

SYNTHESE DU RAPPORT FINAL

Programme soutenu par France Bois Forêt

Section Spécialisée Pin Maritime

Détection nématode dans des échantillons de matériel végétal (année 2 de 3)

RÉFÉRENCE FBF 19/RD/1059

RAPPORT d'ANNEE 2 - Résumé

Porteur(s) du projet : Caisse Phyto Forêt – Maison de la Forêt

Prestataire(s) : FCBA

Montant du soutien apporté par France Bois Forêt : 20 000 euros

(année 2 = 2019, réf 19 /RD/1059) (pour rappel : année 1 = 2018, réf 18 /RD/1024 et année 3 = 2020, réf 20/RD/1162)

Autres financements :

Objectifs et contexte (minimum ½ page) :

Le nématode du pin est un organisme de quarantaine, réglementé sur le territoire européen. Les mesures de surveillance du territoire national vis-à-vis du nématode du pin et le programme des inspections programmées à conduire sont décrits dans le plan national d'intervention sanitaire d'urgence (PNISU) publié en 2019 par le ministère de l'Agriculture.

Par suite de l'augmentation prévisible du risque de dissémination du nématode par les transports de marchandises et par le mouvement plus lent de l'insecte qui le transporte, le besoin de surveillance et les demandes d'analyse permettant un diagnostic précis de la présence ou non du nématode seront en augmentation. Les services officiels seront soumis à une charge de travail importante alors que les professionnels (propriétaires et gestionnaires de forêts, industriels) auront besoin de réponses rapides.

Le projet a pour objet de mettre en place un service de diagnostic de première ligne de la présence du nématode du pin dans des échantillons de matériel végétal (arbre sur pied ou fraîchement abattu) : efficace, rapide et à un coût accessible. Le principe de ce service de première ligne est de réaliser rapidement un premier tri des cas afin d'écarter rapidement les cas négatifs et de rediriger les cas positifs probables vers les services officiels pour une confirmation avec les techniques officielles plus lourdes. Bien que plus rapide et plus simple, le service de première ligne devra utiliser une technique fiable et garantir la bonne traçabilité des échantillons et résultats. Les techniques testées correspondront donc à des préconisations internationales de panels d'experts, en particulier le système LAMP décrit par l'organisation internationale de la protection phytosanitaire en 2017.

Le projet est structuré en trois tranches annuelles. Il visera en premier lieu à maîtriser les protocoles rapides LAMP à partir du bois (sans séparation préalable des nématodes d'avec le bois) non encore passé dans la pratique des services officiels Français. Le projet s'appuiera sur des échanges avec les services officiels de diagnostic opérant en zone contaminée au Portugal pour établir un protocole de prélèvement et analyse puis le mettra en œuvre sur le massif landais (simulation) afin d'améliorer le protocole et d'établir des éléments de coût et délai de réalisation. Un dialogue avec les autorités phytosanitaires permettra de préciser les contraintes de mise en œuvre réelle du service proposé.

Principaux résultats obtenus (minimum 1 page) :

Les livrables 1 à 4 ont été produits dans le cadre de la tranche 1 du projet de 3 ans. Ils décrivent la prise en main des différentes méthodes de détections (testées sur des ADN purifiés, aucun nématode n'est utilisé) et confirment le choix du système LAMP. Nous avons pu constituer et valider des échantillons de référence (livrable 2). Le bilan de la première année (livrable 3) décrit l'approche bibliographique et la prise de contact avec des experts internationaux.

Résumé des livrables de l'année 2:

Livrable 5 : Révéler le résultat sans avoir besoin d'outil de lecture

Le procédé usuel lourd avec utilisation d'un agent chimique toxique a pu être remplacé par la lecture directe du résultat de l'analyse exprimé par un changement de couleur visible à l'œil nu. L'optimisation de l'équilibre chimique des réactifs a permis de différencier les échantillons faiblement positifs des négatifs (cf. figure 1).



Figure 1 : Illustration d'un résultat type d'analyse LAMP visible à l'œil nu avant (année 1) et après (année 2) l'optimisation de la lecture directe des résultats. Les tubes présentés contiennent un réactif dont la coloration indique la présence ou absence du nématode. Le passage du colorant Jaune/Rouge en année 1 au colorant Bleu/Violet optimisé en année 2 permet de distinguer plus clairement les résultats faiblement positifs (tube 3, faible trace de nématode) d'avec les négatifs (tubes 6 et 7, absence de nématode).

Livrable 6 (prévu Fin année 2): Caler le niveau de sensibilité pour éviter les faux positifs

Les ajustements réalisés sur la méthode permettent d'éviter totalement les faux

positifs. Aucun faux négatif n'a été obtenu. La quantité minimale d'ADN de nématode détectée sans ambiguïté correspond à l'équivalent de moins d'un nématode entier dans le bois prélevé.

Livrable 7: Simplifier et optimiser la préparation des ADN

La purification d'ADN fonctionne bien. Il n'y a pas lieu de simplifier plus car cela reviendrait certes à une réduction du coût mais à une augmentation du besoin en main d'œuvre et une prise de risque quant à la fiabilité du diagnostic.

