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/2011-09-003
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2011-8200

Date: 06 septembre 2011

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	Sans objet
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 20 partie B version 1a relative à détection et l'identification par analyse morphologique et biomoléculaire de *Bursaphelenchus xylophilus.*

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 020 partie B version 1a relative à la détection et l'identification de *Bursaphelenchus xylophilus* par analyse morphologique et PCR conventionnelle

Mots-clés : Nématologie - méthode officielle - analyses - détection - *Bursaphelenchus xylophilus* - bois - conifère - *Monochamus*.

Destinataires

Pour information :
- DRAAF-SRAL
- DAAF-Service de l'alimentation
- Anses-Laboratoire de la santé des végétaux (LSV)

Le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, est un parasite qui attaque de façon sévère les conifères et cause la maladie dite « Maladie du dépérissement du pin » (ou « pine wilt disease »). *Bursaphelenchus xylophilus* est listé en annexe II, partie A, chapitre I de la directive 2000/29/CE.

La présente note a pour objet la publication officielle de la partie B de la méthode de détection et d'identification de *Bursaphelenchus xylophilus*. Cette méthode permet de détecter la présence de ce nématode dans des échantillons de bois de conifères, ainsi que sur les insectes vecteurs *Monochamus sp*, par extraction (échantillon mis en contact avec l'eau, les nématodes vont ainsi migrer dans l'eau) puis identification par observation des caractéristiques morphologiques et PCR conventionnelle.

Cette méthode est destinée à être utilisée par le laboratoire de référence, unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses basée au Rheu (35) notamment en confirmation des résultats positifs obtenus par les laboratoires agréés avec la méthode de détection par PCR temps réel (MOA020 partie A) publiée au bulletin officiel du ministère le 5 août dernier.

Vous trouverez donc en annexe à cette note d'information la partie B de la méthode officielle d'analyse pour la détection de *Bursaphelenchus xylophilus*, MOA020 partie B version 1a.

L'adjoint au sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux

Joël FRANCART

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection et identification par analyse morphologique et biomoléculaire du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*

Réf. : MOA 020 partie B 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 de l'ANSES, 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
	-	-		
MOA 020 version 1a	Avril 2011	Août 2011	Septembre 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 méthode 11
4. Matériel et consommables 12
4.1. Extraction 12
4.2. Identification morphologique 12
4.3. PCR 12
5. Extraction 14
5.1. Migration 14
5.2. Récupération des nématodes 14
5.3. Conditionnement de l'extrait 14
6. Identification morphologique 14
6.1. Principe 14
6.2. Identification du groupe 15
6.3. Identification de l'espèce 16
6.4. Résultats 17
7. Identification par amplification génomique 17
7.1. Prise d'analyse 17
7.2. Contrôles et témoins 17
7.3. Extraction d'ADN 18
7.4. Amplification d'ADN 18
7.5. Electrophorèse 19
7.6. Révélation 19
7.7. Résultats 20
8. Interprétation et expression des résultats finaux 21

9. Elimination des matériels biologiques susceptibles d'être contaminants 21
10. Conservation des reliquats de matériels biologiques utilisés 22

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 23

REMERCIEMENTS 23

BIBLIOGRAPHIE 24

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 (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. 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 de l'alimentation, 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 l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux. Elle fait suite à l'évaluation de différents outils publiés, à savoir :

- pour la détection et l'identification morphologiques : Braasch (2008), OEPP (2009)
- pour l'identification moléculaire : Matsunaga & Togashi (2004)

Les éléments techniques décrits dans cette méthode sont donc basés sur ces éléments de publications avec des adaptations pour leur optimisation.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du 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 (première version)

AMELIORATIONS

Sans objet (première version)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Le nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer 1934) Nickle 1970 est l'agent responsable d'un dépérissement des pins. Il se rencontre principalement sur *Pinus*, mais d'autres conifères tels que *Larix*, *Abies, Cedrus, Chamaecyparis, Pseudotsuga* et *Picea* peuvent aussi être hôte de ce nématode.
Le nématode est transmis d'une plante-hôte à une autre par des coléoptères du genre *Monochamus*.

Le transport de bois infesté ou du vecteur contaminé constitue le mode de dissémination du parasite le plus probable au niveau international.

