Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE, DE LA RURALITE ET DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE

Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de 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/2011-04-006
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2011-8086

Date: 06/04/2011

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	La méthode précédente MHs/06/01
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse/réalisation :	Sans objet
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	Aucune...

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 017 version 1a relative à la détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par filtration sélective et identification morphologique

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, 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 017 version 1a relative à la détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par filtration sélective et identification morphologique.

Mots-clés : Mycologie - méthode officielle – analyses - détection – *Tilletia indica* – carie de Karnal - semences - grains – céréales

Destinataires
Pour information : - DRAAF-SRAL - DAAF-Service de l'alimentation - Anses – Laboratoire de la Santé des Végétaux - Laboratoires agréés

Tilletia indica, agent de la carie de Karnal sur grains et semences de céréales, est listé dans l'annexe IAI de l'arrête du 24 mai 2006 modifié (transposition de la directive du Conseil 2000/29/CE) relative aux organismes nuisibles inconnus dans l'Union européenne et dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les Etats membres.

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection de cet organisme nuisible. Celle-ci permet détecter la présence de *Tilletia indica* dans un échantillon de semences ou grains de blé, triticale ou seigle, par filtrations sélectives et identification morphologique au microscope .

Cette méthode en annexe de cette note doit être utilisée pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'importation ou à l'exportation des semences et grains de blé, triticale et seigle.

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

Robert TESSIER

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par filtration sélective et identification morphologique

Réf. : MOA 017 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 de la méthode.

n° méthode	**Consultation publique**		**Validité**	
Numéro de la version	**Début**	**Fin**	**Début**	**Fin**
MGs/98/12version a	-		1998	2006
MHs/06/01version a	-		2006	Février 2007
MHs/06/01version b	-		Février 2007	Avril 2011
MOA 017 version 1a	Janvier 2011	Février 2011	Avril 2011	

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
1. Objet. 10
2. Domaine d'application. 10
3. Présentation schématique de la détection 11
4. Produits et consommables 12
5. Appareillage et matériel 12
6. Contrôles et témoins 12
7.Prise d'essai 13
8.Etapes de l'analyse 13
8.1.Observation des grains 13
8.2. Lavage 13
8.3. Filtrations 14
8.4.Centrifugation 14
8.5.Lecture 14
9. Résultats 15
9.1.Validation des analyses 15
9.2.Interprétation et formulation des résultats 15
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 15
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 16

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 17

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 18

ANNEXE 1 : Détermination de différentes espèces de *Tilletia* spp présentes sur céréales ou morphologiquement proches de *Tilletia indica* 19

ANNEXE 2 : fiche descriptive.....20

ANNEXE 3 : diagramme decisionnel 21

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.

ÉCHANTILLONNAGE 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 (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.

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 ou unités dérivées. 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'agriculture, de l'alimentation 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

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

La présente méthode a été mise au point par le laboratoire du Service Régional de la Protection des Végétaux de Midi-Pyrénées. Elle a été révisée par l'unité de mycologie de Nancy du Laboratoire de la Santé des végétaux
Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du même laboratoire.

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

AMELIORATIONS

Changement de format dans l'écriture de la méthode, selon un nouveau standard.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1.Objet.

Cette méthode qualitative s'applique à la détection du champignon *Tilletia indica*, agent de la carie de Karnal sur grains et semences de céréales. Ce champignon est listé dans l'annexe IAI de la directive du Conseil 2000/29/CE (organismes nuisibles inexistant dans l'Union européenne et dont l'introduction et la dissémination doit être interdite dans tous les Etats membres).

2.Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à toutes les semences (traitées et non traitées) de blé, triticale et seigle, ainsi qu'aux grains destinés à la consommation et/ou à la transformation.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, (propres, frais…). Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur des échantillons constitués d'environ 1 kg de grains. Dans le cas où la quantité de grains paraît inférieure, le poids de l'échantillon est estimé et ce nombre est reporté sur la fiche de suivi de l'échantillon.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

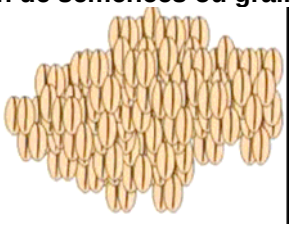
Après réception au laboratoire, l'échantillon peut être stocké avant analyse. Il devra alors être conservé à 5°C±4°C. Au cours du stockage et de la conservation, toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations à d'autres ou par d'autres échantillons (utilisation de bocaux à bouchons vissés par exemple).

