

SYNTHESE DU RAPPORT FINAL

Programme soutenu par France Bois Forêt

Section Spécialisée Pin Maritime

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

RÉFÉRENCE FBF 20/RD/1127

RAPPORT d'ANNEE 2 - Résumé

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

Prestataire(s) : FCBA

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

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

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 rapide et précis de la présence ou non du nématode seront en augmentation.

Le projet a pour objet l'amélioration et l'obtention des éléments de validation technique permettant la mise en place de ce service de diagnostic facile à mettre en oeuvre de la présence du nématode du pin dans des échantillons de matériel végétal (arbre sur pied ou fraîchement abattu). Le principe de ce service de première ligne est de réaliser rapidement et à coût accessible un premier tri des cas afin d'écartier rapidement les cas négatifs et de rediriger les cas positifs probables vers les services officiels pour une confirmation, seule valable pour déclarer un foyer nématode dans le massif. Les techniques testées devront correspondre 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 priorité à maîtriser les protocoles rapides LAMP à partir du bois (sans séparation préalable des nématodes d'avec le bois qui aura été mis en incubation pour permettre la multiplication du nématode au sein de l'échantillon). Le projet s'appuie sur des échanges avec les services officiels de diagnostic opérant en zone contaminée au Portugal pour établir un protocole de prélèvement et d'analyse pour le mettre en oeuvre en forêt landaise (simulation) afin d'améliorer le protocole et d'établir des éléments de coût et délai de réalisation. Un dialogue avec les autorités phytosanitaires françaises permettra de préciser les contraintes de mise en oeuvre réelle du service proposé.

Principaux résultats obtenus (minimum 1 page) :

Année 1 : 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. Le livrable 4 est le compte-rendu d'année 1.

Année 2 : Les livrables 5 à 9 ont été produits dans le cadre de la tranche 2 du projet de 3 ans.

L5: Révéler le résultat sans avoir besoin d'outil de lecture, **L6: Optimiser la sensibilité pour éviter les faux positifs**, **L7: Simplifier et optimiser la préparation des ADN**, **L8:** Compte-rendu de la Tâche 3 : Définir l'offre prototype et **L9: Compte-rendu de la seconde année et perspectives**

En novembre 2019, nous avons simulé l'échantillonnage et l'analyse en situation réelle de terrain au Portugal en partenariat avec l'homologue du DSF et du laboratoire national ANSES de nématologie avec un débriefing des erreurs habituelles et autres décalages avec les documents publiés, dont le manuel de prélèvement et analyse en Portugais.

Résumé des livrables de l'année 3:

Livrable 10 (Fin année 2) : Compte-rendu de réunion technique de fin de seconde année :

Cette réunion de pilotage tenue en février 2020 avec la DRAAF et le SYSSO/Maison de la forêt a permis de discuter l'avancement du projet et les freins administratifs éventuels et conditions réglementaires de mise en œuvre du service de pré-diagnostic FCBA en bonne articulation avec le DSF.

Il a été décidé de finaliser les mises au point techniques, avec un accent sur le contrôle de sa spécificité et d'envisager l'homologation du test par l'ANSES en complément du procédé actuel.

Toutefois l'ANSES considère que ses moyens actuels suffisent amplement au diagnostic du nématode et que les mécanismes habituels de recrutement de laboratoires d'analyses complémentaires mettant en œuvre la méthode de diagnostic de référence permettraient d'assurer la quantité de diagnostic requise.

Il faut toutefois noter deux lourdeurs de la méthode de référence : l'incubation (multiplication) des échantillons pendant une à deux semaines suivies d'une extraction des nématodes et l'utilisation d'équipements très coûteux (équipement de PCR quantitative). La bibliographie et nos essais démontrent la possibilité de contourner ces obstacles.

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

Le procédé usuel lourd avec utilisation d'un agent chimique 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).

Cependant, les tests de spécificité du nématode nuisible (*B. xylophilus*) par rapport à son cousin inoffensif (*B. mucronatus*) ont démenti la spécificité du test basé sur le protocole de Kikuchi et al. 2009 (publiés dans la revue *Nematology*), malgré plusieurs répétitions avec des nématodes isolés et une préparation séparée en atmosphère contrôlée des différents échantillons (échantillons *B. xylophilus* manipulés après *B. mucronatus*, des témoins "vides" étant préparés avant et après les échantillons de nématode).

Une répétition supplémentaire avec de nouveaux échantillons et éventuellement dans un laboratoire indépendant serait nécessaire pour définitivement confirmer ou infirmer ces résultats.

