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 la qualité et de 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/2012-03-010
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2012-8061

Date: 15/03/2012

A l'attention de mesdames et messieurs les Préfets

Date de mise en application :	immédiate
Abroge et remplace :	Note de service DGAL/SDQPV/N2011-8086 du 06/04/2011
Date d'expiration :	-
Date limite de réponse/réalisation :	-
Nombre d'annexes :	1
Degré et période de confidentialité :	Aucune

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 017 version 2a relative à la détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal), *Tilletia caries*, *Tilletia controversa* et *Tilletia foetida* par filtrations sélectives 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, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux.

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA 017 version 2a relative à la détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal), *Tilletia caries*, *Tilletia controversa* et *Tilletia foetida* par filtrations sélectives et identification morphologique.

Mots-clés : Mycologie - méthode officielle d'analyse - MOA - analyses - détection - *Tilletia indica* - *Tilletia caries* - *Tilletia controversa* - *Tilletia foetida* - carie de Karnal - carie commune - carie naine - grains - semences - céréales

Destinataires	
Pour exécution :	**Pour information** : - DRAAF- SRAL - DAAF – Service de l'alimentation - Anses – Laboratoire de la santé des végétaux

Tilletia indica, agent de la carie de Karnal sur grains et semences de céréales, est listé dans l'annexe 1A1 de l'arrêté 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.
Tilletia caries, Tilletia controversa et Tilletia foetida sont trois espèces de caries présentes sur le territoire français ; elles sont non réglementées au niveau européen mais leur détection est fréquemment demandée (surveillance du territoire, exportation).

La présente note a pour objet la publication officielle d'une nouvelle version (2a) de la méthode MOA 017. Celle-ci permet non seulement de détecter *Tilletia indica* comme la précédente version (1a), mais également *Tilletia caries, Tilletia controversa et Tilletia foetida* dans un échantillon de semences ou grains de blé, triticale ou seigle, par filtrations sélectives et identification morphologique.

La 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.

Le Directeur Général de l'Alimentation

Patrick DEHAUMONT

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal), *Tilletia caries, Tilletia controversa* et *Tilletia foetida* par filtrations sélectives et identification morphologique

Réf. : MOA 017 version 2a

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	
MOA 017 version 1a	Janvier 2011	Février 2011	Avril 2011	mars 2012 + 3mois[1]
MOA 017 version 2a	Novembre 2011	Décembre 2011	Mars 2012	

[1] En l'absence de modifications majeures concernant la détection de *Tilletia indica* que couvrait la version 1a, sa durée de validité est ramenée à 3 mois après publication de la version 2a.

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 6

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. Produits et consommables 12
5. Appareillage et matériel 12
6. Contrôles et témoins 12
7. Etapes de l'analyse 13
7.1. Prise d'essai 13
7.2. Traitement des prises d'essai 13
7.3. Lavage 13
7.4. Filtrations 13
7.5. Centrifugation 14
7.6. Lecture 14
8. Résultats 14
8.1. Validation des analyses 14
8.2. Interprétation et formulation des résultats 15
9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 16
10. 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 de *Tilletia indica* 20

ANNEXE 3 : fiche descriptive de *Tilletia caries, Tilletia controversa* et *Tilletia foetida*..... 21

ANNEXE 4 : diagramme decisionneL 22

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 est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.
Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

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

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

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international 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

Adaptation de la MOA017 version 1a afin d'étendre son champ d'application à d'autres espèces de *Tilletia* spp. (i.e. *T. caries, T. controversa* et *T. foetida),* en plus de *T. indica.*

AMELIORATIONS

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 européenne 2000/29/CE (organismes nuisibles inexistant dans la Communauté et dont l'introduction et la dissémination doit être interdite dans tous les états membres). Elle s'applique également à la détection de trois autres espèces de *Tilletia* présentes sur le territoire français : *T. caries, T. controversa et T. foetida*.
Selon la demande, cette méthode permet de rechercher *T. indica* seul, ou de rechercher simultanément *T. indica*, *T.caries, T. controversa et T. foetida.*

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 mesuré 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℃ ±4℃ . 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).
Un échantillon peut-être également conservé 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℃.