Le détention et la manipulation de *Tilletia indica* lors de ces analyses doivent être effectuées dans des conditions de précaution appropriées conformément à la directive 2008/61/CE. L'exigence pour la manipulation et le confinement de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

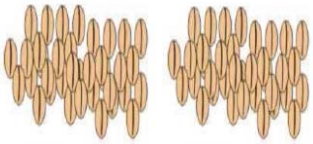
Les téliospores de *Tilletia indica* étant extrêmement volatiles, les risques de contaminations croisées sont élevés entre les différents échantillons à traiter. Il faut prendre les précautions suivantes pour la manipulation des échantillons avant, pendant et après l'analyse :
- Ne traiter qu'un échantillon à la fois,
- Bien séparer les échantillons,
- Porter des gants latex et les changer entre chaque échantillon,
- Bien désinfecter le matériel et les paillasses entre chaque échantillon.

3. Présentation schématique de la détection

Echantillon de semences ou grains de céréales

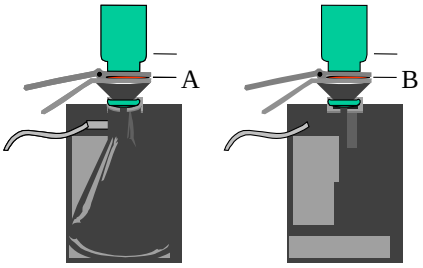


Examen visuel après étalement
(détection directe d'éventuels grains contaminés)



Prélèvement de deux prises d'essai
d'environ 1000 grains chacune

Lavage des grains et filtrations sélectives



A – *Filtre de 60 µm qui retient graines et débris ;*
B - *Filtre de 20 µm qui retient les téliospores ;*

Récupération des spores filtrées
(rinçage des filtres 20 µm, centrifugation, récupération des culots)

Montage entre lame et lamelle
et observation microscopique



Présence ou absence de *Tilletia indica*

4.Produits et consommables

Réactifs et produits :

- Eau distillée ou osmosée stérile.
- Vernis à ongles transparent.
- Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 1°Chlorométrique minimum.
- Solution de lavage : Ajouter environ une goutte de Tween 20 pur à un litre d'eau osmosée ou distillée stérile (des flacons de cette solution peuvent être préparés à l'avance afin de réduire le temps d'analyse). ***Conservation*** : à température ambiante.
- Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à environ 0,2%.

Consommables et petit matériel

- Boîtes de Petri.
- Tubes coniques de centrifugation.
- Parafilm.
- Papier filtre (éventuellement des coupelles en papier jetable).
- Lames en verre porte objet et lamelles couvre-objets.
- Vernis à ongle.
- Spatule.
- Masques anti-poussière risques chimiques
- Gants latex jetables
- Filtres de diamètre de pores de 60 µm (±10 µm) et 20 µm (± 4 µm) (ex. membrane en acétate de cellulose ou toile).

5.Appareillage et matériel

Appareillage :

Matériel courant dans un laboratoire de microbiologie, et notamment :

- Micro pipettes avec cônes de 1000 µL et 5000 µL.
- Appareils de filtration pouvant être branchés sur une pompe à vide.
- Récipient de type plateau ou bac plastique.
- Réfrigérateur ou chambre froide permettant de garantir une conservation en froid positif (T = 5°C ± 4°C).
- Loupe binoculaire (stéréomicroscope), grossissement d'au moins G x 20 à G x 30.
- Microscope photonique à grossissement G x 100 à G x 400 équipé d'un système de mesure.
- Système de production de vide (type pompe à vide).
- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave pouvant atteindre une température minimale de 121°C pendant 20 mn) ou tout autre appareil permettant d'obtenir le même résultat.
- Centrifugeuse (permettant d'obtenir une vitesse d'environ 1000 t/min pour un rayon du rotor de 14 cm).