Le nématode visé est un organisme nuisible de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à la réglementation européenne (directive 2000/29 CE).

1. Objet

Cette méthode décrit l'extraction et l'identification du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*.

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode est applicable aux bois et écorces de conifères sous forme de copeaux, morceaux ou disques de bois.
Les nématodes peuvent également être recherchés à partir des insectes vecteurs (*Monochamus* spp.)

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La taille et le volume des échantillons à prélever pour la recherche de *B. xylophilus* sont définis dans les notes de service correspondantes. Ils doivent permettre une mise en migration optimale avec le matériel standard d'un laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à l'analyse.

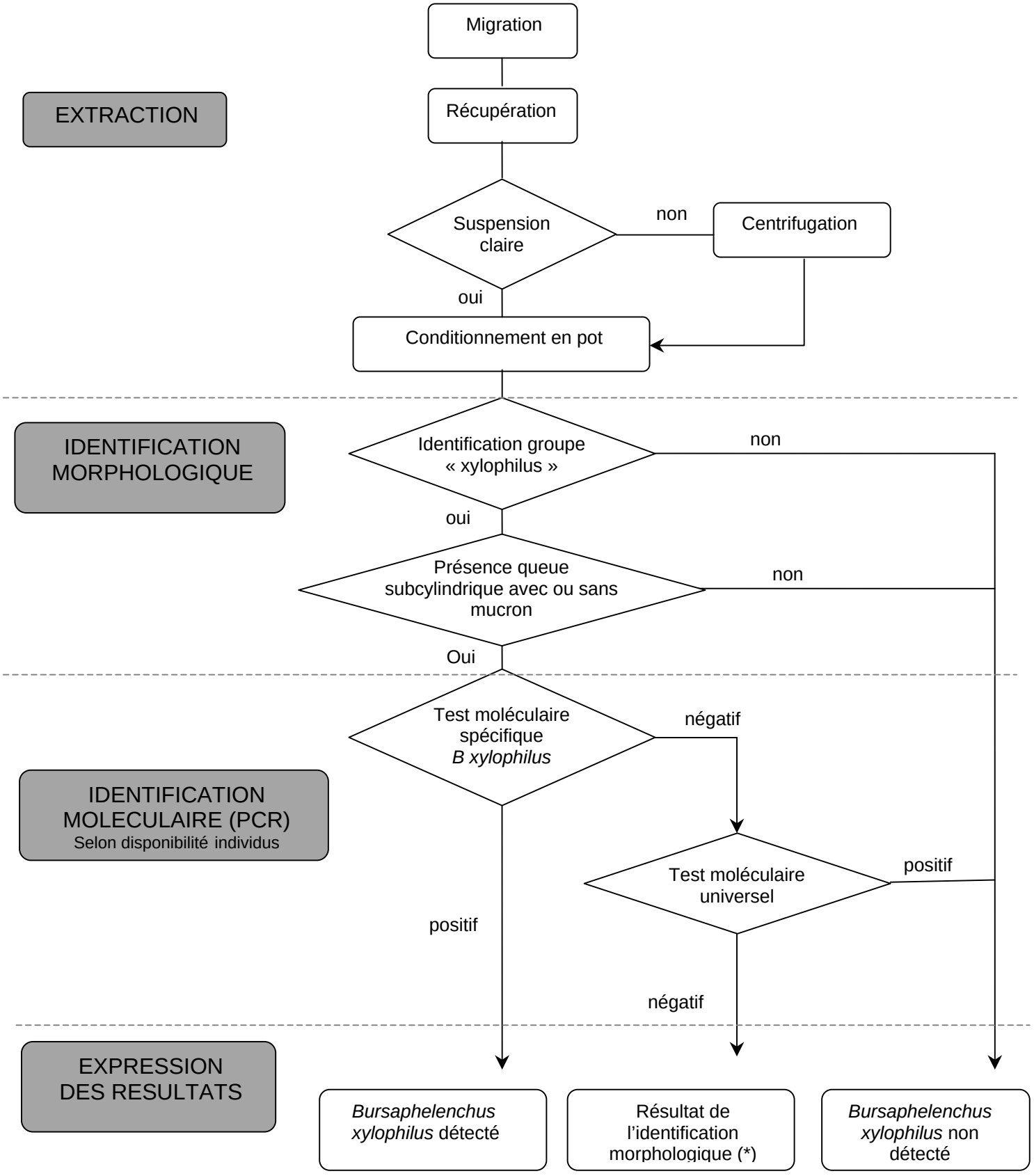
Utiliser la totalité ou partie de l'échantillon reçu (quantité déterminée par le protocole de prélèvement) avec un volume maximal de 400 millilitres pour les copeaux et un diamètre ou une longueur maximale de 20 cm pour les disques et les morceaux de bois.
Dans le cas où le volume de l'échantillon dépasse 400 ml, homogénéiser et prélever environ 400 ml.
Pour une détection à partir de *Monochamus*, utiliser la totalité des insectes reçus.

