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/2010-08-018
MOD10.21 C 12/05/10

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8235

Date: 13/08/2010

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 d'analyse MOA012 version 1a relative à l'extraction, la détection et l'identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites.

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 MOA012 relative à l'extraction, la détection et l'identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites .

Mots-clés : Méthode officielle - analyses – extraction - détection - identification – nématodes – sol – végétaux – formes enkystées – formes libres

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

Les nématodes parasites de plantes ou phytoparasites sont des vers microscopiques transparents, ils mesurent de 200 à 8000 µm de longueur pour un diamètre de 10 à 40 µm. Ils ne sont pas visibles à l'œil nu mais sont facilement observables à la loupe binoculaire.

Ils possèdent un stylet creux, structure ressemblant à une seringue, leur permettant de ponctionner les cellules végétales et d'y injecter des substances digestives. Ces sécrétions peuvent engendrer des mortalités, des proliférations ou des modifications cellulaires. Ces nématodes peuvent occasionner des dommages sur les cultures variant de négligeables jusqu'à une destruction totale.

Certains nématodes vivent dans le sol et se nourrissent à la surface des végétaux : ils sont dits « ectoparasites » (ex : *Helicotylenchus, Paratylenchus).* Parmi ceux ci, certains genres de nématodes tels que *Longidorus, Trichodorus* ou *Xiphinema*, sont vecteurs de virus. D'autres pénètrent dans les tissus et se nourrissent à l'intérieur des végétaux, ils sont dits « endoparasites ». Parmi cette catégorie de nématodes, on distingue 2 sous groupes : les sédentaires et les migrateurs :

♦ Les endoparasites sédentaires sont les nématodes les plus dommageables aux cultures, les deux principaux types étant les nématodes à kystes (*Heterodera*, *Globodera…*) et les nématodes à galles (*Meloidogyne, Nacobbus*). Ces derniers sont responsables de déformations importantes sur racines ;

♦ Les endoparasites migrateurs se déplacent dans le sol et dans les tissus végétaux pour se nourrir en occasionnant des nécroses, tels que le nématode des lésions des racines *Pratylenchus* et le nématode des bulbes et des tiges *Ditylenchus.* Ils peuvent également contribuer à la propagation de maladies en créant des portes d'entrée aux parasites et pathogènes ou en tant que porteurs de champignons (ex : *Pratylenchus*).

Du point de vue biologique, le cycle de vie des nématodes phytoparasites est pratiquement similaire d'une espèce à l'autre : un œuf, 3 à 4 stades larvaires séparés par des mues et un stade adulte, la différenciation sexuelle s'effectuant après la 4ème mue. La plupart des genres de nématodes sont constamment filiformes au cours de leur développement. Toutefois, les nématodes sédentaires (*Meloidogyne, Nacobbus, Heterodera*…) présentent des formes renflées. Certains genres (*Heterodera, Globodera*….) présentent en plus un stade « kyste » correspondant au corps de la femelle chitinisé.

Cette variabilité, tant au niveau du parasitisme des nématodes phytoparasites (endoparasites ou ectoparasites), que des stades de développement recherchés (stades filiformes ou stades sédentaires), implique le recours à des techniques d'extraction variées.

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode générale nématologie MOA012 version 1a décrite en annexe et donnant :

– les différentes méthodes d'extraction pour les nématodes enkystés ou non enkystés (filiformes) selon la matrice considérée (sol, parties aériennes, racines….) ;

– les clés d'identification morphobiométrique des principaux genres de nématodes phytoparasites.

L'ingénieur en chef des Ponts,
des Eaux et des Forêts
Adjoint à la Sous-Directrice
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

Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites

Réf. : MOA012 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
MOA012 version1a	Juillet 2010	Août 2010	Septembre 2010	

SOMMAIRE

PREAMBULE **5**

Objet des méthodes officielles 5
Glossaire, abréviations et documents connexes 5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 5
Échantillonnage et échantillon 5
Modification des méthodes officielles 5
Considérations d'ordre métrologique 6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 7

ORIGINE DE LA METHODE **8**

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE **9**

Modifications 9
Améliorations 9

DESCRIPTION DE LA METHODE **10**

Introduction 10
1. Nématodes formes non enkystées 11
1.1. Préparation des échantillons 11
1.1.1. Sols 11
1.1.2. Organes végétaux 11
1.2. Extraction 11
1.2.1. Méthodes par gravité (extractions à partir de sols) 11
1.2.1.1. Sédimentation 11
1.2.1.2. Elutriation 14
1.2.1.3. Centrifugation 15
1.2.2. Méthodes utilisant la mobilité des nématodes (extraction à partir de sols, substrats et organes végétaux) 16
1.2.2.1. Méthode de l'entonnoir de Baermann (1917) 16
1.2.2.2. Méthode Baermann modifiée (migration sur tamis) 17
1.2.2.3. Brumisation incubation (Seinhorst, 1950) 18
1.2.3. Destruction du milieu (extraction à partir de produits végétaux) 18
1.2.3.1. Destruction par broyage 18
1.2.3.2. Digestion enzymatique 18
1.3. Identification morphobiométrique 19
1.3.1. Identification des genres 20
1.3.2. Identification spécifique 22
1.3.2.1. Technique de montage temporaire d'un nématode sur lame 22
1.3.2.2. Identification 23

2. Nématodes formes enkystées 24
2.1. Préparation des échantillons 24
2.1.1. Sols 24
2.1.2. Organes végétaux souterrains 24
2.2. Extraction 24
2.2.1. Principe 24
2.2.2. Extraction à partir d'un sol sec 25
2.2.3. Extraction à partir d'un sol humide 27
2.2.4. Extraction à partir d'organes végétaux souterrains 28
2.3. Préparation de l'extrait 29
2.3.1. Récupération et séchage 29
2.3.2. Remise en suspension de l'extrait sec et recueil du surnageant 29
2.4. Tri visuel des kystes 30
2.5. Identification spécifique morphobiométrique 31
2.5.1. Examen des kystes 31
2.5.1.1. Examen externe à la loupe binoculaire 31
2.5.1.2. Examen microscopique de la région périnéale 31
2.5.2. Examen des larves contenues dans les kystes 33

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 33

REMERCIEMENTS 33

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 34

Liste des Illustrations 37

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.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.
L' échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.
Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).
Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.
Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.
Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Tout autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

Volume	**volume < à 10 mL** : EMT = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : 5°C et EMT = ± 4°C **congélateur** : ≤ -18°C **congélateur froid intense** : ≤ -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).
Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.
Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont 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

La présente méthode a été rédigée par la station de nématologie du Laboratoire national de la protection des végétaux.

Des remerciements sont adressés à l'ensemble des agents de la station de nématologie pour leur participation active à la relecture ainsi que pour leurs remarques et corrections.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle méthodologie du LNPV.

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

Introduction

Les nématodes parasites de plantes ou phytoparasites sont des vers microscopiques transparents, ils mesurent de 200 à 8000 µm de longueur pour un diamètre de 10 à 40 µm. Ils ne sont pas visibles à l'œil nu mais sont facilement observables à la loupe binoculaire.

Ils possèdent un stylet creux, structure ressemblant à une seringue, leur permettant de ponctionner les cellules végétales et d'y injecter des substances digestives. Ces sécrétions peuvent engendrer des mortalités, des proliférations ou des modifications cellulaires.
Ces nématodes peuvent occasionner des dommages sur les cultures variant de négligeables jusqu'à une destruction totale.

Certains nématodes vivent dans le sol et se nourrissent à la surface des végétaux : ils sont dits « ectoparasites » (ex : *Helicotylenchus, Paratylenchus).* Parmi ceux ci, certains genres de nématodes tels que *Longidorus, Trichodorus* ou *Xiphinema*, sont vecteurs de virus.

D'autres pénètrent dans les tissus et se nourrissent à l'intérieur des végétaux, ils sont dits « endoparasites ». Parmi cette catégorie de nématodes, on distingue 2 sous groupes : les sédentaires et les migrateurs.
- Les endoparasites sédentaires sont les nématodes les plus dommageables aux cultures, les deux principaux types étant les nématodes à kystes (*Heterodera*, *Globodera…*) et les nématodes à galles (*Meloidogyne, Nacobbus*). Ces derniers sont responsables de déformations importantes sur racines.
- Les endoparasites migrateurs se déplacent dans le sol et dans les tissus végétaux pour se nourrir en occasionnant des nécroses, tels que le nématode des lésions des racines *Pratylenchus* et le nématode des bulbes et des tiges *Ditylenchus.* Ils peuvent également contribuer à la propagation de maladies en créant des portes d'entrée aux parasites et pathogènes ou en tant que porteurs de champignons (ex : *Pratylenchus*).

Du point de vue biologique, le cycle de vie des nématodes phytoparasites est pratiquement similaire d'une espèce à l'autre : un œuf, 3 à 4 stades larvaires séparés par des mues et un stade adulte, la différenciation sexuelle s'effectuant après la 4ème mue.

La plupart des genres de nématodes sont constamment filiformes au cours de leur développement. Toutefois, les nématodes sédentaires (*Meloidogyne, Nacobbus, Heterodera*…) présentent des formes renflées. Certains genres (*Heterodera, Globodera*….) présentent en plus un stade « kyste » correspondant au corps de la femelle chitinisé.

Cette variabilité, tant au niveau du parasitisme des nématodes phytoparasites (endoparasites ou ectoparasites), que des stades de développement recherchés (stades filiformes ou stades sédentaires), implique le recours à des techniques d'extraction variées.

Ce document présente ainsi les différentes méthodes d'extraction pour les nématodes enkystés ou non enkystés (filiformes) selon la matrice considérée (sol, parties aériennes, racines….). Enfin, cette méthode donne des éléments d'identification morphobiométrique des principaux genres de nématodes phytoparasites.

1. Nématodes formes non enkystées

1.1. Préparation des échantillons

1.1.1. Sols

Le prélèvement de la prise à analyser est précédé par une élimination des cailloux et des gros débris végétaux, une réduction des mottes, et une homogénéisation du produit.