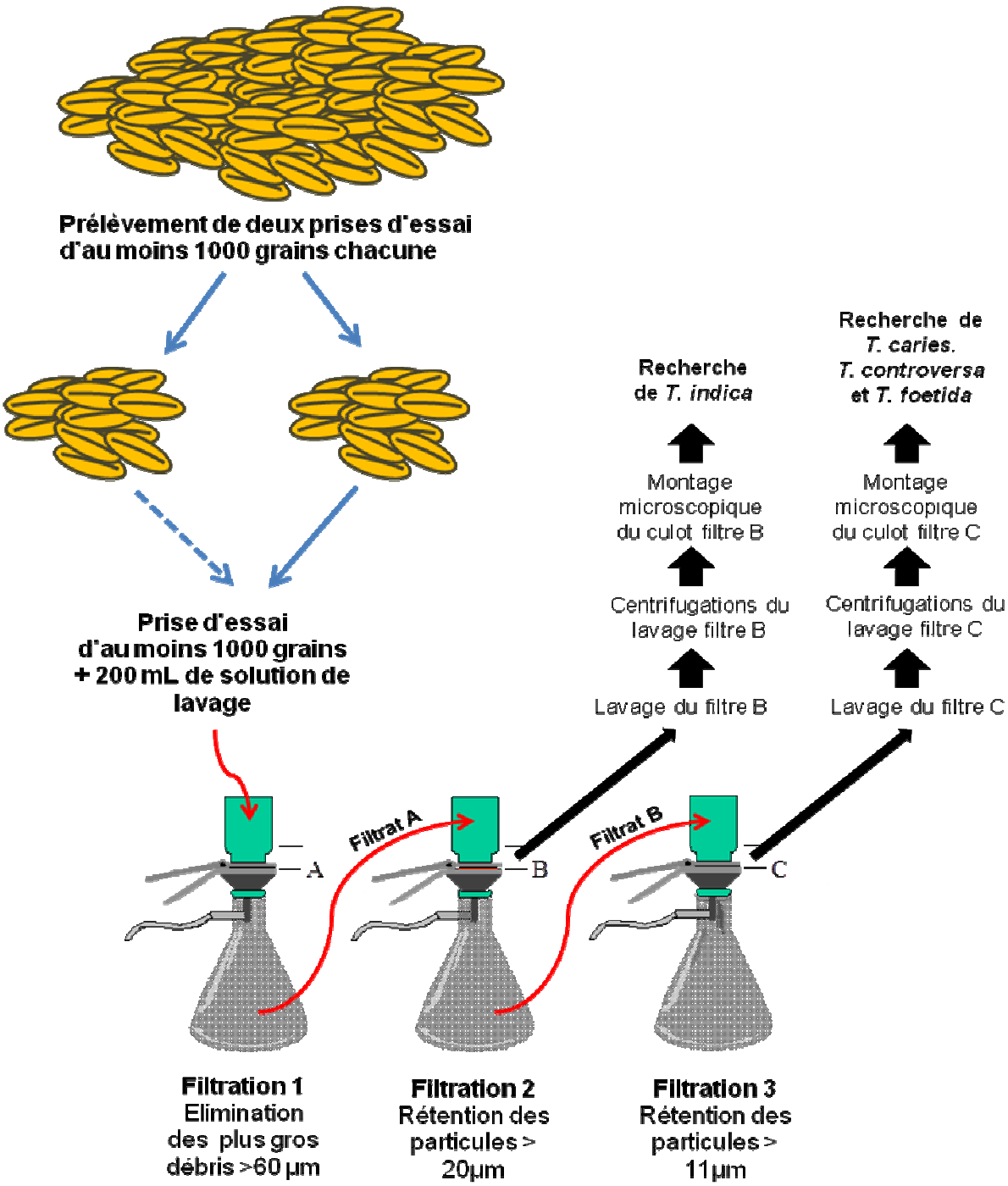
Selon leur provenance, la manipulation des échantillons doit s'effectuer avec des contraintes de confinement appropriées :

i) <u>Echantillons d'importation</u>
La 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, ainsi que des échantillons d'importation doivent être de type NS3.