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

Dans le cadre du plan de surveillance, une incubation préalable est réalisée, notamment pour permettre une multiplication des nématodes éventuellement présents et augmenter la capacité de détection. Pour ce faire, les échantillons sont mis à incuber dans un sac en plastique fermé et si besoin légèrement humidifiés à l'aide d'un vaporisateur à main (cas de bois très sec). Ils sont maintenus à une température d'au moins 20°C pendant une période minimale de 15 jours à partir de la date de réception (Schröeder *et al*, 2009).

Les extraits obtenus après extraction du bois peuvent être conservés quelques jours au froid positif en attendant leur analyse.

3. Présentation schématique de la méthode



(*) : Mention « ADN non exploitable » sur le rapport d'analyse

4. Matériel et consommables

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 de récupération.

4.1. Extraction

Migration
- Filtre papier ou en cellulose
- Eau du robinet
- Cuvettes ou autres récipients de capacité adaptée
- Tamis de migration ou autre support de maille supérieure à 40 µm (passoire par exemple)

Centrifugation
- Centrifugeuse à rotor libre avec bols de grande capacité à fond hémisphérique
- Kaolin
- Solution de sulfate de magnésium (densité environ 1,18) ou solution de propriété équivalente (voir chapitre 1.2.1.3. de la MOA 012 ainsi que le répertoire des recettes REP 001)
- Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur…)
- Pissette d'eau du robinet et pissette de sulfate de magnésium

Récupération
- Tamis de récupération (mailles d'environ 20 µm au plus)
- Récipients pour conditionnement des extraits
- Pissette (eau du robinet)

4.2. Identification morphologique

- Microscope stéréoscopique (loupe binoculaire) avec éclairage diascopique, grossissement de l'ordre de 16 à 60X
- Microscope photonique haute définition (grossissements de l'ordre de X16 à X1000)
- Cil monté sur aiguille ou autre instrument adapté pour la manipulation des nématodes
- Cellule de lecture
- Pissette
- Eau courante
- Huile d'immersion
- Lames
- Lamelles
- Vernis

4.3. PCR

4.3.1. Consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables dits de qualité biologie moléculaire, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

- Eau Ultra Pure de qualité biologie moléculaire

- Tampon d'extraction d'ADN : Tris HCl 10mM pH=8,0 ; EDTA 1mM ; Nonidet P40 1% ; protéinase K 100µg/mL tampon final (d'après Ibrahim et al., 1994)

- Oligonucléotides

Cible	Amorces	Séquence 5'→ 3'
B. xylophilus*	**XF**	ACGATGATGCGATTGGTGAC
	XR	TATTGGTCGCGGAACAAACC
Tous nématodes	**Forward primer**	CGTAACAAGGTAGCTGTAG
	Reverse primer	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG

*Ces amorces spécifiques peuvent être utilisées en duplex avec des amorces spécifiques *B. mucronatus* décrites dans Matsunaga & Togashi (2004).

- Pré-mix commercial
Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, $MgCl_2$, etc.) peuvent être utilisés.

- ADN polymérase thermostable et tampon de polymérase
N'importe quelle polymérase à ADN peut être utilisée dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec la Taq MP Biomedical (ref. EPTQD925) lors de l'évaluation de la méthode. Dans ce cas, le tampon de polymérase utilisé sera celui commercialisé par le fournisseur de la polymérase à ADN associée.
Ces réactifs peuvent être déjà compris dans un pré-mix commercial.

