



**Détection de *Ceratocystis platani*
par piégeage biologique**

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



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 Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
MF/97/09	-	-	Février 1997	Février 2011
MOA 015 version 1a	Octobre 2010	Janvier 2011	Février 2011	Janvier 2014
MOA 015 version 1b			Janvier 2014	

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 majeures	9
Améliorations	9
DESCRIPTION DE LA METHODE	10
1. Objet.....	10
2. Domaine d'application.....	10
3. Présentation schématique de la détection.....	12
4. Produits et consommables.....	12
5. Appareillage et matériel	13
6. Contrôles et témoins.....	13
6.1. Témoin négatif de processus	13
6.2. Témoin positif de processus.....	13
7. Prise d'essai.....	13
8. Etapes de l'analyse (cf. Annexe 3 : Dispositif et matériel).....	14
8.1. Mise en pratique	14
8.1.1. Préparation du matériel et consommables.....	14
8.1.2. Mise en place des échantillons	14
8.1.3. Incubation.....	14
8.2. Observation (sous loupe binoculaire et microscope photonique)	14
9. Résultats	15
9.1. Lecture des résultats	15
9.2. Interprétation et formulation des résultats.....	15
9.2.1. Interprétation des résultats	15
9.2.2. Rapport d'essai	15
10. Fixation des lames.....	16
11. Désinfection et élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	16

12. Conservation des reliquats de matériels utilisés.....	16
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	17
REMERCIEMENTS.....	17
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE	18
Annexe 1 : Téléomorphe	19
Annexe 2 : Anamorphe (forme chalara).....	20
Annexe 3 : Matériel et Dispositif	21
Annexe 4 : Symptômes et conseils de prelevement des echantillons sur arbre « en place »	22
Annexe 5 : Régénération des souches de <i>Ceratocystis platani</i>	23
Annexe 6 : Glossaire	24

PREAMBULE

OBJET DES MÉTHODES 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, ABRÉVIATIONS 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 IMPOSÉES AUX LABORATOIRES AGRÉÉS 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 ÉCHANTILLON

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 MÉTHODES OFFICIELLES

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

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

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

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

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

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

CONSIDÉRATIONS D'ORDRE MÉTROLOGIQUE

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 = \pm 10% Volume \geq à 10 mL : EMT = \pm 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur : EMT = \pm 3°C réfrigérateur : 5°C et EMT = \pm 4°C congélateur : \leq -18°C congélateur froid intense : \leq -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS RÉGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITÉ

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 MÉTHODES 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 version de la méthode a été rédigée en se basant sur les travaux de C.Grosclaude et Al.. Cette méthode a été optimisée et évaluée par la station de mycologie 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 MAJEURES

Aucune.

AMÉLIORATIONS

Mesures de précaution à prendre après prélèvement des échantillons et leur envoi au laboratoire destinataire.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection de *Ceratocystis platani* (Walter) Engelbrecht et Harrington par la technique de piégeage biologique sur *Platanus* spp.

1. Objet.

***Ceratocystis platani* est considéré comme un organisme de quarantaine (Directive 2000/29/CE, annexe II, partie II). La lutte contre ce champignon concerne les végétaux de *Platanus*, destinés à la plantation, à l'exception des semences, et les bois de *Platanus*, y compris celui qui n'a pas gardé sa surface ronde naturelle.**

Le champignon *Ceratocystis platani* (Walter) Engelbrecht et Harrington (synonyme : *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted f.sp. *platani* Walter, synonyme : *Endoconidiophora fimbriata* (Ellis et Halsted) Davidson f.sp. *platani* Walter), **agent du chancre coloré du platane**, est un ascomycète de l'ordre des ophiostomatales. Sa forme imparfaite (stade conidien) est *Chalara* sp.

Les platanes (*Platanus* spp.) sont les seuls hôtes de cette forme spécifique.

Ceratocystis platani (Walter) Engelbrecht et Harrington est un agent de trachéomyose (dégénérescence du système vasculaire) provoquant de graves dépérissements et entraînant rapidement la mort des arbres (3 à 7 ans). Les arbres atteints sont *a priori* reconnaissables par leur feuillage clairsemé et jaunâtre, ainsi que par le dépérissement d'une ou plusieurs branches.