1.1.2. Organes végétaux

Les parties aériennes, graines et substrats ne font l'objet d'aucune préparation. La quantité analysée dépend de la matrice, elle est précisée dans les méthodes officielles correspondantes.
Les racines, bulbes et tubercules sont lavés à l'eau courante si nécessaire avant de procéder à l'extraction.

1.2. Extraction

Pour séparer les nématodes des différents supports dans lesquels ils sont présents, les méthodes d'extraction utilisent selon le cas :
- la densité et la taille du nématode *: méthodes par gravité,*
- la propriété du nématode à se mouvoir : *méthodes par migration.*

Certaines méthodes comprennent en outre une désintégration préalable du produit à analyser.

Les techniques d'extraction sont nombreuses et diverses mais, à l'exception de celles consistant à désintégrer le produit, elles dérivent toutes soit de la méthode de décantation et tamisage de COBB (méthode par gravité) soit de celle de l'entonnoir de BAERMANN (méthode par mobilité).

Remarque : le maillage des tamis spécifié dans la présente méthode ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer du bon état des tamis.

1.2.1. Méthodes par gravité (extractions à partir de sols)

1.2.1.1. Sédimentation

Le principe est fondé sur le fait que la densité d'un nématode (environ 1,05) est très légèrement supérieure à celle de l'eau. Lorsqu'un sol est mis en suspension dans l'eau, la plus grande partie des particules de sol sédimente plus vite que les nématodes, qui sont alors récupérés par un passage du surnageant sur un tamis.
De ce principe, découlent les méthodes de sédimentation, élutriation et centrifugation employées actuellement.

Méthode de COBB (1918) (dite méthode « des seaux »)

Cette méthode est très rudimentaire et demande un équipement minimal :
- 2 seaux ou récipients équivalents,
- des tamis de grand diamètre (environ 20 cm) de maille allant de 1 mm à 40 µm.

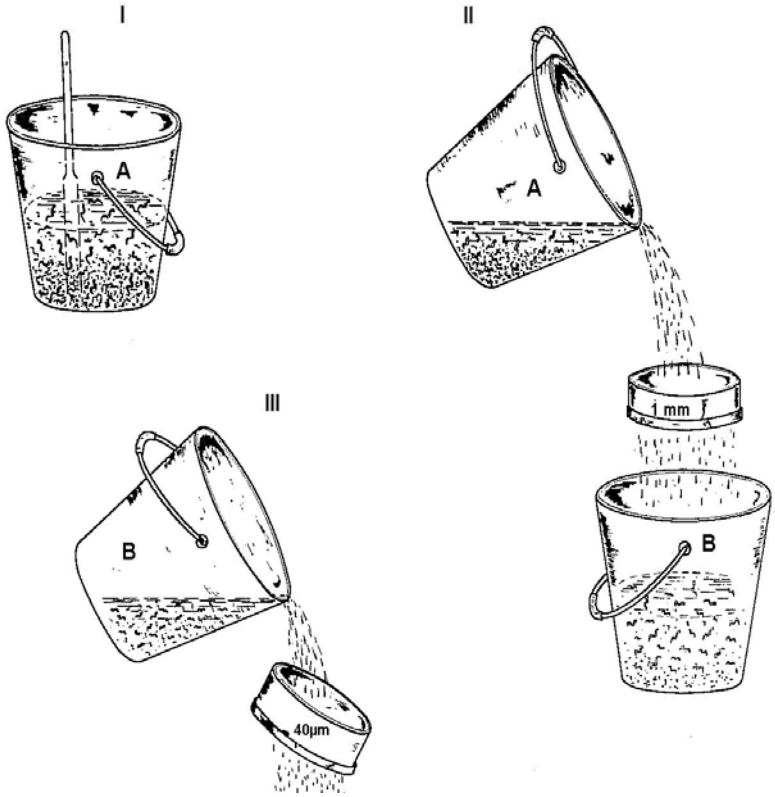


Illustration 1. Méthode de Cobb (1918)

Déroulement de la manipulation :

I - mélanger l'échantillon de sol avec de l'eau par un brassage énergique dans un seau A :
- laisser décanter : les nématodes restent en suspension tandis que les particules lourdes de sol tombent au fond.

II - lorsque l'opérateur estime que la plus grande partie de la phase minérale est déposée au fond du seau A, passer l'eau surnageant du seau A dans un seau B à travers un tamis de 1 mm qui retiendra les particules légères volumineuses et laissera passer les nématodes. Les particules lourdes restent au fond du seau.
Les opérations peuvent être répétées plusieurs fois en rajoutant de l'eau au résidu du seau A.

III - verser lentement l'eau du deuxième seau sur un tamis à maille fine (40 µm par exemple) en évitant de verser la boue fine du fond du seau, la plupart des nématodes sont retenus dans ce tamis.
- récupérer les nématodes dans un bécher ou un gobelet de lecture en rinçant le tamis à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

Cette méthode très simple est rarement employée car la sédimentation est appréciée « à l'œil » et l'efficacité des extractions est très variable.

Théoriquement, en réduisant la vitesse de sédimentation des nématodes, la séparation serait optimale. On peut l'obtenir en créant un courant d'eau ascendant.

Méthode des 2 fioles de Seinhorst (Seinhorst, 1955)

Un courant d'eau vertical ascendant est créé par échange entre 2 récipients réunis par un étranglement : le récipient supérieur contient l'échantillon de sol et ce dernier en descendant dans le récipient inférieur est remplacé par un volume d'eau équivalent en créant une turbulence.
En fin de processus, on obtient le sol sédimenté dans un récipient et le surnageant dans un autre.

Déroulement de la manipulation :

L'illustration ci-dessous montre les 4 récipients A, B, C et D utilisés. Les durées de chaque opération et la taille des particules trouvées à la fin de chaque étape y sont indiquées.

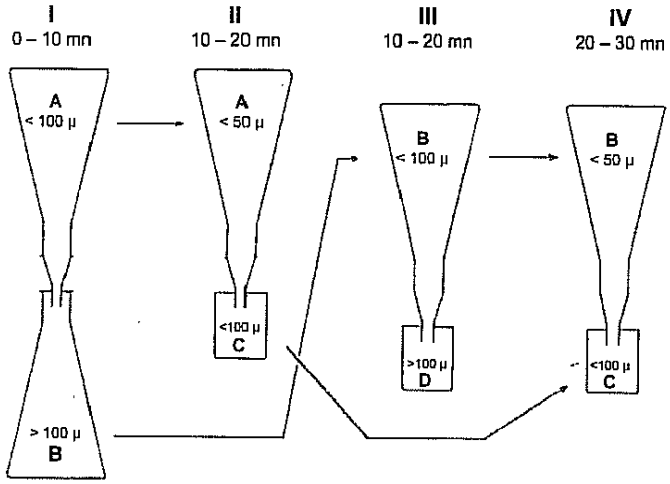


Illustration 2. Méthode des 2 fioles de Seinhorst (Seinhorst, 1955)

1 - mélanger de 200 à 500 g de sol avec environ 750 ml d'eau dans un becher à l'aide d'un mélangeur,
2 - passer la suspension boueuse à travers un tamis de maille de 1 à 2 mm afin d'éliminer les gros débris,
3 - la transférer dans un erlenmeyer A de 2 litres équipé d'un entonnoir,
4 - le remplir d'eau, le renverser sur un erlenmeyer B rempli d'eau de façon à ce que l'entonnoir de A plonge de 1 à 2 cm dans l'eau contenue dans B (*étape* **I**),
5 - laisser environ 10 min, le sol tombe de A dans B,
6 - l'erlenmeyer A est ensuite renversé sur un bécher C plein d'eau pendant 10 à 20 min : l'erlenmeyer A ne contient plus que les particules inférieures à 50 µm et C des particules inférieures à 100 µm (*étape* **II**),
7 - pendant le même temps, B est renversé sur un becher D plein d'eau (*étape* **III**),
8 - la fiole B est ensuite renversée sur le bécher C (*étape* **IV**).
A la fin de l'opération, 50 % des petits nématodes se trouvent dans l'erlenmeyer A et le reste dans B et C (qui contient 75% des plus gros),
9 - les contenus de A et B sont passés à travers un tamis de 40 à 50 µm et celui de C sur un tamis de 90 à 100 µm,
10 - les nématodes sont récupérés sur les tamis à l'aide d'un jet de pissette d'eau,
11 - le becher D ne contient pratiquement pas de nématode et son contenu est éliminé.

Cette méthode permet de récupérer la plupart des nématodes de taille petite à moyenne. L'appareil permet de séparer l'extrait en plusieurs fractions, le tamisage est plus facile.
Le fait d'utiliser des flacons de verre rend la technique fragile.

1.2.1.2. Elutriation

L'élutriation permet d'empêcher la sédimentation des nématodes par un courant d'eau ascendant continu.
La question de la vitesse du courant a été étudiée par Seinhorst, en relation avec la taille des nématodes et des mailles de tamis de récupération (vitesse optimale : 350-700 cm/h).
L'application de ce principe a amené divers auteurs à décrire des appareils plus ou moins perfectionnés qui fonctionnent tous de la même manière.
Il est illustré ci-après par l'appareil mis au point et décrit par Oostenbrinck en 1960.

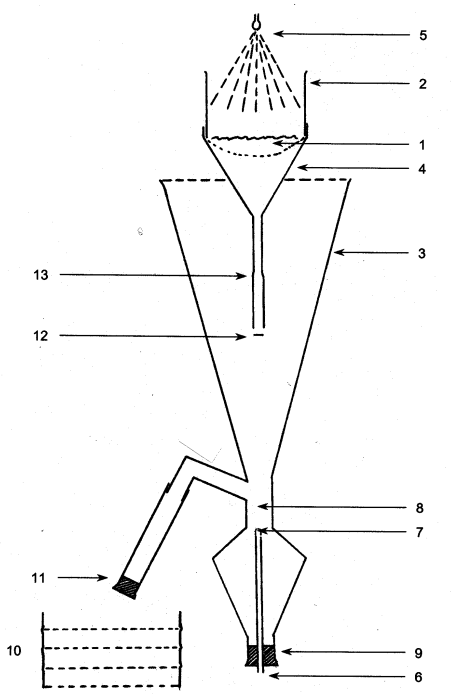


Illustration 3. Elutriateur d'Oostenbrinck (1960)

Cet appareil permet de traiter des échantillons allant de 100 g à 1 kg.

