



## **Note de synthèse sur les rapports d'activités 2018 des mandats de LNR portés par l'Anses**

En application du Code rural et de la pêche maritime et du Code de la santé publique, l'Anses porte différents mandats de laboratoire national de référence (LNR) dans les domaines de la santé animale (SA), de la santé des végétaux (SV) et de la sécurité sanitaire des aliments (SSA) y compris des eaux destinées à la consommation. Ces activités de référence sont mises en œuvre dans le cadre des unités spécialisées des laboratoires de l'Agence.

En 2018, ces mandats de LNR étaient au nombre de 66 : 37 en SA, 17 en SSA et 12 en SV, soit un mandat de plus qu'en 2017 avec l'octroi du mandat « virus d'origine alimentaire dans les denrées alimentaires d'origine animale hors coquillages » (arrêté ministériel du 8 mars 2018). A noter la nouvelle répartition (arrêté ministériel du 26 novembre 2018) des mandats de la fièvre catarrhale ovine (confié à l'Anses) et de la fièvre de la vallée du Rift (confié au CIRAD) là où les 2 organismes se partageaient les mandats dédoublés par domaine de compétence (virologie et sérologie). On notera qu'en 2018, 5 laboratoires de l'Anses porteurs de mandats LNR détenaient également 8 mandats de laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE).

Les missions des LNR visent à assurer la fiabilité des analyses officielles réalisées pour le compte des autorités sanitaires dans ces différents domaines, à travers notamment :

- le développement, l'optimisation et la validation des méthodes d'analyse destinées à être utilisées dans ce cadre ;
- l'animation technique du réseau des laboratoires (notamment les laboratoires départementaux) agréés par l'Etat, y compris la vérification de l'aptitude de ces laboratoires à travers notamment l'organisation d'essais inter laboratoires d'aptitude (EILA) ;
- le cas échéant, la réalisation d'analyses officielles et notamment la confirmation de résultats d'analyses réalisées par des laboratoires agréés.

Deux LNR ont assuré en 2018 une mission d'animation de réseaux de laboratoires reconnus par l'Etat pour les analyses d'autocontrôle des acteurs de la chaîne alimentaire.

Certains LNR réalisent par ailleurs des contrôles de réactifs de diagnostic commerciaux (cela a concerné 16 LNR en 2018), produisent et fournissent des réactifs (pour 14 LNR sur l'année), produisent et fournissent des matériaux de référence (pour 32 LNR) à usage de leurs réseaux de laboratoires agréés. A souligner que le nombre de contrôles de kits commerciaux augmente. Ces contrôles sont réalisés par un nombre globalement constant de LNR d'une année sur l'autre : pour mémoire, en 2017, 16 LNR ont contrôlé des lots de réactifs (2016 : 17 ; 2015 : 15). Le nombre de LNR produisant et fournissant des réactifs se stabilise (2017 : 12 ; 2016 : 13 ; 2015 : 15) et le nombre de LNR produisant et fournissant des matériaux de référence continue de diminuer régulièrement (2017 : 33 ; 2016 : 35 ; 2015 : 36).

Les LNR contribuent par ailleurs à la surveillance épidémiologique et à la veille des dangers sanitaires dont ils ont la charge, le cas échéant dans le cadre des plateformes d'épidémiosurveillance. En 2018, 51 fiches d'alerte ou de signal qui ont été émises par 21 de nos LNR via Salsa, le système d'alertes sanitaires de l'Anses mis en place mi-2017.

Les LNR apportent aussi un appui scientifique et technique aux tutelles en tant que de besoin conformément à leurs missions définies par les textes réglementaires.

### **Développement, optimisation et validation des méthodes d'analyse proposées à l'autorité sanitaire**

Le renforcement des capacités de détection et de contrôle sur toute la chaîne alimentaire ainsi qu'en SA et SV est un enjeu majeur et l'une des missions premières des laboratoires de référence de l'Anses. Dans ce cadre, nos LNR sont amenés à développer, valider, soumettre à consultation à la communauté des laboratoires puis publier sur le site de l'Anses des méthodes d'analyse avant de les proposer à l'autorité sanitaire pour officialisation.

Ainsi, en 2018, 21 méthodes ont été développées ou révisées et proposées à l'autorité sanitaire par 13 de nos LNR, réparties selon les 3 différents champs comme suit : 8 en SSA, 7 en SA et 6 en SV. Ce nombre est en diminution par rapport aux années précédentes : en 2017, 32 méthodes avaient été développées ou révisées et proposées à l'officialisation par 17 LNR (13 en SSA, 10 en SA et 9 en SV), niveau similaire à celui de 2015 où 17 LNR de l'Anses avaient proposé 36 méthodes (14 en SSA, 18 en SA et 4 en SV), après un pic en 2016 où 48 méthodes avaient été développées ou révisées et proposées à l'officialisation par 27 LNR (14 en SSA, 13 en SA et 21 en SV).