- Chlorure de magnésium ($MgCl_2$)
Ce réactif peut être, dans certains cas, déjà intégré dans un pré-mix commercial.

- Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)
Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) peuvent être déjà intégrés dans un pré-mix commercial.

- Autres réactifs
Tampon de charge
Marqueur de taille moléculaire
Agarose
Tampon d'électrophorèse : Tris Acétate EDTA (TAE) ou Tris Borate EDTA (TBE)
Marqueur d'acides nucléiques : bromure d'éthidium, SYBRSafe ou autres intercalants de l'ADN

- **Autres consommables à usage unique**
  - embouts de pipette avec et sans filtre de volume adapté,
  - microtubes d'environ 2 mL,
  - microtubes ou plaques pour PCR adaptés au thermocycleur,
  - billes de verre de 1 mm et 3 mm de diamètre.

4.3.2. Matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, centrifugeuses, agitateur, bain-marie, cuves d'électrophorèse, système de prise de vue de gel d'électrophorèse …), le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent
- Appareil de PCR conventionnelle.

5. Extraction

5.1. Migration

L'échantillon est placé dans un tamis qui repose dans l'eau d'une cuvette. Les nématodes vont migrer à travers les mailles du tamis vers l'eau. Un papier filtre est intercalé entre l'échantillon et le tamis (méthode Baermann modifiée décrite *chapitre 1.2.2.2 de la MOA012*).

Dans le cas d'une détection à partir de *Monochamus,* il convient de couper les insectes en petits morceaux avant de les placer sur le tamis.

Laisser les nématodes migrer pendant au moins 24 heures à température ambiante.

5.2. Récupération des nématodes

Enlever le tamis et filtrer l'eau de la cuvette sur un tamis de récupération.

Si la suspension obtenue est sale, procéder à une centrifugation de l'extrait obtenu au sulfate de magnésium :
Transférer la suspension dans un bol de centrifugation à l'aide d'un jet de pissette de sulfate de magnesium (d=1,18).
Ajouter une cuillerée de kaolin et homogénéiser.
Centrifuger 2 min à 900 g (durée et accélération approximatives).
Récupérer les nématodes par filtration du surnageant sur un tamis de 20 µm.

Voir principe et description de la centrifugation *chapitre 1.2.1.3 de la MOA12.*

5.3. Conditionnement de l'extrait

Transférer le contenu du tamis de récupération dans un récipient de lecture à l'aide d'une pissette d'eau.
L'extrait est conservé au froid positif.

6. Identification morphologique

6.1. Principe

Cette identification nécessite la connaissance des principaux genres de nématodes phytoparasites.

Dans un premier temps, l'analyse consiste à écarter à la loupe binoculaire, les nématodes n'appartenant pas au groupe « *xylophilus* ».
Les individus conservés sont ensuite préparés pour une observation au microscope et caractérisés à l'aide de la clé d'identification de l'espèce.

6.2. Identification du groupe

- Observer directement l'extrait dans le récipient de conditionnement ou dans une coupelle de lecture au microscope stéréoscopique.
- Rechercher et sélectionner les nématodes appartenant à la famille des *Aphelenchoididae*.
- rechercher les nématodes appartenant au genre *Bursaphelenchus.*

Lorsqu'aucun individu du genre *Bursaphelenchus* n'est observé, l'analyse est terminée et le résultat est formulé comme indiqué paragraphe 6.4.

- Préparer, si cela est possible, 5 mâles et 5 femelles de chaque population sélectionnée pour une observation au microscope photonique à fort grossissement selon MOA012 chapitre 1.3.2.1.

L'identification de l'appartenance au groupe « *xylophilus* » nécessite, au minimum, l'observation correcte **d'un mâle et d'une femelle** de la population à déterminer.
Les espèces du **groupe « *xylophilus*** » sont caractérisées par :

- 4 lignes latérales (fig.1)
- un fort recouvrement vulvaire chez la femelle (fig.2)
- de grands spicules fortement arqués chez le mâle (fig.3)

Si pour un individu, un seul des critères observés est différent de ceux indiqués (par exemple observation de 6 lignes latérales ou absence de recouvrement vulvaire), celui-ci n'appartient pas au groupe « *xylophilus* ».
Les critères « recouvrement vulvaire » et « grands spicules fortement arqués » doivent impérativement être observés pour pouvoir statuer sur le groupe. Parfois, le recouvrement vulvaire ne peut être observé sur des femelles mal positionnées (par exemple sur le dos), c'est pourquoi il est préconisé de préparer plusieurs individus de chaque sexe. Si toutefois un des deux critères n'est pas observé, l'étape suivante est mise en œuvre.