Déroulement de la manipulation :

1 - L'échantillon (1) est placé sur un tamis (2) de maille 1 mm porté par un entonnoir (4).
2 - Le sol est entraîné dans l'appareil (3) par un courant d'eau (débit d'environ 700 ml/min) délivré par un pulvérisateur (5).
3 - Le pulvérisateur est stoppé quand l'échantillon entier est passé à travers le tamis (2).
4 - Dans le même temps, un courant d'eau entre par le bas de l'appareil (6) par l'extrémité d'un tube (7). Le débit est ajusté à 800 ml/ min au début de l'opération puis à 400 ml/min dès que l'échantillon passe (environ niveau 12 atteint).
Ce courant empêche les nématodes et les fines particules de passer par la partie étroite (8).
Les particules lourdes tombent au fond.
5 - Lorsque l'appareil (3) est presque plein, le bouchon (11) est enlevé et la suspension filtrée à travers un jeu de tamis (10).
6 -Les nématodes sont récupérés dans les différents tamis du bas et le contenu de chaque tamis transféré dans un pot de lecture à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

Remarque : Les valeurs indiquées des débits du flux ascendant sont approximatives.

Cette technique présente un meilleur rendement mais nécessite un équipement plus onéreux que les méthodes précédentes.

1.2.1.3. Centrifugation

Principe

Pour réduire la vitesse de sédimentation des nématodes, on peut remplacer l'eau par une solution ayant une densité légèrement supérieure à celle des nématodes mais la vitesse de sédimentation des particules de sol diminuant également, on l'accélère avec une centrifugation.

La méthode de centrifugation est plus efficace que celle de Baermann ou l'élutriation mais ne peut être utilisée que pour des échantillons de faible volume (Merny et Luc, 1969).

La centrifugation ne se réalise généralement pas sur du sol brut, car les nématodes sont alors entraînés dans le culot avec les particules de sol et le rendement de l'extraction est très faible (Kermarrec et Berge, 1972).
L'extraction par centrifugation est réalisée sur le produit du tamisage d'un sol ou d'un broyat de végétaux. Elle peut également servir à éclaircir les extraits obtenus par sédimentation ou élutriation.

Description de la manipulation

La vitesse de centrifugation est exprimée en g, il s'agit de la « force centrifuge relative » ou FCR exprimée en multiple de g. Elle est fonction du rayon du rotor de la centrifugeuse et de la vitesse de rotation :
$g=11,18.10^{-6}$ x rayon de rotation de la centrifugeuse en cm x (vitesse en tour/min)^2.
Les vitesses pour l'extraction des nématodes vont de 700 à 2900 g. Compte tenu de l'expérience des différents laboratoires, la plus souvent utilisée est égale à 1800 g.

On distingue deux phases de centrifugation :
- une première centrifugation à l'eau élimine les particules organiques légères, de densité < 1, le surnageant obtenu est éliminé.
- une deuxième centrifugation est réalisée dans un liquide de séparation dont la densité se situe entre 1,15 et 1,20, les nématodes sont alors récupérés dans le surnageant.

Liquide de séparation : en général, on utilise une solution de sucrose de **densité 1,18** (485,5g/l), en raison du faible prix de la matière première et de son absence de toxicité (Hendrickx *et al*, 1976).
Le sucrose peut être remplacé par une solution de $MgSO_4$ (voir répertoire des recettes REP 001) ou une solution de $ZnSO_4$, plus fluides, se dégradant moins vite et qui ne présentent pas comme le sucre de risque de pollution par des micro-organismes.

La formation du culot ne peut se faire qu'en présence de kaolin, qui colle les argiles et limons au fond du pot de centrifugation. Cela évite la mise en suspension du culot quand on verse le surnageant (Kermarrec et Berge, 1972).

Le fond du bol de centrifugation doit être hémisphérique pour faciliter les mises en suspension.

Déroulement de la manipulation :

1 - Ajouter du kaolin dans le bol de centrifugeuse contenant l'échantillon à extraire, la quantité à apporter est à moduler selon l'importance du produit recueilli et la taille du bol de centrifugeuse utilisé. Pour un bol de 700 ml, on ajoute environ une cuillère à soupe rase de kaolin.
2 - Compléter le remplissage du bol avec de l'eau et homogénéiser la suspension.
3 - Equilibrer deux à deux les pots destinés à être diamétralement opposés sur le rotor

→ Centrifugation 1 :

4- Centrifuger la suspension durant 4 minutes à 1800 g.

5- Eliminer le surnageant en vidant le bol doucement au-dessus d'un évier, de manière à ne pas perdre le culot.
6 - Mettre en suspension le culot dans le liquide de séparation.

→ Centrifugation 2 :

7- Centrifuger la suspension (à 900 g par exemple) durant 1 à 2 minutes.

→ Récupération

8 - Vider le surnageant sur un tamis de maille inférieure ou égale à 20 µm.
9 - Rincer rapidement pour éliminer le sulfate de magnésium (ou le sucrose) encore présent, et rassembler le contenu du tamis avec une pissette d'eau.
10 - Transférer le contenu du tamis dans un gobelet de lecture à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

Remarque : les vitesses et les durées de centrifugation sont approximatives.

1.2.2. Méthodes utilisant la mobilité des nématodes (extraction à partir de sols, substrats et organes végétaux)

Ces méthodes utilisent la propriété des nématodes libres de quitter leur site habituel et de se mouvoir en milieu aqueux en se dirigeant vers le bas par gravité.

1.2.2.1. Méthode de l'entonnoir de Baermann (1917)

Un tamis (1) est retenu dans la partie supérieure d'un entonnoir (2). L'extrémité du tube de l'entonnoir (3) est équipée d'un tuyau souple clampé (4).
Un filtre papier ou tissu (5) est placé dans le tamis, l'échantillon de sol ou de broyat de végétaux à extraire (6) est placé sur le tissu. De l'eau est versée dans l'entonnoir jusqu'au recouvrement de l'échantillon.
Après une période de 12 heures à 3 jours, les nématodes mobiles ont traversé le tissu et se trouvent à l'extrémité inférieure de l'entonnoir, ils sont récupérés dans un becher (8) en prélevant quelques millilitres en desserrant le clamp (4) .

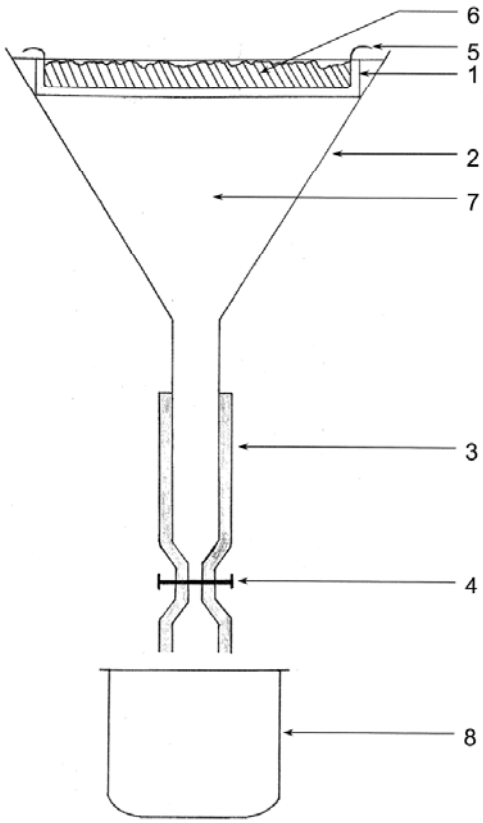


Illustration 4. Méthode de l'entonnoir de Baermann (1917)

Cette méthode est utilisée pour récupérer les nématodes mobiles mais son efficacité reste faible (environ 20% de moins que les autres méthodes).
En effet, la mauvaise oxygénation peut réduire la mobilité des nématodes.

1.2.2.2. Méthode Baermann modifiée (migration sur tamis)

Cette adaptation de la méthode de Baermann vise à pallier le manque d'aération de la méthode d'origine.

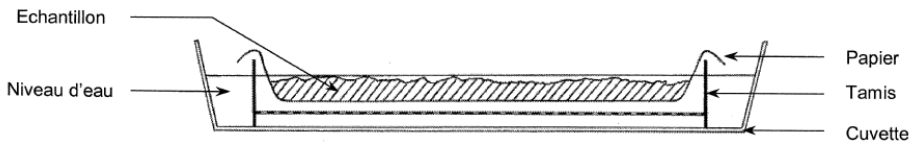


Illustration 5. Méthode de Baermann modifiée

1 - Placer l'échantillon à extraire sur un tamis ou une passoire de maille de 40 µm au moins, éventuellement intercaler un tissu type essuie tout ou filtre à lait entre l'échantillon et le tamis pour les échantillons sales.
2 - Le tout est placé dans une cuvette ou un contenant équivalent dans lequel on versera de l'eau du robinet jusqu'à recouvrir l'échantillon.
3 - Laisser incuber 24 à 48 heures, les nématodes migrent alors dans l'eau de la cuvette.
Après ce laps de temps, le tamis est retiré, l'eau de la cuvette est passée à travers un tamis de 20 µm afin de concentrer les nématodes présents dans la suspension.
On peut également verser l'eau de la cuvette dans un bécher et laisser décanter pendant 2 heures au moins.

Les nématodes vont alors se concentrer au fond du bécher et il suffit d'éliminer avec précaution l'eau en surface avant d'examiner la suspension.

Cette méthode est classiquement utilisée pour les extractions de nématodes mobiles à partir de broyats de végétaux, de semences, de terreaux organiques ou de faibles quantités de sol. Elle peut aussi servir à clarifier une solution après élutriation.