Au total, 19 méthodes ont été transférées par les LNR à leurs réseaux de laboratoires en 2018.

On peut noter à titre d'exemples quelques méthodes développées et/ou proposées à l'officialisation en 2018 :

- *En sécurité sanitaire des aliments*

On peut mentionner à titre illustratif le développement d'une méthode de détermination de la teneur en plomb, cadmium et mercure dans les denrées alimentaires d'origine animale par dilution isotopique et spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS). Le principe de la méthode consiste en un marquage isotopique de l'échantillon avec une quantité appropriée de solution étalon enrichie par un isotope de plomb, de cadmium et de mercure, puis minéralisation de l'échantillon par digestion acide par voie humide à l'aide d'un four à micro-ondes. La solution obtenue (mélange échantillon + marqueur) est ensuite analysée par la dilution isotopique-spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS). La dilution isotopique est fondée sur la mesure de rapports isotopiques puis la quantification est réalisée via des équations de calcul spécifiques à cette approche analytique. Cette méthode est destinée à l'usage du LNR pour réaliser des analyses de confirmation.

La méthode « de routine » fondée sur une digestion acide par voie humide de l'échantillon puis analyse de la solution obtenue en étalonnage externe par spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS), a fait l'objet d'une révision de façon à mieux intégrer les conditions de travail des laboratoires agréés, en proposant différentes options de digestion des échantillons et d'étalonnage interne.

Cette méthode a été également mise en œuvre par le LNR pour mener à bien le plan de surveillance exploratoire de la contamination des bulots par le cadmium, dont l'objectif est d'évaluer la teneur en cadmium dans les bulots, la répartition du cadmium dans les différentes parties du bulot (chair et tortillon viscéral), ainsi que l'impact de la taille et l'effet de la cuisson des bulots sur la teneur en cadmium. Ce plan s'est déroulé en 2 phases : détermination de la teneur en cadmium dans les échantillons frais (chair et tortillon), puis dans une sélection d'échantillons, après cuisson (chair, tortillon et eau de cuisson). Les résultats de ce plan ont permis de faire un état des lieux du niveau de contamination des bulots pêchés (de taille inférieure et supérieure à 7 cm), dans les principaux gisements naturels français, et d'évaluer l'effet de la cuisson sur ces niveaux de contamination. Par

ailleurs, l'exploitation de ces résultats sera poursuivie au travers d'une saisine Anses afin d'évaluer l'exposition du consommateur aux risques liés au cadmium dans les bulots et, le cas échéant, afin d'établir des mesures de gestions adéquates en fonction des risques identifiés, telles que la définition d'un seuil de décision national (en l'absence de teneur maximale réglementaire), ou la proposition de recommandations de consommation.

- *En santé animale*

A titre illustratif, on pourra mentionner les travaux sur la peste porcine africaine (PPA). Depuis son introduction en Géorgie en 2007, la PPA est désormais enzootique en Russie et a atteint l'Union européenne en 2014. Sa progression continue aussi bien en Pologne que dans les pays baltes (Lituanie, Lettonie et Estonie) où l'infection a atteint l'ensemble des populations de sangliers sauvages. La PPA est aussi enzootique en Sardaigne depuis 1978. L'infection a atteint de nouveaux états membres, la Moldavie (2016), la Roumanie (2017), la République Tchèque (2017) et plus récemment la Hongrie (avril 2018) et la Belgique (septembre 2018). Le continent asiatique est aussi atteint, Chine en août 2018 et Mongolie en janvier 2019. Suite à l'extension des zones infectées au sein de l'Union européenne tant chez le porc domestique que chez les sangliers sauvages, la DGAI a mis en place un plan d'action basé sur trois piliers : surveillance, prévention et lutte, avec l'impératif majeur d'éviter l'introduction de la maladie sur le territoire national.

Dans ce cadre, le LNR a notamment conduit un travail de validation de 3 kits commerciaux permettant la détection du génome viral par PCR en temps réel, avec un appel à manifestation d'intérêt auprès des producteurs de kits paru en avril, pour une publication des méthodes officielles de détection du virus le 28 septembre 2018 et l'organisation, fin novembre 2018, d'un essai interlaboratoires d'aptitude (EILA) à destination du nouveau réseau de laboratoires agréés mis en place en parallèle.