Fig.1

Fig. 2

Fig.3

6.3. Identification de l'espèce

Les individus identifiés comme appartenant au groupe "*xylophilus*" sont observés au microscope photonique.
L'identification de l'espèce *Bursaphelenchus xylophilus* nécessite, au minimum, l'observation **d'une femelle** de la population à déterminer :

1	Femelle avec queue conique ou effilée avec ou sans mucron (Fig.4-5-6)……	pas *B. xylophilus*
	Femelle avec queue sub-cylindrique (Fig.7)……....	**2**
2	Femelle avec queue sub-cylindrique, avec extrémité arrondie sans mucron (Fig.7)	***B. xylophilus***
	Femelle avec queue sub-cylindrique avec un mucron terminal (Fig.8)……..	pas *B. xylophilus* ou *B. xylophilus* mucroné (forme rare)

Fig.4

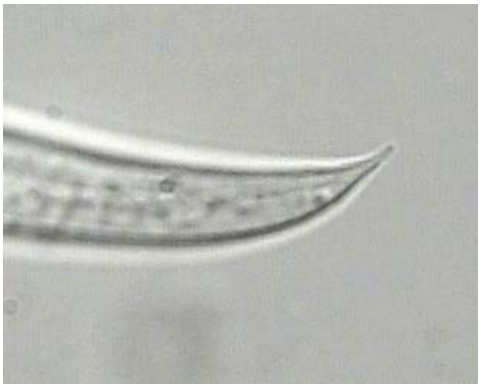


fig 5

fig.6

Fig.7

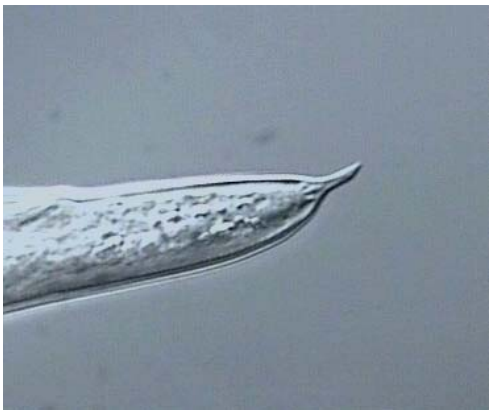


fig.8

6.4. Résultats

L'identification morphologique conduit à l'un des résultats suivants :

1- *Bursaphelenchus xylophilus* **détecté**.

Lorsqu'au moins une des femelles observées est identifiée comme appartenant à l'espèce.

2- *Bursaphelenchus xylophilus* **non détecté**.

Lorsque aucun des individus observés n'a pu être identifié comme appartenant au groupe *xylophilus,* ou aucune des femelles observées comme appartenant à l'espèce *B. xylophilus*.

3- *Bursaphelenchus* « groupe xylophilus » **détecté non classé (ni 1 ni 2)**

Lorsqu'au moins une des femelles observées est du groupe *xylophilus* et présente une queue subcylindrique mucronée.

Les résultats 1 et 3 (*Bursaphelenchus* groupe *xylophilus* avec queue de la femelle subcylindrique) donnent lieu à la mise en œuvre d'une identification moléculaire, si le nombre d'individus est suffisant. Sinon seule l'identification morphologique est réalisée. Pour l'expression du résultat final, se reporter au paragraphe 8.
Le résultat 2 conduit à la fin de l'analyse. Pour l'expression du résultat final, se reporter au paragraphe 8.

7. Identification par amplification génomique

7.1. Prise d'analyse

L'analyse est réalisée sur des nématodes isolés qui auront été prélevés et conditionnés préalablement : un minimum de 3 individus ou un maximum de 10 individus doit être prélevé, conditionné en microtube avec 100µl de tampon d'extraction ADN (placer les nématodes dans le liquide). La prise d'analyse est alors soit soumise à extraction d'ADN, soit conservée en froid négatif jusqu'à l'extraction d'ADN. En dehors de cette fourchette de matériel biologique, des réserves sont émises si un résultat négatif est obtenu.