1.2.2.3. Brumisation incubation (Seinhorst, 1950)

Comme les méthodes de Baermann et dérivées présentent un manque d'aération préjudiciable aux nématodes, Seinhorst (1950) a mis au point un appareil qui permet la création d'une atmosphère humide sur l'échantillon avec une fine pellicule d'eau constamment renouvelée.

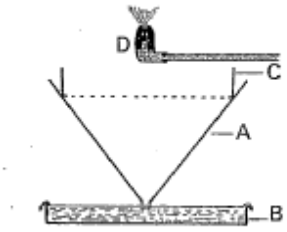


Illustration 6. Asperseur de Seinhorst

Le matériel végétal est placé dans un tamis (C) posé à la partie supérieure d'un entonnoir (A). Un fin brouillard produit par un asperseur (D) maintient l'échantillon continuellement humide.
L'eau qui coule le long du matériel entraînant les nématodes suit l'entonnoir. Elle est recueillie dans un récipient (B) muni d'un trop plein au fond duquel les nématodes sédimentent.

1.2.3. Destruction du milieu (extraction à partir de produits végétaux)

La sortie des nématodes à partir des tissus végétaux est progressive, quelle que soit la méthode employée (aspersion, Baermann…).
Pour évaluer la population existant à un moment donné, le plus efficace est une destruction rapide des tissus végétaux. Deux méthodes sont proposées :

1.2.3.1. Destruction par broyage

Stemerding (1950) décrit une méthode d'extraction des nématodes des racines à l'aide d'un broyeur ménager.
Le broyage, mais également le tranchage ou la dilacération peuvent être utilisés pour extraire les nématodes à partir de végétaux tels que bulbes, rhizomes, feuilles…
La suspension obtenue contient des débris de racines en plus des nématodes, il convient de les séparer à l'aide d'une filtration (méthode Baermann modifiée) ou d'une centrifugation.

1.2.3.2. Digestion enzymatique

Cette technique permet d'éviter le broyage de l'échantillon pour l'extraction de nématodes endoparasites (formes renflées ou filiformes).
La digestion enzymatique est réalisée à l'aide d'enzymes pectinolytiques et cellulolytiques (ARAYA, 1993). La composition idéale du mélange enzymatique est de 15% de pectinase et 30% cellulase, à compléter avec de l'eau (voir répertoire des recettes REP 001).

Déroulement de la manipulation

1 – Préparation de l'échantillon
L'échantillon est analysé après l'avoir découpé en tranches (tubercules de pomme de terre) ou découpé en tronçons de 1 à 2 cm (racines)

2 – Agitation
Placer le produit à analyser dans un récipient pour agitation. Ajouter le mélange enzymatique de manière à recouvrir le matériel végétal et permettre l'agitation.
Placer la préparation sur un agitateur (orbital de préférence) et laisser agiter au minimum 4 heures pour des racines et 8 heures pour des tubercules de pomme de terre.

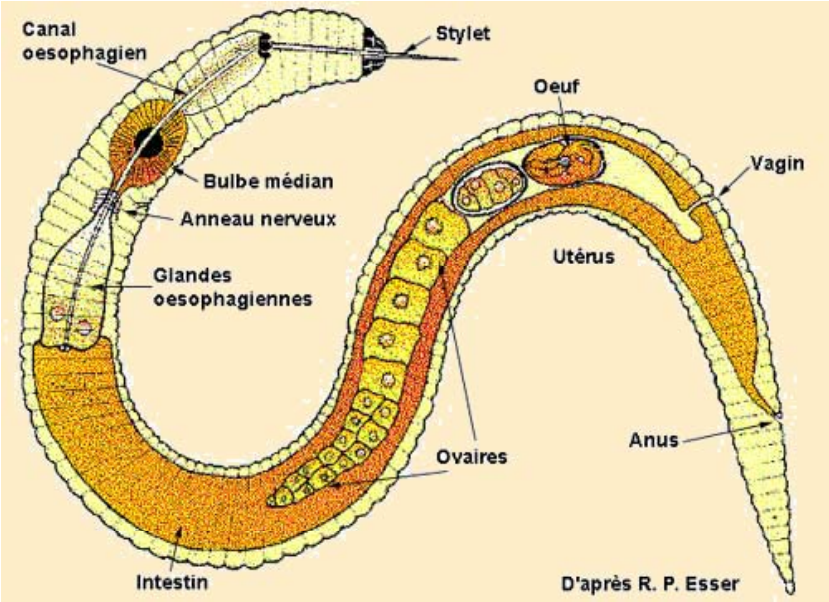
3 – Tamisage et récupération
Verser le produit de la digestion sur un tamis de 600 µm posé sur un tamis de 160 µm (extraction de nématodes de forme renflée) ou de 40 µm (nématodes filiformes).
Laver le contenu du tamis de 600 µm par un courant d'eau et triturer les débris retenus pour faciliter le passage du jus issu de la digestion.
Eliminer le contenu du tamis de 600 µm.
Rassembler le contenu du tamis de 160 ou de 40 µm à l'aide d'un jet d'eau.
Si l'extrait obtenu est suffisamment clair après le tamisage, la centrifugation n'est pas indispensable l'extrait est alors transféré directement dans un pot de lecture.
Transférer à l'aide d'une pissette contenant du liquide de séparation (par exemple MgSO4 de densité 1,18) dans un bol de centrifugation.
Ajouter une cuillerée à soupe de kaolin et agiter.

4 – Centrifugation
Centrifuger la suspension durant 2 min à 900 g.

5 – Récupération sur tamis et conditionnement
Vider le contenu du bol sur un tamis de 20 µm préalablement humidifié.
Eliminer le culot.
Rassembler les particules retenues par le tamis de 20 µm avec un jet de pissette d'eau.
Transférer le contenu du tamis de 20 µm dans un pot de lecture.

1.3. Identification morphobiométrique

La cuticule d'un nématode est transparente, permettant ainsi l'observation des organes internes à l'aide d'une loupe binoculaire équipé d'un éclairage diascopique. Les organes visibles sont principalement ceux du système digestif et ceux du système reproducteur.
L'appareil digestif comprend le stylet, l'œsophage et l'intestin qui débouche à l'extérieur par l'anus.
L'*œsophage* qui occupe la partie entre la base du stylet et l'intestin est constitué de 3 parties : le procorpus antérieur, le bulbe médian similaire à une pompe aspirante (très visible chez certaines espèces comme les *Aphelenchoides*) et les glandes oesophagiennes qui produisent les enzymes digestives.
Le reste du corps est occupé par l'intestin et l'appareil reproducteur.
Chez la femelle, l'appareil reproducteur comprend un ou deux ovaires, l'utérus avec les œufs et le vagin qui débouche à l'extérieur par la vulve. La position de la vulve par rapport à la tête est un des critères essentiels de différenciation entre les genres.
Chez le mâle, la gonade est allongée et tubulaire et s'étend sur plus de la moitié du corps. Les mâles possèdent deux pièces rigides et mobiles, appelées spicules utilisées lors de la copulation. La forme des spicules peut aider à l'identification de certaines espèces de nématodes (*Bursaphelenchus* par exemple).



http://www.congo.ird.fr/html/nematode.htm

Illustration 7. Anatomie générale d'un nématode

1.3.1. Identification des genres

L'identification des genres est basée sur des caractères morphologiques observables à la loupe binoculaire tels que :
la taille et la forme du nématode, la présence et la forme du stylet et des boutons basaux, la position de la vulve, le recouvrement intestinal par les glandes oesophagiennes, la forme de la queue, de la tête…

Le matériel nécessaire est le suivant :
- loupe binoculaire à éclairage épiscopique et diascopique, de grossissement x 6 à x 60
- coupelles d'observation

La suspension aqueuse issue de l'extraction est versée dans une coupelle d'observation (de la taille d'une boite de Petri par exemple) puis observée à la loupe binoculaire.

Clé d'identification des principaux genres observés
(observations des femelles à la loupe binoculaire)

Définitions :
- Setae : soies tactiles en avant de la tête
- Boutons basaux : base du stylet,
- Limite (œsophageo-intestinale) : recouvrement de l'intestin par les glandes oesophagiennes, il peut être oblique ou droit.
- Habitus : forme du nématode au repos ou mort

Présence de setae céphalique ---------- nématode non phytoparasite
Absence de setae céphalique ---------- 1

1. présence d'un stylet ---------- 2
   absence de stylet ---------- nématode non phytoparasite

2. - présence de boutons basaux ---------- 3
   absence de boutons basaux ---------- 23

3. - présence d'un bulbe médian avec valvule ---------- 4
   absence de bulbe médian ---------- 21

4. - femelle filiforme ---------- 5
   femelle renflée ---------- 20

5. vulve médiane (V ≈ 50%) ---------- 6
   vulve postérieure (V ≥ 60%) ---------- 13

6. limite droite ---------- 7
   limite oblique ---------- 9

7. stylet < 50 µm ---------- 8
   stylet > 80 µm ---------- *Dolichodorus, Macrotrophurus*

8. queue en spatule ---------- *Psilenchus*
   queue conique à arrondie ---------- *Tylenchorhynchus, Merlinius Trophurus*

9. tête offset ---------- 10
   tête non offset ---------- 11

10. stylet massif (40 à 50 µm) ---------- *Hoplolaimus*
    stylet long et fin (> 90 µm) ---------- *Belonolaimus*

11. longueur du corps 0,5 à 1 mm ---------- 12
    longueur du corps 2 à 3 mm ---------- *Hirschmanniella*

12. habitus droit ---------- *Radopholus*
    habitus spiralé ---------- *Rotylenchus, Scutellonema Helicotylenchus*

13. (vulve postérieure)
    cuticule fortement annelée, stylet allongé ---------- 14
    cuticule non annelée, stylet court ---------- 16

14. cuticule double bien séparée ---------- *Hemicycliophora, Hemicriconema*
    absence de cuticule double ---------- 15