Par ailleurs, compte tenu de la situation à la frontière franco-belge, les suspicions de peste porcine classique (PPC) et de PPA ont fortement augmenté. En l'absence de distinction possible entre les deux maladies aux plans clinique et lésionnel, le diagnostic différentiel ne repose que sur les analyses de laboratoire réalisées en parallèle pour ces deux infections virales. Afin de faciliter ce diagnostic différentiel, le LNR a validé un kit de RT-PCR en temps réel permettant la mise en évidence du génome des virus de la PPA et PPC avec un seul test à partir d'une extraction unique d'acide nucléique.

- *En santé des végétaux*

Suite à une révision majeure, la méthode MA057 « Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR en temps réel dans un groupe d'insectes vecteurs » a fait l'objet d'une consultation en avril 2018, notamment auprès des laboratoires agréés français, avant d'être diffusée en mai 2018 sur le site de l'Agence. La méthode décrit les modalités de détection du nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, dans son insecte vecteur, un coléoptère du genre *Monochamus*. Elle repose sur une détection directe du nématode dans les insectes en réalisant une extraction d'ADN globale puis une analyse utilisant la technique de PCR en temps réel. La modification apportée (évolution de la méthode d'extraction d'ADN par modification du format du kit commercial tout en respectant les protocoles des fournisseurs) permet (1) d'augmenter le nombre maximal d'insectes à analyser et (2) d'améliorer la limite de détection (modification du cycle seuil).

En 2018 deux alertes relatives au nématode du pin ont fait l'objet d'un suivi par la Mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAI. La première a porté sur des écorces de pins et la seconde sur des palettes en bois contaminées par le nématode du pin. Sur ces bases un renforcement de la surveillance est prévu en 2019 avec au cours du premier trimestre, la délégation aux laboratoires agréés des analyses réalisées sur l'insecte vecteur du nématode et l'extension du réseau de laboratoires agréés sur bois.

Par ailleurs, suite à un renforcement en 2018 des plans de contrôle visant les champignons *Stenocarpella macrospora* et *S. maydis* sur semences de maïs importées, le LNR a

développé et validé une nouvelle méthode (MA058) de détection et d'identification par caractérisation morphologique de ces deux parasites, et a transféré cette dernière au réseau de laboratoires agréés en mycologie.

### **Animation de réseaux**

#### **Caractéristiques des réseaux de laboratoires agréés ou reconnus**

La taille des réseaux de laboratoires agréés ou reconnus animés par les LNR de l'Anses est très variable en fonction du pathogène ou du contaminant concerné.

En 2018, on a répertorié 8 réseaux de moins de 5 laboratoires agréés, 15 réseaux de 5 à 9 laboratoires, 5 réseaux de 10 à 19 laboratoires et 19 réseaux de plus de 20 laboratoires.

Le nombre de réseaux de moins de 10 laboratoires a augmenté (18 en 2017) et le nombre de réseaux de plus de 20 laboratoires reste stable. Le plus grand réseau animé par l'Anses réunit 136 laboratoires (nombre stable depuis 2015). Dix-sept LNR n'animent pas de réseau de laboratoires.

A noter en 2018 la mise en place d'un réseau de laboratoires agréés pour la détection de *Bursaphelenchus xylophilus*, nématode du pin dans son insecte vecteur, *Monochamus galloprovincialis*

#### **Essais inter-laboratoires d'aptitude**

Pour s'assurer de la bonne maîtrise des différentes méthodes d'analyse utilisées par les laboratoires agréés, les LNR organisent notamment des EILA. Il s'agit de faire parvenir à tous les laboratoires agréés un panel d'échantillons préparés par le LNR pour analyse, permettant de détecter d'éventuels écarts de résultats entre le LNR et les laboratoires du réseau.

En 2018, 52 EILA ont été organisés par 33 LNR de l'Agence. Le nombre d'EILA reste stable par rapport aux années précédentes (56 EILA ont été organisés en 2017, 59 en 2016 et 55 en 2015). Le nombre de LNR organisateurs d'EILA varie d'une année sur l'autre (36 en 2017, 35 en 2016 et 49 en 2015) en fonction de la maturité des réseaux, des évolutions de méthodes, des crises sanitaires, ce qui explique les variations annuelles constatées à nombre de mandats stable (65 mandats portés en 2015, 2016 et 2017).

Les 52 EILA organisés en 2018 étaient répartis comme suit : 20 en SSA, 22 en SA et 10 en SV. Le nombre d'EILA est en diminution en SA, en légère augmentation en SSA et reste stable en SV où les LNR, en accord avec la tutelle, ont organisé d'autres types d'évaluation de l'aptitude (analyses en doublon par exemple) plus adaptés pour les petits réseaux que des EILA.

