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/2011-04-022 MOD10.21 E 01/01/11	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDQPV/N2011-8098** **Date: 20/04/2011**

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	La publication de la méthode NS97/01 version b
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 019 version 1a relative à la détection des nématodes du genre *Globodera*

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 019 version 1a relative à la détection des nématodes du genre *Globodera*.

Mots-clés : Nématologie - méthode officielle – analyses - détection – *Globodera* – sol – pomme de terre

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

Les nématodes à kyste de la pomme de terre *Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis* sont classés organismes nuisibles de lutte obligatoire au sein de l'Union Européenne (arrêté du 24 mai 2006 modifié annexe IAII et arrêté du 28 juin 2010 relatif à la lutte contre les nématodes à kystes de la pomme de terre).

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection des nématodes du genre *Globodera*. Celle-ci permet de détecter la présence de ces nématodes dans des échantillons de sol, support de culture ou produit terreux, ainsi que sur des organes végétaux souterrains tels que bulbes, caïeux, rhizomes, racines, et tubercules, par extraction (séparation des kystes par flottation et tamisage) puis tri visuel des kystes au stéréomicroscope.

Cette méthode présentée en annexe de cette note doit être utilisée pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires concernant *Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis*, en surveillance du territoire, à l'importation, et à l'exportation.

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 des nématodes du genre *Globodera*

Réf. : MOA 019 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.

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
NS 9701 version a	-		1997	Juillet 2001
NS 9701 version b	-		Juillet 2001	**Avril 2011**[1]
MOA019 version 1a	Janvier 2011	Février 2011	Avril 2011	

[1] Du fait de l'entrée en application de la MOA 012, la durée de validité de l'ancienne méthode officielle est raccourcie et portée à 3 mois.

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 ET REMERCIEMENTS **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 10
4. Produits et consommables 12
5. Appareillage et matériel 12
6. Contrôles et témoins 12
7. Prise d'analyse 13
8. Etapes de l'analyse 13
8.1 Préparation de l'échantillon pour analyse 13
8.2 Extraction 14
8.3 Récupération et préparation de l'extrait 15
8.4 Lecture 16
8.5 Conditionnement des kystes 17
9 Formulation du résultat 17
10 Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 17
11 Conservation des reliquats d'échantillons et des produits analysés 18

REMERCIEMENTS **19**

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE **19**

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE **20**

Annexe **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 laboratoire national de référence (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.

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

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente méthode a été rédigée par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (ANSES). Elle remplace la version b de la méthode NS 9701 rédigée en 2001.

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

Les modifications intervenues dans ce document par rapport à la méthode NS 9701 version b sont les suivantes :

- Transfert d'une partie des informations dans la méthode officielle d'analyse MOA 012 ‘’Extraction, détection, et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites’’, paragraphe 2 ‘’Nématodes formes enkystées’’

- Domaine d'application : objet susceptible d'être soumis à analyse (organes végétaux souterrains), grandeur de l'objet soumis à l'analyse (volume de sol ou nombre d'unités), page 10,

- Présentation schématique de la détection (principe et schéma), pages 10 et 11,

- Appareillage et matériel : contrôle des tamis de récupération, page 12,

- Contrôles et témoins : nouveau paragraphe, pages 12 et 13,

- Prise d'analyse : fractionnement éventuel de l'échantillon, page 13,

- Préparation de l'échantillon : estimation du volume de sol ou du nombre d'unités d'organes végétaux souterrains, pages 13 et 14,

- Extraction : appareil de Kort, appareil de Seinhorst, autre matériel, extraction à partir d'organes végétaux souterrains, pages 14 et 15,

- Lecture : reconnaissance des kystes des genres *Heterodera*, *Cactodera*, et *Punctodera*, page 16,

- Formulation du résultat : page 17,

- Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants : nouveau paragraphe, page 17,

- Conservation des reliquats d'échantillons et des produits analysés : nouveau paragraphe, page 18,

- Annexe : photos et schémas, pages 19 et 20.

AMELIORATIONS

Révision de la formulation et de la présentation de l'ensemble des paragraphes.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet.

La présente méthode s'applique à la détection des formes enkystées des espèces du genre *Globodera*, dont *Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis* nématodes à kystes des racines de la pomme de terre.

