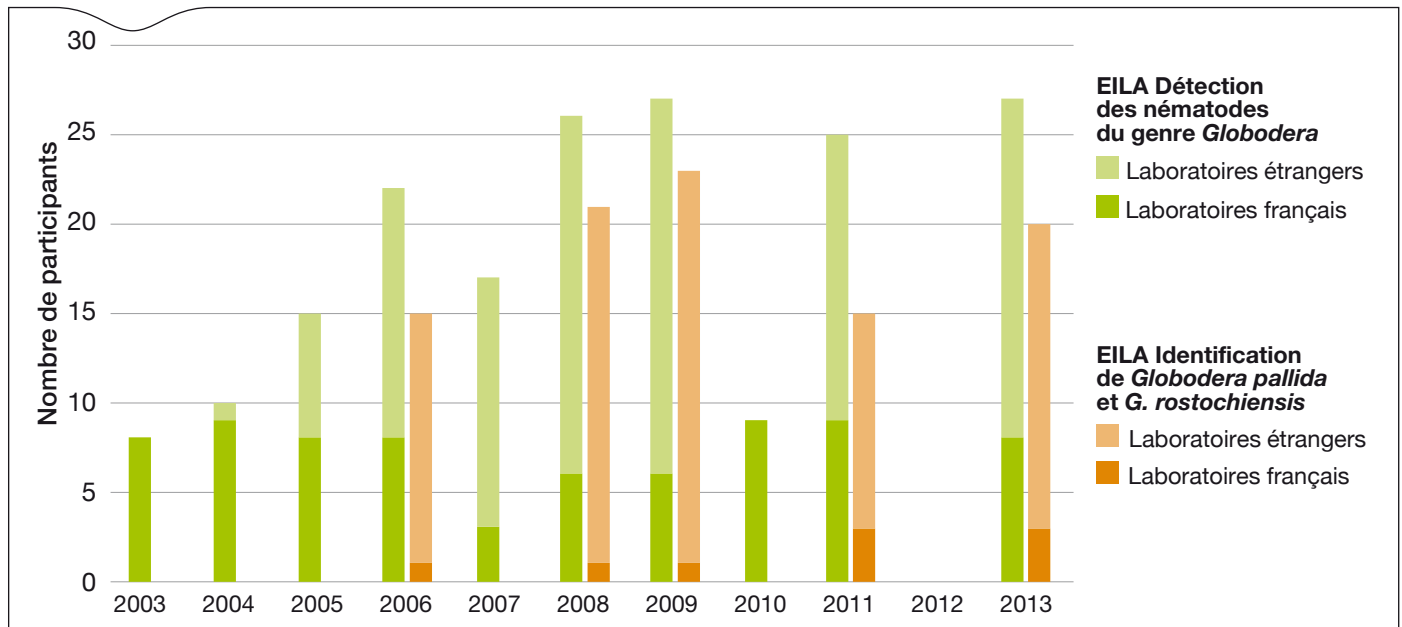


Figure 1. Évolution du nombre de laboratoires français et étrangers participant aux EILA « Détection des nématodes du genre *Globodera* » et « Identification des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis* ».

LAB REF 02 (COFRAC, 2012), qui vise à assurer aux clients des activités analytiques tracées et de qualité, recommande cette participation.

- D'autre part, la démarche qualité déployée au sein du laboratoire de la santé des végétaux (LSV) fait actuellement l'objet d'un renforcement pour *in fine* pouvoir proposer, à l'horizon 2015, des EILA développés selon la norme ISO 17043 (ISO, 2010). Cette norme internationale définit les exigences générales relatives à la compétence des organisateurs de programmes d'essais d'aptitude et à l'élaboration et à l'exécution de tels programmes. Ce processus contribue à renforcer la fiabilisation des analyses officielles réalisées par le réseau de laboratoires agréés et de référence.

L'unité de nématologie, LNR pour les nématodes phytoparasites, organise depuis près de dix ans des EILA portant sur les nématodes à kyste de la pomme de terre *Globodera pallida* (Stones) Behrens et *G. rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (Encadré 1). Après un premier point relatif à l'évolution des participants, un deuxième volet du texte s'attachera à restituer la méthodologie déployée en 2013. La dernière partie de l'article sera dédiée aux retours d'expériences du LNR en matière d'EILA.

### Evolution de la participation aux EILA dédiés aux nématodes du genre *Globodera*

Dix années d'organisation d'EILA portant sur la détection du genre *Globodera* et cinq années sur l'identification des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis* par l'unité de nématologie se sont traduites par des évolutions notoires.

En 2003, le premier EILA consacré à la détection du genre *Globodera* est organisé. Celui-ci est d'abord ouvert aux seuls laboratoires français puis, dès 2004, la participation, actée sur

la base du volontariat, est proposée à certains laboratoires européens. Le nombre de participants aux EILA s'est ainsi amplifié au cours des années.

De 2003 à 2006, les participants français étaient essentiellement composés des Laboratoires régionaux de la protection des végétaux (LRPV) et des laboratoires professionnels. Après 2006, la restructuration du réseau de laboratoires en France donnant lieu à la disparition progressive des LRPV, le nombre de laboratoires français participants a diminué alors qu'en parallèle la proportion de laboratoires étrangers a rapidement augmenté (Figure 1). C'est aussi en 2006 que le premier EILA portant sur l'identification des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis* est organisé, EILA destiné quasi exclusivement à des participants étrangers européens (Figure 1). Le panel de laboratoires européens participants est constitué par des laboratoires nationaux de référence, laboratoires régionaux ou encore des laboratoires professionnels. Ainsi au cours de ces dix dernières années, un total de 54 laboratoires<sup>(1)</sup> issus de 22 pays a participé à une des sessions de l'EILA de détection des nématodes du genre *Globodera* (Figure 2). L'EILA d'identification des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis* a, quant à lui, impliqué la participation de 36 laboratoires<sup>(1)</sup> de 20 pays différents (Figure 2).

