Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
Bureau des semences et de la santé des végétaux

Adresse : 251 rue de Vaugirard - 75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Olivier Dufour
Tél : 01.49.55.81.64
Courriel institutionnel : bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr
Réf. Interne : BSSV/2010-10-041
MOD10.21 C 12/05/10

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8287

Date: 26/10/2010

Date de mise en application :	immédiate
Abroge et remplace :	Sans objet
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse :	Sans objet
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	aucune

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA GLO 001 version 1a relative au Glossaire général et technique en vigueur au LNPV

Références : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA GLO 001 version 1a relative au Glossaire général et technique en vigueur au LNPV

Mots-clés : Méthode officielle d'analyse – MOA - analyses - glossaire - critères de performance - validation - normes ISO17025

Destinataires

Pour information :
- DRAAF-SRAL
- DAF-SPV
- LNPV
- Laboratoires agréés

Les différents référentiels réglementaires ou normatifs internationaux, européens et nationaux, et notamment la norme ISO 17025, introduisent la nécessité, pour les laboratoires, avant recours à une méthode, de la valider.

Le processus de validation nécessite de procéder en premier lieu à une évaluation de la méthode, c'est à dire la détermination de certains critères de performance, pour ensuite procéder à la confrontation de ces critères de performance à ceux attendus pour l'usage considéré.

Les méthodes officielles d'analyses (MOA) du ministère chargé de l'agriculture publiées depuis 2010 précisent dans leur préambule les obligations des laboratoires qui veulent procéder à des modifications sur les méthodes.

La bonne application de ces dispositions nécessite le recours à un vocabulaire et une méthodologie communs pour l'établissement des critères de performance.
La présente note vise à satisfaire la première condition. Elle a pour objet la publication du glossaire général et technique des termes en vigueur au LNPV pour les domaines dans lesquels il est laboratoire national de référence.

Les modalités de détermination des critères de performance sont définies par les laboratoires nationaux de référence. Certaines ont fait l'objet d'une publication, en particulier celles liées aux modalités de validation des réactifs (*antisera*) pour les analyses sérologiques par ELISA et IF (voir MOA 008 et MOA 010).

Les modalités de mise à disposition des laboratoires des critères de performance cibles sont quant à elles à l'étude.

Vous trouverez ce glossaire sous la référence : MOA GLO 001 en annexe de cette note de service d'information.

L' Ingénieur en Chef des ponts, des eaux et des forêts
Sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux

Robert TESSIER

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

GLOSSAIRE GENERAL ET TECHNIQUE EN VIGUEUR AU LNPV

Réf. : MOA GLO 001 version 1a



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

n° méthode	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MOA GLO 001 version 1a	Avril 2010	Septembre 2010	Octobre 2010	

SOMMAIRE

PREAMBULE **4**

Objet des méthodes officielles 4

Glossaire, abréviations et documents connexes 4

Revue des méthodes officielles, amendement et modification 4

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS **5**

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE **6**

Modifications 6

Améliorations 6

DESCRIPTION DE LA METHODE **7**

1. Objet. 7

2. Domaine d'application. 7

3. Présentation schématique de la détection 7

3.1. Définitions générales 8

3.2. Définitions liées aux techniques et méthodes et aux contrôles et témoins 10

3.3. Définitions liées à l'évaluation et la validation des méthodes 14

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE **17**

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE **18**

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.
Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.
Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».
Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

Les définitions reprises dans le présent glossaire sont issues selon les cas des normes internationales ou nationales, de guides internationaux ou nationaux, de publications reconnues ou d'autres sources. Elles intègrent également les habitudes de langage des laboratoires du domaine phytosanitaire français.

Elles ont été compilées par le LNPV, pôle « Développement de méthodes et analyses».

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet.

L'objet du présent document est de préciser les définitions correspondant aux principaux termes généraux et techniques utilisés dans les méthodes officielles. Il a été élaboré sur la base des référentiels normatifs internationaux et nationaux et reprend des définitions qui pré-existaient dans les anciennes méthodes officielles, notamment les directives générales. En aucun cas le présent document ne saurait être considéré comme exhaustif. Il fera l'objet de compléments autant que de besoin.

2. Domaine d'application.

Le présent glossaire s'applique communément à toutes les méthodes d'analyse officielles réalisées dans le domaine de la protection des végétaux pour le compte du Ministère chargé de l'agriculture. Ces dernières renvoient systématiquement au présent glossaire.