ii) <u>Echantillons prélevés sur le territoire français</u>
Le territoire français est officiellement indemne de *Tilletia indica, tandis que T. caries, T. controversa et T. foetida* sont des espèces endémiques en France. La manipulation des échantillons de céréales prélevés en France ne nécessite donc pas de niveau de confinement NS3, mais la maîtrise et désinfection des effluents liquides et solides seront requises.

Les téliospores de *Tilletia* spp. 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 :
- Bien séparer les échantillons,
- Porter des gants à usage unique au minimum jusqu'à l'étape de lavage et les changer entre chaque échantillon, se désinfecter les mains à l'éthanol à 70° (ou solution désinfectante équivalente) en cas de contact avec l'échantillon.
- Nettoyer et bien désinfecter le matériel et les paillasses entre chaque échantillon.

3. Présentation schématique de la méthode



4. Produits et consommables

Réactifs et produits :

- Eau distillée ou osmosée.
- Vernis à ongles transparent.
- Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) titrant environ 2,6% de chlore actif.
- Solution de lavage : Ajouter environ une goutte de Tween 20 pur à un litre d'eau osmosée ou distillée (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%.
- Ethanol à 70% ou solution désinfectante équivalente.

Consommables et petit matériel

- Boîtes de Petri.
- Tubes coniques de centrifugation à usage unique (20 à 50 mL).
- 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 pore ou de maille d'environ 60 µm (± 10 µm), 20 µm (± 4 µm) et 11 µm (± 2 µm) (ex. membrane en acétate de cellulose ou toile). Dans le cas où un raccordement métrologique n'est pas possible, un certificat du fournisseur attestant de la qualité des filtres peut-être suffisant

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 à fond plat de type plateau ou bac plastique.
- Réfrigérateur ou chambre froide permettant de garantir une conservation en froid positif (T = 5℃ ± 4℃).
- Microscope photonique à grossissement G x 100 à G x 400 équipé d'un système de mesure et de prise de vue.
- Système de production de vide (type pompe à vide).
- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave pouvant atteindre une température minimale de 121℃ pendant 20 mn) ou tout autre appareil perm ettant d'obtenir le même résultat.
- Centrifugeuse (permettant d'obtenir une vitesse d'environ 1000 tr/min) + rotor adapté aux tubes coniques utilisés (20 à 50 mL)

Verrerie :

- Erlenmeyers de 500 mL.
- Flacons autoclavables

6. Contrôles et témoins

Témoins positifs : lames microscopiques de référence ou photographies de téliospores de *Tilletia indica, T. caries, T. controversa* et *T. foetida*.

7. Etapes de l'analyse

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 :

i) Laisser tremper les semences de la prise d'essai dans environ 100 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à environ 0,2% pendant 24 heures à température ambiante.

ii) Après les 24 h de trempage, ajouter environ 100 mL d'une solution de lavage doublement concentrée en Tween 20 (2 gouttes par litre d'eau osmosée au lieu d'une).

iii) Poursuivre ensuite l'analyse à partir de l'étape de lavage comme pour un lot non traité.

7.1. 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 désinfectée, 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.

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.

7.2. Traitement des prises d'essai

Transférer chaque prise d'essai dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL contenant environ 200 mL de la solution de lavage (cf. § 4).

Les opérations suivantes de lavage, filtrations, centrifugation et observations microscopiques seront réalisées pour chacune des deux prises d'essai.

7.3. Lavage

-Recouvrir la fiole contenant la prise d'essai et la solution de lavage de film étirable étanche de type « parafilm ».
-Agiter vigoureusement le mélange pendant environ 30 secondes.
-Laisser reposer quelques secondes.