Le champignon se manifeste sous forme de lésions de l'écorce, reconnaissables à leur aspect de flamèches de couleur bleu-noir ou violette sur le tronc et les branches. Il pénètre obligatoirement par des blessures et gagne l'intérieur de l'arbre par les rayons ligneux et les vaisseaux.

Le parasite est principalement véhiculé par les outils infectés soit à l'occasion d'élagages, soit lors de travaux de terrassement. La dissémination peut également s'effectuer par l'intermédiaire des eaux de canaux et de rivière, par simple contact racinaire et à partir de tissus végétaux infectés morts.

L'objet de cette méthode est de détecter *Ceratocystis platani* dans des tissus végétatifs (ou tout autre matériel susceptible d'héberger le champignon) de *Platanus* spp ..

La présence de *Ceratocystis platani* est mise en évidence par une technique de piégeage biologique. Celle-ci consiste à utiliser une bûchette de bois de **platane sain**, que l'on écorce avant de la mettre en contact avec le matériel à tester dans un milieu liquide aéré. La bûchette de platane sain joue le rôle de **piège spécifique** vis à vis du champignon éventuellement présent dans le matériel à tester.

Cette méthode est qualitative et permet de détecter *Ceratocystis platani* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode par piégeage biologique (Grosclaude *et al.*; 1988) permet de détecter *C. platani* :

⇒ *dans des échantillons collectés sur arbre « en place »*, au niveau du tronc et des grosses branches, de préférence en bordure de lésions, à l'endroit où le champignon est le plus actif :

- soit à l'aide d'une tarière de type Pressler (carottes de bois) ;
- soit par tout autre moyen permettant un prélèvement équivalent (copeaux de bois

⇒ *dans tout autre matériel susceptible d'héberger le champignon* (débris d'arbres dépérissant ou morts, sciure, eau, terre, etc.).

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les outils sont désinfectés avant et après chaque prélèvement par trempage dans de l'éthanol à 70% ou de l'eau de Javel (ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl)), diluée et titrée à au moins 1% de Chlore actif ou dans l'alcool à brûler ou par tout moyen convenable, le tout suivi d'un égouttage énergique et flambage.

Chaque échantillon est déposé dans un conditionnement individuel fermé hermétiquement (ex.: flacon plastique avec bouchon à vis) et parfaitement identifié.

Afin de garantir la qualité de l'analyse, l'échantillon doit être conservé à 5°C±3°C avant son envoi au laboratoire. L'envoi devra s'effectuer le plus rapidement possible après prélèvement (maximum 3 jours) et assurer une livraison du colis sous 48h.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

L'objet soumis à l'analyse peut être constitué :

