

Dityluz - Acquisition d'outils méthodologiques pour la détection et la quantification du nématode des tiges, *Ditylenchus dipsaci*, sur semences de luzerne (*Medicago sativa* L.).

Mise au point d'un test de viabilité, adaptation de l'échantillonnage et de l'échantillon analysé

Orgeur G.¹, Baldwin T.K.¹, Grimault V.¹

¹ GEVES, 25 rue Georges Morel, CS 900024, F-49070 Beaucouzé

Correspondance : geoffrey.orgeur@geves.fr

Résumé

En Europe, le nématode de la tige, *Ditylenchus dipsaci*, était jusqu'au 14 décembre 2019, un organisme de quarantaine sur les semences de Luzerne (passé cette date, son statut évolue en ORNQ, Organisme Réglementés Non de Quarantaine) et seules les semences exemptes de nématodes libres pouvaient être commercialisées. Le projet Dityluz repose sur un partenariat multiple et innovant associant les acteurs du secteur semencier (UFS et GNIS) et de la recherche publique (ANSES, Laboratoires de pathologie et biologie moléculaire du GEVES) ainsi que des experts scientifiques et techniques (INRAE et FNAMS). Une méthode de détection directe sur semences par PCR (SE-PCR) a été mise au point et consiste à collecter toute la population de nématodes présents dans un échantillon dans un petit volume et à l'analyser par PCR. La méthode a été validée à travers un test interlaboratoire où les critères de performance ont été évalués : le seuil de détection a été déterminé à 1 *D. dipsaci*, la sensibilité, la spécificité, la justesse et la concordance ont été déterminées à 100%. De plus, une méthode d'évaluation de la viabilité de *D. dipsaci* a également été développée et validée selon l'évaluation des critères de performance. Les résultats de ce projet ont été mis à la disposition des entreprises semencières et du Service Officiel de Contrôle par l'organisation d'un workshop. Suite à de nombreux échanges entre le GEVES, le SOC, la DGAL et l'ANSES, la méthode été officialisée au Bulletin Officiel du ministère en charge de l'Agriculture en Novembre 2020 et appliquée au GEVES

Mot-clés : *Ditylenchus dipsaci*, Luzerne, Pré-screening par PCR, Viabilité, Echantillonnage.

Abstract: Development of tools for the detection of *Ditylenchus dipsaci* on alfalfa seeds

In Europe the stem nematode, *Ditylenchus dipsaci* was, until 14 December 2019, a quarantine pest on alfalfa seeds (then it will be a RNQP, Regulated Non-Quarantine Pests), and only nematode free-seeds could be marketed. The Dityluz project was based on a multiple and innovative partnership involving the stakeholders from the Seed sector (UFS and GNIS) and Public Research (ANSES, Laboratories of Pathology and Molecular Biology of GEVES) as well as scientific and technical experts (INRAE and FNAMS). A detection method on seed extracts by PCR (SE-PCR) was developed which involves the pooling of all the nematodes from a seed sample into a small volume and then to analyze it by PCR. The method was validated in a ring test where performance criteria were evaluated: the detection threshold was determined to be 1 *D. dipsaci* and sensitivity, specificity, accordance and concordance were determined at 100%. In addition, a method for assessing the viability of *D. dipsaci* was also developed and validated according to the evaluation of performance criteria. The results of this project were made available to seed companies and the Official Control Service through the organization of a workshop. Following numerous exchanges between GEVES, SOC, DGAL and ANSES, the method was made official in the Official Bulletin of the Ministry of Agriculture in November 2020 and applied to GEVES.

Keywords : *Ditylenchus dipsaci*, Alfalfa, Seed Extract PCR, Viability, Sampling.

Introduction

En France, le nématode des tiges, *Ditylenchus dipsaci*, met en péril la filière de production de semences de luzerne. En effet, *D. dipsaci* est un organisme de quarantaine sur semences de luzerne, jusqu'au 14 Décembre 2019, au sein de l'Union Européenne (Directive 2000/29/CE), imposant que les semences en soient indemnes pour être commercialisées. Passé cette date, son statut évoluera en organisme réglementé non de quarantaine (ORNQ) et les semences seront soumises à l'utilisation d'un Passeport Phytosanitaire Européen. Jusqu'en 2010, les semences contaminées étaient exclusivement désinfectées par fumigation au bromure de méthyle mais, suite au retrait de ce produit, les établissements semenciers ont dû développer des techniques alternatives d'élimination de l'organisme nuisible par des process industriels mécaniques ou par thérapie.

Le présent projet a proposé d'améliorer la fiabilité de la détection de *D. dipsaci* par l'évolution du protocole d'échantillonnage en usine (méthode de prélèvement, taille d'échantillon), la mise à disposition des semenciers de moyens de détection rapides du nématode dans les lots de semences, ainsi que de différenciation des nématodes vivants/morts. Il s'est appuyé sur une approche intégrée depuis la récolte des semences chez l'agriculteur-multiplicateur jusqu'à la mise sur le marché des semences commerciales, et des techniques variées (biologie moléculaire, morphobiométrie, coloration...). Le partenariat multiple et innovant associait les acteurs de la filière Semences (établissements semenciers et prestataire spécialisé dans le traitement de semences *via* l'UFS ; interprofession *via* le GNIS,) à la Recherche Publique (Unité de Nématologie de l'ANSES, Laboratoire de Pathologie et Laboratoire de biologie moléculaire du GEVES, ainsi qu'une expertise scientifique et technique apportée par l'INRA, UMR IGEPP et la FNAMS). Les résultats issus de ces travaux ont été mis à la disposition des semenciers et du Service Officiel de Contrôle de nouveaux moyens de contrôle durable dans le cadre du déclassement du parasite en ORNQ. Ce projet s'inscrit pleinement dans la démarche souhaitée par le Ministère de l'Agriculture de mettre en œuvre les mesures opérationnelles d'un nouveau schéma de certification, telles que recommandées par l'ANSES dans son ARP (Analyse de Risque Phytosanitaire).

