



## 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

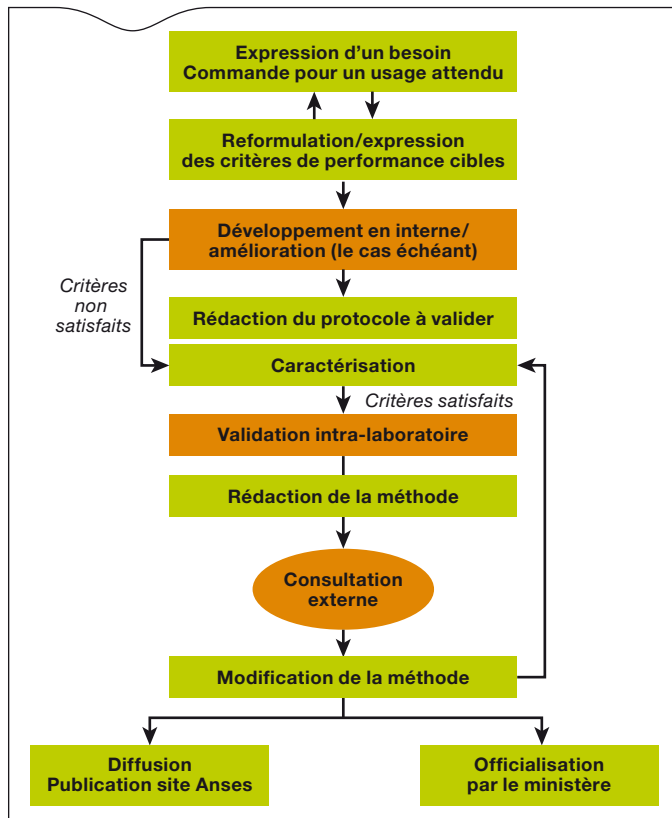


Figure 1. Processus de préparation et d'officialisation des méthodes en santé des végétaux

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.