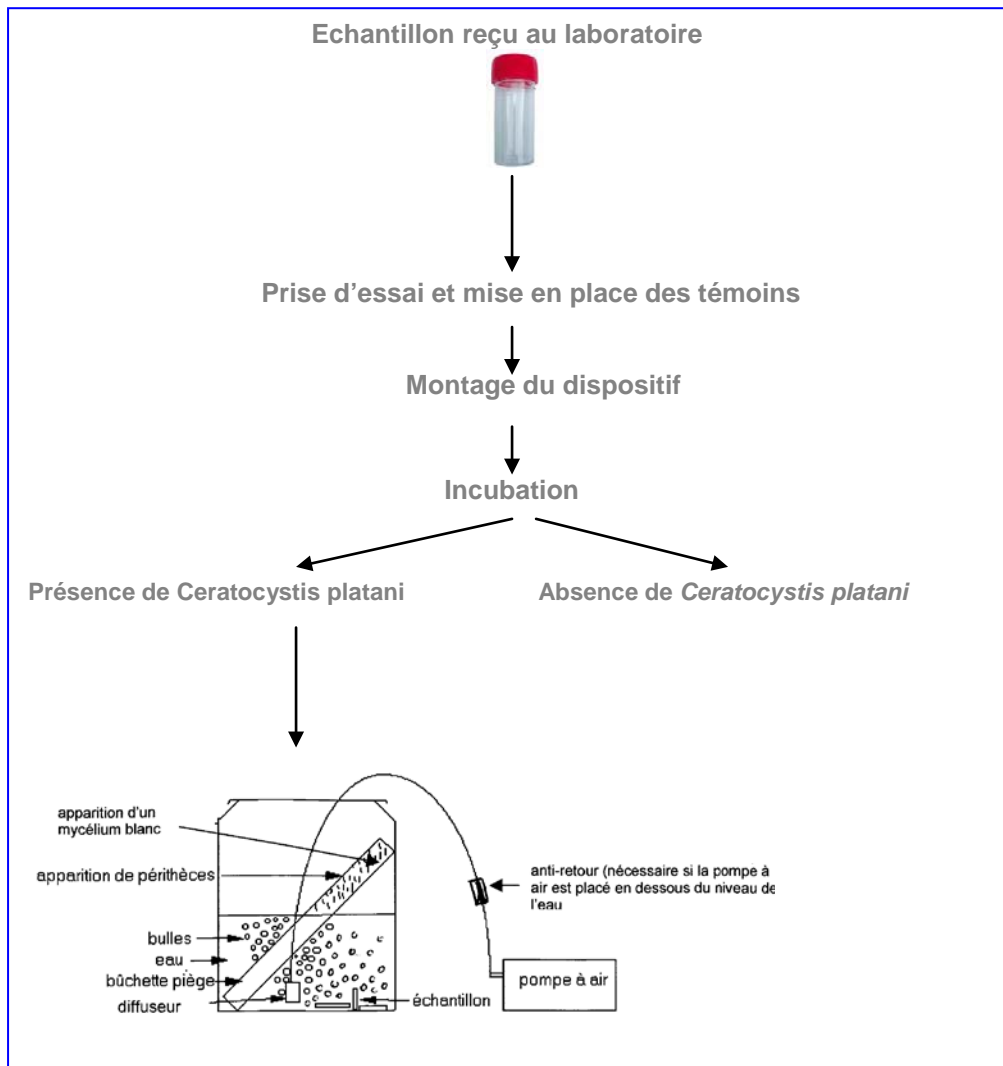
- ⇒ de **carottes de bois** (un minimum de 2 carottes est recommandé), d'une longueur d'environ 5 cm, prélevées à l'aide d'une tarière de type Pressler dans une direction approximativement radiale par rapport au tronc ou à la branche qui porte un symptôme suspect, ;⇒ de petits **fragments de bois**, de **sciure**, ... (de préférence, volume inférieur ou égal à 200 ml), ;
- ⇒ de terre prélevée au voisinage d'arbres atteints par le chancre coloré ;
- ⇒ d'eau d'un cours d'eau traversant une zone contaminée.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

⇒ Dans la mesure du possible, l'échantillon est exploité dès son arrivée au laboratoire. L'analyse peut être reportée de quelques jours (5 maximum). L'échantillon est alors conservé au réfrigérateur à 5°C ± 3°C.

⇒ L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet organisme nuisible doit être en accord avec les exigences de la directive 2008/61/CE.

3. Présentation schématique de la détection



4. Produits et consommables

- Bûchettes provenant de platane sain- de diamètre de 5 à 15 mm environ- de longueur à peu près équivalente à la hauteur du récipient utilisé.

Un lot de bûchettes homogène correspond à des tronçons débités dans un ou plusieurs rameaux prélevés le même jour, sur le même arbre.

A leur arrivée au laboratoire, les rameaux sont stockés dans un réfrigérateur (ou une chambre froide), à une température de $5^{\circ} \pm 3^{\circ}C$. Les extrémités des rameaux sont protégées préalablement par un film plastique de type « Parafilm » afin de minimiser le dessèchement du végétal. Une étiquette portant la référence du lot (année- numéro d'ordre chronologique) et date de prélèvement est apposée sur le conditionnement contenant les rameaux. Un contrôle visant à vérifier leur fraîcheur est effectué avant utilisation (le phloème doit être encore vert).

- Ethanol à 70%
- Eau distillée ou osmosée ou eau de source.
- Acide lactique ou solution de bleu de méthyle à environ 0,5% dans de l'acide lactique.
- Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl), à 1% de Chlore actif minimum.
- Coton, papier absorbant.
- Vernis à ongle ou baume du Canada (conservation de lames).
- Film plastique de type Parafilm.