Ces deux dernières espèces sont classées organismes de quarantaine au sein de l'Union Européenne (arrêté du 02.09.93 modifié par l'arrêté du 16.08.94, annexe I, liste A2).
Cette méthode respecte les recommandations du protocole OEPP PM7/40.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à tout sol, support de culture ou produit terreux, ainsi qu'aux organes végétaux souterrains tels que bulbes, caïeux, rhizomes, racines, et tubercules.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Pour que l'analyse puisse être réalisée, l'échantillon doit avoir été conditionné par l'expéditeur dans un sachet ou un récipient fermé et référencé.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La grandeur de l'échantillon à analyser est précisée par le demandeur :

- volume de sol exprimé en mL,
- nombre d'unités pour des organes végétaux souterrains.

Le volume de sol à analyser ne peut pas être inférieur à 100 mL.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

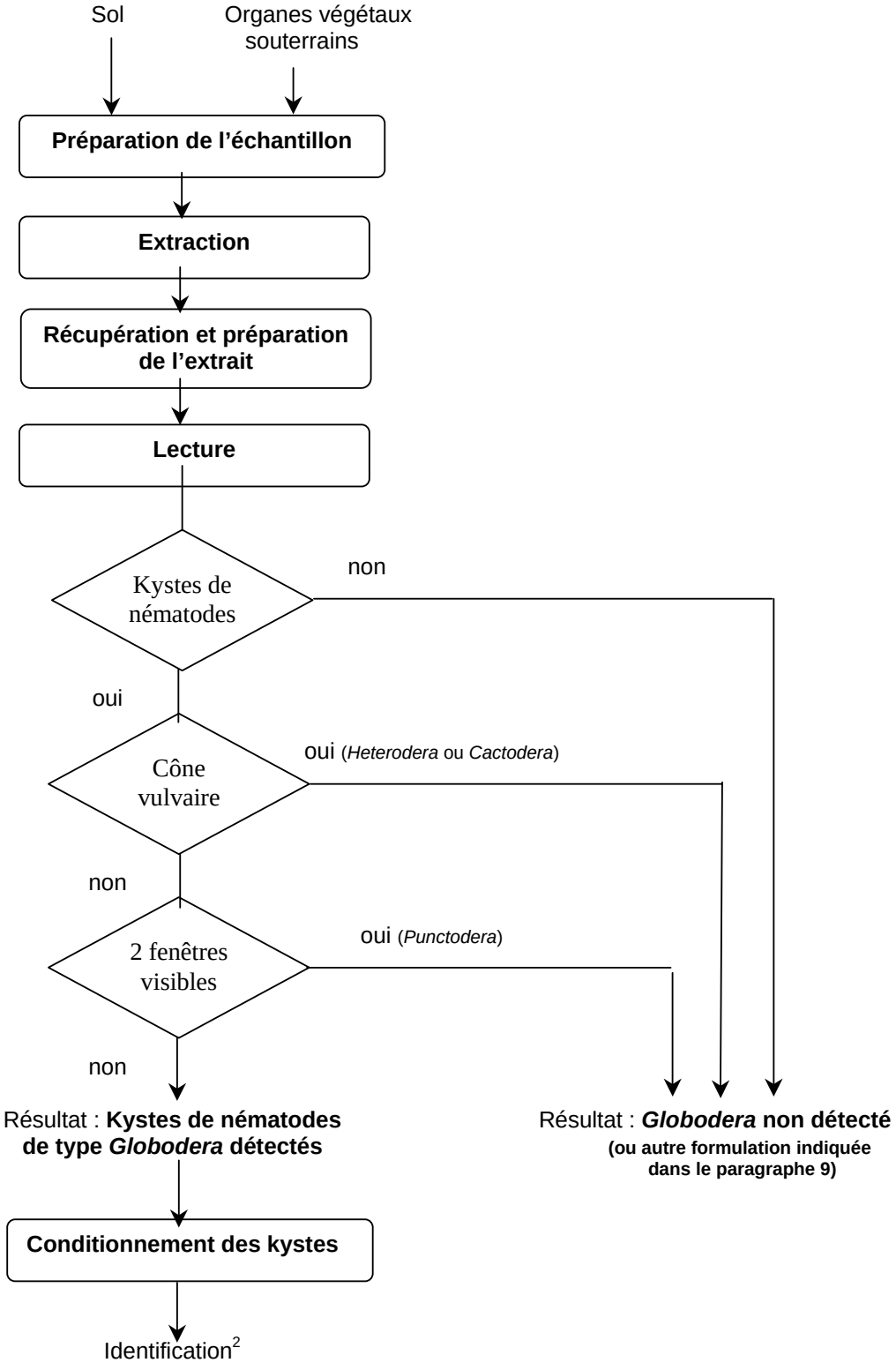
Dans l'intervalle entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse, les sols sont conservés à une température inférieure à 35 °C. Les températures plus élevées sont proscrites pour éviter l'altération du contenu larvaire des kystes nécessaire à l'identification.