7.4. Filtrations

-**Recherche de *T. indica***
Filtrer la solution de lavage en utilisant un appareillage de filtration sous vide surmonté d'un filtre de 60 µm pour retenir les grains et les débris (cf. §3).

- Récupérer le filtrat A puis réaliser une deuxième filtration sur un second appareillage de filtration équipé d'un filtre B de 20 µm de façon à retenir les téliospores de *T. indica* potentiellement présentes.
-Récupérer délicatement le filtre B de 20 µm et rincer minutieusement au dessus d'un récipient stérile (e.g. boîte de Petri) sa face supérieure avec environ 12 à 14 mL d'eau osmosée ou distillée à l'aide d'une micro pipette. Le rincage peut être renouvelé plusieurs fois en reprenant la même eau.
-si aucune autre recherche supplémentaire de *Tilletia* spp. n'est requise, l'analyse se poursuit en §7.5, et les filtrats A et B peuvent être éliminés.

Si une recherche supplémentaire de *T. caries*, *T. controversa* et *T. foetida* est requise :

-Récupérer le filtrat B puis réaliser une troisième filtration sur un troisième appareillage de filtration équipé d'un filtre C de 11 µm de façon à retenir les téliospores de *T. caries, T. controversa* et/ou *T. foetida* potentiellement présentes (cf. §3).
- Récupérer délicatement le filtre C de 11 µm et rincer minutieusement au dessus d'un récipient stérile (e.g. boîte de Petri) la face supérieure de ce filtre avec environ 12 à 14 mL d'eau osmosée ou distillée à l'aide d'une micro pipette. Le rinçage peut être renouvelé plusieurs fois avec la même eau.

7.5. Centrifugation

Centrifugation pour recherche de *T. indica* (filtre B)

Transférer le liquide contenant potentiellement les téliospores (issu du rinçage du filtre B) dans un tube de centrifugation.

-Centrifuger à une vitesse minimale de 1000 tr/min) 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 tr/min, pendant au moins 1 minute à température ambiante.

-Eliminer délicatement 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 suffisant de lames.

Remarque : le culot peut être conservé au réfrigérateur pour une observation microscopique ultérieure.

Centrifugation pour recherche de *T. caries, T. controversa, et T. foetida* (filtre C)

Transférer le liquide contenant potentiellement les téliospores (issu du rinçage du filtre C) dans un tube de centrifugation.

Poursuivre ensuite le même processus analytique que décrit plus haut pour la recherche de *T. indica* jusqu'au montage microscopique entre lame et lamelle.

7.6. Lecture

- Observer les lames au microscope à des grossissements variant de 100 à 400 x. Lorsque des téliospores sont présentes, se reporter au tableau présentant les principales espèces de *Tilletia* spp. (**annexe1**) ainsi qu'aux fiches descriptives (**annexe 2 et 3)** pour l'identification de l'espèce.

- Dans le cas de l'observation de téliospores typiques de *Tilletia indica*, l'identification devra être systématiquement confirmée par le laboratoire national de référence (envoi de lame lutée + photo + reliquat de grains dans un sac confiné « quarantaine »). **Des mesures immédiates de désinfection des locaux et du matériel utilisé devront être mises en œuvre si la manipulation ne s'est pas déroulée dans un local NS3 (cas des analyses sur grains de céréales prélevés en France).**

8. Résultats

8.1. Validation des analyses

-Les téliospores observées seront identifiées comme *T. indica* si tous les critères spécifiques correspondant à cette espèce listés dans le tableau de l'**annexe 1** sont satisfaits.

-Les téliospores observées seront identifiées comme *T. caries* si tous les critères spécifiques correspondant à cette espèce listés dans le tableau de l'**annexe 1** sont satisfaits.
-Les téliospores observées seront identifiées comme *T. controversa* si tous les critères spécifiques correspondant à cette espèce listés dans le tableau de l'**annexe 1** sont satisfaits.
-Les téliospores observées seront identifiées comme *T. foetida* si tous les critères spécifiques correspondant à cette espèce listés dans le tableau de l'**annexe 1** sont satisfaits.