Verrerie :

- Erlenmeyers de 500 mL.
- Becher
- Flacons autoclavables

6.Contrôles et témoins

Témoin positif : lames microscopiques de référence, serties au vernis, qui présentent des téliospores de *Tilletia indica*.

7.Prise d'essai

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, …) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

Le contenu du sac de grains est transféré dans un récipient plat de type plateau ou bac plastique suffisamment vaste pour étaler de façon correcte et homogène la totalité du matériel à analyser.

L'analyse comporte deux prises d'essai par échantillon :
A l'aide d'une spatule, les grains sont mélangés puis dix prélèvements aléatoires minimum en dix points différents du récipient sont effectués afin de constituer un volume minimal de 60 mL (correspond à un minimum de 1000 grains). Ces 10 prélèvements constituent une prise d'essai pour analyse.

Un échantillon peut-être également conservé quelques temps (quelques semaines par exemple) après analyse (cas d'analyses dans le cadre d'échanges internationaux par exemple). Il est alors à nouveau placé dans un sac plastique étanche et stocké à 5°C ± 4°C.

Précautions à prendre lors de la prise d'essai :
Ces prélèvements s'effectuent en portant des gants à usage unique qui doivent être changés au minimum à chaque nouvel échantillon.

8.Etapes de l'analyse

L'ensemble des opérations décrites doit s'effectuer en portant des gants à usage unique.

Remarque : une manipulation supplémentaire préalable est nécessaire lorsque l'analyse porte sur des semences traitées, car les produits de traitement des semences peuvent gêner l'observation. Dans ce cas :

Laver les semences par trempage dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à environ 0,2% (cf. § 5) pendant 24 heures à température ambiante.

Rincer à l'eau distillée ou osmosée stérile puis étaler les semences sur un papier absorbant sous une hotte filtrante pour séchage.

Ensuite, pour tout type de grain (traité et non traité) :

8.1.Observation des grains

Bien étaler les grains afin de repérer ceux qui sont cariés, reconnaissables à leur aspect noir luisant contrastant avec la teinte jaune pâle des grains sains.

Enlever les grains cariés détectés et préparer une lame avec les téliospores prélevées dans la partie cariée au moyen d'un scalpel ou d'une aiguille lancéolée pour un examen microscopique.

Observer les lames montées et scellées par une bande de vernis à ongle au microscope photonique à grossissement Gx100 pour détecter la présence de spores. Si des spores de *Tilletia sp*. sont observées, passer au grossissement Gx400 pour identifier l'espèce. Pour la détermination, se reporter à la fiche descriptive en annexe.

Si aucun grain carié ni téliospore caractéristique de *T. indica* ne sont observés, poursuivre l'analyse avec le lavage.

8.2. Lavage

Effectuer deux prises d'essais pour analyse (§ 7) et transvaser chaque prise d'essai dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL contenant environ 200 mL de la solution de lavage.

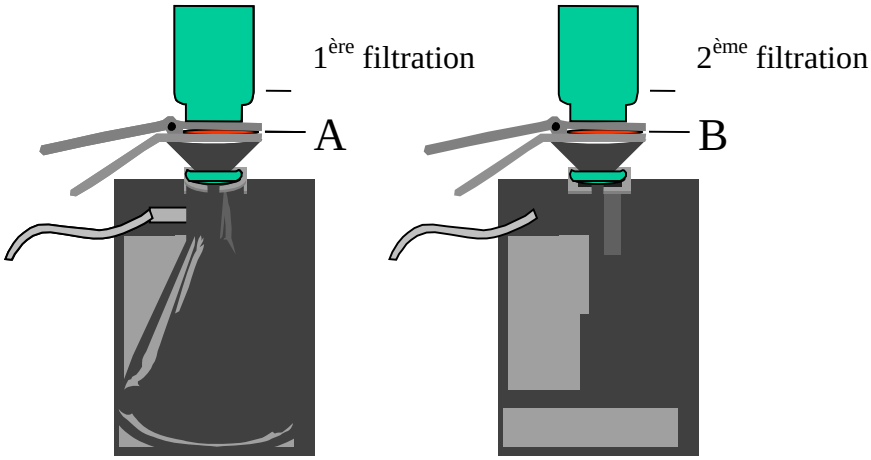
-Recouvrir la fiole de parafilm ®.
-Agiter vigoureusement à la main pendant environ 30 secondes.
-Laisser reposer quelques secondes.