5. Appareillage et matériel

- Dispositif d'aération avec tuyaux avec ou sans diffuseurs (type aquarium).
- Récipient de type Erlenmeyer ou bocal d'une contenance minimale de 200 mL
- Pincettes
- Aiguilles de prélèvement.
- Lames et lamelles pour montage microscopique et scotch
- Loupe binoculaire (minimum x25).
- Microscope photonique (grossissement x20 à x1000) avec micromètre ou tout autre système permettant la mesure des éléments observés.
- Autoclave à pression de vapeur permettant d'atteindre une température de 121°C pendant au moins 20 minutes ou tout autre traitement permettant d'obtenir un résultat équivalent.
- Brûleur à alcool ou tout autre matériel permettant la stérilisation des instruments.
- Pompe à air.
- Répartiteurs en métal ou en plastique.
- Anti-retour pour pompe à air (nécessaire si la pompe à air est placée en dessous du niveau de l'eau).
- Réfrigérateur (T= 5°± 3°C) ou chambre froide.
- Recommandation : Poste de travail en conditions stériles (poste de sécurité microbiologique,

6. Contrôles et témoins

6.1. Témoin négatif de processus

Un témoin négatif est testé en parallèle à chaque lot d'échantillons afin de vérifier :

- l'état sanitaire du lot de bûchettes-piège vis à vis du *Ceratocystis platani*,
- l'absence de contamination pendant la phase de traitement de l'échantillon,
- l'absence de contamination croisée entre échantillons pendant la durée de l'analyse.

Une bûchette- piège, écorcée, provenant du même lot de bûchettes que celles utilisées pour analyser les échantillons, est placée, **seule**, dans un **bocal témoin**, avec le même dispositif de diffuseurs que les bocal tests. Ce bocal témoin est mis à incuber dans les mêmes conditions que les échantillons à tester (cf. Annexe 3).

6.2. Témoin positif de processus

Un témoin positif est mis en place en parallèle à chaque lot d'échantillons. Celui-ci permet de contrôler la sensibilité du lot de bûchettes et de montrer que l'analyse s'est déroulée de façon optimale.

Une bûchette-piège, provenant du même lot de bûchettes que celles utilisées pour analyser les échantillons est placée dans un bocal témoin avec un échantillon hébergeant *Ceratocystis platani*. Cet échantillon est constitué d'un fragment de culture pure du champignon. Cette culture pure est conservée au réfrigérateur et régénérée en tant que de besoin cf. Annexe 5 : Régénération des souches de *Ceratocystis platani*. Le bocal témoin est incubé parallèlement et dans les mêmes conditions que les échantillons à tester.

7. Prise d'essai

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

Le test se pratique (si possible) sur l'ensemble de l'échantillon reçu pour analyse, qui doit être préparé (si nécessaire, les fragments de végétaux sont découpés, de préférence sous une hotte permettant de travailler en conditions stériles, à l'aide d'un instrument préalablement désinfecté (trempé dans l'alcool à brûler puis passé à la flamme et refroidi)) pour pouvoir être immergé dans le bocal.

8. Etapes de l'analyse (cf. Annexe 3 : Dispositif et matériel)

8.1. Mise en pratique

8.1.1. Préparation du matériel et consommables

- Ecorcer les bûchettes saines,
- Préparer un bocal par échantillon à analyser et l'identifier par une référence unique,

Pour des échantillons constitués de carottes ou de fragments de bois, remplir à peu près à moitié chacun des bocaux avec de l'eau osmosée ou de l'eau distillée ou de l'eau de source,

Pour des échantillons de terre, d'eau ou de sciure, le volume d'eau à ajouter est à peu près équivalent à la quantité d'échantillon à tester,

- Préparer les systèmes « tuyau-diffuseur » (un par bocal).

8.1.2. Mise en place des échantillons

Sous hotte permettant la réalisation des manipulations en conditions stériles, chaque échantillon est traité individuellement (le plan de travail, les ustensiles et les mains sont désinfectés à l'éthanol à 70% entre chaque échantillon).

