

## **Rapport annuel d'activité, année 2019 Laboratoire National de Référence Autres virus**

**Nom du responsable du LNR**

Françoise POLIAKOFF

**Nom du laboratoire où l'activité du LNR est mise en oeuvre**

Laboratoire de la santé des végétaux

**Nom de l'unité où l'activité du LNR est mise en oeuvre**

LSV – unité de bactériologie, virologie et OGM - Site d'Angers

**Nom du ou des laboratoires ayant collaboré avec le LNR dans le cadre de son mandat sur l'exercice considéré**

sans objet

**Nom des unités ayant collaboré avec le LNR dans le cadre de son mandat sur l'exercice considéré**

sans objet

## **Dangers sanitaires de catégories 1 et 2 couverts par le mandat**

Catégorie 1 : Aucun

Catégorie 2 : American plum line pattern virus (APLPV) ; Arabis mosaic virus (ArMV); Beet curly top virus (BCTV); Beet leaf curl virus (BLCV); Blueberry scorch virus (BISV); Cherry leaf roll virus (CLRV); Cherry rasp leaf virus (CRLV); Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV); Cucumber vein yellowing virus (CVYV); Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV); Little cherry virus (Little cherry pathogen); Peach mosaic virus; Peach rosette mosaic virus; Pepino mosaic virus (PepMV); Raspberry leaf curl virus (RLCV); Strawberry crinkle virus (SCrV); Strawberry latent C virus; Strawberry latent ringspot virus (SLRSV); Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV); Strawberry Vein Banding Virus (SVBV); Tobacco ringspot virus (TRSV); Tomato black ring virus (TBRV); Tomato chlorosis virus (ToCV); Tomato infectious chlorosis virus (TiCV); Tomato mottle virus (ToMoV); Tomato ringspot virus (TomRSV); Tomato spotted wilt virus (TSWV); Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)

### **Les faits marquants de l'année**

En 2019, les activités de diagnostic ainsi que les analyses de 1ère intention liées à des demandes spécifiques sur des pathogènes réglementés ont représenté une grande partie de notre activité en virologie. Ainsi, en diagnostic et analyses de 1ère intention, 95 échantillons ont été analysés représentant 299 analyses différentes faisant appel à plusieurs techniques : indexage biologique sur plantes herbacées, microscopie électronique, tests sérologiques (ELISA) et biologie moléculaire (PCR et RT-PCR). Sur ces 95 échantillons, 46 ont permis d'aboutir à la caractérisation d'un ou plusieurs virus. Ce taux est en constante augmentation (2017 : 22% ; 2018 : 35% ; 2019 : 48%). Il montre la pertinence et l'efficacité des méthodes utilisés pour détecter et caractériser les virus recherchés.

Ces analyses nous ont permis d'identifier 14 virus appartenant à 9 espèces différentes parmi lesquels nous avons identifiés deux potyvirus sur piment et courgette (potato virus Y, Watermelon mosaic virus), un alfamovirus sur lavande (Alfalfa mosaic virus), deux nucleorhabdovirus sur tomate (Eggplant mottle dwarf virus, Physostegia chlorotic mottle virus), un Potexvirus sur tomate (Pepino mosaic virus), un Alphacarmovirus sur pelargonium (Pelargonium flower break virus), deux tobamovirus sur tomate dont une provenait d'Israel (Tomato brown rugose virus, Tomato mosaic virus), un Orthotospovirus sur tomates (Tomato spotted wilt virus), un comovirus sur Melon (Squash mosaic virus) et un Polerovirus récemment décrit sur Persil le Torilis crimson leaf virus.

Réglementairement, au 01er novembre 2019, deux nouvelles décisions d'exécution ont été mises en place au niveau européen. Elles visent à réglementer deux virus émergents ou présentant un risque pour l'UE : le Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) et le Rose rosette virus (RRV).