8.3. Filtrations

-Filtrer la solution de lavage en utilisant un appareillage de filtration sous vide (figure1) surmonté d'un filtre de 60 µm (± 10 µm) pour retenir les grains et les débris.

-Récupérer le filtrat puis réaliser une deuxième filtration sur un second appareillage de filtration équipé d'une membrane de 20 µm (± 4 µm) de façon à retenir les téliospores potentiellement présentes.

-Récupérer délicatement le filtre de 20 µm et laver minutieusement dans un petit récipient la face supérieure de ce filtre avec environ 12 à 14 mL d'eau stérile à l'aide d'une micro pipette munie d'un cône de 5 mL.



A – Filtre de 60 µm qui retient graines et débris ;

B - Filtre de 20 µm qui retient les téliospores ;

Figure 1. Dispositif de filtration

8.4.Centrifugation

-Transférer le liquide contenant potentiellement les téliospores dans un tube de centrifugation de 15 mL.

-Centrifuger à une vitesse minimale de 1000 t/min (pour un rayon du rotor de 14 cm), ou accélération équivalente, pendant au moins 1 minute à température ambiante.

-Enlever délicatement le surnageant en laissant 1 mL environ au-dessus du culot.

-Centrifuger à nouveau à une vitesse minimale de 1000 t/min (pour un rayon du rotor de 14 cm), ou accélération équivalente, pendant au moins 1 minute à température ambiante.

-Eliminer la majorité du surnageant en laissant un minimum de liquide au-dessus du culot.

-A l'aide d'une micropipette munie d'un cône de 1000 µL, remettre le culot en suspension dans de l'eau par aspiration refoulement. Monter la suspension obtenue entre lame et lamelle en prenant bien soin de répartir la totalité du volume récolté sur un nombre nécessaire et suffisant de lames.

Remarque : le culot peut être conservé au réfrigérateur pour des analyses ultérieures.

8.5.Lecture

-Observer les lames au microscope à des grossissements variant de 100 à 400 x, comme indiqué au paragraphe 10.3.1. Lorsque des téliospores sont présentes, se reporter au tableau présentant les principales espèces de *Tilletia* spp. (**annexe1**) ainsi qu'à la fiche descriptive (**annexe 2)** pour l'identification de l'espèce.

9. Résultats

9.1.Validation des analyses

-Les téliospores observées seront identifiées comme produits de l'espèce *T. indica* si tous les critères spécifiques listés dans le tableau de l'**annexe 2** sont satisfaits.

9.2.Interprétation et formulation des résultats

- Si des téliospores de *Tilletia indica* sont observées directement sur grains cariés, alors l'échantillon est déclaré positif et le résultat sera exprimé par une phrase du type : « ***Tilletia indica*** **détecté par filtration sélective et/ou observation morphologique dans l'échantillon analysé** »

- Si aucun grain carié n'est observé ou si aucune téliospore de *Tilletia indica* n'est observée sur grains cariés, et qu'après lavage et filtrations :

• aucune téliospore de *Tilletia indica* n'est observée sur l'ensemble des prises d'essai de l'échantillon, alors les prises d'essai sont déclarées négatives et le résultat sera exprimé par une phrase du type : « ***Tilletia indica non*** **détecté par filtration sélective et/ou observation morphologique dans l'échantillon analysé** »

• plus de 10 téliospores de *Tilletia indica* sont observées sur l'ensemble des prises d'essai de l'échantillon, alors l'échantillon est déclaré positif et le résultat sera exprimé par une phrase du type : « ***Tilletia indica*** **détecté par filtration sélective et/ou observation morphologique dans l'échantillon analysé** »

• 1 à 10 téliospores de *Tilletia indica* sont observées sur l'ensemble des prises d'essai de l'échantillon, alors la présence de *Tilletia indica* est présumée et l'analyse doit être refaite sur deux nouvelles prises d'essai.