- Disposer l'échantillon à tester dans le bocal référencé correspondant (cf. Annexe 3).
- Plonger le système tuyau-diffuseur puis une bûchette- piège dont le sommet doit émerger de l'eau,
- Recouvrir immédiatement le bocal avec un film plastique de type Parafilm, de façon bien hermétique (ou tout autre moyen équivalent) afin d'éviter tout risque de contamination et de dissémination,

Le témoin négatif est préparé en premier (le film plastique est scellé à la fin du traitement des échantillons). Ce témoin est placé sur le poste de travail pendant toute la durée des manipulations des échantillons.

Le témoin positif est préparé en dernier.

8.1.3. Incubation

- Monter le dispositif à une température de $22^{\circ}\pm 6^{\circ}\text{C}$ à la lumière ambiante du laboratoire ou dans une enceinte thermostatique pourvue d'un éclairage de type lumière blanche avec éventuellement une photopériode de 12 heures,

- Brancher la pompe,
- Incuber les échantillons en analyse jusqu'à 3 semaines environ, en s'assurant que le dispositif d'aération entraîne un brassage de l'eau de chaque bocal,

- Surveiller l'apparition d'un mycélium blanc et/ou d'une coloration noire sur la partie émergée des bûchettes pièges.

8.2. Observation (sous loupe binoculaire et microscope photonique)

Pour ce paragraphe, se référer aux Annexes 1 : Téléomorphe et 2 : Anamorphe)

Après plusieurs jours d'incubation, si *C. platani* est présent, on peut observer sur la partie émergée de la bûchette:

- des amas d'aspect humide, évoquant la neige fondante.

Un prélèvement à ce niveau (de préférence avec un scotch) pour examen microscopique révèle des cellules conidiogènes laissant échapper des masses d'endoconidies caractéristiques de *C. platani*. Les conidies sont hyalines, cylindro-tronquées, éventuellement encore groupées en files raides (en moyenne 5- 40 x 3- 6 μm). Plus rarement, des endoconidies doliformes (7- 12 x 6- 9 μm) sont formées en chaînes courtes.

- des périthèces du champignon, dont le col, très allongé (longueur : en moyenne 400 - 800 μm), est facilement reconnaissable même à la loupe binoculaire, sous forme d'une « sphère » noire surmontée d'une soie noire faisant saillie du bois. Les ascospores ont une forme caractéristique de chapeau melon (4-8 μm).

- des chlamydospores, à paroi épaisse, bulbeuses ou ampoulées, brunâtres à maturité, isolées ou en chaîne, de dimension en moyenne 11-19 x 9-15 μm sont parfois présentes.

9. Résultats

9.1. Lecture des résultats

Pour conclure à la présence de *Ceratocystis platani* sur la bûchette-piège, il est nécessaire :

- d'observer sous la loupe binoculaire la présence d'un mycélium blanc évoquant la « neige fondante »
- de vérifier par un montage entre lame et lamelle la présence de cellules conidiogènes libérant les endoconidies (Annexe 2)

S'ils sont présents (car certaines souches de *C. platani* ne produisent pas de périthèces) :

- d'observer sous la loupe binoculaire la présence et l'aspect des périthèces de *C. platani*,
- de vérifier par un montage entre lame et lamelle la forme des ascospores de *C. platani* (cf. fiche annexe 1).

Les mesures des structures observées au microscope photonique (endoconidies, longueur du col des périthèces,) ne sont réalisées qu'en cas de doute.

D'autres espèces, *Ceratocystis paradoxa*, *Ceratocystis moniliformis*, ont des anamorphes semblables à celles de *Ceratocystis platani*, cependant elles ne sont pas signalées sur platane.

9.2. Interprétation et formulation des résultats

9.2.1. Interprétation des résultats

Le tableau décisionnel ci-dessous résume toutes les possibilités de validation et d'interprétation des résultats obtenus sur la prise d'essai et les contrôles mis en place.