8.2. Interprétation et formulation des résultats

8.2.1. Recherche de *Tilletia indica* uniquement

Si 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(s) sélective(s) et identification morphologique dans l'échantillon analysé** »

Si 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 filtrations sélectives et identification morphologique dans l'échantillon analysé** ». Le résultat devra être systématiquement confirmé par le laboratoire national de référence.

Si de 1 à 10 téliospores de *T. indica* sont observées sur l'ensemble des prises d'essai de l'échantillon, alors la présence de *Tilletia indica* est présumée et devra être systématiquement confirmée par le laboratoire national de référence. Le résultat sera exprimé par une phrase du type : « **Présence présumée de *Tilletia indica* par filtration sélective et identification morphologique dans l'échantillon analysé** » ; le nombre de téliospores observées sera précisé.

8.2.2. Recherche conjointe de *Tilletia indica, T. caries, T. controversa et T. foetida*

- En ce qui concerne *T. indica*, le schéma décisionnel est identique à celui décrit au paragraphe 8.2.1.

- En ce qui concerne les trois autres espèces de *Tilletia* :

Si aucune téliospore de *T. caries/T. controversa/T. foetida* 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 : « ***T. caries/T. controversa /T. foetida** non détecté(s) par filtration(s) sélective(s) et identification morphologique dans l'échantillon analysé** »

Si une ou plusieurs téliospores de *T. caries/T. controversa/T. foetida* 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/caries/controversa/foetida** détecté(s) par filtrations sélectives et identification morphologique dans l'échantillon analysé** ».

*** ne retenir que le nom de l'espèce ou des espèces concernée(s)**

Le diagramme décisionnel présenté en **annexe 4** résume ces conditions.

Les résultats peuvent être également exprimés sous forme d'un tableau reprenant les informations ci-dessus.
Le nombre de téliospores observées peut-être précisé sous forme de commentaire dans le rapport d'analyse.

9. 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 non conservés de l'échantillon (cf §10) et des consommables à usage unique en chaleur humide par passage à l'autoclave à pression de vapeur au moins 20 minutes à 121℃ ou par tout a utre 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 .

10. 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 (dans le cas présent présence ou suspicion de présence de *T. indica* uniquement), et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, à 5±4℃, sauf pour les parties éventuellement transmi ses 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 MOA017 version 1a	Détection sur semences et grains de céréales 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
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

- AGARWAL 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***
.

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

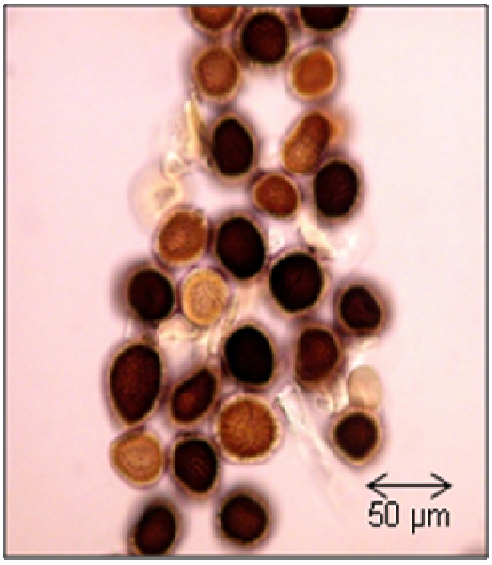
	T. caries (DC.) Tul.	***T. controversa*** Kühn	***T. foetida*** (Wallr.) Liro	***T. indica*** Mitra	***T. barclayana*** (Bref.) Sacc. & Syd. **(1)**	***T. walkeri*** Castlebury & Carris **(1)**
Synonymes	***T. tritici*** (Bjerk.) Wolf ***Uredo caries*** de Candolle	***T. brevifaciens*** Fischer	***T. laevis*** Kühn	***Neovossia indica*** (Mitra) Mundkur	Historiquement confondu avec ***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, min-moy-max) *	14 - 18,0 - 23	16 - 19,9 - 25	13 - 18,8 - 25	28 - 35-41 - 54	20- 24-28 - 40	24-30-31-44