15. annelations avec épines ou ornementations ---------- *Criconema*
    annelations sans épine ou ornementations ---------- *Mesocriconema*

16.habitus droit ---------- 17
habitus en spirale ---------- *Helicotylenchus, Rotylenchus*

17.bulbe médian distinct mais non prononcé ---------- 18
bulbe médian bien développé ---------- *Aphelenchoides, Bursaphelenchus*

18.limite oblique ---------- 19
limite droite ---------- *Tylenchus, Paratylenchus*

19.bulbe médian peu développé, stylet faible ---------- *Ditylenchus*
!!(certaines espèces ont une limite droite)
valve du bulbe médian et stylet bien développés ---------- *Pratylenchus*

20.(femelle renflée)
femelle blanche sans œufs à l'intérieur ---------- *Meloidogyne, Tylenchulus, Nacobbus*
corps de la femelle brun et chitinisé, œufs à l'intérieur *Heterodera, Globodera*

21.(absence de bulbe médian)
longueur du corps < 1mm, stylet court et courbe ---------- *Trichodorus*
longueur du corps > 1mm, stylet long et droit ---------- 22

22.base du stylet renflée ---------- *Xiphinema*
base du stylet non renflée ---------- *Longidorus*

23.(absence de boutons basaux)
queue arrondie ---------- *Aphelenchus*
queue pointue ---------- *Seinura*

1.3.2. Identification spécifique

L'identification des espèces de nématodes par morphobiométrie est réalisée à l'aide d'un microscope équipé d'un dispositif de mesure étalonné (lentille micrométrique, tube à dessin ou logiciel de mesure).

Matériel :

- loupe binoculaire à éclairage épiscopique et diascopique, de grossissement x6 à x60
- Microscope photonique de grossissement x16 à x1000 (à immersion)
- Coupelles d'observation
- Aiguille fine ou « cil » pour sortir les nématodes de l'eau. L'aiguille doit être très acérée. On peut en fabriquer une avec un fragment de bambou ou monter sur un manche un cil maintenu par du vernis.
- Lames porte-objet en verre
- Lamelles couvre-objet de 16 à 22 mm de large, rondes ou carrées
- Lut ou vernis à ongles par exemple
- Pinceau pour appliquer le lut
- Liquide de montage :
  -solution aqueuse de formaldéhyde à 3% ou tout autre fixateur approprié.
  -pour un montage à observer dans l'heure qui suit, on utilise de l'eau
- Huile à immersion pour l'observation au microscope à objectif x 100

1.3.2.1. Technique de montage temporaire d'un nématode sur lame

Placer la suspension de nématodes dans une coupelle peu profonde que l'on observe sous la loupe binoculaire à grossissement x10 à x30.
Placer une goutte de liquide de montage sur une lame porte-objet posée à portée de main.
Tout en regardant dans la loupe binoculaire, porter le cil dans le champ de vision, choisir un nématode et glisser le cil sous son corps (1).
Le soulever ensuite avec précaution en faisant varier la mise au point afin de le voir toujours nettement.
Quand le nématode affleure à la surface de l'eau, le sortir d'un geste vif et le déposer dans la goutte d'eau sur la lame porte-objet (2).

Répéter l'opération avec quelques spécimens (3).
Déposer délicatement une lamelle couvre-objet sur la goutte (4).
Tuer les nématodes à l'aide d'une source de chaleur, en déposant la lame sur une plaque chauffante, de préférence.
Absorber l'excès de liquide éventuel à l'aide d'un buvard (5). Réaliser cette opération à la loupe afin de ne pas aspirer les nématodes.

Appliquer le lut ou le vernis à l'aide du pinceau sous la loupe également (6).

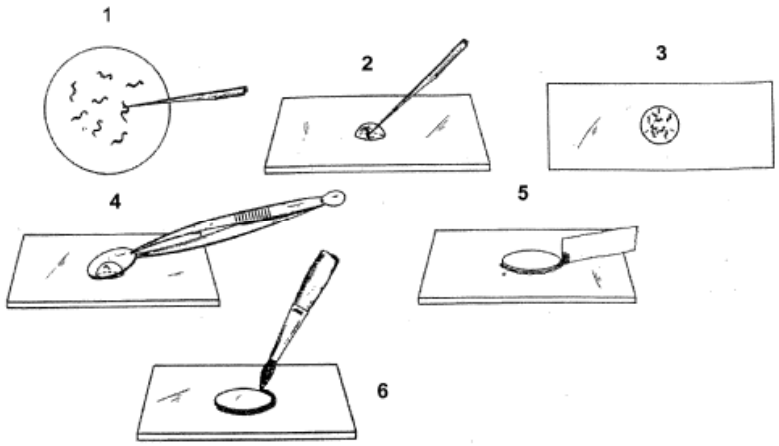


Illustration 8. Technique de montage temporaire d'un nématode sur lame

1.3.2.2. Identification

L'observation des nématodes au microscope est indispensable pour réaliser les examens morphologiques et les mesures permettant de différencier les espèces les unes des autres.
Une fois les mesures réalisées, les espèces peuvent être caractérisées grâce à des paramètres connus sous le nom d' « indices de De Man » qui sont désignés par des lettres dans les descriptions :

n = nombre de spécimens à partir desquels sont basées les mesures
L = longueur du corps
V= (distance entre la vulve et l'extrémité antérieure du nématode / L) en %
a = longueur / largeur du corps (à l'endroit le plus large)
b = L / distance de la partie antérieure de la tête au début de l'intestin
b' = L / distance de la partie antérieure de la tête à la fin de l'œsophage
c = L / longueur de la queue
c'=longueur de la queue / diamètre de la queue au niveau de l'anus
N.B : queue= partie du nématode comprise entre l'anus et l'extrémité postérieure du corps
s = longueur du stylet
T = (longueur de la gonade mâle / L) en %
o = (distance de l'ouverture de la glande oesophagienne dorsale aux boutons basaux / longueur du stylet) en %
P = (distance de la phasmide à l'anus / longueur de la queue) en %
P_a = (distance de la phasmide antérieure à l'extrémité antérieure du nématode/L) en %
P_p = (distance de la phasmide postérieure à la tête du nématode / L) en %
G_1 = (longueur de la gonade antérieure femelle / L) en %
G_2 = (longueur de la gonade postérieure femelle / L) en %

Dans les descriptions d'espèces, les paramètres sont exprimés en moyennes et intervalles de valeurs entre parenthèses, avec les unités de mesure quand les indices ne sont pas des ratios, selon l'exemple suivant :

Pour n= 20 femelles, L = 1,2 (0,9-1,45) mm, a = 32 (26,8-35,1), b = 9,2 (7,8-10,3),b' = 6,3 (5,2-5,3), V = 53 (50-56) %, stylet = 25 (23-28) µm……

2. Nématodes formes enkystées

Cette partie concerne les kystes de nématodes et leur contenu larvaire. Les autres stades de ces mêmes nématodes (mâles, femelles et larves libres) font l'objet de la partie « formes non enkystées ».

Définition :
⬧ Kyste : Corps de la femelle du nématode transformée en enveloppe protectrice d'œufs et de larves de stades L1 et L2.

Produits analysés :
⬧ Sol, support de culture ou produit terreux.
⬧ Organes végétaux souterrains tels que bulbes, caïeux, rhizomes, racines, et tubercules.

Remarque : le maillage des tamis spécifié dans la présente méthode ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer régulièrement du bon état des tamis.

2.1. Préparation des échantillons

2.1.1. Sols

Le prélèvement de la prise à analyser est précédé par une élimination des cailloux et des gros débris végétaux, une réduction des mottes, et une homogénéisation du produit. Un tamis de maille 4 ou 5 mm peut être utilisé pour parfaire la préparation.
Pour les extractions avec l'appareil de Fenwick ou la centrifugeuse de Schuiling, les échantillons sont séchés au préalable à l'air libre ou dans une enceinte ventilée à une température inférieure à 35 °C afin d'éviter l'altération du contenu larvaire des kystes. Le séchage des échantillons n'est par contre pas nécessaire avec les autres appareils indiqués ci-après.

En cas d'utilisation d'une enceinte ventilée, la ventilation doit être extrêmement modérée : les kystes sont très légers et peuvent être emportés par les courants d'air.

2.1.2. Organes végétaux souterrains

L'analyse porte sur la totalité du produit reçu ou sur une fraction représentative de celui-ci.

2.2. Extraction

2.2.1. Principe

Les kystes sont séparés des autres fractions de l'échantillon grâce à :

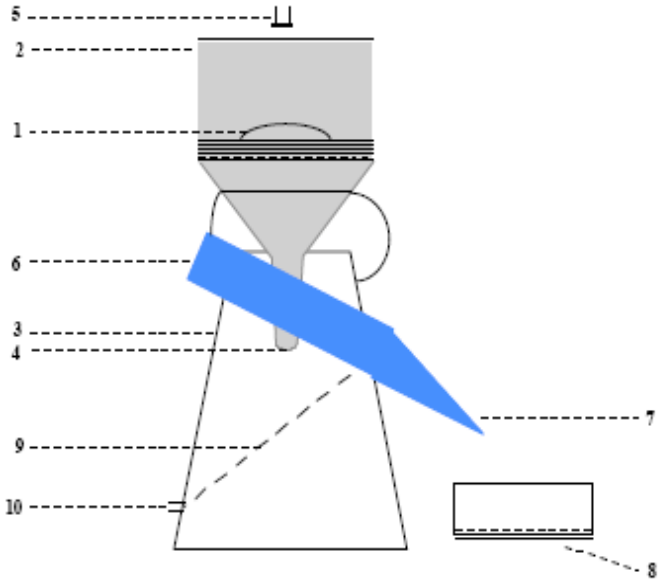
⬧ leur densité : inférieure à 1 pour les kystes secs de *Globodera*, légèrement supérieure à 1 pour les kystes de *Globodera* humides et pour les kystes d'autres genres,

⬧ leur taille : comprise entre 200 et 600 µm.
Les méthodes utilisées consistent en une mise en suspension de l'échantillon dans de l'eau (flottation des kystes), tamisage du surnageant, et récupération du produit sur un tamis de maille adaptée à la taille des kystes recherchés (160 à 250 µm).