3. Présentation schématique

Le présent glossaire donne la définition des termes retenus par le Ministère chargé de l'agriculture dans ses méthodes officielles. Lorsque les termes définis sont des critères relatifs à la performance des méthodes, réactifs, etc…, le mode d'obtention du résultat est spécifié.

Les définitions données dans le présent glossaire sont réparties en trois rubriques : la première donne des définitions générales (point 3.1), la seconde regroupe des définitions liées aux techniques et méthodes de détection des organismes nuisibles (point 3.2) et la dernière donne des définitions liées à l'évaluation et la validation des méthodes, notamment en ce qui concerne les différents critères de performance (point 3.3).

3.1. Définitions générales

Analyse
Ensemble des opérations (méthodes) aboutissant à un résultat. Mise en œuvre d'une méthode.

Analyte
composant mesuré à l'aide de la méthode d'analyse. Il peut s'agir de microorganismes

Confirmation
Mise en œuvre d'une deuxième méthode, faisant appel, dans toute la mesure du possible, à une ou des techniques différentes de la ou des première(s) mise(s) en œuvre pour la détection ou l'identification d'un organisme nuisible, en vue de la vérification de la validité du premier résultat obtenu.

Détection (analyse de) [9]
Recherche de la présence de microorganismes ou ravageurs dans un échantillon biologique à un niveau taxonomique fixé [dans la limite de la technique utilisée].

Détermination
Voir identification

Échantillon (échantillon pour laboratoire) (échantillon de terrain) [adapté de 9]
Échantillon dans l'état de préparation où il est envoyé au laboratoire et destiné à être utilisé pour des analyses.

Échantillon de référence
Echantillon de statut connu servant de référence pour l'interprétation et la validation des résultats d'essai ou d'analyses.

Échantillon de terrain
Voir échantillon, échantillon pour laboratoire

Échantillon de travail
Voir échantillon pour analyse

Echantillon pour analyse (ou de travail)
Ensemble des fragments de matrice prélevés d'un même échantillon utilisé pour réaliser l'analyse.
Egalement appelé « prise à analyser », « prise d'essai » ou « prise d'analyse ».
N.B. : La norme XP V03 043 donne une définition proche de « échantillon pour essai »

Echantillonnage [5]
Prélèvement d'un échantillon de l'objet de l'évaluation de la conformité, selon une procédure

EMT (ou limite d'erreur) [3]
Erreur Maximale Tolérée

Extrait
Suspension ou solution liquide obtenue après traitement (broyage, macération,…) de la prise d'analyse dans un tampon d'extraction ou une solution.

Identification (ou détermination) [9]
Détermination du niveau taxonomique correspondant le mieux à la demande (famille, genre, espèce, pathovar,…) d'un organisme nuisible détecté à l'issue d'une première recherche ou méthode.

Isolat
Organisme isolé en culture pure (synonyme de souche). Par extension, peut aussi désigner un échantillon naturel de statut positif certain ou présumé sans que l'organisme nuisible concerné n'ait été typé ou caractérisé précisément. L'échantillon est alors défini par sa matrice, sa provenance (origine géographique) et sa période de collecte (année, mois,…)

Laboratoire agréé
Laboratoire disposant d'un agrément délivré par le Ministère chargé de l'agriculture (DGAL) pour la réalisation d'analyses officielles
N.B. : Voir art. R. 202-17 du Code rural*

Laboratoire National de Référence (LNR)
Laboratoire satisfaisant aux exigences de la section 2 du chapitre I du titre préliminaire du livre II du Code rural et désigné comme tel par arrêté du ministère chargé de l'agriculture.
N.B. : Voir art. R. 202-2 et suivants du Code rural*

Macérat
Produit issu d'une macération (d'un échantillon).
On distingue les macérations à froid (+4°C) de celles effectuées à température ambiante

Matrice [9]
Produits soumis à analyse et pouvant présenter des différences de composition chimique et d'état physique

Méthode (ou protocole)
Ensemble ordonné de manière logique de principes, de règles, d'étapes permettant de parvenir à un résultat . Ensemble des étapes successives mises en œuvre pour la détection ou l'identification d'un organisme nuisible. Une méthode peut faire appel à plusieurs techniques successivement ou engagées en parallèle.