Livrable 8 : Compte-rendu de la Tâche 3 : Définir l'offre prototype.

L'offre correspond à une prestation complète ou partielle (avec ou sans échantillonnage réalisé par FCBA). Sa réalisation sera simulée en 2020 pour validation et précision (notamment sur le timing et les coûts). Un guide d'échantillonnage facile d'emploi sera réalisé à partir d'une synthèse des protocoles européens, portugais et français. La documentation de l'origine de l'échantillon est un point important (propriétaire, préleveur, parcelle, relèvements GPS par arbre, date, observations). L'analyse par FCBA se basera sur deux prélèvements par arbre, l'un des deux étant conservé pour un transfert éventuel à un labo officiel (si le diagnostic FCBA indique la présence probable du nématode). Un rapport simplifié sera rédigé et communiqué au demandeur. En dehors des cas positifs, l'information transmise par défaut aux autorités consistera en un nombre global d'échantillons et une carte à basse résolution de leurs origines. Cette définition des modalités a été complétée et modifiée lors de la réunion évoquée plus loin ci-après (livrable 10).

Livrable 9: Compte-rendu de la seconde année et perspectives

Nous avons obtenu d'excellents résultats au cours des mises au point des méthodes de laboratoire (Livrables 5,6 et 7 décrits plus haut). En novembre 2019, nous avons effectué une visite de terrain en compagnie de spécialistes du diagnostic nématode en zone contaminée au Portugal pour suivre toutes les étapes du prélèvement à l'analyse en situation réelle avec un débriefing des erreurs habituelles et

autres décalages avec les documents publiés. Nous avons défini l'offre prototype (**Livrable 8**) à simuler courant 2020 par échantillonnage en forêt Aquitaine mais en réalisant les analyses avec ou sans ajout d'ADN de nématode obtenu d'un labo officiel partenaire.

Livrable 10: Compte-rendu de réunion technique de fin de seconde année :

Cette réunion a eu lieu le 18 février 2020 avec le SySSO, la Caisse Phyto Forêt, la DRAAF/DSF et FCBA avec pour objet un résumé du projet et la discussion des freins administratifs éventuels et conditions réglementaires de mise en œuvre du service de pré-diagnostic FCBA en bonne articulation avec le DSF. Les conclusions principales sont que la spécificité de la technique proposée devra être testée sur d'autres espèces de nématodes et la prestation décrite et testée en priorité dans la perspective d'une mise en œuvre pour l'autocontrôle des industriels importateurs et/ou producteurs de produits bois et substrats horticoles incorporant des connexes ou écorces.

Valorisation envisagée (minimum ½ page) :

Les résultats du projet et les éléments techniques, scientifiques et éventuellement économiques acquis au travers de la bibliographie et des contacts internationaux pris seront utilisés pour rédiger des documents de communication portés par FBF et les partenaires.

A l'issue de la dernière année du projet et d'une concertation avec les partenaires (Caisse phyto forêt SYSSO) et les services officiels (DSF, ANSES, Ministère), un accompagnement pour mettre en place l'outil ou une prestation réalisée par FCBA et/ou un partenaire seront proposés aux professionnels de la filière intéressés.

Le principe en est d'une part de faire homologuer la méthode et de la mettre en œuvre en tant que laboratoire agréé contribuant à l'effort global de diagnostic avec les services officiels (avec ou sans intervention dans les prélèvements).

Il s'agit d'autre part d'agir à plus court terme, sans la contrainte d'homologation officielle, dans le cadre de l'auto-contrôle des entreprises de transformation du bois d'œuvre et des producteurs de substrats horticole incorporant des connexes ou écorces.

Indépendamment de ce projet, FCBA développe différentes solutions techniques de réalisation et de contrôle de conformité des traitements du bois et des produits bois de la norme internationale NIMP15 imposés par la réglementation aux transports internationaux au départ des zones géographiques où le nématode du pin est présent (voir <https://www.fcba.fr/search?term=nimp15>).

Proposition de deux indicateurs pour évaluation (maximum ½ page) et analyse :

Indicateur 1 : Nombre de livrables finalisés/prévus : analyse : 100% (cf. rapport ci-dessus).

Indicateur 2 : Proximité avec la réalité du terrain et des contraintes opérationnelles : Le lien établi avec les experts et les praticiens sur le terrain en zone infestée ainsi que le rapprochement prévu avec les autorités phytosanitaires dans la troisième tranche du projet (convention FBF/SSPM réf 20/RD/1162 signée en janvier 2020) garantissent à ce stade la parfaite cohérence des actions réalisées avec la concrétisation de la mise en place du service de diagnostic de présence du nématode qui est le but du projet. Cet indicateur sera évalué en année 3 sur la base du Taux de réussite des tests de validation à partir de prélèvements positifs sur échantillons au Portugal en zone contaminée.

Année de publication : 2020