		Contrôles			
		Témoin négatif non contaminé et Témoin positif non contaminé*	Témoin négatif non contaminé et Témoin positif contaminé	Témoin négatif contaminé et Témoin positif non contaminé*	Témoin négatif contaminé et Témoin positif contaminé
Prise d'essai	Contaminée	Positif	Positif	Manipulation non validée Résultat indéterminé (faux positif ?)	Manipulation non validée Résultat indéterminé (faux positif ?)
	non Contaminée	Manipulation non validée Résultat indéterminé (faux négatif?)	Négatif	Manipulation non validée Résultat indéterminé (faux négatif?)	Négatif

* Prévoir la régénération de la souche de référence ou l'utilisation d'une autre souche de référence

9.2.2. Rapport d'essai

Exprimer le résultat dans un tableau comportant les informations ci-dessous ou par une phrase du type :

⇒ **lorsque le résultat de l'analyse est négatif** :

"*Ceratocystis platani* non détecté sur l'échantillon analysé par piégeage biologique.", en citant la référence et le titre de la méthode ci-dessus.

⇒ **lorsque le résultat de l'analyse est positif** :

"*Ceratocystis platani* détecté sur l'échantillon analysé par piégeage biologique.", en citant la référence et le titre de la méthode ci-dessus.

⇒ **lorsque le résultat de l'analyse est indéterminé** :

"*Ceratocystis platani* indéterminé sur l'échantillon analysé par piégeage biologique.", en citant la référence et le titre de la méthode ci-dessus.

Si possible, des informations sont données sur la cause de l'indétermination.

Dans ce cas, un nouveau prélèvement peut être transmis au laboratoire.

10. Fixation des lames

La mise en évidence de *C. platani* peut être confirmée par l'envoi au laboratoire de référence de lames fixées.

Mode opératoire pour la préparation des lames :

- Déposer une goutte de colorant (de préférence solution de bleu de méthyle) sur une lame porte-objet,
- Prélever les structures fongiques à observer à l'aide d'une aiguille (préférable au scotch lorsque l'observation n'est pas immédiate) préalablement nettoyée puis flambée,
- Déposer le prélèvement dans la goutte de colorant,
- Couvrir la préparation à l'aide d'une lamelle couvre-objet en chassant un maximum d'air,
- Absorber le surplus de colorant avec un coton-tige,
- Sceller la lamelle sur la lame à l'aide de vernis à ongle pour conserver la préparation,
- Déposer une étiquette auto-collante sur le côté de la lame contenant la référence de l'échantillon et la date de préparation de la lame
- Transmettre la lame au LNR accompagnée d'un document contenant les différents éléments concernant l'échantillon.

11. Désinfection et élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

- Décontamination des restes de l'échantillon après analyse, en chaleur humide par passage à l'autoclave à pression de vapeur au moins 20 minutes à 121°C ou par tout autre traitement permettant d'obtenir un résultat équivalent.
- Désinfection du matériel recyclable (verrerie, répartiteur, ...) 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 .
- Élimination de tous les diffuseurs et tuyaux du dispositif d'aération à la fin de l'analyse.

12. Conservation des reliquats de matériels utilisés

La technique utilisée ne permet pas de conserver les reliquats pertinents de matériel soumis à l'analyse.

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de la santé des végétaux remercie :

- L'INRA de Montfavet ;
- Arboriste Conseil

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

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	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	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 <i>Ceratocystis platani</i>	Validation de la méthode de détection de <i>Ceratocystis platani</i> (Walter) Engelbrecht et Harrington, par la technique de piégeage biologique
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

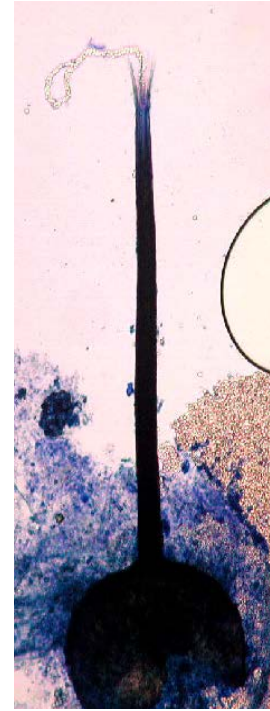
- **ENGELBRECHT CJB., HARRINGTON TC..** Intersterility within *Ceratocystis fimbriata*. Mycologia 2005. 97-1
- **GROSCLAUDE C., OLIVIER R., PIZZUTO J.C., ROMITI C. ET MADEC S.** (1988). Détection par piégeage du *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*, Application à l'étude de la persistance du parasite dans du bois infecté. *European Journal of Forest Pathology*, **18** : 385-390.
- **OEPP/EPPO** (2003). Diagnostic protocols for regulated pests. Bulletin **33**, 249- 255
- **VIGOUROUX A.** (1979) Une méthode simple de recherche de *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* sur arbre en place. *European Jour*

