Ordre de méthode

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
DE LA SOUVERAINETÉ
ALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT
Liberté
Égalité
Fraternité

Direction générale de l'alimentation **Services des actions sanitaires** **Sous-direction de la santé et de la protection des végétaux** **Bureau de la Santé des Végétaux** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Instruction technique** **DGAL/SDSPV/2025-25** **07/01/2025**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Date limite de mise en œuvre : 01/01/2026
Cette instruction n'abroge aucune instruction.
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 0

Objet : Méthode officielle d'analyse relative à la détection de Clavibacter sepedonicus en France métropolitaine sur végétal par immunofluorescence, PCR conventionnelle, PCR en temps réel et/ou isolement et identification de la souche.

Destinataires d'exécution
DRAAF-SRAL SIVEP Anses-Laboratoire de la santé des végétaux (LSV) Laboratoires agréés

Résumé : Officialisation de la méthode de détection de Clavibacter sepedonicus en France métropolitaine sur végétal par immunofluorescence, PCR conventionnelle, PCR en temps réel et/ou isolement et identification de la souche.

Textes de référence :
- Règlement (UE) 2016/2031 du Parlement européen et du Conseil du 26 octobre 2016 relatif aux mesures de protection contre les organismes nuisibles aux végétaux, modifiant les règlements du Parlement européen et du Conseil (UE) n° 228/2013, (UE) n° 652/2014 et (UE) n° 1143/2014 et abrogeant les directives du Conseil 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE et 2007/33/CE

- Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 modifié concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques.

- Règlement d’exécution (UE) 2019/2072 de la Commission du 28 novembre 2019 modifié établissant des conditions uniformes pour la mise en œuvre du règlement (UE) 2016/2031 du Parlement européen et du Conseil, en ce qui concerne les mesures de protection contre les organismes nuisibles aux végétaux.

- Règlement d’exécution (UE) 2022/1194 de la Commission du 11 juillet 2022 établissant des mesures destinées à éradiquer Clavibacter sepedonicus (Spieckermann & Kotthoff 1914) Nouioui et al. 2018 et à prévenir sa propagation.

- Articles L202-1, R200-1, R202-2 à R202-20-7 du code rural et de la pêche maritime.

- 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.

- Arrêté du 30 mars 2023 désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire.

- EPPO (2022). PM 7/59 (2) Clavibacter sepedonicus. Bulletin OEPP 52(2). 262-285.

La présente instruction technique a pour objet l'officialisation de la méthode de détection de *Clavibacter sepedonicus* en France métropolitaine.

Cette instruction vise à remplacer la précédente méthode décrite dans la directive 2006/56/CE de la Commission du 12 juin 2006 modifiant les annexes de la directive 93/85/CEE du Conseil du 4 octobre 1993 concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre, transposée dans le droit français par l'arrêté ministériel du 22 mars 2007 (NOR : AGRG0700698A) et abrogée le 31 décembre 2021 en conséquence de l'application de l'article 113 du Règlement (UE) 2016/2031.

Les modifications majeures des dispositions européennes, lesquelles sont désormais définies par le Règlement d'exécution (UE) 2022/1194 sont les suivantes :

- Ajout de la notion de résultats incohérents nécessitant la réalisation d'un troisième test de détection ;
- Ajout de la possibilité de l'utilisation de test(s) de PCR temps réel ;
- Le test de pouvoir pathogène n'est plus systématique et réservé à des demandes particulières ;
- Pour les échantillons asymptomatiques :
    - Au moins un des deux tests de détection devra être un test moléculaire ;
    - La mise en œuvre systématique de l'isolement est supprimée. L'échantillon pourra être déclaré positif sur la base de la réalisation de 2 tests de détection dont un moléculaire.

La méthode de détection de *Clavibacter sepedonicus* en France métropolitaine décrite dans la présente instruction technique doit être mise en œuvre pour la réalisation d'analyses officielles selon les modalités listées dans le tableau ci-après :

Matrice	1ère intention	Confirmation
Matériel symptomatique *Solanum tuberosum* ou *Solanum melongena*	Laboratoire National de Référence (LNR)	LNR
Tubercules asymptomatiques de *Solanum tuberosum*	Laboratoire agréé	LNR
Végétaux hôtes asymptomatiques	LNR	LNR

Les procédures de diagnostic de la présence de *Clavibacter sepedonicus* dans les échantillons sont décrites dans les diagrammes disponibles en annexe I paragraphe 3 du règlement d'exécution (UE) 2022/1194 ou dans les figures 1 et 2 au paragraphe 1 de la méthode OEPP PM7/59 (2) en utilisant les tests de détection et/ou d'identification listés dans la présente instruction technique.