2.2.2. Extraction à partir d'un sol sec

Appareil de Fenwick (technique d'extraction manuelle)

Ce matériel est utilisable pour l'extraction des kystes de *Globodera* à partir d'un sol sec. Poids maximal de l'échantillon : 300 g.



1-échantillon
2-tamis supérieur maille 1 mm
3-corps de l'appareil
4-sortie de l'entonnoir
5-arrivée d'eau sous pression
6-collerette de récupération
7-sortie de l'extrait
8-tamis de récupération de l'extrait
9-fond incliné
10- sortie-évacuation

Illustration 9. Appareil de Fenwick

Dépôt de l'échantillon (1) dans le tamis supérieur de l'appareil préalablement rempli d'eau.
A l'aide d'un courant d'eau (5), le sol est entraîné dans l'appareil à travers le tamis supérieur de maille de 2 mm au plus.
L'apport d'eau permet d'évacuer les éléments de densité inférieure à 1 (débris organiques et kystes) vers le tamis de maille 250 µm (8) placé sous la collerette de récupération (6).
L'apport d'eau est maintenu jusqu'à épuisement de l'échantillon.

Centrifugeuse de Schuilling (**technique d'extraction semi-automatique)**
(Hietbrink H. et Ritter C.E, 1982)

Ce matériel est utilisable pour la détection des kystes de *Globodera* à partir d'échantillons de sol sec. Poids maximal de l'échantillon : 300 g.

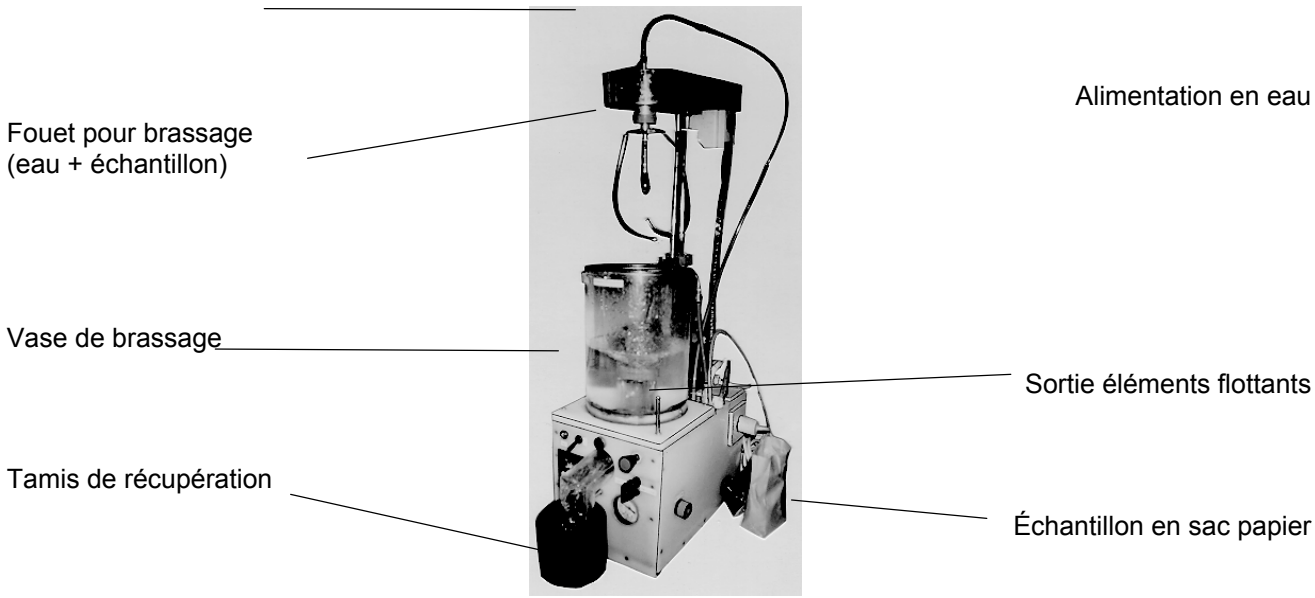


Illustration 10. Centrifugeuse de Schuilling

1 - Dépôt de l'échantillon de sol sec dans le vase de brassage, partiellement rempli d'eau.
2 - Mise en rotation du fouet : dispersion du sol dans l'eau et création d'un vortex.
3 - A l'arrêt de la rotation du fouet, les éléments les plus légers (kystes et les matières organiques) flottent et passent à travers un tamis cylindrique central de maille 1,5 mm.
4 - Evacuation des éléments flottants vers le tamis de récupération de maille de 250 µm.
5 - Rinçage au jet de l'extrait recueilli pour éliminer les particules terreuses les plus fines.
6 - Passage si nécessaire du produit dans l'appareil de séparation associé (colonne d'Arvo). Cette deuxième opération permet de réduire le volume de l'extrait à examiner ultérieurement.

Le produit est recueilli sur un tamis de maille de 250 µm en sortie de la colonne d'Arvo ou dans un filtre papier disposé dans la nacelle de cet appareil.

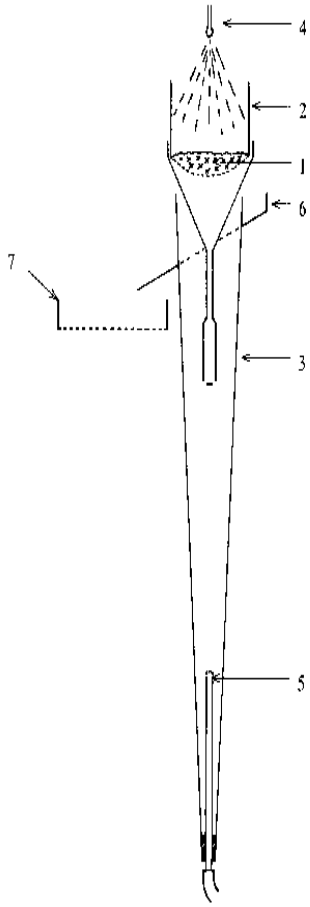
Autres matériels

Les matériels et techniques présentés dans le paragraphe 2.2.3. sont également utilisables pour extraire les formes enkystées dans un sol sec.

2.2.3. Extraction à partir d'un sol humide

Les techniques décrites sont utilisables pour extraire des kystes dont le contenu larvaire risque d'être altéré par le dessèchement (ex : *Heterodera schachtii*), ou lorsque le délai de réponse demandé ne permet pas d'entreprendre un séchage. Elles sont également utilisables pour la détection de l'ensemble des nématodes à kystes, et en particulier des genres *Globodera*, *Heterodera* et *Punctodera*.

Appareil d'Oostenbrinck ou appareil de Kort (Oostenbrinck M. , 1960)

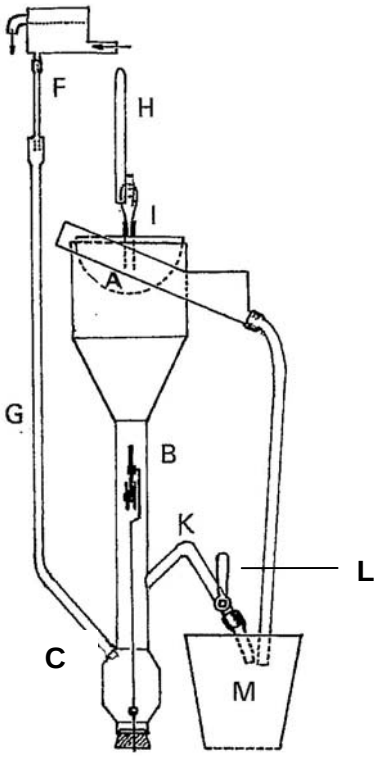


Cet appareil fonctionne sur le même principe que l'élutriateur pour extraire les formes libres, avec une gouttière inclinée comme l'appareil de Fenwick.

La colonne de l'appareil (3) est remplie d'eau et alimentée en continu dans sa partie inférieure (5) par un débit égal ou supérieur à 4 litres par minute.
L'échantillon (1) est entraîné à l'aide d'un jet d'eau (4) au travers du tamis supérieur (2) de maille au plus égale à 2 mm vers un entonnoir qui plonge dans le corps de l'appareil.
Les kystes de densité inférieure ou légèrement supérieure à 1 flottent ou sont entraînés par le flux d'eau ascendant.
Ils sont ensuite conduits par débordement dans la collerette de récupération (6), sous laquelle est placé un tamis de 160 à 250 µm (7) selon l'espèce recherchée.
L'apport d'eau est maintenu jusqu'à épuisement de l'échantillon.

Illustration 11. Appareil d'Oostenbrinck ou appareil de Kort

Appareil de Seinhorst (Seinhorst, 1964)



Le courant ascendant délivré par le tube G est fourni par le tube F dans lequel circule de l'eau maintenue sous pression par un dispositif à niveau constant.
Les particules les plus denses demeurent dans la partie C et le bas de la partie B.
Les kystes les plus légers sont récupérés par le tube relié à la collerette située en A.
Les kystes les plus lourds sont récupérés par le tube K en ouvrant le robinet L.

Illustration 12. Appareil de Seinhorst (Seinhorst, 1964)

Des modèles semi-automatisés sont commercialisés.

Autres matériels

L'utilisation d'autres appareils d'extraction est possible sous réserve d'être évalués et validés.

2.2.4. Extraction à partir d'organes végétaux souterrains

Le produit à analyser est lavé par trempage, et brossage dans de l'eau.
Cette opération peut être réalisée dans tout contenant d'un volume suffisant. Un bac de lavage peut être aménagé à cet effet.
L'eau issue du lavage est passée sur un tamis de récupération de 160 à 250 µm selon la taille des kystes à rechercher. La mise en place d'un tamis de 1 mm sur le tamis de récupération permet d'éliminer les débris végétaux (fragments d'épiderme).
Pendant les opérations de lavage :
- éviter tout débordement (dans le bac de lavage et dans le tamis de récupération),
- rincer les parois du bac de lavage au jet, et passer l'eau de rinçage sur le tamis de récupération.