Durant cette même période les organes végétaux souterrains périssables sont conservés en froid positif.

3. Présentation schématique de la détection

Principe : Les kystes sont séparés des autres fractions de l'échantillon à partir de leur densité (inférieure à 1 pour les kystes secs, légèrement supérieure à 1 pour les kystes humides), de leur taille (comprise entre 250 et 600 µm), et de leur forme.
La méthode décrite consiste en une extraction des kystes par flottation dans de l'eau, récupération sur un tamis de 250 µm, et tri visuel du produit obtenu.

Schéma de la détection :



[2] méthode NS 0105 au 1er février 2011

4. Produits et consommables

- Eau courante,
- Microtubes d'environ 1,5 mL,
- Filtres papier.

Selon la technique choisie :

- Bandes de papier buvard blanc (toutes techniques de récupération et de préparation de l'extrait sauf variantes 1 et 3),
- Produit dispersant (liquide à vaisselle), (toutes techniques de récupération et de préparation de l'extrait sauf variantes 1 et 3),
- Acétone (récupération et préparation de l'extrait selon variante 3).

5. Appareillage et matériel

Petit matériel

- Cristallisoir (toutes techniques de récupération et de préparation de l'extrait sauf variantes 1 et 3) et verrerie courante de laboratoire,
- Pissette,
- Pinceau,
- Aiguille montée,
- Fiole jaugée 200 à 500 mL (récupération et préparation de l'extrait selon variante 3),

Tamis de maille 250 µm, et selon la technique choisie, 800 µm (récupération et préparation de l'extrait selon variante 2), 1 mm (détection à partir d'organes végétaux souterrains), et 4 mm (préparation de sols).

Des tamis spécifiques sont en outre intégrés aux extracteurs.

Le maillage des tamis ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer du bon état des tamis (MOA 012, paragraphe 11).

Des contrôles portent sur les tamis de récupération (maille 250 µm) :

- vérification à vue avant chaque utilisation : absence de perforations ou de déchirures de la toile, étanchéité de l'encollage ou du sertissage sur l'armature,
- contrôle à la loupe des points précédents, avant la première mise en service, puis périodiquement.

Cet examen permet de détecter des micro perforations et des irrégularités éventuelles de la toile.
Les tamis endommagés sont réparés lorsque cela est possible ou réformés.

Gros matériel

-Stéréo microscope équipé d'un éclairage épiscopique, grossissement G X 25 à G X 40.

Selon le produit analysé et la technique choisie :

- Etuve chauffée (T < 35 °C) et ventilée (équipement non obligatoire utilisable pour le séchage des échantillons de sols),
- Appareil d'extraction pour les sols : appareil de Fenwick, ou centrifugeuse de Schuiling, ou tout autre appareil à performance de même niveau pour les sols séchés, appareil de Kort, ou appareil de Seinhorst, ou équivalent pour les sols, supports de culture, et produits terreux, séchés ou non. Ces matériels sont décrits dans la MOA 012.
- Bac de lavage pour les organes végétaux souterrains.

6. Contrôles et témoins

Des contrôles sont réalisés pour qualifier un nouveau dispositif de détection, un nouvel équipement d'extraction, ou un nouvel opérateur.
Des contrôles périodiques annuels sont réalisés, de préférence en début de campagne d'analyses, pour s'assurer du maintien de la fiabilité du dispositif d'analyse et de la compétence des opérateurs.

Les contrôles peuvent prendre la forme de participation à des essais inter laboratoires d'aptitude (analyse de l'ensemble des échantillons d'un essai par un opérateur avec un même extracteur) ou d'autocontrôles organisés par le laboratoire.