### Organisation des EILA dédiés aux nématodes du genre *Globodera*

Une restitution chronologique de la méthodologie déployée en 2013 est déclinée selon les étapes clés listées dans le Tableau 1. L'étape de mise en œuvre des analyses est spécifiquement développée ci-après.

(1) La participation d'un même laboratoire est comptabilisée une seule fois sur l'ensemble de la période citée.





## Réseaux

Tableau 1. Principales étapes de l'organisation des EILA 2013 « Détection du genre *Globodera* » et « Identification de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* »

Étapes	Détails
Appel à candidature	Les participants sont : <ul style="list-style-type: none"> <li>• au niveau français, les laboratoires agréés par le ministère de l'Agriculture ou les candidats à un agrément ;</li> <li>• au niveau européen, les laboratoires nationaux de référence, les laboratoires régionaux et professionnels.</li> </ul>
Préparation des supports de comparaison	Le panel soumis à l'analyse est composé de dix échantillons référencés par un code unique. Chaque échantillon contient : <ul style="list-style-type: none"> <li>• pour l'EILA « Détection du genre <i>Globodera</i> », du sol exempt ou infesté artificiellement par des kystes de <i>Globodera</i> sp. (plusieurs niveaux de contamination) ;</li> <li>• pour l'EILA « Identification de <i>Globodera pallida</i> et <i>G. rostochiensis</i> », trois kystes isolés.</li> </ul>
Mise en œuvre des analyses (cf. § Méthodes analytiques)	La méthode mise en œuvre est : <ul style="list-style-type: none"> <li>• pour les laboratoires français, la méthode officielle d'analyse (MOA019) ;</li> <li>• pour les laboratoires étrangers, la méthode de leur choix, généralement celle utilisée en routine.</li> </ul>
Rapport d'essai : déclaration de conformité ou de non-conformité des résultats	Niveaux de performance attendus : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 % sensibilité (tous les échantillons positifs sont trouvés positifs par le laboratoire participant) ;</li> <li>• 100 % spécificité (tous les échantillons négatifs sont trouvés négatifs par le laboratoire participant) ;</li> <li>• 100 % exactitude (synthèse des deux précédents critères).</li> </ul>
Enquête de satisfaction	Le traitement des résultats de l'enquête de satisfaction permet une amélioration constante de l'organisation des EILA.

### Méthodes analytiques

Les analyses mises en œuvre par les laboratoires français sont décrites dans les méthodes officielles de « Détection des nématodes du genre *Globodera* » (Anonyme, 2011) et d'« Identification de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* par analyse morphobiométrique et biomoléculaire » (Anonyme, 2012). On notera que les participants français, en particulier les laboratoires agréés ou candidats à l'agrément, sont tenus

de suivre strictement ces méthodes. Les participants étrangers mettent en œuvre la méthode de leur choix, généralement celle utilisée en routine dans leur laboratoire. Les spécificités propres à chaque EILA sont décrites ci-après :

- EILA « Détection du genre *Globodera* » : quelle que soit l'origine des laboratoires participants, les échantillons préparés à partir de sol sont soumis à un processus d'extraction utilisant, le plus souvent, un éluatrieur de Seinhorst ou une centrifugeuse de Schuiling (ou tout autre appareil équivalent). L'extrait obtenu est ensuite observé au stéréomicroscope pour rechercher la présence de kystes sans cône vulvaire. Pour cela, des critères morphologiques sont pris en considération (présence ou absence de cône vulvaire entre autres) pour la distinction du genre. Les laboratoires participants doivent ainsi statuer, pour chaque échantillon, sur la présence ou l'absence de kystes sans cône vulvaire et retourner à l'organisateur les kystes détectés pour confirmation du genre ;
- EILA « Identification de *G. pallida* et *G. rostochiensis* » : les laboratoires français, appliquant la méthode officielle, basent leur identification sur des critères morphobiométriques déclinés sur les kystes (rapport de Granek obtenu par le ratio de la distance vulve – anus par le diamètre de la vulve ; nombre de plis cuticulaires présents entre la vulve et l'anus) et les larves (forme des boutons basaux et taille du stylet). Cette identification est complétée par une analyse moléculaire (amplification de l'ADN par PCR conventionnelle) réalisée sur les larves. Les résultats obtenus par ces deux techniques sont ensuite confrontés et une conclusion sur le statut final de l'échantillon est rendue. Les laboratoires étrangers mettent en œuvre la méthode de leur choix (morphobiométrique et/ou biomoléculaire). Comme précédemment, les laboratoires statuent, pour chaque échantillon, sur la présence ou l'absence de *G. pallida* et/ou *G. rostochiensis*.

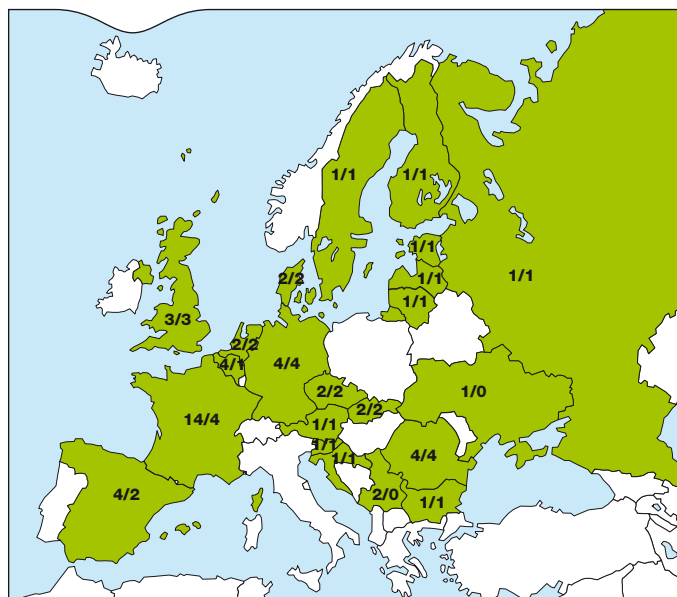


Figure 2. Répartition et nombre de laboratoires participant aux EILA « *Globodera* » organisés par l'unité de nématologie du LSV. Chiffre à gauche : nombre\* total de laboratoires ayant participé à l'EILA « Détection des nématodes du genre *Globodera* » de 2003 à 2013 et chiffre à droite : nombre\* total de laboratoires ayant participé à l'EILA « Identification des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis* » de 2006 à 2013.