Méthode d'analyse [8]
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 [8]
Méthode d'analyse utilisée par le laboratoire à la place d'une méthode d'analyse de référence

Méthode d'analyse de référence [8]
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.
N.B. : Voir art. R. 202-17 du Code rural*

Mise au point
Développement d'une méthode de détection ou d'identification qui n'existait pas avant le début des travaux.

Mode opératoire
Document décrivant les modalités précises de mise en œuvre d'une méthode au sein du laboratoire avec les ressources (personnel, équipements, consommables,…) concernés

Optimisation
Amélioration de la performance d'une méthode existante au regard d'un ou plusieurs critère(s). Le ou les critère(s) de performance à améliorer doi(ven)t être défini(s) au préalable.

Prélèvement
Voir échantillon, échantillon pour laboratoire, échantillon de terrain

Prise d'essai (ou prise d'analyse) [9]
Fraction de l'échantillon pour essai soumis à analyse. Dans certains cas (produits liquides, analyses sur symptômes, etc.) l'échantillon pour laboratoire correspond à l'échantillon pour essai.

Prise d'analyse
Voir prise d'essai

Prise d'analyse de référence
Prise d'analyse dont l'état sanitaire est connu, (témoin positif / témoin négatif) introduite volontairement dans l'essai pour permettre la validation et l'interprétation des résultats.

Protocole
Voir méthode

Schéma de détection
Récapitulatif, la plupart du temps présenté sous forme de logigramme, des différentes techniques à mettre en œuvre en fonction des résultats obtenus à chaque étape en vue de la détection ou l'identification d'un organisme nuisible (ex : détection d'un organisme nuisible x par ELISA confirmée par PCR).

Série d'analyses
Echantillons traités en même temps, avec les mêmes réactifs et dans les mêmes conditions

Technique
Ensemble des procédés et des méthodes d'un art, d'un métier, d'une industrie. Concrètement, le terme « technique » renvoie aux analyses utilisant un même principe biologique, par exemple sérologique, moléculaire, l'isolement sur milieu,… Des regroupements de techniques peuvent être faits par type : les techniques sérologiques, qui font appel aux réactions antigène – anticorps (ELISA, IF, séroagglutination, immunodiffusion en gélose, test de l'anneau,…), les techniques moléculaires (PCR, hybridation,…)

3.2. Définitions liées aux techniques et méthodes et aux contrôles et témoins

ADN de qualité PCR [9]
Matrice d'ADN de longueur, en quantité et pureté suffisantes pour la PCR.

ARN de qualité PCR [9]
Matrice d'ARN de longueur, en quantité et pureté suffisantes pour la transcription inverse en ADN de qualité PCR.

ADN polymérase ADN (ou ARN) dépendante pour PCR
Enzyme synthétisant le brin complémentaire d'une matrice d'ADN (ou ARN) monocaténaire par polymérisation de dNTPs à partir de l'extrémité 3'-OH libre d'une amorce.

Amorce (= « primer »)
Oligonucléotide de longueur et de séquence définies, complémentaire d'un segment d'une séquence d'ADN (ou d'ARN) pertinente pour l'analyse. Appariée à un acide nucléique simple brin, elle permet l'initiation de la synthèse d'une chaîne désoxyribonucléique par l'ADN polymérase.
Remarque : Une amorce délimite l'une des extrémités de la séquence d'ADN cible. Existe aussi pour les ARN (pour la transcription inverse)

Amplicon (amplifiat)
Fragment(s) d'ADN amplifié(s) au cours d'une analyse PCR délimité par les zones d'appariement des amorces

Anticorps (Ac)
Protéine (immunoglobuline, Ig) synthétisée par les cellules du système immunitaire des mammifères et capable de se fixer spécifiquement sur un ou plusieurs épitopes de l'antigène. NB : Il existe plusieurs types d'immunoglobulines : IgG, IgA, IgM,…

Anticorps conjugué
Anticorps couplé à une enzyme, un marqueur fluorescent, un marqueur radioactif.

Anticorps de révélation
Voir conjugué et anticorps conjugué

Anticorps monoclonaux
Anticorps dirigés vers un seul épitope

Anticorps polyclonaux
Anticorps dirigés vers plusieurs épitopes (sites antigéniques)

Antigène
Macromolécule naturelle reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immune. Les antigènes sont généralement des protéines, des polysaccharides et leurs dérivés lipidiques.Un antigène peut porter un ou plusieurs épitopes.