Les autocontrôles consistent en l'analyse d'échantillons de sols : au minimum 3 témoins sains et 3 témoins contaminés.
Les témoins sains sont fabriqués avec des sols indemnes de kystes de *Globodera* (prélèvements dans des parcelles dont l'historique ne comporte pas de culture de pomme de terre, et dans lesquelles des analyses n'ont pas permis de détecter des kystes de *Globodera)*.
Les témoins contaminés sont préparés par mélange à sec d'un minimum de 200 mL de sol indemne de kystes avec au moins 20 kystes de *Globodera*. Les kystes utilisés peuvent être des kystes de *G. pallida* ou de *G. rostochiensis* issus de reliquats d'échantillons contaminés ou de *G. tabacum*[3].

Les résultats d'un autocontrôle sont considérés conformes lorsque les 2 exigences suivantes sont respectées :

- taux moyen de détection des kystes de *Globodera* (nombre total de kystes détectés rapporté au nombre total de kystes apportés dans les témoins contaminés) au moins égal à 60 %,
- kystes de *Globodera* non détectés dans les témoins sains.

7. Prise d'analyse

La totalité de l'échantillon envoyé par le demandeur est analysée, sauf si la quantité reçue est supérieure à la grandeur à analyser demandée (cf paragraphe 2 : grandeur de l'objet soumis à analyse). Dans ce cas, l'échantillon à analyser est une fraction de l'échantillon reçu (paragraphe 811, cas particulier, et paragraphe 812).

Les extracteurs de sol cités ci-après permettent de traiter environ 300 mL de sol. Si le volume de l'échantillon à analyser est supérieur à la capacité de l'appareil, l'échantillon est fractionné et passé en plusieurs fois dans l'extracteur.

Remarque : La taille de l'échantillon analysé, qu'il s'agisse de sol ou d'organes végétaux souterrains, est mentionnée dans le rapport d'analyse (cf paragraphe 9).

8. Etapes de l'analyse

8.1– Préparation de l'échantillon pour analyse

8.1.1. Sols

Préparation du produit

Le cas échéant, les cailloux et gros débris végétaux sont éliminés, et les mottes réduites. Un tamis de maille 4 mm peut être utilisé pour parfaire la préparation.

Pour les extractions avec l'appareil de Fenwick ou la centrifugeuse de Schuiling, les échantillons à analyser doivent être secs (séchage préalable des échantillons à l'air libre ou dans une enceinte ventilée à une température inférieure à 35 °C). En cas d'utilisation d'une enceinte ventilée, la ventilation doit être modérée : les kystes secs sont très légers et peuvent être emportés par les courants d'air.

[3] Des kystes ou des sols contaminés peuvent être fournis en cas de besoin par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Estimation du volume de l'échantillon analysé

Le volume de l'échantillon est déterminé approximativement par l'une des méthodes suivantes :

- prise en compte de la capacité, du nombre, et du niveau de remplissage des contenants utilisés pour conditionner l'échantillon,
- utilisation d'une mesure : récipient de volume connu, gradué ou non.

Remarque : La détermination du volume apprécié visuellement ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques.

Cas particulier : Préparation de l'échantillon à analyser par prélèvement d'une fraction de l'échantillon reçu

La totalité du produit reçu est préparée comme indiqué précédemment. Il est ensuite homogénéisé, par exemple par brassage manuel. L'échantillon à analyser est alors constitué par un minimum de 10 prises au hasard sur l'ensemble du produit à l'aide d'une cuillère ou de tout autre instrument adapté. Le volume de l'échantillon ainsi préparé est évalué en utilisant un récipient de volume connu.

8.1.2 – Organes végétaux souterrains

Les unités constitutives de l'échantillon reçu sont dénombrées.

Lorsque le nombre obtenu est supérieur au nombre maximal d'unités à analyser demandé, l'échantillon à analyser est préparé avec ce nombre maximum d'unités prélevées au hasard sur l'ensemble de l'échantillon reçu.

8.2 Extraction

8.2.1 – Extraction à partir de sols

L'un ou l'autre des appareils suivants peut être employé.

Ces matériels sont décrits dans la MOA 012.

♦ **Appareil de Fenwick**

L'appareil est rempli d'eau à ras bord. Le sol séché est entraîné à l'aide d'un jet d'eau au travers du tamis supérieur de maille 1 à 2 mm, puis vers un entonnoir qui plonge dans le corps de l'appareil. Les kystes flottent et sont entraînés par débordement dans la collerette de récupération, sous laquelle est placé un tamis de 250 µm.

L'apport d'eau est maintenu jusqu'à épuisement de l'échantillon.