Lorsque le produit à analyser (organes végétaux souterrains) est terreux et sec, le prélèvement à analyser peut être obtenu par secouage sur une bâche ou dans un bac. Le produit terreux ainsi recueilli est ensuite traité selon les techniques indiquées dans les § 2.2.2 et 2.2.3.

2.3. Préparation de l'extrait

2.3.1. Récupération et séchage

La fraction retenue sur tamis est nettoyée sous pression d'eau à l'aide d'un jet fin pour éliminer les particules terreuses les plus fines. Elle est ensuite récupérée sur papier filtre par un jet de pissette.
Le filtre et son contenu sont alors mis à sécher naturellement à température ambiante.
Les températures > 35°C sont à proscrire car le contenu des kystes peut être altéré.

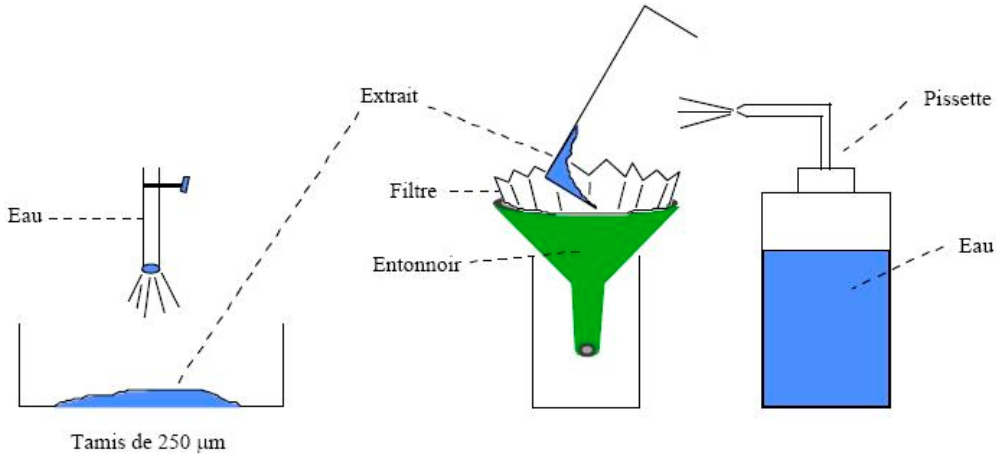


Illustration 13. Schéma de récupération et séchage

2.3.2. Remise en suspension de l'extrait sec et recueil du surnageant

Une bande de papier buvard est disposée dans un cristallisoir, contre la paroi verticale, en faisant chevaucher légèrement les extrémités.
Le cristallisoir est rempli d'eau à un niveau correspondant aux trois quarts de la hauteur de la bande.
L'extrait sec est trituré pour obtenir un produit de texture fine, et versé dans le cristallisoir.
La suspension est brassée délicatement pour disperser les éléments de l'extrait, puis laissée au repos jusqu'à l'immobilité des particules flottantes.
Une goutte de dispersant est alors déposée au centre du cristallisoir pour repousser les particules flottantes vers la bande de buvard.
Enfin, la bande est retirée délicatement du cristallisoir, et placée sur un support adapté (planchette par exemple) en vue du tri des kystes.

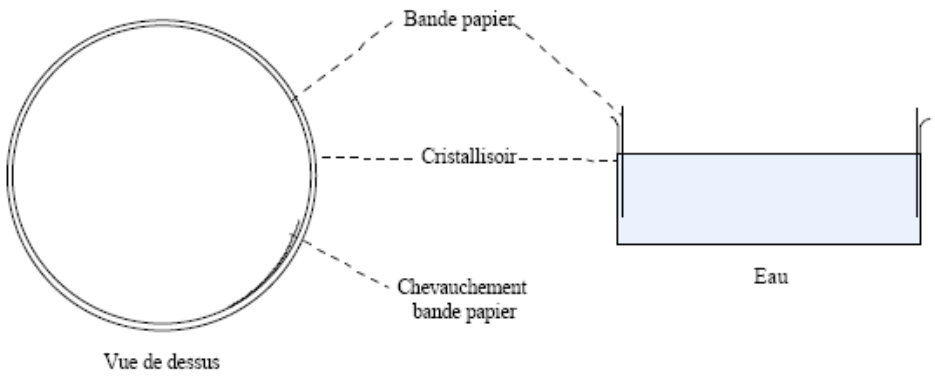


Illustration 14. Disposition du papier filtre dans le cristallisoir

Variantes :

L'extrait recueilli en fin d'extraction sur un filtre papier, peut être lu sans séchage ni préparation préalable.

Un tamis de 800 µm peut être disposé sur le cristallisoir utilisé pour la préparation de l'extrait pour parfaire la séparation des kystes (élimination des particules les plus grosses).

L'extrait obtenu après extraction peut, après séchage, être préparé en utilisant de l'acétone (densité 0,79) pour séparer les kystes et la matière organique. L'extrait sec est placé dans une fiole à col long remplie pour partie d'acétone. Après agitation, le remplissage de la fiole est complété par ajout d'acétone. La partie supérieure de la fiole (zone où se situent les kystes éventuels) est versée sur un filtre papier. L'extrait ainsi obtenu peut être lu rapidement en raison de la brièveté du séchage (grande volatilité de l'acétone) et de la faible quantité d'éléments organiques (sédimentation au fond de la fiole des débris organiques majoritairement plus denses que l'acétone).
La séparation des kystes de la matière organique, en utilisant de l'acétone, doit être effectuée sous hotte.

2.4. Tri visuel des kystes

La bande ou le filtre humide supportant l'extrait est disposé sous la loupe binoculaire pour un examen visuel. Les kystes recherchés sont séparés manuellement des autres éléments de l'extrait en utilisant par exemple un pinceau ou une aiguille montée.

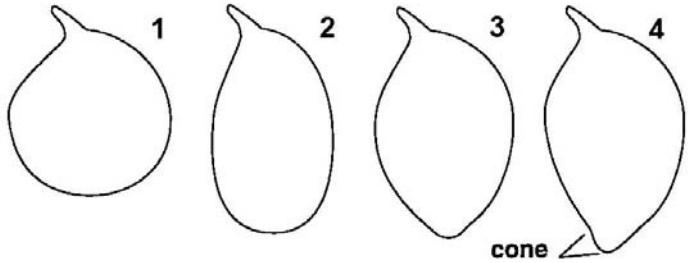


Illustration 15. Forme des kystes (d'après Baldwin *et al*, 1991)

Les kystes peuvent être regroupés d'après leur forme, en 4 catégories (voir ci dessus):
1- sphérique (exemple *Globodera* sp.)
2- ovoïde (exemple *Punctodera* sp.)
3- citriforme avec cône peu proéminent (exemple *Heterodera cruciferae*)
4- citriforme avec cône proéminent (exemple *Heterodera schachtii*)

Laisser sécher la bande 1 à 2 heures pour faciliter la collecte des kystes. Au-delà il peut être nécessaire de ré-humidifier.
Collecter les kystes à l'aide d'un pinceau humide et les déposer dans des microtubes.
Laisser sécher les kystes dans les microtubes ouverts avant de les fermer.

Les kystes conditionnés en microtubes sont conservés au frais ou à température ambiante, à l'écart de toute source de chaleur. Les kystes de *H. schachtii* sont conservés dans de l'eau et au frais, en raison de la fragilité de leur contenu larvaire.

2.5. Identification spécifique morphobiométrique

L'identification morphobiométrique des formes enkystées consiste en un examen microscopique d'un ou plusieurs kystes et des œufs ou des larves qu'ils renferment.

2.5.1. Examen des kystes

2.5.1.1. Examen externe à la loupe binoculaire

La forme générale du kyste, la présence ou non de cône vulvaire et la forme de celui-ci, permettent de déterminer le genre, et pour *Heterodera* le groupe d'espèces.

2.5.1.2. Examen microscopique de la région périnéale

Organisation des fenêtres anales et vulvaires

Cette zone située à l'extrémité du cône vulvaire ou pour les kystes sans cône à l'opposé de la tête, comprend l'anus et la vulve à laquelle sont rattachées diverses structures.

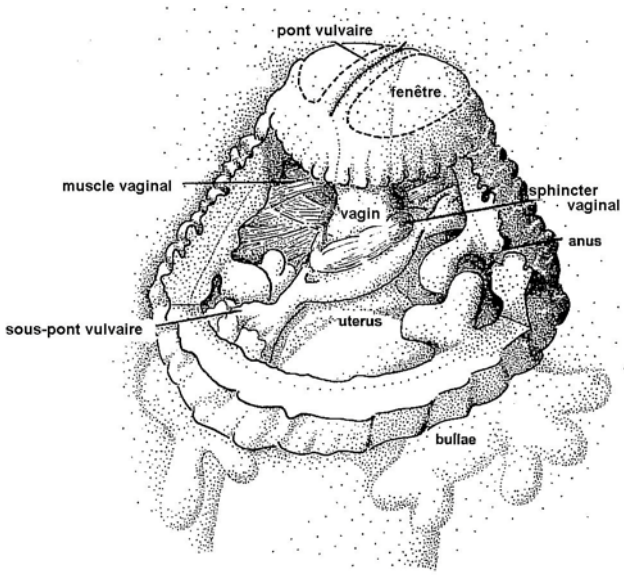


Illustration 16. Structure du cône vulvaire d'un *Heterodera* (d'après Baldwin et al, 1991)

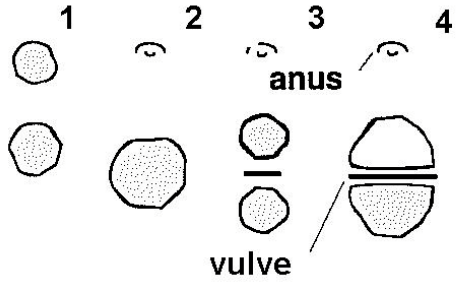


Illustration 17. Zones périnéales de kystes (d'après Baldwin *et al*, 1991)