7.2. Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :

- un contrôle négatif de processus (E-) : tampon d'extraction ADN seul conditionné selon les mêmes modalités que celles pour l'échantillon à analyser,
- un témoin positif de PCR (A+) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *B. xylophilus* ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et a permis une amplification des échantillons contenant la cible,
- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Ces contrôles permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (amplification de l'ADN de *B. xylophilus* pour le contrôle positif et absence de contamination pour les contrôles négatifs).

N.B. : les présents termes sont définis dans le glossaire MOA-GLO 001.

7.3. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN résulte de l'action successive d'un broyage mécanique (billes de verre) et d'un traitement chimique (protéinase K).
Pour ce faire,
- Ajouter des billes de verre de diamètre différent (3mm et 1mm) au tube de conditionnement contenant les nématodes.
- Placer sous agitation pendant environ 40 secondes à fréquence maximale (tubes préalablement décongelés).
- Placer les tubes au bain marie (entre 50 et 60°C) pendant au moins une heure, pour permettre l'activation de la protéinase K.
- Centrifuger les tubes pour précipiter les débris cellulaires.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube ou en microplaque pour un nouveau traitement thermique à environ 95°C pendant environ 10 min (dénaturation de la protéinase K). Il est conseillé de réaliser cette étape en thermocycleur pour garantir une meilleure performance thermique de cette étape.

7.4. Amplification d'ADN

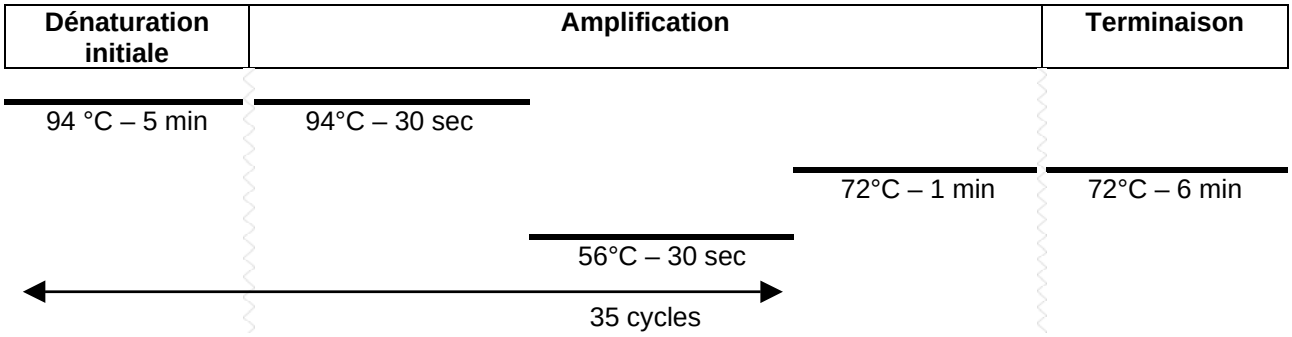
Pour chaque extrait d'ADN, un minimum de 2 tubes de réaction par PCR doit être réalisé pour la recherche de *B. xylophilus* dans l'échantillon.

Test PCR spécifique

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Réactifs	Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	25 µl
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl2 (prendre en compte le MgCl2 éventuellement présent dans le tampon Taq)	1.5 mM
Amorce XF	0.2 µM
Amorce XR	0.2 µM
dNTPs	0.3 mM
Taq DNA polymérase	1 unité
Extrait ADN	5 µl
Eau ultra pure	Qsp 25 µl

L'évaluation de ce test PCR a été réalisé avec une Taq DNA polymérase de MP Biomedicals (réf. EPTQD925).
Appliquer le cycle d'amplification suivant :