♦ **Centrifugeuse de type Schuiling**

Le sol séché est versé dans la cuve contenant de l'eau. Le brassage disperse l'échantillon, les éléments les plus légers (kystes et matière organique) flottent et sont filtrés par un cylindre grillagé central de maille 1 à 2 mm. Le produit est ensuite recueilli sur un tamis de 250 µm, rincé au jet pour éliminer les particules terreuses les plus fines collées aux éléments de l'extrait, puis passé dans l'appareil de séparation associé à la centrifugeuse (colonne d'Arvo) à la sortie duquel est placé un tamis de 250 µm.

Variante : L'extrait obtenu avec la centrifugeuse de Schuiling peut ne pas être passé dans la colonne d'Arvo, si la nature et le volume des échantillons s'y prêtent. L'extrait renferme alors une quantité plus importante de particules terreuses et organiques.

Remarque : La centrifugeuse de Schuiling ne doit pas être utilisée pour des sols riches en matière organique en raison des risques de colmatage du cylindre grillagé central par des débris végétaux.

♦ **Appareil de Kort et appareil de Seinhorst**

La colonne de l'appareil est remplie d'eau et alimentée dans sa partie inférieure. L'échantillon est entraîné par un jet d'eau au travers du tamis supérieur de maille 1 à 2 mm vers un entonnoir qui plonge dans le corps de l'appareil. Les kystes de densité inférieure à 1 (kystes secs) ou de densité légèrement supérieure à 1 (kystes humides) flottent ou sont entraînés par le flux d'eau ascendant. Ils sont ensuite conduits par débordement dans la collerette de récupération, sous laquelle est placé un tamis de 250 µm.

L'apport d'eau est maintenu jusqu'à épuisement de l'échantillon.

♦ **Autres techniques**

L'utilisation d'autres appareils d'extraction est possible sous réserve d'être reconnus ou vérifiés comme ayant des performances au moins équivalentes aux matériels précédents.
Pour comparer les performances d'un nouvel appareil d'extraction par rapport à un matériel connu, des fractions similaires d'échantillons contaminés naturellement et d'origines variées, peuvent être passées dans les 2 appareils.
Un autocontrôle décrit dans le paragraphe 6 est en outre réalisé pour s'assurer que le taux moyen de détection des kystes de *Globodera* dans des échantillons contaminés artificiellement est au moins égal à 60 %.

Remarques :
- Le rinçage des tamis et des appareils d'extraction doit être réalisé avec le plus grand soin après chaque utilisation.
- Avec les appareils d'extraction automatisés (Schuiling, Seinhorst Meku) le déclenchement d'un cycle d'extraction entre les échantillons (''extraction à blanc'') est recommandé pour réduire les risques de contamination.

8.2.2 - 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 250 µm pour récupérer les kystes. La mise en place d'un tamis de 1 mm sur le tamis de récupération permet d'éliminer les débris végétaux les plus gros (fragments d'épiderme, radicelles,….).
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.

8.3 Récupération et préparation de l'extrait

8.3.1 - Récupération et séchage de l'extrait

La fraction retenue sur le tamis de 250 µm est rincée à l'aide d'un jet d'eau pour éliminer les particules terreuses ou organiques les plus fines.
Le produit est ensuite disposé sur un filtre papier mis à sécher à l'air libre ou dans une enceinte ventilée en respectant les dispositions décrites dans le paragraphe 8.1.1.

Variante 1 : L'extrait recueilli en fin d'extraction sur un filtre papier, est lu humide (ni séchage ni remise en suspension de l'extrait).

Remarque : Lorsque la taille d'un échantillon de sol a nécessité son fractionnement pour l'extraction (cf paragraphe 7), les extraits obtenus peuvent être regroupés si leur volume n'est pas trop important, dans un ou plusieurs tamis de récupération.

8.3.2 - 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 du cristallisoir, et placée sur un support adapté (planchette par exemple) en vue du tri des kystes.

Variante 2 : Un tamis de 800 µm est disposé sur le cristallisoir utilisé pour la préparation de l'extrait pour parfaire la séparation des kystes (élimination des particules les plus grosses).