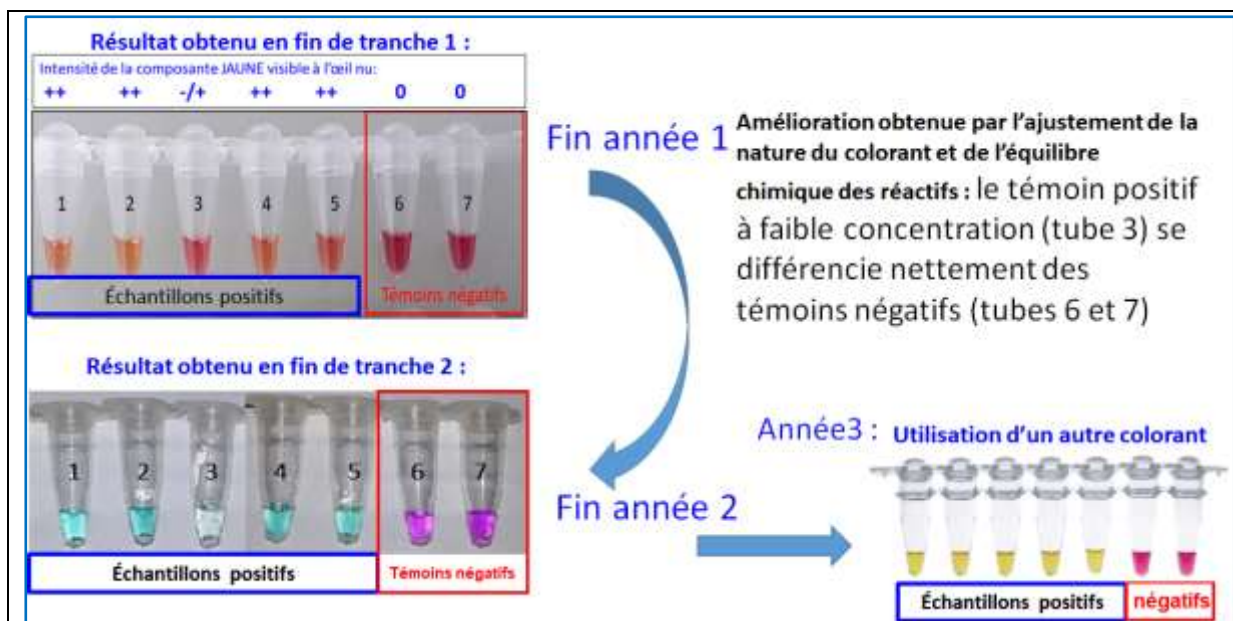


Figure 1 : Illustration d'un résultat type d'analyse LAMP visible à l'œil nu avant (année 1) , pendant (année 2) et après l'optimisation de la lecture directe des résultats (fin d'année 3). Les tubes présentés contiennent un réactif dont la coloration indique la présence ou absence du nématode. Le passage du colorant Orange/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) mais demande toujours un ajustement de la lumière ambiante. L'ajustement fait en année 3 permet d'emblée un bien meilleur contraste (jaune/rouge).

La problématique de la contamination entre échantillons positifs et négatifs est le seul point technique qui bloque la réalisation directe des analyses en forêt ou atelier de transformation du bois, l'infrastructure d'un laboratoire permettant d'éviter ce problème.

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 pourront être 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, SYSSO) et les services officiels (DSF, ANSES, Ministère), une prestation réalisée par FCBA et/ou un partenaire pourra être proposée aux professionnels de la forêt intéressés.

Le principe en est de constituer une première ligne de détection afin de contribuer à fluidifier, via la séparation des cas négatifs les plus probables, le flux d'échantillons à traiter par les services officiels. Elle consistera à réaliser des prélèvements géolocalisés en forêt, conditionner les échantillons et les analyser avec un outil simplifié validé internationalement afin de détecter la présence du nématode. L'information produite sera transmise au propriétaire concerné. **Selon les dispositions convenues avec les partenaires**, l'information pourra être incluse dans une compilation permettant la réalisation et la communication sur des suivis cartographiques et bulletins d'information gérés par les organisations professionnelles (Caisse phyto). Par suite de l'obligation réglementaire établie en cas de résultat positif, un doublon de l'échantillon sera transmis avec ses informations de traçabilité (position du lieu d'échantillonnage et nom du propriétaire) aux services officiels de l'état (courrier à l'ANSES et transmission de l'échantillon au laboratoire délégué LDA33).

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 garantissent à ce stade la parfaite cohérence des actions réalisées l'objectif de tester la validité technique du procédé en vue d'une mise en place des analyses.

Année de publication : 2021