Dans le domaine de la référence, suite à un problème déjà rencontré par le passé sur la qualité de sérums commerciaux ELISA pour la détection du Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), nous avons reçu un nombre important de confirmations (136 échantillons) et un investissement important en méthodologie suite à des non-conformités observées avec les laboratoires agréés (4 essais commun mis en place, une nouvelle version de la MA056 proposée). Nous avons également participé à 3 analyses de risque phytosanitaire (ARP) sur des sujets d'actualités et en particulier sur le ToBRFV, virus émergent dans le monde et en Europe dont la propagation semble s'étendre très rapidement.

Dans le domaine de la recherche, nous avons été lauréat de deux appels à projet en partenariat avec l'INRA et le CIRAD : le projet ANR " Phytovirus " et le projet Européen EVA-GLOBAL. Le projet " Phytovirus " vise à la compréhension des mécanismes de diffusion des virus entre et à l'intérieur des compartiments cultivés et sauvages. Le projet EVA-GLOBAL a pour objectif la structuration des collections de virus, ce projet international est d'envergure mondiale, dépasse le cadre de la santé végétale et regroupe 38 partenaires.

## **1. Méthodes développées ou révisées**

**Nombre de méthodes développées ou révisées proposées à l'autorité compétente**

0 méthode(s)

**Informations complémentaires**

sans objet

**Nombre total de méthodes transférées par le LNR à son réseau dans l'année**

0 méthode(s)

## **2. Matériels biologiques ou chimiques, échantillons et souches d'intérêt**

Information disponible auprès du LNR.

## **3. Activités d'analyse**

### **3.1 Analyses officielles de première intention**

**Nombre d'analyses officielles de première intention réalisées dans l'année (de biotypage, sérotypage, caractérisation moléculaire...)**

299 analyse(s)

**Détail par type d'analyse de première intention**

Nombre d'analyses de première intention : 299

Les principales analyses de première intention concernent :

- le diagnostic de virus pathogènes sur tout végétal avec 219 analyses.
- la détection du TICV / ToCV par RT PCR (méthode interne) et du CVYV et du CYSDV par RT PCR (méthode interne) avec 59 analyses.

Pour les virus détectés au laboratoire, on observe pour 2019 une poursuite de la baisse globale des analyses de 1ère intention et en particulier des analyses non déléguées mais aussi pour la première fois des analyses de diagnostic.

### **3.2 Analyses officielles de confirmation**

**Nombre d'analyses officielles de seconde intention réalisées dans l'année (de biotypage, sérotypage, caractérisation moléculaire...)**

136 analyse(s)

**Détail par type d'analyse de confirmation**

136 analyses de confirmation ont été réalisées en 2019. Sur ces 136 demandes, 26 analyses ont été confirmées positives. Comme en 2018, les principales analyses de seconde intention concernent la détection du BNYVV (agent de la rhizomanie) sur betterave-épinard par ELISA (MOA 056). Cette méthode présente des défauts de spécificité liée à la qualité

des sérums commerciaux mis sur le marché et entraînant plusieurs faux positifs devant être confirmés par PCR temps réel au LNR.

Pour les analyses de confirmation, on observe un retour aux valeurs de 2017 du nombre d'analyses BNYVV (57 en 2015, 88 en 2016, 181 en 2017, 524 en 2018, 136 en 2019).

Aucune analyse de confirmation n'a été réalisée pour le PepMV (2 en 2015, 4 en 2016, 0 depuis 2017) ou pour tout autre virus.

### **3.3 Autres analyses**

#### **Nombre estimé d'autres analyses (non officielles) réalisées dans l'année en lien avec le mandat de LNR**

2000 analyse(s)

#### **Détail par type d'autres analyses**

Pour l'année 2019, près de 2000 analyses ont été réalisées à des fins d'études de méthodologie. Plusieurs projets ont mobilisé les agents : la finalisation du projet Virvalid traitant de la comparaison des méthodes conventionnelles de détection des virus avec la méthode HTS (High throughput sequencing), un projet engagé dans le cadre d'un stage de Master 2 sur la détection des virus par méthode HTS utilisant le séquenceur MinION et enfin la préparation d'un EILV pour la détection des Begomovirus. Ces analyses visent au développement, à la validation ou à l'amélioration de techniques d'analyses. En l'absence d'outils de comptabilité analytique ce chiffre est une estimation basée sur les fiches d'enregistrement des manipulations réalisées.