1 : Zones vulvaire et anale circumfenestrées (*Punctodera*)
2 : Zone vulvaire circumfenestrée et absence de fenêtre anale (*Globodera* et *Cactodera*),
3 : Zone vulvaire bifenestrée (*Heterodera*)
4 : Zone vulvaire ambifenestrée (*Heterodera*)

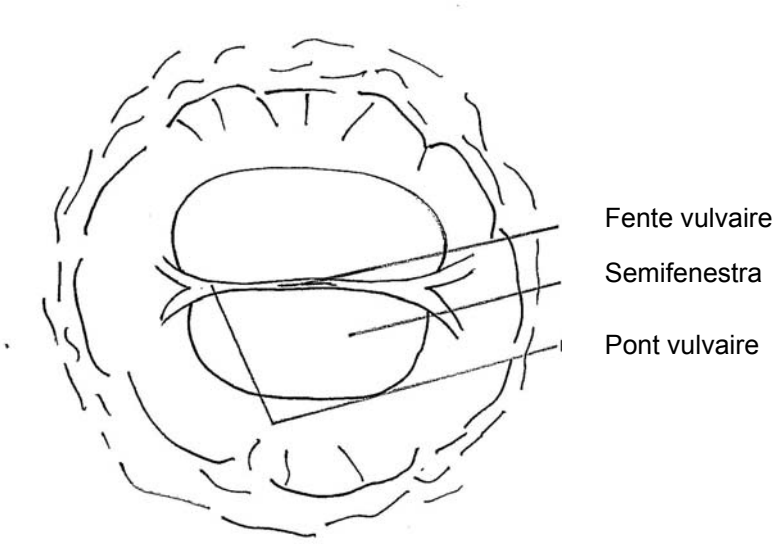


Illustration 18. Cône vulvaire vu de face

Préparation des kystes

- Les kystes secs sont mis à tremper dans de l'eau durant au moins 24 heures.
- Les cônes vulvaires sont disséqués sur une lame de plexiglass dans une goutte d'eau.
- L'intérieur du cône est nettoyé avec un cil.
- Le cône est décoloré par trempage quelques minutes dans de l'eau oxygénée à 30%.
- Le cône est ensuite mis à tremper dans de l'essence de girofle après passage dans de l'alcool à 70% pour parfaire le nettoyage.
- Montage des kystes entre lame et lamelle, dans une goutte de baume du Canada ou de gomme de Faure (montages permanents).
- Utiliser des cales (fragments de lamelles) pour éviter l'écrasement des cônes.
- Les préparations sont serties avec du lut (montage permanent) ou du vernis (montage temporaire).
- En l'absence de cône proéminent (exemple : *Globodera*) un simple montage temporaire dans de l'eau peut être réalisé.

Critères observés

Les préparations sont examinées sous microscope à fort grossissement.
Les critères morphologiques les plus utilisés sont les suivants :

- Ornementations cuticulaires de la zone périnéale

- Diamètre de la fenêtre vulvaire

- Distance vulve anus

- Rapport de Granek (distance vulve anus / diamètre de la fenêtre vulvaire)

De nombreux autres critères peuvent être utilisés : présence ou absence de bullae, développement du sous-pont, longueur de la fente vulvaire, présence de masse d'œufs, etc…

2.5.2. Examen des larves contenues dans les kystes

Les larves prélevées lors de la dissection du kyste sont montées et examinées comme indiqué pour les formes non enkystées (1.3.2.1.).

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

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

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire national de la protection des végétaux remercie :

- l'INRA BIO 3 P Le Rheu ;
- le GEVES Beaucouzé
- l'IRD Fort de France
- l'INRA Sophia Antipolis

pour l'expertise qu'ils ont mobilisée lors de la revue de la présente méthode.

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

ARAYA M., CASWELL-CHEN E.P. (1993) Enzymatic digestion of roots for recovery of root-knot nematode developmental stages. *Journal of Nematology* 25 (4) , 590-595.

BAERMANN G. (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijschrift Ned-indie* 57, 131-137.

BALDWIN J.G., MUNDO-OCAMPO M. (1991) *Heteroderinae*. In : *Manual of Agricutural Nematology*, Nickle W.R. Ed, p 310.

BEEN T.H., Van BEKKUM P.J., van BEERS T.G., BENIERS A. (2007) A scaled-up Seinhorst elutriator for extraction of cyst nematodes from soil. *Nematology* 9 (3), 431-435.

BELAIR G. (2005) les nématodes, ces anguillules qui font suer les plantes par la racine. *Phytoprotection* 86 (1) 65-69.

BRIDGE J., STARR J.L. (2007) *Plant nematodes of agricultural importance*. Manson Publishing. 152 pp.

CAVENESS F.E., JENSEN H.J. (1955) Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of their eggs from soil and plant tissue. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 22 , n°2, 87-89.

COBB, N.A. (1918) *Estimating the nema population of the soil*. Agric. Tech. Circ. Bur. Pl. Ind. U.S. Dep. Agric., n°1, 48 pp.

DROPKIN V.H., SMITH W.L., MYERS R.F. (1960) Recovery of nematodes from infected roots by maceration. *Nematologica* 5, 285-288.

FENWICK D.W. (1940) methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology* 18, 155-172.

FLEMING C.C., POWERS T.U. (1998) Potato Cyst Nematodes Diagnostic. In: *Potato Cyst Nematodes*, MARK R.J. and. BRODIE B.R Eds, page 97.

GOODEY J.B. (1963) *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Technical Bulletin 2, , London, ADAS Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 4th edition, 72 pp.

HENDRICKX G.J., COOLEN W.A. et MOERMANS R. (1976) Influence de la nature et de la densité des liquides de séparation sur les nématodes pendant le processus de centrifugation-flottation. *Nematologia mediterranea* 4, 31-40.

HIETBRINK H., RITTER C.E. (1982) Separating cysts from dried soil samples by a new centrifugation and flotation method. *Abstracts, XVIth international symposium, European Society of Nematologists,* St Andrews, 28-29.

JENKINS W.R. (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48, 692.

KERMARREC A. et BERGE J.B. (1972) Méthodes d'estimation des populations de nématodes des sols et des racines. *Bulletin de la Société d'Ecologie* t III, 2, 151-169.

MARCHE L. (2001) *Notion de l'espèce chez les nématodes phytoparasites*. Mémoire de fin d'études, Conservatoire National des Arts et Métiers Centre régional associé de Rennes Antenne CNAM/ENSAR.

MERNY G., LUC M. (1969) Les techniques d'échantillonnage des peuplements de nématodes dans le sol. In : LAMOTTE M. (ED.) et BOURLIERE F. (ED.) *Problème d'écologie : l'échantillonnage des peuplements animaux des milieux terrestres*. Paris : Masson, 1969, p.237-273.

MULVEY R.H., Golden A.M. (1988) Key of the Cyst-forming Genera and Species of *Heteroderidae* in the Westhern Hemisphere. *Journal of Nematology* 15, 1.

OOSTENBRINK M. (1960) Estimating nematodes populations by some selected methods. In: *Nematology* edited by SASSER J.N and JENKINS W.R. The University of North Carolina Press, Chapel hill, 85-102.

SEINHORST J.W (1950) De betekenis van de toestand von de grond voor het optreden van aanstasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* Kuhn Filipjev). *Tijschrift over Plantenziekten* 56, 291-349.

SEINHORST, J.W. (1955) Een eenvoudige methode voor het afscheiden van aaltjes uit grond. *Tijschrift over Plantenziekten*, 61, 188-190.

SEINHORST J.W. (1962) Extraction methods for nematodes inhabiting soils. In: *Progress in soil zoology*, edited by W. MURPHY, London, Butterworths, 243-256.

SEINHORST J.W. (1964) Methods for the extraction of Heterodera cysts from not previously dried soil samples. *Nematologica* 10, 87-94.

SOUTHEY J.F. (1986) *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Reference book 402 ,London, ADAS Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 202pp.

STEMERDING S. (1963) Een mixer-watenfilter methode om vrijbeweeglijke endoparasitaire nematoden uit wortels te verzamelen. *Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen*, 1963, 141, 6p.

TAYLOR A.L. (1968) *Introduction à la recherche sur les nématodes phytoparasites*. Manuel FAO pour l'étude des nématodes phytoparasites et les moyens de lutte. Rome, 1968, 135p.

WOUTS W.M., BALDWIN J.G. (1998) Taxonomy and identification. In: *The Cyst Nematodes,* Sharma S.B. Ed, 107-110.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Illustration 1. Méthode de Cobb (1918) **12**

Illustration 2. Méthode des 2 fioles de Seinhorst (Seinhorst, 1955) **13**

Illustration 3. Elutriateur d'Oostenbrinck (1960) **14**

Illustration 4. Méthode de l'entonnoir de Baermann (1917) **17**

Illustration 5. Méthode de Baermann modifiée **17**

Illustration 6. Asperseur de Seinhorst **18**

Illustration 7. Anatomie générale d'un nématode **20**

Illustration 8. Technique de montage temporaire d'un nématode sur lame **23**

Illustration 9. Appareil de Fenwick **25**

Illustration 10. Centrifugeuse de Schuilling **26**

Illustration 11. Appareil d'Oostenbrinck ou appareil de Kort **27**

Illustration 12. Appareil de Seinhorst (Seinhorst, 1964) **28**

Illustration 13. Schéma de récupération et séchage **29**

Illustration 14. Disposition du papier filtre dans le cristallisoir **30**

Illustration 15. Forme des kystes (d'après Baldwin *et al*, 1991) **30**

Illustration 16. Structure du cône vulvaire d'un *Heterodera* (d'après Baldwin et al, 1991) **31**

Illustration 17. Zones périnéales de kystes (d'après Baldwin *et al*, 1991) **32**

Illustration 18. Cône vulvaire vu de face **32**

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.