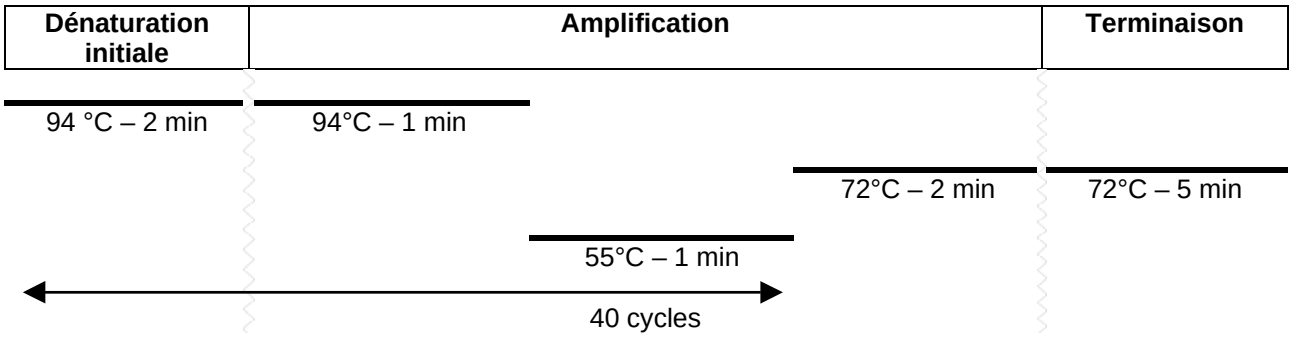
Test PCR universelle

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Réactifs	Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	25 µl
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
$MgCl_2$ (prendre en compte le $MgCl_2$ éventuellement présent dans le tampon Taq)	2 mM
Amorce Forward	0.6 µM
Amorce Reverse	0.6 µM
dNTPs	0.1 mM
Taq DNA polymérase	2 unités
Extrait ADN	5 µl
Eau ultra pure	Qsp 25 µl

L'évaluation de ce test PCR a été réalisé avec une Taq DNA polymérase de MP Biomedicals (réf. EPTQD925).

Appliquer le cycle d'amplification suivant :



7.5. Electrophorèse

Préparer un gel d'agarose dans un tampon TAE ou TBE (voir MOA-REP 001). Le marqueur d'ADN (intercalant) peut soit être ajouté dans le gel lors de sa préparation, soit ultérieurement.
Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposée sur chaque ligne de dépôts afin de définir la taille du fragment obtenu.
Faire migrer les produits d'amplification en appliquant un courant électrique.

7.6. Révélation

La révélation se fait directement par lecture sur table UV si le marqueur d'ADN a été préalablement incorporé (point 7.4).
Sinon, la révélation est réalisée après immersion dans une solution de marqueur d'ADN (le bromure d'ethidium, BET, est souvent utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/ml). Cette solution doit être protégée de la lumière ; après coloration, rincer si nécessaire le gel à l'eau (sans chlore).
Observer le gel sous UV.
Remarques : veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau) et le BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port obligatoire de gants nitriles. Tous les déchets ayant été en contact avec du BET ou tout marqueur d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.
D'autres marqueurs de l'ADN sont également disponibles Sybr Green (lecture à 530 nm)…

7.7. Résultats

L'observation de gel sous U.V. ne constitue pas un moyen suffisant pour garantir la traçabilité des résultats. Un équipement adapté fournissant une copie /image fidèle du gel sur un support stable dans le temps et référencé est nécessaire.

7.7.1. Validation des résultats

L'analyse pour la PCR spécifique ou la PCR universelle est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultat attendu et devant être observé
Contrôle négatif de processus (E-)	**NEGATIF**
Contrôle négatif de PCR (A-)	**NEGATIF**
Contrôle positif de PCR (A+)	**POSITIF**

7.7.2. Interprétation et formulation des résultats moléculaires

L'analyse est qualitative. Quel que soit le test PCR, le résultat de test par puits est négatif pour les échantillons ne présentant aucune amplification à la taille attendue. Le résultat de test par puits est positif pour les échantillons présentant un fragment de taille attendue.

Cas de la PCR spécifique : Les amorces XF et XR décrites au point 4.3.1 permettent une amplification spécifique d'un fragment d'environ 560 pb pour *B. xylophilus*.

Analyse		**Résultat du test**	**Résultat de l'analyse moléculaire**
Puits 1	**Puits 2**		
+	**+**	POSITIF	Résultat positif pour l'identification moléculaire de *Bursaphelenchus xylophilus*
+	**-**	PCR à refaire. Si au moins1 positif sur 2 lors de la 2ème amplification, le résultat est interprété comme positif.	
-	**-**	NEGATIF, test PCR universelle à réaliser	

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.