Blanc [8]
Essai réalisé en l'absence de matrice ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte.En ELISA, permet de faire le « zéro » optique du spectrophotomètre. Voir référence de lecture de l'absorbance

Broyat
Produit résultant du broyage (d'un échantillon).

Capside virale (= capside protéique)
Ensemble des protéines entourant l'acide nucléique d'un virus.

Coating
Action de "sensibilisation" de la plaque (les immunoglobulines se fixent sur la plaque de microtitration) (« adsorption »).

Confirmation de l'identité du produit PCR [9]
Procédé apportant la preuve que le produit PCR est issu de la séquence cible.

Conjugué
Composé couplé à un marqueur (enzymatique, fluorescent ou radioactif) ; si le composé est un anticorps, on parle d'anticorps conjugués
Remarque : Pour les techniques immuno-enzymatiques (ELISA notamment), le marqueur enzymatique est le plus souvent la phosphatase alcaline ou la péroxydase. Pour les techniques d'immuno-fluorescence, les immunoglobulines sont le plus souvent conjuguées avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

Contrôle d'inhibition
Voir témoin d'inhibition

Contrôle de spécificité
Voir témoin de spécificité

Contrôle négatif
Voir témoin négatif

Contrôle négatif de PCR
Voir témoin négatif de PCR

Contrôle négatif de processus
Voir témoin négatif de processus

Contrôle positif
Voir témoin positif

Contrôle positif d'extraction
Voir témoin positif d'extraction

Contrôle positif de PCR
Voir témoin positif de PCR

Contrôle positif de PCR en limite de détection (= « T_LOD »)
Voir témoin positif en limite de détection

Contrôle positif de processus
Voir témoin positif de processus

Dénaturation d'ADN [9]
Processus qui a pour résultat la fusion (séparation) de l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire.

Désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP)
Définition « commerciale » : Solution composée de dATP, dCTP, dGTP, dTTP et/ou dUTP.

Détection du produit PCR
Procédé permettant de reconnaître la présence d'un produit PCR.

Dilution d'emploi
Le titre est défini comme la plus grande dilution du réactif donnant une réaction positive intense optimale avec une suspension bactérienne contenant une quantité connue d'antigènes (par exemple, environ 10^5 à 10^6 cellules/ml) d'une souche homologue à celle recherchée et, en utilisant le conjugué FITC à un titre donné.

Eau de qualité analytique [9]
Eau de qualité compatible avec les méthodes utilisées.
Remarque : En PCR par exemple l'eau doit être dépourvue d'activité nucléasique, d'effet inhibiteur et d'acides nucléiques détectables.

Épitope
Partie d'un antigène reconnue par un anticorps.

Extension de l'amorce
Réaction enzymatique conduisant à la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par addition de désoxyribonucléotides à l'extrémité 3' de la séquence d'amorce.

Extraction de l'acide nucléique [9]
Préparation d'un échantillon pour la libération des acides nucléiques.

Extrait
Un extrait est un produit solide ou liquide résultant d'étapes de concentration / isolement de pathogènes/parasites à partir du prélèvement initial. Il peut s'agir par exemple d'une suspension liquide obtenue après broyage ou macération de la prise d'analyse dans un tampon d'extraction ou une solution saline.

Hybridation
Liaison de séquences complémentaires d'acides nucléiques dans les conditions de réaction appropriées.

Ig, IgG, Ac ou Anticorps de capture
Anticorps mono ou polyclonal intervenant dans la reconnaissance de l'épitope dans une réaction sérologique

Immunofluorescence Indirecte (IF)
Technique sérologique basée sur la réaction antigène-anticorps. Le complexe antigène bactérien - anticorps spécifique est révélé grâce à un second anticorps spécifique du premier et couplé à un fluorochrome. Les bactéries recherchées apparaissent fluorescentes sous le microscope à épifluorescence.

Inhibiteur de ribonucléase [9]
Substance qui bloque totalement ou partiellement l'activité de la ribonucléase.

Macérat
Produit issu d'une macération (d'un échantillon).On distingue les macérations à froid (+4°C) de celles effectuées à température ambiante

Matrice [9]
Produits soumis à analyse et pouvant présenter des différences de composition chimique et d'état physique

Mélange maître ou master mix [9]
Mélange des réactifs nécessaires à une PCR, à l'exception de la matrice d'ADN cible et des contrôles.

PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) [9]
Méthode enzymatique permettant l'amplification in vitro de l'ADN.

PCR «hot start» [9]
Activation d'une ADN polymérase thermostable par une étape initiale de chauffage pour éviter une amplification non spécifique.

PCR en point final [9]
Méthode PCR permettant de détecter les amplifiats à la fin de la réaction de PCR (en général par électrophorèse).

PCR en temps réel [9]
Méthode PCR permettant de détecter en temps réel les amplifiats durant la réaction de PCR, par exemple par hybridation avec des sondes fluorescentes.

PCR multiplex [9]
PCR qui utilise des paires d'amorces multiples (ex : duplex pour deux paires d'amorces.

Primer [9]
Voir « amorce »

Produit PCR (amplifiat) [9]
ADN amplifié par PCR

Purification des acides nucléiques
Méthode permettant d'obtenir des acides nucléiques purifiés.

Réactifs sérologiques
Ils sont composés des immunoglobulines seules ou du couple « immunoglobulines - immunoglobulines couplées ». Ils permettent la reconnaissance spécifique d'un agent pathogène (ou parfois de plusieurs, cas des réactifs combinés virus A + virus B, ou spécifiques d'une famille virale).

Référence de lecture de l'absorbance
Permet de faire le « blanc » ou zéro optique sur le photomètre du lecteur de plaque de microtitration. Voir également « blanc ».

Ribonucléase [9]
Enzyme qui dégrade l'ARN.

Séquence cible [9]
Séquence d'ADN qui est utilisée en tout ou partie pour la détection et/ou l'identification par PCR.

Sérum (ou antisérum)
Liquide correspondant au plasma, extrait du sang d'un animal et contenant les anticorps spécifiques obtenus après réaction immunologique suite à l'introduction d'antigènes dans le corps.Voir aussi réactifs sérologiques

Sonde d'ADN [9]
Oligonucléotide marqué de séquence définie, utilisée pour détecter une séquence d'ADN cible par hybridation.

Tampon de broyage
Solution utilisée pour l'obtention d'un broyat

Témoin d'inhibition [9]
Contrôle qui permet au laboratoire de s'assurer que les résultats n'ont pas été affectés par une inhibition significative de la réaction de PCR. Il permet d'interpréter un résultat négatif sans ambiguïté (repérer les faux négatifs obtenus en présence significative d'effet inhibiteur de PCR). Plusieurs types de contrôles d'inhibition peuvent être utilisés par le laboratoire : Les Témoins internes d'amplification et les Contrôles positifs d'extraction

Témoin de spécificité [9]
Matrice d'ADN de séquence proche de la cible ne permettant pas d'amplification PCR (ex : organisme phylogénétiquement proche).

Témoin eau
Voir Référence de lecture de l'absorbance, témoin négatif,…

Témoin interne d'amplification (TIA) [9]
Le produit d'amplification qui sert de contrôle interne est obtenu au cours de la réaction d'amplification du fragment cible par ajout d'ADN et/ou amorces. Ce produit d'amplification est distinct de la séquence cible. Ce témoin correspond à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré un fragment d'ADN hétérologue sur lequel on a artificiellement greffé la zone cible des amorces du test PCR considéré.
NB : Ce fragment est de taille significativement différente de la taille de la cible chez l'organisme recherché. Il permet de mettre en évidence les échantillons qui ne seraient pas exploitables par PCR, à cause de la présence d'inhibiteurs dans l'extrait (= «faux négatifs »). Le TIA sera amplifié même pour le contrôle négatif car il est ajouté directement dans le mélange réactionnel.

Témoin malade TM
Voir témoin positif

Témoin négatif
Référence non infectée ou non contaminée par la cible recherchée.

Témoin négatif de PCR [9]
Réaction de PCR réalisée avec de l'eau exempte d'ADN amplifiable et sans effet inhibiteur de PCR.

Témoin négatif de processus [9]
Contrôle soumis à toutes les étapes en partant de l'extraction, en substituant par exemple de l'eau ou de la matrice non contaminée à la prise d'essai.

Témoin positif
Référence infectée ou contaminée par la cible recherchée.