\* La participation d'un même laboratoire est comptabilisée une seule fois sur l'ensemble de la période citée.

### Retour d'expérience d'EILA dédiés aux nématodes du genre *Globodera*

#### Retours de l'organisateur

L'organisation d'EILA nécessite, en premier lieu, la production et le maintien de matériel biologique de référence. À cet effet,



## Réseaux

l'unité de nématologie entretient depuis 2003 une collection d'espèces et de populations d'espèces. Le nombre croissant de participants aux deux EILA a nécessité une production de matériel de référence en conséquence, pour permettre la préparation des supports de comparaison.

Pour garantir la conformité de ces derniers, l'unité de nématologie a renforcé, au cours des années, ses étapes de contrôle. Spécifiquement pour l'EILA « Détection du genre *Globodera* », ce contrôle se traduit par la réalisation de tests préalables sur la matrice sol pour garantir l'absence d'organismes cibles (kystes sans cône vulvaire tels que *Globodera* sp. et *Punctodera* sp.). Par ailleurs, et pour éviter tout risque de contamination croisée, la préparation des échantillons à différents niveaux de contamination est dissociée dans le temps et/ou dans l'espace (préparation des échantillons sains puis des échantillons contaminés dans des zones dédiées du laboratoire). D'autre part, des tests d'homogénéité sont réalisés sur 20 échantillons par niveau de contamination avant l'envoi des panels aux laboratoires participants. Un test de stabilité n'est pas nécessaire car les kystes de *Globodera* sp. ont la capacité de se conserver plusieurs dizaines d'années (Wright et Perry, 2006). Enfin des doubles vérifications, réalisées par des opérateurs distincts, sont effectuées afin de s'assurer (i) du respect du niveau de contamination pour chaque échantillon (ii) de la conformité entre la référence (code) attribuée à chaque échantillon et son statut. D'autres aspects pratiques relatifs au développement de procédures, d'une documentation spécifique ou encore à la saisie des données, peuvent être relevés. À titre d'exemple, chaque laboratoire participant signe un contrat de participation détaillant notamment les engagements de chacune des parties. Depuis 2013, pour limiter toute erreur de retranscription des résultats, le laboratoire organisateur demande aux participants de saisir leurs résultats informatiquement, de préférence, par l'intermédiaire d'un formulaire (document Word) transmis par courriel.

L'analyse des résultats obtenus au cours des différentes sessions de l'EILA « Détection du genre *Globodera* » (Ladevèze et Anthoine, 2010) a permis de montrer que la probabilité de détecter un kyste dans un échantillon n'est pas liée au nombre total de kystes présents. Ainsi, la probabilité de détecter au moins un kyste dans un échantillon en contenant  $n$  est définie par la formule suivante :  $P = 1 - (1-p)^n$ . Cette relation a permis de déterminer des niveaux de contamination plus appropriés à soumettre aux laboratoires participants, supérieurs à la limite de détection.

### Retours des participants

Pour les laboratoires français, il s'agit essentiellement de respecter (i) la méthode officielle en vigueur lors de la mise en œuvre des analyses et (ii) les dates limites de réalisation des analyses et de rendu des résultats. L'analyse des résultats obtenus lors de l'EILA « Détection du genre *Globodera* » a permis de constater que certains participants confondent des kystes de nématodes avec d'autres éléments (graines, propagules autres que kystes de nématodes...). Même si cette erreur de tri est ensuite corrigée à l'étape d'identification, elle met en évidence la difficulté à déléguer des méthodes mettant en œuvre des critères morphologiques. Les EILA « Identification de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* » organisés depuis 2006 ont confirmé l'intérêt de coupler les techniques d'analyses morphobiométriques et biomoléculaires, plutôt que l'utilisation d'une seule technique d'analyse (biomoléculaire ou morphobiométrique), pour garantir une plus grande fiabilité des résultats (Ladevèze et Anthoine, 2010).

### Conclusion et perspectives

Comme l'unité de nématologie, l'ensemble des unités du Laboratoire de la santé des végétaux organise désormais des essais inter-laboratoires d'aptitude dans leur domaine de compétence (voir planning 2013 donné dans le présent numéro d'*EuroReference*), mais de manière un peu plus récente, avec la mise en place de la délégation d'analyses officielles auprès du réseau de laboratoires agréés. Tout comme l'unité donnée en exemple dans le présent article, ces EILA s'ouvrent progressivement aux participations de laboratoires européens, en particulier les laboratoires de référence des autres États membres de l'Union européenne ou de pays avec lesquels le laboratoire collabore. La mise en place de la démarche qualité selon le référentiel ISO 17043 s'accompagne ainsi progressivement de la traduction des documents en anglais afin de permettre la participation de ces pays étrangers. Ces derniers répondent en effet très favorablement à ce genre d'offre, car il n'existe que très peu, voire quasiment pas pour certaines disciplines (ex : mycologie, entomologie) de prestataires d'EILA dans le domaine de la santé des végétaux en Europe.

Il est à noter toutefois que les laboratoires participants à de tels EILA doivent être autorisés, par leur service officiel, à recevoir des échantillons contenant des organismes nuisibles de quarantaine.

Si les méthodes sont imposées aux participants inscrits au titre d'un agrément pour le compte des autorités françaises, dans la majorité des cas, les échantillons proposés permettent aux participants étrangers d'utiliser le protocole de détection de leur choix, basé sur des approches différentes (morphométrique, biomoléculaire, sérologique...).