ANNEXE 1 : TÉLÉOMORPHE

Périthèces

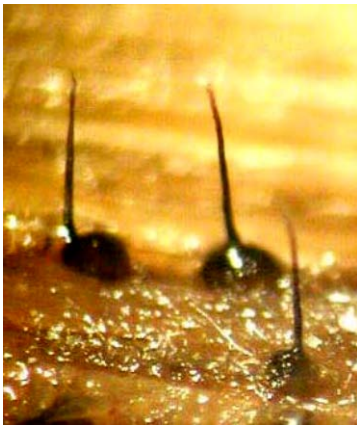
- Col très long (400 - 800 μm)
- \varnothing : 140 - 220 μm
- Absence d'appendice

Au microscope photonique

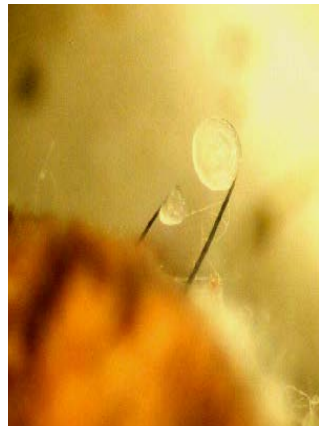


LSV-SM

A la loupe binoculaire



LSV-SM



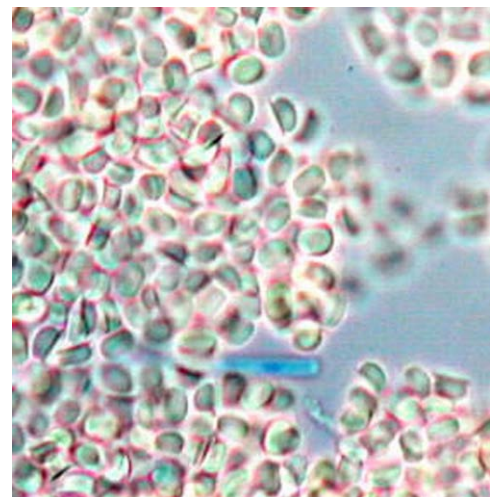
LSV-SM

Ascospores

- Forme caractéristique de chapeau melon
- Longueur : 4 - 8 μm

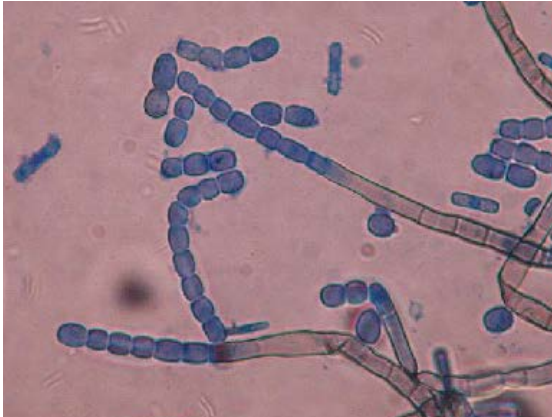


LSV-SM



LSV-SM

ANNEXE 2 : ANAMORPHE (FORME CHALARA)



LSV-SM



LSV-SM

Endoconidies

Deux types d'endoconidies :

1) Hyalines, tronquées, cylindriques, éventuellement groupées en chaînes courtes

Dimensions : 5 - 40 x 3 - 6 μm

2) Doliformes, brun-pâle

Dimensions : 7 - 12 x 6 - 9 μm

Chlamydospores

- Bulbeuses, brunâtres et à paroi épaisse,

- Dimensions 11 - 19 x 9 - 15 μm



LSV-SM



LSV-SM

ANNEXE 3 : MATÉRIEL ET DISPOSITIF

Pompe à air



Diffuseurs



Anti-retour

Tuyau en silicone



Répartiteur



Dispositif des piégeages biologiques

ANNEXE 4 : SYMPTÔMES ET CONSEILS DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR ARBRE « EN PLACE »