Si le cumul du nombre des téliospores observées sur l'ensemble des prises d'essai est alors supérieur à 10, l'échantillon est déclaré positif et le résultat sera exprimé par une phrase du type : « ***Tilletia indica*** **détecté par filtration sélective et/ou observation morphologique dans l'échantillon analysé** », sinon le résultat sera exprimé par une phrase du type **« Présence de *Tilletia indica* présumée dans l'échantillon analysé** ».

Le diagramme décisionnel présenté en **annexe 3** résume ces conditions.
Les résultats peuvent être également exprimés sous forme d'un tableau reprenant les informations ci-dessus.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

- Décontamination des restes de l'échantillon et des consommables à usage unique en chaleur humide par passage à l'autoclave à pression de vapeur au moins 20 minutes à 121°C ou par tout autre traitement permettant d'obtenir un résultat équivalent.
- Désinfection du matériel recyclable (verrerie, …) soit par stérilisation dans les conditions précédentes (si le matériel le supporte) soit par trempage dans une solution d'hypochlorite de Sodium ou d'eau de Javel, diluée et titrée à au moins 1% de Chlore actif, au minimum 10 minutes, ou par tout autre moyen permettant d'arriver à un résultat équivalent .

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés

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, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.
Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Méthode MGs/98/12 version a	Semences et grains de céréales, détection de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par identification morphologique
Méthode MHs/06/01 version a	Semences et grains de céréales, détection de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par filtration sélective et identification morphologique
Méthode MHs/06/01 version b	Semences et grains de céréales, détection de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par filtration sélective et identification morphologique
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	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
Dossier d'évaluation	Méthode mise au point par le laboratoire du SRPV Midi-Pyrénées
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

- A V.K., MATHUR S.B., 1992. Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides. *FAO Plant Prot. Bull*., **40** (4) : 148-153.
- AGARWAL, V.K., VERMA H.A., 1983. A simple technique for detection of karnal bunt infection in wheat seed samples. *Seed Res*., **11** (1) : 100-102.
- **Anonyme** (2000) : Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté, et ses modifications successives.
- CASTRO C., SCHAAD N.W., BONDE M.R., 1994. A technique for extracting *Tilletia indica* teliospores from contaminated wheat seeds. *Seed Sci. and Technol*., **22** : 91-98.
- Commonwealth Mycological Institute. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria : Fiche n° 719 (***Tilletia caries***), fiche n° 720 (***Tilletia foetida***), fiche n° 746 (***Tilletia controversa***), fiche n° 748 (***Tilletia indica***).
- **EU** Recommended protocol for the diagnosis of a quarantine organism *:* ***Tilletia indica***
- ORGANISATION EUROPÉENNE ET MÉDITERRANÉENNE POUR LA PROTECTION DES PLANTES - 96/5538 - WP RP point 9 - The detection of teliospores of *Tilletia indica*, the causal agent of Karnal bunt of wheat sampled during the national Karnal bunt survey and the export elevator survey. April 1996, USDA.
- **RAPILLY F., LEMAIRE J.M., CASSINI R.,** 1973. **Les principales maladies cryptogamiques des céréales**. INRA Département de Pathologie Végétale. Ouvrage I.T.C.F.
- WIESE M. V., 1987. **Compendium of Wheat diseases**. The American Phytopathological Society. 106 pp.
- **ZILLINSKY F.J**., 1983. **Maladies communes des céréales à paille *:* Guide d'identification**. Centre international pour l'amélioration du maïs et du blé. 140 pp.