Cas de la PCR universelle (Burgermeister *et al*. (2005)) : Les amorces Forward et Reverse décrites au point 4.3.1 permettent une amplification spécifique d'un fragment de taille entre 850 à 1350 pb selon l'espèce de *Bursaphelenchus*.

Analyse		**Résultat du test**	**Résultat de l'analyse moléculaire**
Puits 1	**Puits 2**		
+	**+**	POSITIF	Présence d'ADN amplifiable, *Bursaphelenchus xylophilus* non identifié
+	**-**	POSITIF	Présence d'ADN amplifiable, *Bursaphelenchus xylophilus* non identifié
-	**-**	NEGATIF	ADN non amplifiable, pas de résultat d'identification moléculaire

8. Interprétation et expression des résultats finaux

Le résultat final de détection de *B. xylophilus* est exprimé sous forme qualitative et résulte de la combinaison des résultats d'identification morphologique et moléculaire, lorsque que les deux types d'identification ont été mises en œuvre, selon les règles de décisions suivantes :

		Identification morphologique		
		B. xylophilus détecté	*B.xylophilus non détecté*	*B.* « groupe *xylophilus* » non classé
Pas d'identification moléculaire			*B.xylophilus* non détecté	
Identification moléculaire	*B. xylophilus identifié*	*B.xylophilus* détecté		*B.xylophilus* détecté
	B. xylophilus non identifié	*B.xylophilus* détecté		*B.xylophilus* non détecté
	ADN non exploitable	*B.xylophilus* détecté*		*B.xylophilus* non détecté *****

L'expression du résultat d'analyse sur le rapport est une phrase semblable à :

***Bursaphelenchus xylophilus* non détecté**

***Bursaphelenchus xylophilus* détecté**

Remarque :

(*****) un commentaire sera porté sur le rapport indiquant que l'analyse moléculaire n'a pu être réalisée pour cause d'ADN non exploitable.

9. Elimination des matériels biologiques susceptibles d'être contaminants

Les risques de contamination du laboratoire et de son environnement sont liés à la présence du parasite dans :
- les reliquats d'échantillons et emballages,
- les effluents d'analyses.

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans le laboratoire et l'environnement : traitement des effluents, destruction contrôlée des déchets.

10. Conservation des reliquats de matériels biologiques utilisés

Il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction générale de l'Alimentation au sein du Ministère chargé de l'agriculture.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
MOA 012	Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites
Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 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 Communtauté *Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022*
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de la Santé des Végétaux remercie :

Philippe Castagnone,
Hervé Marzin,

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

BIBLIOGRAPHIE

- BRAASCH H. (2008) The enlargement of the *xylophilus* group in the genus *Bursaphelenchus*. *In:* MOTAN M, VIEIRA (eds) Pine Wilt Disease: a Worldwide Threat to Forest Ecosystems. Springer.139-149.
- BURGERMEISTER W., METGE K., BRAASCH H. et E. BUCHBACH (2005). ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1), 29-42.
- IBRAHIM S.K., PERRY R.N., BURROWS P.R. et D.J. HOOPER (1994). Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus augustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of nematology*, 26, 412-421.
- MATSUNAGA K. et K. TOGASHI (2004). A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species-specific polymerase chain reaction. *Nematology*, 6(2), 273-277.
- OEPP (2009) PM 9/1 (2) *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors : procedures for official control. *Bulletin OEPP* (39) 454-459
- OEPP (2009) PM 7/4 (2) Normes de diagnostic pour les organismes réglementés: *Bursaphelenchus xylophilus* Bulletin OEPP (39) 344-353
- SCHRÖDER T., McNAMARA D., GAAR V. (2009) Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *Bulletin OEPP* (39),2, 179-188
- STEINER, G., BUHRER, E.M. (1934). *Aphelenchoides xylophilus* n.sp., a nematode associated with blue stain and other fungi in timber. *Journal of agricultural research* 48, 949-951.
- Fiche informative sur *Bursaphelenchus xylophilus Le CABI et l'OEPP* pour l'UE http://www.eppo.org/QUARANTINE/nematodes/Bursaphelenchus_xylophilus/F-bursxy.pdf

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.