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

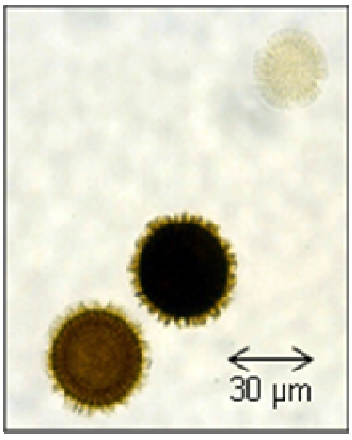
(1) Ces espèces peuvent accidentellement contaminer des lots de blé, par contact dans des containers par exemple.

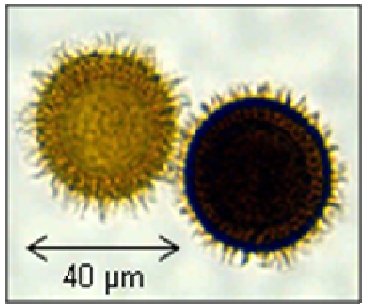
ANNEXE 2 : FICHE DESCRIPTIVE DE *TILLETIA INDICA*

(photos : Laboratoire de la Santé des Végétaux – Unité de mycologie)

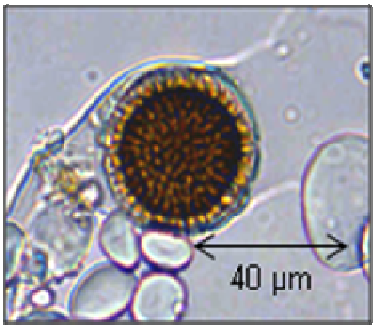


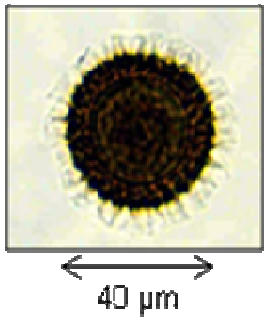
Téliospores à parois de type verruqueux, finement cérébriforme.





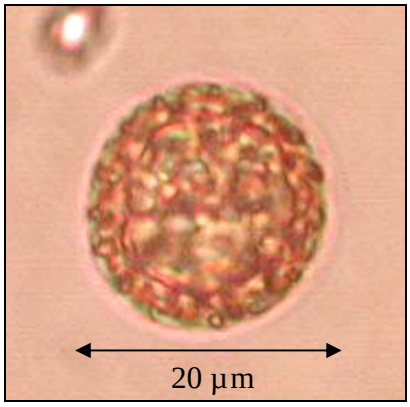
Téliospores à différents stades de maturité (gauche et droite)





Téliospores à ornementations cérébriformes visibles (gauche) et quasi opaques (droite)

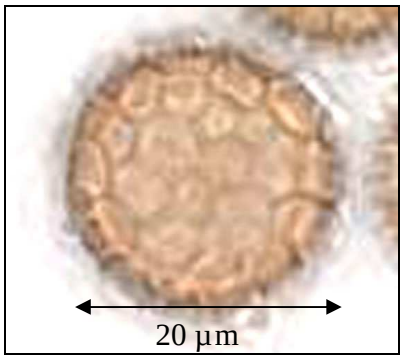
ANNEXE 3 : FICHE DESCRIPTIVE DE *TILLETIA CARIES*, *TILLETIA CONTROVERSA* ET *TILLETIA FOETIDA*



Tilletia caries

Noter les réticulations polygonales dont la largeur est inférieure à 3 µm.