Variante 3 : Séparation des kystes à l'acétone (densité 0,79). L'extrait sec est placé dans une fiole à col long (type fiole jaugée) remplie pour partie d'acétone. Après agitation, le remplissage de la fiole est complété par ajout d'acétone jusqu'à 1 cm environ du bord. Le surnageant situé dans la partie supérieure de la fiole est versé sur un filtre papier et le dépôt au fond de la fiole éliminé. L'extrait ainsi préparé peut être lu rapidement en raison de la brièveté du séchage (grande volatilité de l'acétone) et de la faible quantité d'éléments organiques résiduels (sédimentation de la majorité des débris organiques au fond de la fiole).

Remarques :
- La séparation des kystes avec de l'acétone, doit être effectuée sous hotte.
- L'utilisation de l'acétone est recommandée pour les sols riches en matière organique.

8.4 Lecture

La bande ou le filtre supportant l'extrait est disposé sous le stéréomicroscope pour rechercher les kystes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* (annexe, figure 1). Cet examen peut être réalisé en 2 temps.

1 ère étape : Examen à grossissement faible ou moyen
Les kystes de nématodes sont séparés des autres éléments de l'extrait en utilisant par exemple un pinceau ou une aiguille montée.
Les kystes sont reconnus à partir de divers critères : la taille (250 à 600 µm), la forme (globuleuse, plus ou moins sphérique), la présence d'une tête, la couleur (brun clair à brun foncé, aspect souvent doré), la brillance (mate), l'absence d'ornementations (fréquentes sur graines), l'élasticité (appréciée par une légère pression avec une aiguille montée).

2ème étape : Examen à plus fort grossissement (annexe, figures 2 et 3)
Les kystes précédemment triés sont réexaminés pour éliminer les kystes des genres *Heterodera, Cactodera*, et *Punctodera*. Cet examen porte principalement sur la zone périnéale (partie postérieure des kystes située à l'opposé de la tête) :
- Cône vulvaire plus ou moins proéminent : kyste d'*Heterodera* ou de *Cactodera*,
- Absence de cône vulvaire, 2 fenêtres circulaires visibles et nettement distinctes (fenêtre vulvaire et fenêtre anale) : kyste de *Punctodera*,
- Absence de cône vulvaire, 1 fenêtre circulaire visible (fenêtre vulvaire, fenêtre anale non visible) : kyste de *Globodera*.

Les kystes de *Globodera* sont par ailleurs plutôt sphériques alors que les kystes de *Punctodera* ont une forme souvent plus allongée, en outre.

Les kystes sans cône vulvaire, et ne présentant pas 2 fenêtres distinctes visibles au stéréomicroscope sont donc susceptibles d'appartenir au genre *Globodera*. L'examen visuel réalisé n'est cependant pas suffisant pour assurer la détermination certaine du genre.

Remarques :

- Les kystes dont la zone périnéale ne peut pas être caractérisée nettement sont considérés comme susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* et traités comme tels (demande d'identification et formulation du résultat correspondante).

- Les kystes ne sont en aucun cas disséqués pour faciliter la reconnaissance du genre car l'identification de l'espèce serait ensuite impossible.

8.5 Conditionnement des kystes

Les kystes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* détectés précédemment sont placés à l'aide d'un pinceau dans un microtube référencé au numéro de l'échantillon.
Le contenu du microtube est séché à l'air libre (T < 35 °C).
Le microtube est ensuite fermé et transmis pour identification du genre et de l'espèce des kystes détectés au laboratoire national de référence.

Lorsque l'identification est réalisée par un autre laboratoire, le microtube contenant les kystes est conditionné dans un emballage rigide résistant. Une demande d'analyse écrite est jointe à l'envoi.

Remarque : Lorsque plusieurs extraits sont obtenus à partir d'un échantillon (cf paragraphe 7 : fractionnement d'un échantillon), les kystes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* détectés dans chacun des extraits sont regroupés dans un seul microtube.

9 Formulation du résultat

- **Absence de kystes de nématodes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera***

Le résultat est exprimé par une phrase semblable à :

"*Globodera* non détecté" ou par une formulation appropriée lorsque la demande est clairement identifiée, par exemple **"*Globodera pallida* non détecté"**, ou **"*Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis* non détectés".**

- **Présence de kystes de nématodes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera***

Le résultat est exprimé par une phrase semblable à :

"Kystes de nématodes de type *Globodera* détectés"

Ce résultat est accompagné obligatoirement d'une mention précisant que la présence définitive du genre *Globodera* sera confirmée par l'analyse d'identification. Cette analyse permettra en outre de rechercher la présence éventuelle des espèces *G. palllida* et *G. rostochiensis.*

Si le laboratoire ne réalise pas cette dernière analyse, l'envoi des kystes au laboratoire chargé de leur identification est indiqué sur le rapport d'analyse.