### Références bibliographiques

Anonyme. 2000. Directive 2000/29/CE du conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté. Conseil de l'Union européenne, L169/1-L169/106.

Anonyme. 2011. Détection des nématodes du genre *Globodera*. MOA019 partie A version 1a. 23 pp. [consulté le 25 mars 2013] <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/LABO-Ft-MOA019-Globo.pdf>

Anonyme. 2012. Identification de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* par analyse morphobiométrique et biomoléculaire. MOA019 partie B version 1a, 28 pp. [consulté le 25 mars 2013] <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/LABO-Ft-MOA019B-ident-Globo.pdf>

COFRAC. 2012. LAB REF 02 : Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025. Révision 07 : 54 pp. [consulté le 25 mars 2013] <http://www.cofrac.fr/documentation/LAB-REF-02>

Greco N, Di Vito M, Brandonisio A, Giordano I, De Marinis G. 1982. The effect of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* on potato yield. *Nematologica*, 28 : 379-386.

ISO. 2010. ISO/IEC 17043 – General requirements for proficiency testing : 41 pp.

Ladevèze L, Anthoine G. 2010. Outcomes of a seven-year proficiency test for the detection and identification of potato cyst nematodes. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> symposium on potato cyst nematodes, Harper Adams University College, UK, 14-15 September 2010. *Aspects of Applied Biology*, 103 : 1-9.

Picard D, Plantard O, Scurrah M, Mugniéry D. 2004. Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Molecular Ecology* 13 : 2899-2908.

Wright DJ, Perry RN. 2006. Reproduction physiology and biochemistry. In: *Plant Nematology*. CABI publishing, Wallingford, UK : 187-209.



## Réseaux

### ENGL, le Réseau européen de laboratoires de référence pour les OGM

Joachim Kreysa (1) (Joachim.Kreysa@ec.europa.eu), Guy Van Den Eede (2), Marco Mazzara (1)

(1) Commission européenne, Centre commun de recherche, Unité « Biologie moléculaire et génomique », Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les OGM dans l'alimentation humaine et animale, Ispra, Italie

(2) Commission européenne, Centre commun de recherche, Conseiller pour la bio-économie, Bruxelles, Belgique

**Lors de l'élaboration de l'actuelle politique de l'UE sur les organismes génétiquement modifiés (OGM), des méthodes spécifiques de détection d'OGM n'étaient pas couramment disponibles. Un Réseau européen de laboratoires de référence pour les OGM, l'ENGL, a été établi sous la direction du Centre commun de recherche (JRC) de la Commission européenne.**

**L'ENGL rassemble les laboratoires de contrôle des OGM de l'UE (y compris les LNR) afin d'établir des normes standards, de diffuser les bonnes pratiques et de débattre des problèmes. Ses normes sont aujourd'hui utilisées dans toute l'UE et même au-delà.**

**L'ENGL illustre comment un réseau à l'échelle de l'UE peut assurer une égalité de traitement, indispensable pour un commerce sans entraves, et combien il bénéficie à ses membres dans le cadre de leur travail quotidien.**

#### Introduction et contexte de l'ENGL

L'Union européenne n'autorise l'introduction des organismes génétiquement modifiés (OGM) sur le marché qu'après une minutieuse évaluation des risques par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments). Afin de respecter le droit à l'information des consommateurs, il est aussi obligatoire d'étiqueter toutes les denrées alimentaires et aliments pour animaux contenant un ingrédient dont la masse comprend une concentration de plus de 0,9 % d'un OGM autorisé, même si cette présence est fortuite ou inévitable techniquement.

En application du règlement de l'UE (CE) n° 1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés (GM) (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/legalbasis.htm>) les méthodes validées de détection des denrées alimentaires et aliments pour animaux GM sont une condition préalable à toute autorisation et il est stipulé que ces méthodes doivent être appliquées uniformément à travers toute l'UE.

Lors de l'élaboration de cette politique, les méthodes fondées sur la technique PCR pour la détection des OGM n'étaient disponibles que depuis peu et pas encore couramment appliquées dans les laboratoires de contrôle des denrées alimentaires et aliments pour animaux des États membres de l'UE. Créé sous la direction du JRC, le Réseau européen de laboratoires de référence pour les OGM (ENGL) avait pour objectif d'appuyer l'introduction et l'application harmonisée de ces méthodes. Depuis lors, ce réseau a contribué à corréliser le système de contrôle des OGM de l'UE aux progrès scientifiques.

#### ENGL - membres, structure, et fonction

Tous les laboratoires officiels de contrôle des OGM des États membres de l'UE, y compris les LNR pour les OGM, sont membres de l'ENGL. L'ENGL est dirigé par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour les OGM dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux (LRUE GMFF, <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>), hébergé par le Centre commun de recherche. Des laboratoires OGM d'États non-membres de l'UE participent aussi en tant que membres ou en tant qu'observateurs. La liste des participants peut être consultée à : <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/ENGL/ENGLmembers.htm>. Le LRUE GMFF préside le réseau et assure son secrétariat.

Il organise et finance les réunions de l'assemblée plénière, du comité directeur, et des groupes de travail de l'ENGL.

Il y a **deux assemblées plénières de l'ENGL** par an, aussi ouvertes aux observateurs. Elles se tiennent normalement au siège du LRUE GMFF à Ispra, dans le nord de l'Italie. Leur rôle principal est d'informer le réseau sur les nouveaux développements et de permettre des échanges en face-à-face entre les membres. Elles servent aussi à partager les bonnes pratiques, à discuter des problèmes communs et du plan de travail du réseau et à échanger les documents de l'ENGL approuvés par le Comité directeur de l'ENGL.