Témoin positif d'extraction pour PCR[9]
Réalisation d'un test PCR endogène supplémentaire sur un ou plusieurs échantillons de la série analysée, utilisant un couple d'amorces universel permettant d'amplifier de manière aspécifique par exemple l'ADN de champignon ou l'ADN de plante, dans le cas ou les échantillons concernés consistent en des prélèvements de tissu végétal. Ce contrôle positif externe permet de montrer que l'ADN contenu dans le (les) échantillons analysés a été correctement extrait.Il est possible de réaliser ce contrôle positif d'extraction en interne par le biais d'une PCR duplex en testant dans le même master mix l'ADN d'un échantillon

donné avec le couple d'amorce spécifiques de la cible et le couple d'amorce universel ou endogène.

Témoin positif de PCR [9]
Réaction de PCR contenant la séquence d'ADN cible en quantité ou en nombre de copies détectable. Il peut être constitué d'une solution d'un clone bactérien dont les plasmides contiennent la séquence cible du test PCR ou un extrait d'ADN génomique et/ou mitochondrial obtenu à partir d'une culture pure du parasite recherché.

Témoin positif de PCR en limite de détection (= « T_LOD ») [9]
Réaction de PCR contenant la séquence d'ADN cible en quantité ou en nombre de copies proche du correspondant au seuil de détection PCR déterminé par le dossier de validation du test. Il peut être constitué d'une solution d'un clone bactérien dont les plasmides contiennent la séquence cible du test PCR ou un extrait d'ADN génomique et/ou mitochondrial obtenu à partir d'une culture pure du parasite recherché (
Ce contrôle permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon optimale (critère de performance).

Témoin positif de processus [9]
Contrôle soumis à toutes les étapes en partant de l'extraction, en substituant à la prise d'essai de l'eau ou de la matrice artificiellement dopée par l'ajout d'une quantité suffisante pour être détectée de séquence cible

Témoin sain (TS)
Voir témoin négatif

Témoin substrat
Voir Référence de lecture de l'absorbance

Thermocycleur [9]
Appareil automatique qui réalise les cycles de chauffage et de refroidissement nécessaires à la PCR

Tp
Tampon

3.3. Définitions liées à l'évaluation et la validation des méthodes

Accord négatif (NA) [4]
La méthode alternative présente un accord négatif si elle donne un résultat négatif lorsque la méthode de référence donne un résultat négatif.
Un accord négatif devient un vrai négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est négatif.

Accord positif (PA) [4]
Une méthode alternative présente un accord positif si elle donne un résultat positif lorsque la méthode de référence donne un résultat positif.
Un accord positif devient un vrai positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.

Concordance [4,9]
C'est le pourcentage de chances de trouver le même résultat (c'est à dire tous les 2 positifs ou tous les 2 négatifs) pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents.
Voir le point L3 de l'annexe L de la norme [4] pour le mode de calcul
Le degré d'accord est l'équivalent de la reproductibilité pour les méthodes quantitatives.
Attention : se dit « accordance » en anglais (Bulletin OEPP 2006, n°36, 425-428)

Conditions de répétabilité [8]
Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

Conditions de reproductibilité [8]
Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

Coût (d'une méthode)
Il est déterminé approximativement uniquement sur la base des consommables (coûts standards). Les coûts de main d'œuvre ne sont pas inclus, ni ceux liés à l'amortissement des locaux ou des équipements qui dépendent de chaque laboratoire.

Degré d'accord [4,9]
C'est le pourcentage de chances de trouver le même résultat (c'est à dire tous les 2 positifs ou tous les 2 négatifs) pour deux prises d'essai identiques analysées dans le même laboratoire, dans des conditions de répétabilité.
Voir le point L2 de l'annexe L de cette norme pour le mode de calcul.
Le degré d'accord est l'équivalent de la répétabilité pour les méthodes quantitatives.
Ne pas confondre avec « accordance » en anglais (voir concordance).

Détectabilité [adapté de 7]
Capacité d'une méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir de gammes de dilutions.
NB : la norme U 47-301 précise pour la détectabilité que « la limite inférieure de détection est déterminée à l'aide de matériaux de référence (certifié, interne ou externe),s'ils existent et sont disponibles ou, à défaut, à l'aide d'un échantillon de contrôle positif du fournisseur ».

Déviation négative (ND) [4]
Une méthode alternative présente une déviation négative si elle donne un résultat négatif lorsque la méthode de référence donne un résultat positif.
Une déviation négative devient un faux négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.Une déviation négative devient un vrai négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est négatif.