ANNEXE 1 : DETERMINATION DE DIFFERENTES ESPECES DE *TILLETIA* SPP PRESENTES SUR CEREALES OU MORPHOLOGIQUEMENT PROCHES DE *TILLETIA INDICA*

*D'après les fiches du Commonwealth Mycological Institute et le protocole EU pour la détection de *Tilletia indica*

	T. caries (DC.) Tul.	***T. controversa*** Kühn	***T. foetida*** (Wallr.) Liro	***T. indica*** Mitra	***T. barclayana*** (Bref.) Sacc. & Syd.	***T. walker*** Castlebury & Carris
Synonymes	***T. tritici*** (Bjerk.) Wolf ***Uredo caries*** de Candolle	***T. brevifaciens*** Fischer	***T. laevis*** Kühn	***Neovossia indica*** (Mitra) Mundkur	***T. horrida*** Takahashi	
Répartition géographique	Cosmopolite	Cosmopolite	Cosmopolite	Inde, Pakistan, Iraq, Mexique, U.S.A.	Asie, extrême Orient, Afrique, Amérique centrale	Cosmopolite
Hôtes	*Triticum* et nombreuses graminées	*Triticum* et nombreuses graminées	*Triticum* et nombreuses graminées	*Triticum*, *Triticale*	*Oryza sativa* et diverses graminées	*Lolium multiflorum*, *L. perenne*
Maladie	Carie commune	Carie naine	Carie lisse	Carie de Karnal	Rice smut	Ryegrass bunt
Morphologie des spores						
Forme	Globuleuse ou subglobuleuse à ovoïde	Globuleuse à subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse à ovoïde	Globuleuse ou subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse
Couleur	Brun rougeâtre ou brun clair	Jaune à brun rougeâtre	Brun olivâtre	Brun rougeâtre sombre à presque noire (opaque)	jaune pâle à brun marron (semi opaque)	jaune pâle à brun rouge foncé (jamais opaque)
Paroi *	Réticulation polygonale : 0,5 - 1,5 µm de haut, < 3 µm de large	Réticulation polygonale : 1,5 - 3 µm de haut, 3 - 5 µm de large	Lisse à légèrement trouée	Verruqueuse densément échinulée, finement cérébriforme (espaces étroits)	Verruqueuse, echinulations pointues et fréquemment courbées (espaces étroits)	Verruqueuse coralloïde (ornementations plus espacées)
Gaine	Absente	Présente, peu visible	Absente, parfois court fragment de mycélium attaché	Absente, parfois appendice cellulaire court	Présente , hyaline ou tintée, parfois apiculus court	
Taille (en µm) *	14 - 18,0 - 23	16 - 19,9 - 25	13 - 18,8 - 25	28 - 35-41 - 54	20- 24-28 - 40	24-30-31-44

ANNEXE 2 : FICHE DESCRIPTIVE

Symptômes sur grains :

Les grains affectés ne gonflent pas, les tissus le long de la suture se nécrosent et se creusent, des fructifications ou « sores » s'y développent. Celles-ci contiennent des masses poussiéreuses de spores marrons à noires, les téliospores, qui produisent une odeur caractéristique de poisson en décomposition.



Photo : S.B. Mathur and Barry M. Cunfer ;
Danish Institute of Seed Pathology

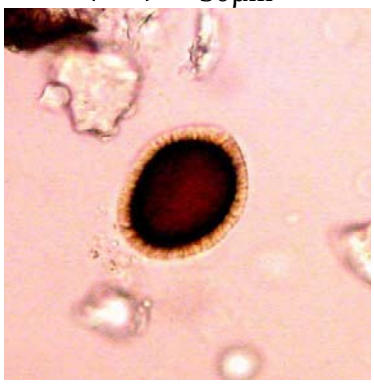
Détails des ornementations :

Ci-dessous à droite, vue de surface : parois de type verruqueux, finement cérébriforme.
Ci-dessous à gauche, vues en plan médian : échinulations denses et pointues.