Le **Comité directeur (ou Steering Committee) de l'ENGL** comprend essentiellement les LNR pour les OGM. Il se réunit aussi deux fois par an pour préparer les assemblées plénières de l'ENGL, établir le plan de travail du réseau, décider de la création et du mandat des groupes de travail de l'ENGL et suivre leur progrès, et enfin pour adopter leurs résultats finaux comme produits du réseau. À ce jour, l'ENGL a quatre groupes de travail actifs :

#### Le groupe de travail « Critères de performance des méthodes »

Ce groupe travaille sur le document « Définition des critères minimaux de performance des méthodes analytiques d'examen des OGM ». Le but est d'élargir le champ d'application du document actuel (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>) aux méthodes qualitatives, spécifiques de taxa, d'extraction d'ADN et aux méthodes multiplexes. De nouveaux critères de définition des faux-positifs et des faux-négatifs et d'évaluation de la performance des méthodes qualitatives de détection sont discutés, ainsi que des protocoles pour tester la robustesse des méthodes et des critères généraux pour les méthodes d'extraction de l'ADN.

#### Le groupe de travail « Méthodes de préparation des échantillons »

Ce groupe de travail recense les bonnes pratiques de recueil d'échantillons et prépare un document d'orientation sur les méthodes de préparation des échantillons. La dernière version en est à un stade avancé et préconisera, entre autres, des tests de performance pour les différentes étapes de la préparation des échantillons. Les Bonnes pratiques de travail seront décrites.



## Réseaux

### Le groupe consultatif sur la « Sélection des méthodes de validation »

Le mandat de ce groupe consultatif n'est pas, contrairement aux groupes de travail proprement dits, limité dans le temps. Le groupe identifie des méthodes de détection à valider pour combler des lacunes dans l'éventail réglementaire de détection des OGM. À ce jour, des méthodes spécifiques à des constructions, des éléments ou des taxa, ont été suggérées par les membres de l'ENGL et une liste prioritaire sera proposée par le groupe au comité directeur du réseau pour adoption. Par la suite, les membres de l'ENGL seront invités à contribuer et à participer à leur validation, laquelle sera dirigée par le LRUE GMFF.

### Le groupe de travail « Détection, interprétation et rendu des résultats »

Ce groupe de travail produira et mettra à jour un guide d'orientation pratique pour la détection, l'identification et la quantification des OGM dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux, l'interprétation des résultats analytiques, et leur rendu. Il portera sur les OGM autorisés, pour lesquels des méthodes spécifiques adaptées à chaque situation sont disponibles, et les OGM non autorisés, pour lesquels ces méthodes font normalement défaut. Pour couvrir le large champ d'application du document, les activités ont été divisées en trois sous-groupes :

- G1 - Valeurs-seuils et vérification des résultats analytiques ;
- G2 - Approche matricielle et rendu des résultats ;
- G3 - Approche basée sur la connaissance et les nouveaux développements technologiques.

### Résultats du RELO

Après plus de dix ans d'existence, on ne saurait surestimer l'importance de l'ENGL dans l'harmonisation de la détection des OGM à travers toute l'Europe et au-delà de ses frontières. En s'appuyant sur sa très grande expertise pratique, l'ENGL s'est assuré du caractère réaliste et de la faisabilité des critères de performance des méthodes généralement acceptées dans des situations pratiques de contrôle. Par ce travail de rassemblement de toute l'expertise de l'analyse réglementaire des OGM de l'UE, l'ENGL est devenue une autorité très respectée dans son domaine.

L'ENGL a d'autre part réalisé des documents d'orientation qui sont publiés sur le site du LRUE GMFF et ainsi rendus disponibles dans le monde entier (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>). Certains d'entre eux sont devenus de fait une norme mondiale et l'ENGL lui-même sert d'exemple à d'autres régions du monde où des réseaux similaires sont en cours de création. Les membres de l'ENGL sont régulièrement sollicités pour fournir à des collègues de pays tiers des formations sur l'analyse des OGM.

En règle générale l'organisation, les pratiques et les documents de l'ENGL ont servi de modèles dans d'autres domaines de détection telle que la microbiologie de l'alimentation.

### ENGL - Perspectives

Le nombre d'OGM (plantes et animaux) qui atteignent aujourd'hui et atteindront demain le stade de commercialisation est en augmentation. Leur gestion réglementaire continuera à nécessiter des méthodes généralement acceptées et efficaces en termes de coût pour leur détection, leur identification et leur quantification. L'expertise de l'ENGL continuera à contribuer au développement et à l'adoption de méthodes réalisables d'un point de vue pratique dans le monde entier, même si les défis posés par les nouvelles techniques d'élevage et la possible introduction d'animaux génétiquement modifiés dans les chaînes de l'alimentation humaine et animale ne devraient pas être sous-estimés.

Nous allons nous trouver face à des défis considérables, résultant des progrès scientifiques et techniques. De nouvelles techniques d'ingénierie génétique remettent en question les méthodes actuelles de détection ; par ailleurs de nouvelles techniques analytiques doivent être mises en œuvre par la communauté des laboratoires de contrôle des OGM de l'UE. L'ENGL soutiendra cette mise en œuvre tout en poursuivant son travail sur la faisabilité des méthodes tant en termes de complexité scientifique et technique que de coûts.



## Réseaux

### Q-bacco-net: une initiative pour faciliter l'accès à des ressources de qualité pour la recherche, la détection et le diagnostic des bactéries de quarantaine

Perrine Portier (perrine.portier@angers.inra.fr) (1), Danielle Janssens (2), Paul De Vos (3), John Elphinstone (4), Andrew Aspin (4), Françoise Petter (5), Martine Maes (6)

(1) CIRM-CFBP, Centre international de ressources microbiennes - Collection française de bactéries associées aux plantes, IRHS UMR 1345 INRA-ACO-UA. Beaucozéz, France. <http://www.angers-nantes.inra.fr/cfbp/>

(2) BCCM/LMG, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms - LMG Bacteria Collection, Gent, Belgium. <http://bccm.belspo.be/>

(3) LM-UGent, Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium. <http://www.lm.ugent.be>

(4) NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Food and Environment Research Agency (Fera), Royaume-Uni. <http://www.ncppb.com/>