### **3.4 Essais interlaboratoires d'aptitude auxquels le LNR a participé dans l'année**

#### **Détail des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) auxquels le LNR a participé dans l'année, dans le cadre : National; UE (en particulier les EILA organisés par le LRUE); International**

National : 1

Essai d'aptitude à la détection du BNYVV sur plantes hôtes par test sérologique ELISA selon la MA056 version 2

UE (en particulier les EILA organisés par le LRUE) : 0

International : 0

## **4. Activités de production et de contrôle de matériaux de référence et de réactifs biologiques**

**Le LNR produit des réactifs à usage du LNR uniquement**

Non

**Le LNR produit des réactifs à usage du LNR et du réseau**

Non

**Le LNR produit des matériaux de référence à usage du LNR uniquement**

Non

**Le LNR produit des matériaux de référence à usage du LNR et du réseau**

Non

**Le LNR réalise des contrôles de réactifs commerciaux**

Non

## **5. Activités d'appui scientifique et technique**

### **5.1 Demandes d'appui scientifique et technique (AST) des ministères (de l'agriculture, de la santé, etc...) ou d'instances européennes ou internationales qui concernent le domaine de compétence du LNR**

**Nombre de demandes d'AST reçues dans l'année**

0 demande(s)

**Nombre de rapports d'AST rendus dans l'année, issus de demandes de l'année ou de l'année précédente**

0 rapport(s)

### **5.2 Autres expertises**

**Les membres de l'équipe du LNR peuvent avoir des activités d'expertise (internes: CES, GT ou externe: EFSA...) ou des activités auprès de commissions de normalisation (Afnor...).**

Le laboratoire a réalisé un audit relatif aux exigences (directive 2008/61 CE) pour le respect du confinement d'installations de quarantaine (audit initial, renouvellement ou d'extension): analyses et audit des documents fournis et évaluation du risque. Audit des installations du demandeur sur site, rédaction du rapport d'audit, suivi des fiches d'écart émises lors de l'audit. Temps de travail effectif : 4 jours pour 1 entreprise.

Le laboratoire a participé au groupe d'expert OEPP pour la rédaction de l'analyse de risque phytosanitaire " Tomato brown rugose fruit virus (Tobamovirus - ToBRFV) " (12J), ainsi qu'au groupe d'experts ANSES pour la rédaction de l'analyse de risque phytosanitaire pour ce même virus (Ref : 2019-SA-0080) (12J),

Le laboratoire est engagé dans le groupe d'expert ANSES pour la rédaction de l'avis répondant à la saisine concernant " l'efficacité des méthodes visant à la destruction de végétaux contaminés par le virus de la sharka en verger de Prunus " (Ref : 2019-SA-0048) (5J), il est consulté comme expert auprès du comité technique de certification piloté par le Ctifl (4J),

Le laboratoire a été sollicité pour la revue d'un article scientifique pour la revue Phytopathologie Mediterranea (2j), il a participé au jury de la thèse soutenue par M Thibaut OLIVIER " Pospiviroids: From Detection to Molecular Pathogenesis " (Université de Louvain la Neuve (B) (5j) ainsi qu'au jury de la thèse soutenue par Mme Emeline RICCIUTI " Caractérisation des mécanismes de défense contre les intégrations virales de Banana streak virus et les infections qui en dérivent chez les bananiers hybrides natifs interspécifiques " (Montpellier SupAgro) (5j),

### **5.3 Dossiers de demande d'agrément**

**Nombre de dossiers de demande d'agrément étudiés dans l'année**

0 dossier(s)

### **5.4 Activités d'appui ou de conseil aux autorités ou aux professionnels**

Le LNR a été sollicité pour apporter un appui aux professionnels : en répondant à façon à des demandes d'analyse de diagnostic pour 10 professionnels engagés dans l'autocontrôle de leur matériel ou désirant faire établir un certificat phytosanitaire pour l'exportation.