Photo : LSV – Unité de mycologie



Tilletia controversa

Noter les réticulations polygonales dont la largeur est supérieure à 3 µm

Photo : http://nt.ars-grin.gov

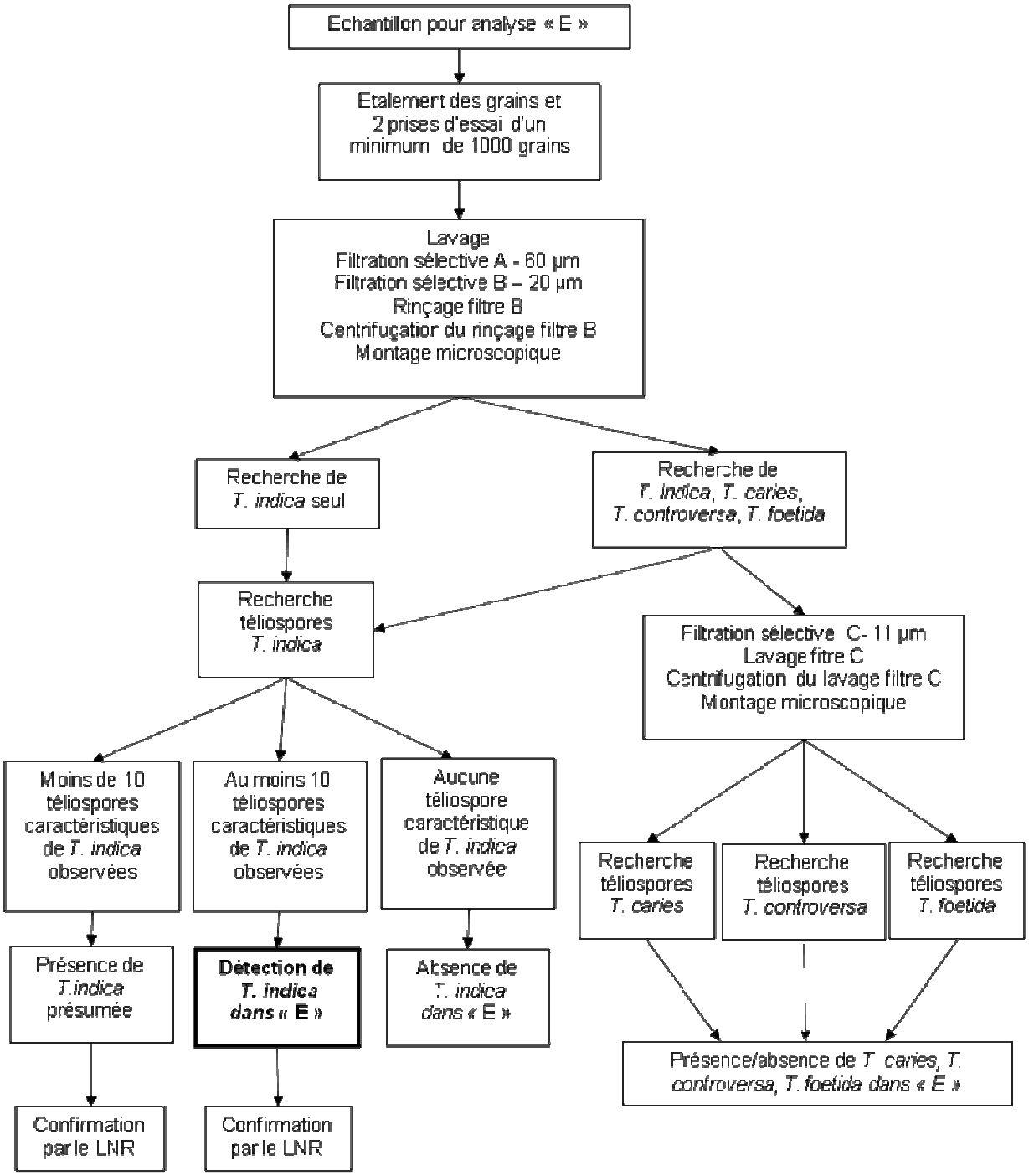


Tilletia foetida

Noter la paroi lisse à légèrement trouée

Photo : http://nt.ars-grin.gov

ANNEXE 4 : 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.