(5) OEPP, Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes, Paris, France. <http://www.eppo.int/>

(6) ILVO, Institute for Agricultural and Fisheries Research-Unit Plant, Crop Protection. Merelbeke, Belgium. <http://www.ilvo.vlaanderen.be/>

**Le diagnostic et la détection fiable des bactéries de quarantaine sont cruciaux pour l'agriculture européenne. L'établissement de méthodes de diagnostic et de détection fiables nécessite de s'appuyer sur du matériel de référence bien caractérisé et représentatif de la diversité à la fois du taxon considéré et aussi des taxons proches et des « look-alike ». Pour améliorer l'accès à de telles ressources, trois collections publiques, la BCCM/LMG, la NCPPB et le CIRM-CFBP se sont associées au sein de l'initiative Q-bacco-net, initiée par l'ILVO et soutenue par l'OEPP. Cette initiative a pour but de faciliter la recherche, la détection et le diagnostic en proposant un panel de souches pour chacun des taxons de bactéries de quarantaine.**

Les échanges internationaux ont augmenté de façon importante ces dernières décennies, générant en Europe un accroissement des mouvements de plantes et de produits végétaux. En conséquence, le taux d'entrée et d'établissement de nouveaux agents potentiellement nocifs pour les cultures et l'environnement a lui aussi augmenté de façon notable. De plus, le changement climatique augmente lui aussi la probabilité d'établissement de nouveaux organismes hors de leur région d'origine. Parmi ces organismes nouvellement arrivés en Europe certains sont pathogènes pour les plantes.

Parmi les bactéries pathogènes de plantes, vingt-sept taxons ont d'ores et déjà été identifiés comme posant un risque inacceptable pour les cultures et l'environnement et ont de fait été inclus dans les annexes de la Directive européenne 2000/29/CE comme pestes de l'Union européenne (cette liste est appelée liste des organismes de quarantaine).

La liste des pestes recommandées pour être soumise à réglementation (liste A1 et A2) et de pestes représentant un risque potentiel (liste d'Alerte) pour l'Union européenne et pour la région méditerranéenne est disponible via le site internet de l'OEPP (Organisation européenne de protection des plantes) (<http://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm>).

En l'absence de méthodes curatives pour lutter contre les maladies bactériennes des plantes, les seules options sont l'évitement, la prévention et la prophylaxie. En conséquence, la détection de ces bactéries réglementée est d'importance primordiale, permettant d'adopter les mesures de protection adéquates, afin de protéger efficacement l'agriculture européenne. La détection et l'identification des bactéries classées de quarantaine se doivent d'être efficaces et fiables, en effet, les conséquences d'une mauvaise détection (faux positif ou faux négatif) peuvent être dramatiques d'un point de vue économique et environnemental.

Dans le but de mettre au point des techniques de détection et de diagnostic efficaces, il est nécessaire d'avoir accès à

du matériel de référence bien caractérisé. Idéalement, ces ressources doivent permettre une vue d'ensemble du taxon considéré la plus exhaustive possible en prenant en compte la diversité biologique. De plus, les contrôles négatifs doivent inclure des représentants des taxons phylogénétiquement proches ainsi que des représentants de taxons plus éloignés mais habituellement isolés dans les mêmes conditions que les organismes recherchés (nommés « look-alike ») et pouvant introduire des erreurs dans le diagnostic.

Trois collections publiques spécialisées pour les bactéries pathogènes de plantes (BCCM/LMG, CIRM-CFBP et NCPPB), qui sont toutes des Centres de ressources biologiques, certifiés ISO 9001, se sont associées au sein du réseau Q-bacco-net. Cette initiative a été stimulée par l'ILVO (*Institute for Agricultural and Fisheries Research*) et soutenue par le projet Q-Bank et l'OEPP. Ces trois collections se sont accordées pour proposer des panels de souches de référence pour tous les taxons de bactéries présents sur les listes A1, A2 et liste d'Alerte de l'OEPP (Q-bacco-ref). Ces souches de référence ont été choisies selon les critères suivants :

- les souches représentent l'ensemble de la diversité connue de chacun des taxons et incluent des proches voisins ainsi que des « look-alike » ;
- ces souches sont bien caractérisées d'un point de vue phénotypique et génétique ;
- elles couvrent le spectre des origines géographiques et biologiques ;
- y sont incluses, quand pertinent, les souches types d'espèce, de sous-espèces ou les souches de référence des pathovars et des souches dont la séquence du génome complet est disponible.

Des standards communs de qualité sont mis en œuvre dans chacune des collections pour la caractérisation des souches, leur authentification, leur maintenance, leur stockage et leur distribution.



## Réseaux

Ces panels de référence seront disponibles prochainement via le site de l'OEPP. Plus d'informations à propos de ces souches sont disponibles sur les sites web des différentes collections ainsi que sur le site StrainInfo (<http://www.straininfo.net/>).

Les trois collections ont décidé de partager leurs ressources afin d'assurer la disponibilité de cette ressource dans au moins deux des trois collections, pour la communauté des diagnosticiens et des scientifiques y compris les organisations nationales de protection des plantes. Ces collections publiques de service sont idéalement placées pour proposer ces panels de référence. En effet, de part leur position centrale elles sont en contact étroit avec tous les spécialistes du secteur de la pathologie végétale. De plus leurs missions sont de préserver les ressources biologiques, les données associées, de caractériser ces ressources et d'assurer la disponibilité de ces ressources pour la communauté scientifique internationale, en accord avec la législation internationale (Janssens *et al.*, 2010). Ces panels de souches évolueront avec le temps, afin de suivre les évolutions des connaissances, notamment en ce qui concerne la taxonomie et la description de la diversité des taxons considérés ainsi que des « look-alike », et afin de prendre en compte les évolutions des listes de quarantaine et d'alerte. Les marqueurs génétiques disponibles pour chaque taxons sont susceptibles d'augmenter.