## **6. Animation du réseau de laboratoires agréés ou reconnus**

### **6.1 Description du réseau**

#### **Animation d'un réseau de laboratoires agréés**

Oui

#### **Nombre de laboratoires agréés dans le réseau**

12 laboratoires

#### **Animation d'un réseau de laboratoires reconnus**

Non

### **6.2 Essais interlaboratoires d'aptitude**

#### **6.2.1 Organisation d'essais interlaboratoires d'aptitude**

##### **Nombre d'EILA organisés par le LNR au cours de l'année**

1 EILA

##### **Nom de l'EILA**

Essai d'aptitude à la détection du BNYVV (Beet necrotic yellow vein virus) sur plante hôte par test sérologique ELISA selon la méthode ANSES/LSV MA056 version 2.

##### **L'EILA est-il réalisé sous accréditation "17043"?**

Non

##### **Nombre de laboratoires participants**

4 laboratoire(s)

##### **Nombre de laboratoires agréés participants**

3 laboratoire(s) agréé(s)

##### **Le LNR a-t-il participé à l'EILA?**

Oui

##### **Nombre de laboratoires participants en cours de demande d'agrément**

0 laboratoire(s) en demande d'agrément

##### **Nombre d'autres laboratoires participants**

0 laboratoire(s)

##### **Nombre de laboratoires dont la performance individuelle a été jugée non satisfaisante\*\* par le LNR**

2 laboratoire(s)

##### **Nombre de laboratoires agréés dont la performance individuelle a été jugée non satisfaisante\*\* par le LNR**

2 laboratoire(s) agréé(s)

##### **Nature des écarts (limiter aux laboratoires agréés)**

les résultats ont été jugés non conformes pour la sensibilité, l'exactitude et la répétabilité.

(\*\*) au sens de la norme 17043

### **Gestion des écarts (limiter aux laboratoires agréés) : actions mises en œuvre pour l'identification des causes et définition des mesures correctives**

Les actions mises en œuvre pour l'identification des causes et la définition des mesures correctives ont été les suivantes: formation des laboratoires agréés, organisation de deux nouveaux essais inter-laboratoires. Au final, la conformité des laboratoires agréés pour la poursuite de la campagne a été obtenue.

### **Suivi de décisions sur l'agrément**

Les analyses ont été suspendues pendant la période de vérification de mise en œuvre des actions correctives.

### **Evolution du réseau dans le temps**

Une modification de la méthode d'analyse avec abandon de l'ELISA (MA056) au profit de la RT-PCR temps réel avec nouvel appel à candidature est envisagée pour 2020

### **6.2.2 Exploitation de résultats d'essais interlaboratoires d'aptitude organisé par un tiers**

**Le LNR exploite les résultats d'EILA organisé(s) par un (des) tiers (LRUE, autre...)**

Non

### **6.3 Autres actions visant à vérifier l'aptitude des laboratoires**

#### **Actions mises en œuvre**

Essai en doublon sur analyses de terre dans le cadre de la détection du BNYVV sur sol. Le but de cet essai était de comparer les résultats obtenus par test biologique et sérologique au LSV avec ceux obtenus par le laboratoire Eurofins afin d'identifier et d'évaluer les discordances observées. Nous avons également analysé par qRT-PCR les broyats obtenus indépendamment par les deux laboratoires dans les conditions habituelles de confirmation après un test biologique et sérologique.

### **6.4 Formation, organisation d'ateliers**

**Nombre de journées d'échange et de restitution rassemblant les laboratoires agréés du réseau, organisées dans l'année**

1 journée(s)

**Détail de ces activités et nombre de participants par journée**

journée d'échange LNR/laboratoires agréés (46 participants)

**Nombre de sessions de formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels, organisées dans l'année**

1 session(s) de formation

**Détail de ces activités, durée moyenne des sessions et nombre de participants par session**

Détection du BNYVV par test sérologique ELISA selon la MA056 version 2 (3 participants -2 jours)

**Autres formations dans le cadre des activités du LNR**

Le laboratoire a dispensé une formation à la reconnaissance des symptômes associés à des virus réglementés sur plantes ligneuses pour la DGAL-INFOMA (1 jour).