Les EILA organisés par nos LNR sont réalisés dans le respect des exigences de la norme NF EN ISO 17043. Le nombre d'EILA réalisés sous accréditation selon cette norme augmente régulièrement : 10 en 2015, 11 en 2016, 12 en 2017 et 13 en 2018.

Les 52 EILA réalisés en 2018, ouverts aussi à des laboratoires non agréés pour un grand nombre d'entre eux, ont concerné de 3 à 117 participants (tous types de laboratoires confondus : agréés, non agréés, français, étrangers), soit un total de 1361 participations. En fonction des EILA, jusqu'à 80 laboratoires agréés ont participé, soit un total de 880 participations de laboratoires agréés (dont 6 dans le cadre d'une demande d'agrément), un même laboratoire agréé pouvant participer jusqu'à une trentaine d'EILA organisés par l'Anses.

Plusieurs faits marquants de l'année sont à noter :

- l'utilisation pour la première année du logiciel de gestion en ligne des EILA « LEILA » interne à l'Agence et commun à l'ensemble de nos LNR et LRUE, destiné à améliorer

l'interface entre les organisateurs et les participants, ainsi qu'à gagner en efficacité dans la gestion et le suivi des EILA, tout en assurant une traçabilité complète des opérations et des échanges,

- la diffusion du guide sur le transfert des méthodes d'analyses et de l'outil associé, internes à l'Agence, après consultation des tutelles et des représentants des associations des laboratoires agréés,
- la révision de la trame des rapports d'activités des LNR suite à sa présentation et discussion à la session du collège de la référence de novembre 2018 dédiée aux LNR de l'Anses.

Ces trois actions ont une même et unique vocation : favoriser l'harmonisation des pratiques au sein de l'Agence.

### **Journées d'échange et de restitution rassemblant les laboratoires agréés ou reconnus du réseau**

Les journées d'échange et de restitution sont des moments de partage privilégiés avec les laboratoires agréés ou reconnus des réseaux, afin notamment de faire le bilan des EILA organisés dans l'année et de présenter les travaux de développement de méthodes en cours.

En 2018, 32 journées ont été organisées par l'Anses. Ce nombre est resté stable par rapport aux années précédentes (26 en 2015, 42 en 2016, 31 en 2017).

### **Formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels**

Douze sessions de formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels ont été organisées en 2018 par les responsables des LNR de l'Anses. Ce nombre de sessions de formation est en baisse régulière (25 en 2017, 26 en 2016, 36 en 2015, 29 en 2014, 46 en 2013, 48 en 2012) et s'explique par le gain en maturité d'un grand nombre des réseaux que l'Anses anime.

### **Réalisation d'analyses officielles**

Les LNR de l'Anses sont amenés à réaliser des analyses de seconde intention, afin notamment de confirmer en tant que de besoin les résultats d'analyse des laboratoires agréés. Ils réalisent également des analyses de première intention dans un certain nombre de cas, notamment lorsqu'il n'existe pas de réseau de laboratoires agréés pour le pathogène ou le contaminant considéré.

### **Relations avec les CNR**

Les journées d'échanges co-organisées en 2016 et 2017 par l'Agence et Santé Publique France, afin de mieux connaître les attentes respectives des LNR et CNR dont les mandats se recoupent et de favoriser la coordination et les collaborations, ont renforcé une dynamique partagée.

En 2018, 10 LNR de l'Agence sur 21 ont rencontré le CNR dont le mandat recouvre au moins en partie le leur. Treize des 21 LNR collaborent avec le CNR dans le cadre de la surveillance et 11 collaborent dans le cadre de projets de recherche.

A noter également que l'Anses et Santé Publique France avaient travaillé en 2017 à la préparation d'une trame commune et simplifiée d'Accord de Transfert de Matériel afin de faciliter au mieux les échanges de matériels biologiques entre LNR et CNR dans le cadre de leurs activités de référence, document qui est en cours de finalisation. En 2018, 11 LNR ont enregistré des échanges dans ce cadre.

## **Conclusion**

Pendant l'année 2018, les LNR de l'Anses ont continué d'assurer leurs missions de référence en développant et validant les méthodes *ad hoc* et en garantissant la qualité des analyses des laboratoires agréés et reconnus, tout en fournissant un appui, parfois dans l'urgence, dans la gestion d'incidents et crises sanitaires qui ont pu survenir dans l'année.

A noter comme fait marquant cette année la mise en place du logiciel « LEILA » qui facilite l'organisation des EILA par les LNR et la participation des laboratoires de leurs réseaux, appréciée par l'ensemble des utilisateurs.