Avec Q-bacco-net, les trois collections souhaitent faciliter les activités des laboratoires de diagnostic et de recherche en améliorant l'accès à des ressources biologiques de référence, permettre le développement de nouvelles méthodes de détection/diagnostic fiables et efficaces, et aider à la validation de ces méthodes.

### Références bibliographiques

Janssens, D., D. R. Arahall, *et al.* (2010). The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res Microbiol* 161(6): 422-429.



## Agenda

### Comparaisons inter-laboratoires organisées par les laboratoires dans la région de l'OEPP

Françoise Petter (petter@epo.int), Madeleine McMullen, Jean Perchet  
Secrétariat de l'OEPP, Paris, France

En 1998, l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) a élaboré un programme de travail dans le domaine du diagnostic phytosanitaire afin d'harmoniser les procédures dans toute la région de son ressort. Ce travail est mené par le panel sur le diagnostic et l'assurance qualité en collaboration avec des panels spécialisés (Diagnostic en bactériologie, entomologie, nématologie, virologie et phytoplasmiologie et le Réseau européen de mycologie). Le panel sur le diagnostic et l'assurance qualité de l'OEPP prépare une norme qui donnera des orientations sur l'organisation de comparaisons inter-laboratoires à l'intention des laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles.

Afin d'approfondir le travail sur la norme en préparation, il a semblé important de recueillir des informations sur les procédures suivies par les laboratoires qui organisent des essais d'aptitude et des études de performance sur les tests (souvent appelées essais d'intercomparaison). Une enquête en ligne a été organisée entre septembre 2012 et janvier 2013. Au total, 52 laboratoires de 28 pays ont répondu à l'enquête. Il a été demandé aux laboratoires s'ils avaient déjà organisé des essais d'aptitude et/ou des études de performance sur les tests et sur quels couples matrice/organisme nuisible. La liste des laboratoires et des couples matrice/organisme nuisible est présentée dans les tableaux ci-dessous.

#### Couples matrice/organisme nuisible pour les essais d'aptitude

Pays	Nom du laboratoire	Couples matrice/organisme nuisible
France	Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chalara fraxinea</i>/<i>Fraxinus</i> spp.</li> <li>• <i>Phytophthora ramorum</i>/<i>Rhododendron</i> spp.</li> <li>• <i>Monilia fructicola</i>/<i>Prunus persica</i></li> <li>• <i>Gibberella circinata</i>/semences de <i>Pinus</i> spp.</li> <li>• <i>Gibberella circinata</i>/culture pure</li> <li>• <i>Plasmopara halstedii</i>/semences de <i>Helianthus annuus</i></li> <li>• <i>Ceratocystis platani</i>/<i>Platanus</i> spp.</li> </ul>
	Anses, Laboratoire de la santé des végétaux	• Virus/feuilles de <i>Musa</i> spp.
		• <i>Globodera pallida</i> et <i>Globodera rostochiensis</i> /sol
		• Femelle de <i>Meloidogyne</i> sp/ <i>Solanum tuberosum</i>
		• <i>Ditylenchus dipsaci</i> et <i>Ditylenchus destructor</i> /semences
		• <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> /extrait de bois de <i>Pinus</i> spp.
• <i>Ralstonia solanacearum</i> et <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>sepedonicus</i> sur des pommes de terre		
• <i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV) sur des racines de betterave à sucre ( <i>Beta vulgaris</i> ).		
• <i>Bemisia tabaci</i> (pupe)		
• <i>Diabrotica virgifera</i> (adultes)		
• Phytoplasmes de la flavescence dorée et du Bois noir sur <i>Vitis vinifera</i>		
Allemagne	Analyse und Diagnoselabor im DLR Rheinpfalz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV), <i>Arabic mosaic virus</i> ArMV); Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), Grapevine fleck virus (GFIV)/<i>Vitis vinifera</i></li> <li>• <i>Prune dwarf virus</i> (PDV), <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV), <i>Plum pox virus</i> (PPV)/<i>Prunus</i> spp</li> </ul>
	JKI-KLM, bactériologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>/extrait de tubercule de <i>Solanum tuberosum</i></li> <li>• <i>Ralstonia solanacearum</i>/extrait de tubercule de <i>Solanum tuberosum</i></li> </ul>
Russie	Russian Plant Quarantine Centre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suspensions bactériennes (<i>E. amylovora</i>, <i>R. solanacearum</i>, <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>, <i>P. stewartii</i>)</li> </ul>



## Agenda

### Couples matrice/organisme nuisible pour les essais d'aptitude (suite)

Pays	Nom du laboratoire	Couples matrice/organisme nuisible
Pologne	Laboratoire central de l'Inspectorat principal de la santé végétale et de l'inspection des semences	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Globodera</i> spp. – sol, kystes, ADN</li> <li>• <i>Bursaphelenhus xylophilus</i>/échantillons</li> <li>• PPV, PSTVd/matériel lyophilisé ou frais</li> <li>• CMS/lames, <i>Diabrotica virgifera</i>/échantillons</li> <li>• <i>Frankliniella occidentalis</i>/échantillons</li> <li>• <i>Synchytrium endobioticum</i>/sol</li> </ul>
Finlande	Autorité finlandaise pour la sécurité alimentaire Evira	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tospovirus INSV et TSWV dans les plantes ornementales.</li> </ul>
Belgique	ILVO, unité sciences des plantes, protection des cultures	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Phytophthora ramorum</i> et <i>Phytophthora kernoviae</i> sur <i>Rhododendron</i> spp., <i>Viburnum</i> spp. et <i>Camellia</i> spp.</li> <li>• <i>Clavbacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>/extrait de tubercule de <i>Solanum tuberosum</i></li> <li>• <i>Ralstonia solanacearum</i>/extrait de tubercule de <i>Solanum tuberosum</i></li> <li>• <i>Erwinia amylovora</i>/extrait de plantes ligneuses</li> </ul>
Espagne	Instituto Agroforestal Mediterraneo, Universitat politecnica de Valencia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Gibberella circinata</i> en cultures pures</li> </ul>
	Laboratori de Sanitat Vegetal, Generalitat de Catalunya	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PepMV, TSWV, ToMV, TYLCV dans des <i>Solanaceae</i></li> </ul>
Pays-Bas	Laboratorio regional de la C.A.R.	Virus affectant <i>Vitis vinifera</i> (GFLV, GLRaV1, GLRaV3, GFKV AND ArMV): <ul style="list-style-type: none"> <li>• matériel végétal frais de <i>Vitis vinifera</i> ;</li> <li>• extraits de <i>Vitis vinifera</i>.</li> </ul>
	Laboratoires du Naktuinbouw	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Feuilles, semences/différents organismes nuisibles</li> </ul>
Slovénie	Institut national de Biologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADN isolé d'un mélange de <i>Ralstonia solanacearum</i> dans un extrait de pomme de terre</li> <li>• Lames d'immunofluorescence de <i>R. solanacearum</i> dans un extrait de <i>Solanum tuberosum</i></li> </ul>