## 6.5 Organisation d'autres essais interlaboratoires (EIL)

Nombre d'EIL de validation (EILV) organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILV

Nombre d'EIL de transfert (EILT) organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILT

## 7. Surveillance, alertes

### 7.1 Surveillance programmée par l'autorité sanitaire, notamment PS/PC et prophylaxie officielle en santé animale

L'autorité sanitaire a mis en œuvre dans l'année une surveillance programmée dans le champ du LNR

Oui

### 7.2 Autres activités de surveillance

Le LNR est impliqué dans des activités de surveillance autres que celle programmée par l'autorité sanitaire

Non

### 7.3 Fiches d'alerte ou de signal

Le LNR a émis dans l'année des fiches d'alerte ou de signal dans Salsa (système d'alerte sanitaire de l'Anses)

Oui

Nombre de fiches émises dans Salsa dans l'année:

1 fiche(s)

## 8. Activités de recherche en lien avec l'activité de référence

Acronyme	Titre	Statut
COST NGS	Application of next generation sequencing for the study and diagnosis of plant viral diseases in agriculture (DIVAS)	terminé
Euphresco 2018-A-289	Bioinformatics network	en cours
PHYTOVIRUS (ANR)	Measuring and mapping the plant virus richness at the ecosystem scale	en cours
EVAGLOBAL (H2020)	European virus archive goes global	en cours

## 9. Relations avec le CNR

Existence d'un CNR dont le mandat recouvre au moins en partie celui du LNR

Non

## 10. Relations avec le LRUE

Détention d'un mandat LRUE qui recouvre au moins en partie celui du LNR

Non



**Existence d'un LRUE dont le mandat recouvre au moins en partie celui du LNR**  
Oui

**Intitulé du LRUE**  
Pests on plants - on Viruses, Viroids and Phytoplasmas

**Le LNR a participé au Workshop organisé par le LRUE**  
Oui

**Le LNR a participé à une formation organisée par le LRUE**  
Pas de formation proposée

**Relations avec le LRUE**

**Questions posées par le LNR**

Souhait de voir intégré dans le programme de travail du LRUE le développement d'un protocole harmonisé pour la détection du ToBRFV.

**Points particuliers ou d'actualité sur l'année, à signaler**  
sans objet

**11. Détention d'autres mandats de référence au niveau international**

**Autres mandats détenus par le LNR dans le même domaine de compétences**

Aucun

## Annexes

- Communications nationales

Gentit, P., A. Marais, Y. Brans, J. P. Renvoisé, B. Remenant, A. Saison, C. Faure, M. Lefebvre, J. Castaing, F. Chambon, C. Calado, V. Theailler, F. Latour, N. Grasseau, and T. Candresse. 2019. "Comparaison directe de la performance des techniques classiques avec Séquençage à haut débit (HTS) pour la détection des virus des arbres fruitiers." Poster *17èmes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois (FR)*..

Remenant, B., J. Mille, and P. Gentit. 2019. "Molecular characterization of a new world bipartite Begomovirus infecting green beans in French Caribbean Island." Poster *17èmes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France, January 27th-31th*.

Svanella-Dumas, L., Y. Ma, A. Marais, S. Theil, C. Faure, V. Golyaev, B. Batailler, J. Gaudin, A. Saison, M. Pooggin, and T. Candresse. 2019. "Viruses too divergent for detection by Blast searches: a novel higher order viral taxon in viral metagenomes from the Kerguelen islands and southwest France." Oral *17èmes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois (FR)*.

Visage, M., P. Nouailles, and P. Gentit. 2019. "Comparison and validation of a Tosspovirus detection method." Poster *17èmes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois (FR)*.