Déviation positive (PD) [4]
Une méthode alternative présente une déviation positive si elle donne un résultat positif lorsque la méthode de référence donne un résultat négatif.
Une déviation positive devient un faux positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est négatif.Une déviation positive devient un vrai positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.

Dossier de validation intra-laboratoire
Dossier constitué du rapport d'évaluation et de l'avis de l'utilisateur quant à l'aptitude de la méthode ayant fait l'objet de l'évaluation à satisfaire à l'usage attendu
Voir point 4 de la norme NF V 03-110 pour son contenu

Durée (d'une analyse avec une méthode)
La durée d'une analyse pour une méthode donnée est établie entre la mise en analyse et l'obtention du résultat. Les délais d'acheminement au laboratoire dépendent du transporteur et ceux liés à la mise en analyse à compter de la réception des échantillons liés aux laboratoires eux-mêmes ; ils ne sont donc pas inclus

Evaluation [10]
Estimation de la valeur, du nombre, de l'importance ou de la grandeur des choses. La démarche d'évaluation se conçoit essentiellement dans un but de décision, mais la décision ne fait pas partie de l'évaluation.

Evaluation de la répétabilité
Détermination de la répétabilité par la réalisation d'un essai qui consiste en l'analyse d'un même échantillon

dans des conditions de répétabilité standardisées (même opérateur, même lots, même réactifs, même instruments…)..
Le coefficient de variation est une expression courante de la répétabilité de la méthode (méthode quantitative). Voir également degré d'accord.
CV = coefficient de variation (ou dispersion) :CV=s/m avec m= moyenne et s = l'écart type. L' objectif est de caractériser la meilleure performance possible dans des conditions optimales

Evaluation de la reproductibilité
Un essai de reproductibilité consiste en l'analyse d'un même échantillon dans des conditions de reproductibilité. Le coefficient de variation est une expression courante de la reproductibilité de la méthode.
Voir également concordance.
CV = coefficient de variation (ou dispersion) :CV=s/m avec m= moyenne et s = l'écart type

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

Exactitude [4]
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.
Lorsque l'exactitude est calculée par rapport à des résultats obtenus par une méthode de référence et non dans l'absolu (sur la base d'échantillons de statut connu), on parle d'exactitude relative.

Exactitude relative (AC) [4]
Niveau de correspondance entre la réponse obtenue avec la méthode de référence et la réponse obtenue avec la méthode alternative sur des échantillons identiques.
En anglais : accuracy
AC = (PA+NA)/ (NA+PA+PD+ND) en %

Exclusivité [4]
Absence d'interférences par un éventail approprié de souches, isolats, populations… non cibles de la méthode.

Fidélité [8]
Etroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées.
Elle est exprimée en termes d'infidélité et est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais (que les valeurs soient vraies ou non).

Faux négatif
Statut d'un échantillon pour lequel la méthode a donné un résultat négatif alors que l'on sait que la cible est présente
Voir aussi déviation négative (par rapport à une méthode de référence)
Exemple en PCR : Absence d'amplification causée par un effet inhibiteur significatif lors de la PCR.

Faux positif
Statut d'un échantillon pour lequel la méthode a donné un résultat positif alors que l'on sait que la cible est absente Voir aussi déviation positive (par rapport à une méthode de référence) Interne LNPV Exemple en PCR : Amplification observée pour le témoin négatif».

Inclusivité [4]
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.

Justesse [Norme V03-111]
Par niveau de contamination, la justesse est définie en comparant les résultats obtenus par la méthode de référence avec ceux obtenus par la méthode alternative, sur des échantillons identiques artificiellement contaminés.

Limite de détection [8]
C'est la « plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée […] dans les conditions expérimentales décrites de la méthode ».
NB 1 : Un pourcentage est en général associé. Dans ce cas, il s'agit de la plus petite concentration pouvant être détectée avec ledit pourcentage de chances d'obtenir un résultat positif. La norme EN/ISO 16140 propose 50%, mais en général, les limites de détection donnés par le LNPV sont des seuls à 100%.
NB 2 : Ce seuil n'est pas quantifiable de la même façon pour tous les organismes nuisibles : en bactériologie, il s'exprime en concentration de l'analyte dans un volume donné (ufc/mL). En virologie, il s'exprime pour chaque échantillon par son niveau de dilution (1/5000è, 1/100è,…). En biologie moléculaire, il s'exprime en quantité d'ADN, d'ARN ou d'ADNc cible (ng d'acide nucléique ou nombre de copies du gène cible).