## Agenda

### Couples matrice/organisme nuisible pour les études de performance des tests

Pays	Nom du laboratoire	Couples matrice/organisme nuisible
France	Anses, Laboratoire de la santé des végétaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chalara fraxinea</i>/<i>Fraxinus</i> spp.</li> <li>• <i>Phytophthora ramorum</i>/<i>Rhododendron</i> spp.</li> <li>• <i>Monilia fructicola</i>/<i>Prunus persica</i></li> <li>• <i>Gibberella circinata</i>/semences de <i>Pinus</i> spp.</li> <li>• <i>Gibberella circinata</i>/culture pure</li> <li>• <i>Plasmopara hasltedii</i>/semences d'<i>Helianthus annuus</i></li> <li>• <i>Ceratocystis platani</i>/<i>Platanus</i> spp.</li> </ul>
		• Bactéries ( <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> )/ <i>Anthurium</i>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Meloidogyne chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>/ADN extrait de sols</li> <li>• <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>/ADN d'extrait de bois de <i>Pinus</i> spp.</li> </ul>
Pologne	Laboratoire central de l'Inspectorat principal de la santé végétale et de l'inspection des semences	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Globodera</i> spp. – sol, kystes, ADN</li> <li>• <i>Diabrotica virgifera</i>/échantillons</li> <li>• <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>/échantillons</li> </ul>
Italie	CRA - Centre de recherche en pathologie végétale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus: Plum pox virus sur les feuilles de <i>Prunus</i> spp. avec et sans symptômes</li> <li>• Pepino mosaic virus sur des feuilles, fruits et semences de <i>Solanum lycopersicum</i>, <i>Tomato infectious chlorosis virus</i> et <i>Tomato chlorosis virus</i> sur des feuilles de <i>Solanum lycopersicum</i></li> <li>• <i>Potato spindle tuber viroid</i> sur les feuilles de solanacées ornementales</li> <li>• Virus de la vigne sur l'écorce de <i>Vitis vinifera</i></li> <li>• Phytoplasmes: <i>Candidatus P. mali</i> sur les feuilles de pommiers <i>Malus domestica</i>, <i>Candidatus P. prunorum</i> sur les feuilles de <i>Prunus</i> spp.</li> <li>• Bactéries: <i>Erwinia amylovora</i> sur des rameaux asymptomatiques de <i>Pyrus</i> spp., <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i> sur des semences de <i>Solanum lycopersicum</i>, <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> sur différents matériels de <i>Prunus domestica</i> et de <i>Prunus persica</i> asymptomatiques, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Actinidiae</i> sur du pollen, des feuilles et de l'écorce malades de <i>Actinidia chinensis</i></li> <li>• Champignons: <i>Monilinia fructicola</i> sur <i>Prunus persica</i>, <i>Tilletia indica</i> sur téliosporos, <i>Gibberella circinata</i> sur des semences de <i>Pinus nigra</i>, <i>Phytophthora ramorum</i> sur de l'ADN fongique</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bactéries: <i>Erwinia amylovora</i> sur des rameaux asymptomatiques de <i>Pyrus</i> spp., <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i> sur des semences de <i>Solanum lycopersicum</i>, <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> sur différents matériels de <i>Prunus domestica</i> et de <i>Prunus persica</i> asymptomatiques, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Actinidiae</i> sur du pollen, des feuilles et de l'écorce malades de <i>Actinidia chinensis</i></li> <li>• Champignons: <i>Monilinia fructicola</i> sur <i>Prunus persica</i>, <i>Tilletia indica</i> sur téliosporos, <i>Gibberella circinata</i> sur des semences de <i>Pinus nigra</i>, <i>Phytophthora ramorum</i> sur de l'ADN fongique</li> </ul>
Belgique	ILVO, unité sciences des plantes, protection des cultures	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Diabrotica virgifera</i> adultes sur des pièges à phéromone</li> </ul>
Pays-Bas	Laboratoires du Naktuinbouw	• Feuilles, semences/différents organismes nuisibles
	Organisation nationale de la protection des végétaux	• Divers: se concentre sur les méthodes de détection et d'identification par biologie moléculaire (PCR conventionnelle, (RFLP), PCR en temps réel, code-barres ADN)
Slovénie	Institut national de biologie	• ADN isolé de mélanges définis d' <i>Erwinia amylovora</i> dans des tissus de plantes-hôtes (PCR en temps réel)

#### Réalisation graphique et éditoriale

**Directeur de la publication:** Marc Mortureux

**Rédacteur en chef:** Paul Martin

**Rédacteur en chef adjoint:** Barbara Gouget

**Comité de rédaction spécial:** Vincent Héreau, Françoise Petter, Charles Manceau, Annie Micoud

**Merci à** Pascale Parisot pour la relecture du numéro

**Création/réalisation:** Julien Vigneron, Céline Leterq, Fabrice Coutureau, Parimage

**Crédits photos:** Anses, GEVES

**ISSN** 2110-5294