Remarque : Quelque soit le résultat de l'analyse, la taille approximative de l'échantillon analysé est mentionnée sur le rapport d'analyse.

10 Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Les risques de contamination sont liés à la présence de kystes, forme de conservation et de dissémination du parasite, dans les reliquats d'échantillons en tant que tels ou dispersés en poussières au sol, dans les emballages, dans les contenants, dans les consommables utilisés durant l'analyse (filtres papier, bande de papier buvard), et dans les effluents issus de l'extraction des échantillons et du nettoyage du matériel.
Pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement, le laboratoire doit au moins mettre en œuvre les mesures suivantes :

- Déchets solides précités : autoclavage ou incinération.
- Effluents : traitement chimique (eau de Javel) ou thermique (au moins 80 °C durant 1 min), ou tout autre procédé permettant la destruction du contenu larvaire des kystes.

11 Conservation des reliquats d'échantillons et des produits analysés

Lorsque l'analyse porte sur une fraction de l'échantillon reçu, et que des kystes de type *Globodera* sont détectés, le reliquat de l'échantillon peut être conservé pour des analyses complémentaires, ou à des fins méthodologiques, ou en temps que matériel de référence, en froid positif, et lorsqu'il s'agit de produits végétaux souterrains, si leur état le permet.

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de la Santé des Végétaux remercie :

- Eric Grenier de l'UMR Bio 3P de l'INRA du Rheu,
- Hervé Marzin du Conseil Général de l'Alimentation de l'Agriculture et des Espaces Ruraux, Paris,

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

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
MOA 012	Extraction, détection, et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites
NS 0105	Identification morphologique et par outil biomoléculaire de *Globodera pallida* et de *Globodera rostochiensis*
Arrêtés du 02.09.93 et du 16.08.94	Exigences sanitaires des végétaux, produits végétaux et autres produits Annexe I, liste A2 : Organismes nuisibles présents dans la Communauté et importants pour elle

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

WOUTS, W.T. BALDWIN J.G. (1998) Taxonomy and identification. In : The Cysts Nematodes, Sharma, S.B (ed), p 88.

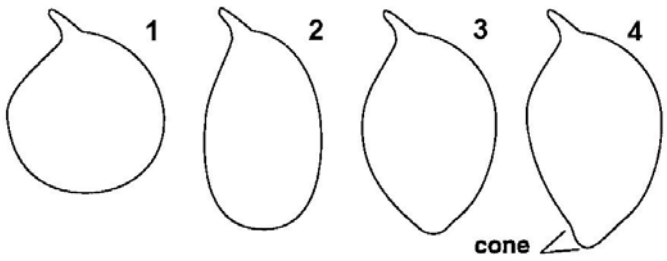
OEPP (2009)- 05/2009 : Diagnostic *Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis* PM7/40. Bulletin OEPP, 39, 354-368.

ANNEXE

Figure 1 – Kystes de *Globodera* *(*photo Laboratoire de la Santé des Végétaux*)*

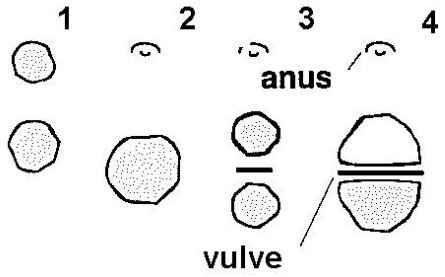


Figure 2 – Formes de kystes de nématodes (d'après Wouts et Baldwin, 1998)



1- Sphérique, sans cône (*Globodera*.)
2- Ovoïde, sans cône (*Punctodera*)
3- Citriforme avec cône peu proéminent (*Heterodera* ou *Cactodera*)
4- Citriforme avec cône proéminent (*Heterodera*)

Figure 3 – Zones périnéales des kystes (d'après Wouts et Baldwin, 1998)



1 : Fenêtres vulvaire et anale circulaires (*Punctodera*)
2 : Fenêtre vulvaire circulaire et fenêtre anale non visible (*Globodera* et *Cactodera*),
3 : Fenêtre vulvaire bifenestrée et fenêtre anale non visible (*Heterodera*)
4 : Zone vulvaire ambifenestrée et fenêtre anale non visible (*Heterodera*)

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.