Méthode d'analyse [8]
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 [8]
Méthode d'analyse utilisée par le laboratoire à la place d'une méthode d'analyse de référence.

Méthode d'analyse de référence [8]
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.
Voir art. R. 202-17 du code rural*

Rapport d'évaluation
Rapport donnant le protocole, les résultats bruts et l'interprétation des essais conduits pour déterminer les critères de performance d'une méthode.

Relative
Adjectif utilisé pour qualifier un critère de performance calculé par rapport à des résultats donnés par une méthode de référence et non par rapport à un statut connu des échantillons.

Répétabilité [4]
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 [4]
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 CV est une expression simplifiée de la reproductibilité de la méthode.

Sensibilité (d'une méthode) [normes NF EN 12306 et X42-313]
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 lorsque il est présent dans l'échantillon.
La notion de sensibilité inclut celle d'inclusivité et de détectabilité qui est la capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir de gammes de dilutions.

Sensibilité analytique (*Analytical sensitivity*)
Voir limite de détection

Sensibilité relative [4] *Diagnostic sensitivity*
SE : Capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte lorsque la méthode de référence le détecte.
SE = PA / (ND + PA) en %

Seuil de détection
Voir limite de détection

Seuil relatif de détection
Niveau de contamination le plus bas pouvant être détecté par la méthode alternative.

Simplicité
Déterminée sur une échelle de 1 à 3, elle permet d'identifier l'éventuelle facilité de transfert , d'appropriation de la méthode par un laboratoire tiers.

Spécificité [8,9 et 10]
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 dans un échantillon sain.

En PCR, l'est par exemple l'aptitude à reconnaître spécifiquement la séquence d'acide nucléique à détecter en le distinguant des autres séquences d'acide nucléique.

Spécificité analytique
Capacité d'un test à distinguer un analyte cible d'un analyte non cible en donnant une mesure quantifiée de la non distinction (espèces ou taxons non cibles phylogénétiquement proches) par approche in vitro (expérimentation labo) ou in silico (analyse de séquences orthologues et autres régions du génome) le cas échéant.

Spécificité relative [4] *Diagnostic specificity*
Capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte lorsque la méthode de référence ne le détecte pas.
PE = NA / (NA + PD) %

Validation [Norme ISO 9000 : 2000, 4]
Confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue sont satisfaites ». Appliquée à une méthode d'analyse, elle se définit comme « l'action de soumettre une méthode d'analyse à une étude statistique, fondée sur un protocole normalisé et/ou reconnu, et apportant la preuve que dans son domaine d'application, la méthode d'analyse satisfait à des critères de performance préétablis
Remarque : La validation d'une méthode correspond donc à une reconnaissance officielle de son aptitude à satisfaire à l'usage attendu. Elle s'effectue par confrontation de ses critères de performance à des critères de performance visés pour les conditions dans lesquelles la méthode est utilisée.

Validation intra-laboratoire d'une méthode d'analyse [8]
Action de soumettre une méthode d'analyse à une étude statistique intra-laboratoire, fondée sur un protocole normalisé et/ou reconnu, et apportant la preuve que dans son domaine d'application, la méthode d'analyse satisfait à des critères de performance préétablis.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
REP 001	Répertoire des recettes
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

1] DG 01/98 version b (DG ELISA) Méthode générale d'analyse officielle. Techniques ELISA. Bactériologie/Virologie. Mai 2005.

2] DG 2/03/version a (DG PCR). Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques de type : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Septembre 2003.

3] ISO/CEI Guide 99 : 2007 Vocabulaire international de métrologie — Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM). Décembre 2007.

4] Norme NF EN ISO 16140. Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Octobre 2003.

5] Norme NF EN ISO 17000. Évaluation de la conformité. Vocabulaire et principes généraux. Avril 2005.

6] Norme NF EN ISO 17025. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Septembre 2005.

7] Norme U 47-301 Dossier de présentation pour le contrôle des réactifs biologiques utilisés dans le domaine de la santé animale. Décembre 2001.

8] Norme V 03-110. Procédure de validation intra-laboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. Décembre 1998.

9] Norme XP V03 – 043. Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés.

10] Toma B., Dufour B., Sanaa M ., Bénet J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 2è édition. AEEMA, France. 696 pages.

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.