A noter que les analyses faisant appel à la détection par isolement et les tests d'identification de la souche sont du ressort exclusif du LNR.

Prise d'essai et préparation des échantillons :

La prise d'essai et la préparation des échantillons se réalisent conformément aux sections suivantes de la méthode OEPP PM7/59 (2) :

- 3.2.1 pour matériel symptomatique de *Solanum tuberosum* ou *Solanum melongena,*
- 3.3.1.1 pour tubercules asymptomatiques de *Solanum tuberosum,*
- 3.3.1.2 pour végétaux hôtes asymptomatiques.

Tests pour les analyses de première intention :

- Tests d'immunofluorescence tels que décrits dans la section 3.2.3.1 de la méthode OEPP PM7/59 (2) ;
- Test de PCR conventionnelle utilisant les amorces de Pastrik (2000), tel que décrit dans l'appendice 5 de la méthode OEPP PM7/59 (2) après extraction de l'ADN en utilisant le kit de purification Easy-DNA™ gDNA (Invitrogen, comme validé par Pastrik & Maiss, 2000, cf. point 1.1 de l'appendice 4 de la méthode OEPP PM7/59 (2)) ;
- Test de PCR en temps réel TaqMan® à l'aide d'amorces et de sondes de Schaad *et al*. (1999) tel que décrit dans l'appendice 9 de la méthode OEPP PM7/59 (2) après extraction de l'ADN en utilisant le kit de purification Easy-DNA™ gDNA (Invitrogen, comme validé par Pastrik & Maiss, 2000, tel que décrit au point 1.1 de l'appendice 4 de la méthode OEPP PM7/59 (2)).

Tests pour les analyses de confirmation :

- Tests de détection :
    - Tests précédemment listés pour les analyses de première intention ;
    - Isolement direct ou après enrichissement biologique sur milieu de croissance semi-sélectif MNTA et/ou non sélectif LPGA, tel que décrit dans les sections 3.2.1 ou 3.3.3 de la méthode OEPP PM7/59 (2).

- Tests d'identification :
    - Tests d'immunofluorescence tels que décrits dans la section 3.2.3.1 de la méthode OEPP PM7/59 (2) ;
    - Test de PCR conventionnelle utilisant les amorces de Pastrik (2000), tel que décrit dans l'appendice 5 de la méthode OEPP PM7/59 (2) après extraction de l'ADN par lyse thermique telle que décrite au point 2 de l'appendice 4 de la méthode OEPP PM7/59 (2) ;
    - Test de PCR en temps réel TaqMan® à l'aide d'amorces et de sondes de Schaad *et al*. (1999) tel que décrit dans l'appendice 9 de la méthode OEPP PM7/59 (2) après extraction de l'ADN par lyse thermique telle que décrite au point 2 de l'appendice 4 de la méthode OEPP PM7/59 (2) ;
    - Test de pouvoir pathogène (pour cas particuliers) tel que décrit dans l'appendice 11 de la méthode OEPP PM7/59 (2).

Conservation des échantillons au laboratoire :

- Avant analyse :

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 7 jours calendaires pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions.
L'échantillon devra pendant ce temps être conservé :

- à température ambiante (15 à 25°C ± 4°C) pour les végétaux asymptomatiques,
- en enceinte réfrigérée à +5°C ± 4°C pour les échantillons symptomatiques.

- Après analyse :

  - Cas d'un échantillon négatif : sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.
  - Cas d'un échantillon positif : l'ensemble des reliquats pertinents (souche isolée, extrait d'ADN) doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises au laboratoire national de référence, à qui est alors transféré la charge de conservation des reliquats.
  - Conservation d'une souche isolée : toute souche isolée d'un échantillon positif doit être conservée par une méthode de conservation bactérienne à long terme (par exemple congélateur ≤ - 18°C).

Cette instruction technique est applicable à partir du 01/01/2025 et de façon obligatoire à compter du 01/10/2025.

La méthode OEPP PM7/59 (2) à laquelle il est fait référence dans la présente instruction technique a été publiée dans le Bulletin de l'OEPP, volume 52, N°2 d'août 2022. Elle est également disponible sur le site Internet de l'OEPP (https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards/pm7_diagnostics).

Le sous-directeur de la santé et de la protection des végétaux

Emmanuel KOEN