➤ **Symptômes**

- ⇒ Feuillage clairsemé et jaunâtre
- ⇒ Dépérissement d'une ou plusieurs branches
- ⇒ Présence d'une lésion de couleur bleu-noir ou violette, en forme de flamme, sur le tronc ou les grosses branches,



GDON Marseille
Lésion bordée d'un liseré brun clair à brun orangé



GDON Marseille

Les lésions peuvent être d'étendue variable. Leurs marges montrent des bandes ou plages allongées de couleur bleu-violette, bleu-noir (plus visibles lorsque l'écorce est enlevée) ou mouillée



GDON Marseille

Zones de coloration caractéristique d'une section de tronc de platane infecté

➤ **Prélèvement**

L'échantillon peut être constitué de tout matériel susceptible d'héberger le champignon : sciure, fragment de bois, carotte, ... Dans ce dernier cas, les échantillons sont collectés en bordure de ces lésions, si possible à l'aide d'une tarière de type Pressler. Les prélèvements sont alors effectués dans une direction radiale, sur une profondeur d'environ 5 cm. Chaque échantillon est déposé au fur et à mesure dans un conditionnement individuel, bien hermétique, et portant une référence unique.

Important : Les outils sont complètement désinfectés à l'éthanol à 70%, (ou par tout autre moyen de même pouvoir désinfectant), avant et après prélèvement, et entre chaque échantillon.

ANNEXE 5 : RÉGÉNÉRATION DES SOUCHES DE CERATOCYSTIS PLATANI

La régénération d'une souche consiste à effectuer un repiquage sur milieu gélosé solide (voir composition ci-dessous), conditionné de préférence dans des boîtes de Petri de diamètre 90mm, à partir d'une souche pure du champignon, conservée sur milieu de culture gélosé ou en tube contenant de l'huile minérale ou :

Pour un litre

- Extrait de Malt : 12g ±1g
- Chloramphénicol (200 ppm) : 2ml s.s. ± 100µl
- Agar Agar : 15g ±1g
- Eau osmosée : qsp 1000ml ±10ml

1- Repiquage :

Les repiquages peuvent s'effectuer sous une hotte à flux d'air stérile ou sous une loupe binoculaire.

Un fragment de mycélium du champignon est prélevé à l'aide d'un instrument (scalpel, aiguille,) stérilisé (ex. : tremper l'instrument dans l'alcool à brûler, le passer à la flamme et le refroidir) puis déposé directement sur le milieu de culture à raison d'un implant par boîte (prévoir si possible de 3 à 4 repiquages).

2- Incubation :

Les boîtes ensemencées sont incubées dans une enceinte à température contrôlée (T= 22° ± 6°C), avec un éclairage de type lumière du jour à photopériode de 12 heures ou à défaut dans une pièce climatisée (T= 22° ± 6°C), à la lumière du laboratoire.

L'opérateur réalise des observations régulières des boîtes ensemencées. Si des pollutions bactériennes ou fongiques apparaissent, l'opérateur procède à de nouveaux repiquages.

3- Codification et stockage des souches de référence :

Chaque boîte ensemencée porte la même référence que la souche mère et la date du repiquage.

Environ 10 à 15 jours après repiquage, l'opérateur vérifie sous la loupe binoculaire la croissance du mycélium et la présence de périthèces à long col portant à leur extrémité les masses mucilagineuses contenant les ascospores du champignon.

Les souches sont alors parafilmées, stockées dans une boîte hermétique, parafilmée, au réfrigérateur puis utilisées en tant que de besoin.

4- Réalisation du témoin positif de processus :

Un fragment de culture d'environ 10mm sur 5mm est prélevé, à l'endroit où des périthèces sont présents, puis déposé dans le bocal témoin à l'aide d'un instrument stérilisé (voir paragraphe 1).

ANNEXE 6 : GLOSSAIRE

Cellule conidiogène : cellule qui produit une ou plusieurs conidies.

Endoconidie : spore asexuée (= conidie) déjà formée à l'intérieur de la cellule conidiogène.

Périthèce : fructification (souvent globuleuse) contenant asques et ascospores, issue de la reproduction sexuée.

Ascospores : spores résultant d'un processus de reproduction sexuée toujours formées dans un sac appelé asque qui s'ouvre à maturité pour les libérer.

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.