Ordre de méthode

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
DE L'AGROALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation **Service des actions sanitaires en production primaire** **Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux** **Bureau des semences et de la santé des végétaux** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Note de service** **DGAL/SDQPV/2015-1016** **25/11/2015**

Date de mise en application : 25/11/2015
Diffusion : Tout public

Date limite de mise en œuvre : 25/11/2015
Cette instruction n'abroge aucune instruction.
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 1

Objet : Méthode officielle d'analyse ANSES/LSV/MA 040 version 1a relative à la détection de Phytophthora lateralis par PCR en temps réel.

Destinataires d'exécution
DRAAF SRAL DAAF - SERVICE DE L'ALIMENTATION LSV Laboratoires agréés

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MA XXX version 1a relative à la détection de Phytophthora lateralis sur échantillons végétaux par PCR en temps réel.

Textes de référence : 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

L’organisme *Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath, est responsable de dépérissements et mortalités sur *Chamaecyparis lawsoniana* et ponctuellement sur d’autres cupressacées. Il cause d’importants dégâts dans le Nord-Ouest des Etats-Unis et est présent de façon limitée en Europe (France, Grande-Bretagne, Irlande, Pays-Bas). En France il a été identifié sur des haies coupe-vent en Bretagne.
P. lateralis figure sur la liste A2 de l’OEPP relative aux organismes nuisibles recommandés pour réglementation.

La présente note a pour objet la publication officielle d’une méthode de détection de *Phytophthora lateralis* sur échantillons végétaux, basée sur la PCR en temps réel.

La nouvelle méthode en annexe de cette note doit être utilisée pour les analyses officielles,disponible sur le site de l'Anses (https://www.anses.fr/fr).

Le directeur général adjoint de l'alimentation
Chef du service de la gouvernance
et de l'international
CVO
Loïc Evain

ANNEXE I : FICHE DE SYNTHESE POUR LA COMPARAISON DES METHODES D'ANALYSE
ELEMENTS DE CONTEXTE

Organisme nuisible concerné	***Phytophthora lateralis*** Tucker & Milbrath
Surveillance du territoire ☒ Importation ☐ Exportation ☐	
Organisme nuisible présent ☒ Organisme nuisible absent ☐	
Commande	Autosaisine du Laboratoire de la Santé des Végétaux : *Phytophthora lateralis* est un oomycète connu aux Etats-Unis depuis 1923, il est responsable d'importants dégâts sur *Chamaecyparis Lawsoniana* dans le Nord-Est du pays. Il a été détecté récemment de façon limitée en Europe, dont en France (Bretagne). La limitation de l'extension de la maladie nécessite de disposer d'un test sensible, spécifique et rapide permettant de détecter le parasite.
Méthodes actuellement disponibles (OEPP/ISTA/méthodes nationales, ……)	La littérature proposait trois méthodes de détection de *Phytophthora lateralis*: - L'identification morphologique après isolement sur un milieu semi-sélectif - La PCR conventionnelle (deux méthodes disponibles) utilisant des couples d'amorces spécifiques : Schena L., Duncan J.M., & Cooke D.E.L. (2008). Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57, 64-75. Winton L.M., & Hansen E.M. (2001). Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *Forest Pathology* 31, 275-283.
Problématique	*Phytophthora lateralis* est susceptible de causer de gros dégâts (chancres et nécroses sur la partie basse des arbres entraînant la mort, brunissement du feuillage) sur *Chamaecyparis* spp.; d'autres cupressacées se sont également révélées sensibles (*Thuja* spp. notamment). Il a été identifié récemment en Bretagne sur des haies coupe-vent plantées dans les années 1970, puis au Royaume-Uni et en Irlande, ainsi qu'en pépinière aux Pays-Bas. Les trois méthodes de détection précédemment citées ne sont pas pleinement satisfaisantes : la méthode morphologique est longue (plus d'une semaine dans le meilleur des cas), délicate (mycélium à croissance lente) et d'une sensibilité limitée (nécessité d'avoir de beaux symptômes sur un échantillon frais). Quant aux deux méthodes PCR, l'une n'est pas totalement spécifique (croisement avec *P. ramorum*), l'autre n'a pas été pleinement validée et caractérisée, et les différents témoins sont encore à produire ; d'une façon plus générale, la PCR conventionnelle nécessite plus de temps de travail qu'une méthode par qPCR et oblige à manipuler du bromure d'éthidium, composé hautement toxique. L'Unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux a donc travaillé sur la mise au point, l'optimisation et la validation d'une méthode de détection de *Phytophthora lateralis* sur végétaux par PCR en temps réel. Une proposition de méthode officielle a été rédigée.
Axes de travail	• Mise au point et optimisation d'une méthode de PCR en temps réel • Validation des critères de performance suivants: sensibilité, spécificité,

	inclusivité, robustesse, répétabilité et reproductibilité • Optimisation de l'extraction de l'ADN sur échantillons végétaux • Comparaison de la nouvelle méthode avec deux autres méthodes existantes (morphologique et PCR conventionnelle de Schena *et al*., 2008)
Objectifs fixés au LSV- Unité de Mycologie	**Mise au point, optimisation et validation d'une méthode de détection de *Phytophthora lateralis* sur tissus végétaux par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne temps réel.**

ELEMENT DE COMPARAISON

Un dossier complet comprenant l'ensemble des données de validation est disponible auprès des unités UCR et mycologie du LSV.

PROPOSITIONS LSV

Le projet de méthode officielle est joint à ce dossier :
« Détection de *Phytophthora lateralis* par PCR en temps réel »

Un article « A robust and specific real-time PCR tool for the detection of *Phytophthora lateralis* in plant tissues" est actuellement soumis pour publication à une revue internationale à comité de lecture.

Bilan coût/bénéfice :
Cette technique est d'un coût supérieur à une analyse par isolement et identification morphologique, mais elle est plus sensible et beaucoup plus rapide ; de plus elle ne nécessite aucune expertise taxonomique. Elle est d'un coût et d'une durée inférieurs à une analyse par PCR conventionnelle et minimise le risque de faux négatifs ou de faux positifs grâce à de meilleurs critères de performance.