Photos LNPV



⟷ 30µm

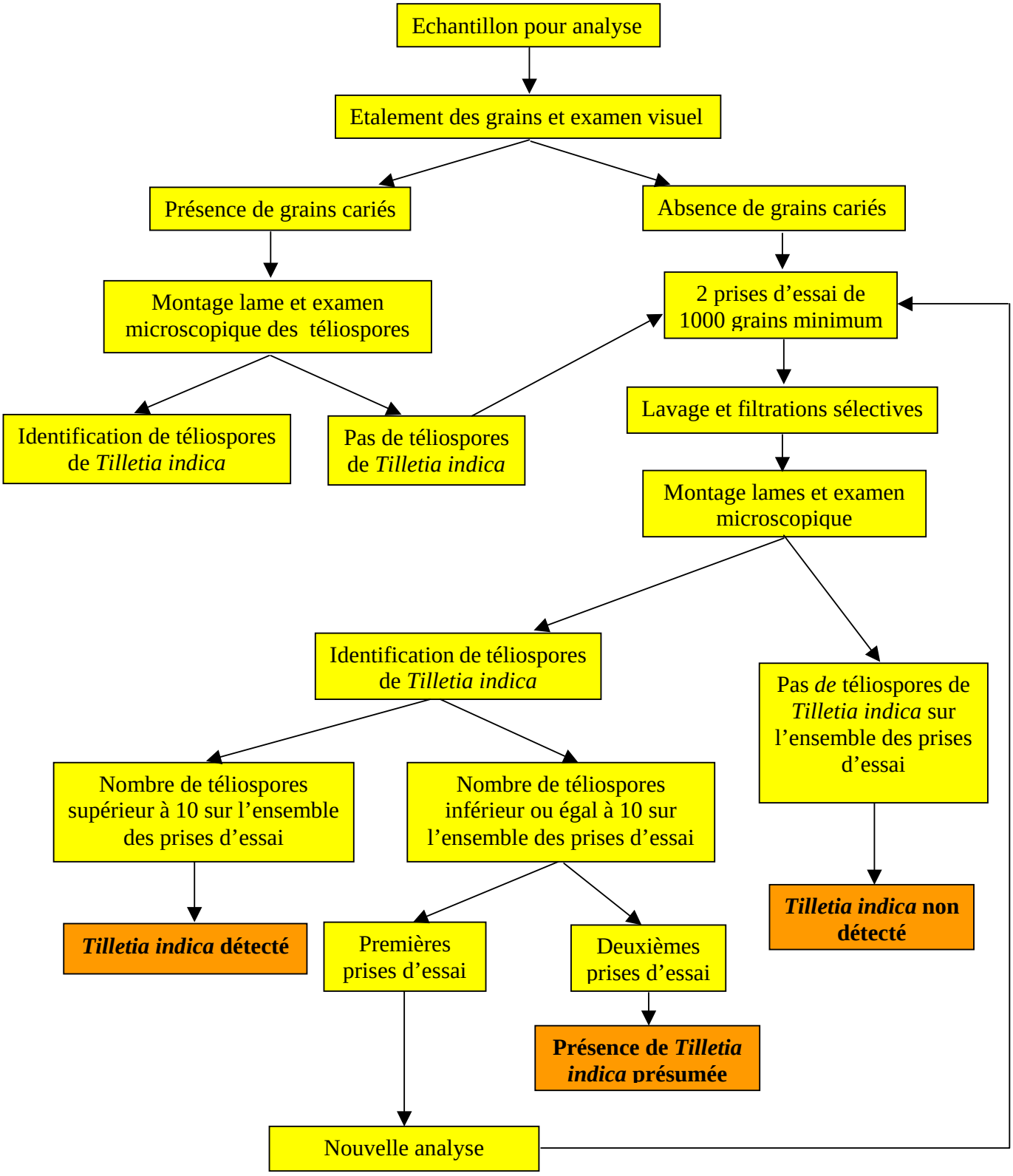


⟷ 30µm



⟷ 30µm

ANNEXE 3 : DIAGRAMME DECISIONNEL



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 de la santé des végétaux (ANSES),
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

Ministère chargé de l'agriculture
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.