



## 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 Ioos (renaud.ioos@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.

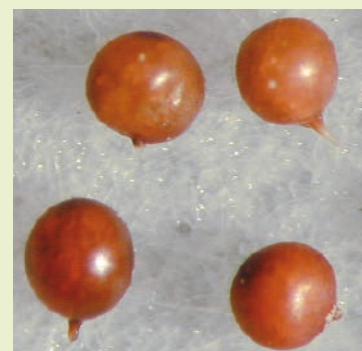


Photo 1. Kystes de nématode du genre *Globodera* (Source: LNPV).



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



## Réseaux

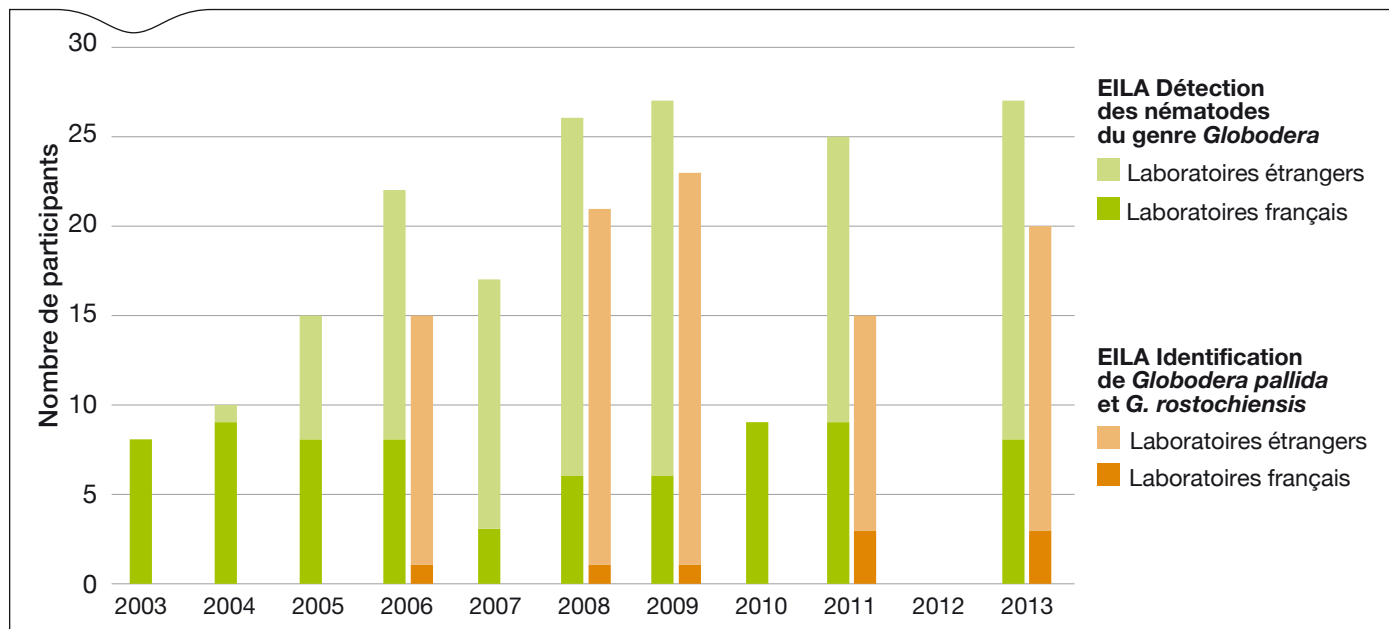


Figure 1. Évolution du nombre de laboratoires français et étrangers participant aux EILA « Détection des nématodes du genre *Globodera* » et « Identification des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis* ».

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*.

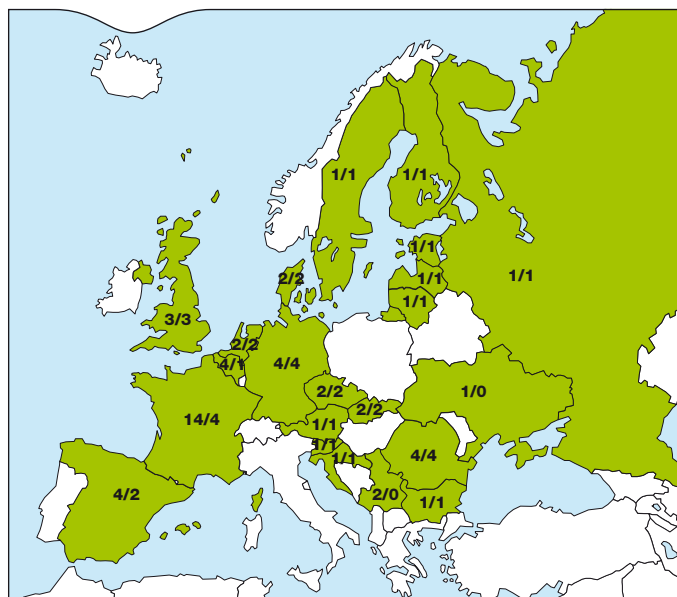


Figure 2. Répartition et nombre de laboratoires participant aux EILA « *Globodera* » organisés par l'unité de nématologie du LSV. Chiffre à gauche : nombre\* total de laboratoires ayant participé à l'EILA « Détection des nématodes du genre *Globodera* » de 2003 à 2013 et chiffre à droite : nombre\* total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