1. Fiabilisation du protocole d'échantillonnage pour la détection de *D. dipsaci*

La répartition des nématodes au sein d'un lot de semences peut se révéler hétérogène : les nématodes peuvent être alors agrégés en nombre important sur certaines semences et totalement absents sur d'autres.

Une enquête de recensement a été réalisée chez 6 semenciers partenaires du projet DityLuz entre mars et mai 2016 : Terrena (RAGT), CAVAC, Jouffray Drillaud, FertiBerry, Florimond Desprez.

L'objectif était de comparer et confronter les différents process appliqués en usine, les différents points de prélèvements, les différentes quantités prélevées ainsi que les règles définies entre les établissements.

D'après l'enquête, les prélèvements peuvent être faits à divers moments du process usine (sur lot brut, nettoyé, trié, assemblé ou conditionné ; Tableau 1). Le nombre d'échantillons primaires prélevés dépend :

- du poids initial du lot (inférieur à 500 Kg jusqu'à supérieur à 20 tonnes),
- du contenant final (en sac de 15 Kg à 100 Kg, et en big bag de plus de 100 Kg).

Les prélèvements sont réalisés soit de manière automatisée (débit régulier) soit manuellement. Dans le premier cas (prélèvement automatique), les préleveurs sont réglés, chaque échantillon primaire prélevé pèse 40 g soit un total de 50 à 150 prélèvements par lot pour un volume total de 2 à 6Kg d'échantillon soumis. Dans ce cas le nombre d'échantillons primaires respecte le minimum défini par l'ISTA (ISTA, International rules 2017).

Tableau 1 : Variation des prélèvements appliqués en usine

Semenciers	Brut	Nettoyé	Trié	Assemblé	Conditionné
Semencier 1	❖		❖	Pas d'assemblage	❖
Semencier 2		❖	❖		
Semencier 3			❖		❖
Semencier 4 et 5	❖		❖	❖	❖
Semencier 6	❖		❖	❖	

❖prélèvement effectué ❖prélèvement avec analyse nématode

Pour les prélèvements manuels, les outils varient en fonction du type de contenant. Une canne sonde multiple ou simple est utilisée pour les big-bags (prélèvements obliques à 3 hauteurs différentes) tandis qu'une louche est utilisée pour les prélèvements en sacs. Les prélèvements à la canne sonde ou à la louche permettent d'obtenir un échantillon soumis variant de 1,2 Kg et 1,6 Kg. Chaque échantillon primaire prélevé pèse environ 75 g avec une canne sonde et 160 g avec une louche soit un total de 10 à 20 prélèvements par lot. Le nombre d'échantillon primaire suit les règles ISTA si le lot est inférieur à 20 000 Kg ou 59 emballages. En revanche au-delà, l'échantillon soumis devrait être plus conséquent pour atteindre le minimum de prélèvement défini par l'ISTA.

Suite à l'enquête réalisée, les différentes modalités d'échantillonnage ont été définies. Un total de 4 lots (3 lots contaminés par *D. dipsaci* et un lot sain) a été testé suivant un plan d'échantillonnage. Le premier facteur testé correspond au nombre d'échantillons primaires prélevés au sein d'un même lot : entre 10 et 80 échantillons primaires sont prélevés (10, 20, 40 et 80). Les prélèvements des échantillons primaires ont été réalisés manuellement. Deux méthodes ont été utilisées : à la louche et à l'aide d'une canne sonde. Pour les modalités 10 et 20 échantillons primaires, l'échantillonnage a été fait à la louche (160 g) afin d'avoir un échantillon soumis d'environ 1,5 Kg à 2 Kg minimum pour réaliser l'ensemble des tests. Pour les autres modalités, la canne sonde a été suffisante.

Les différents échantillons soumis ont ensuite été divisés en échantillons de travail de tailles variables (deuxième facteur) : 100g, 200g et 300g à raison de 3 échantillons (3 répétitions) par modalité (Tableau 2). Le choix de ces tailles d'échantillons a été défini d'après les résultats obtenus lors du programme TESTA, à savoir tester des tailles d'échantillons trois à quatre fois plus importantes que la taille d'échantillon actuellement analysée (70 g). Ces échantillons ont ensuite été testés pour détecter la présence de *D. dipsaci*.

Tableau 2 : Modalités d'analyses des échantillons de travaux

Echantillons	Poids échantillon de travail	100 g	200 g	300 g
	10	3 répétitions		
20	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
40	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
80	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Total échantillon par lot		12	9	12

Afin de réaliser ces essais, certains partenaires semenciers ont envoyé des lots potentiellement positifs en analyse dans le but de sélectionner des lots candidats.

Une fois les lots sélectionnés, chacune des modalités a été analysée par méthode de filtration (MOA013 partie A et B, 2010) dans le but de comparer la taille des populations de nématodes observés (*D. dipsaci* et saprophages) et éventuellement déterminer une modalité d'échantillonnage représentative d'un lot. Les résultats sont présentés dans la Figure 1, ci-dessous.

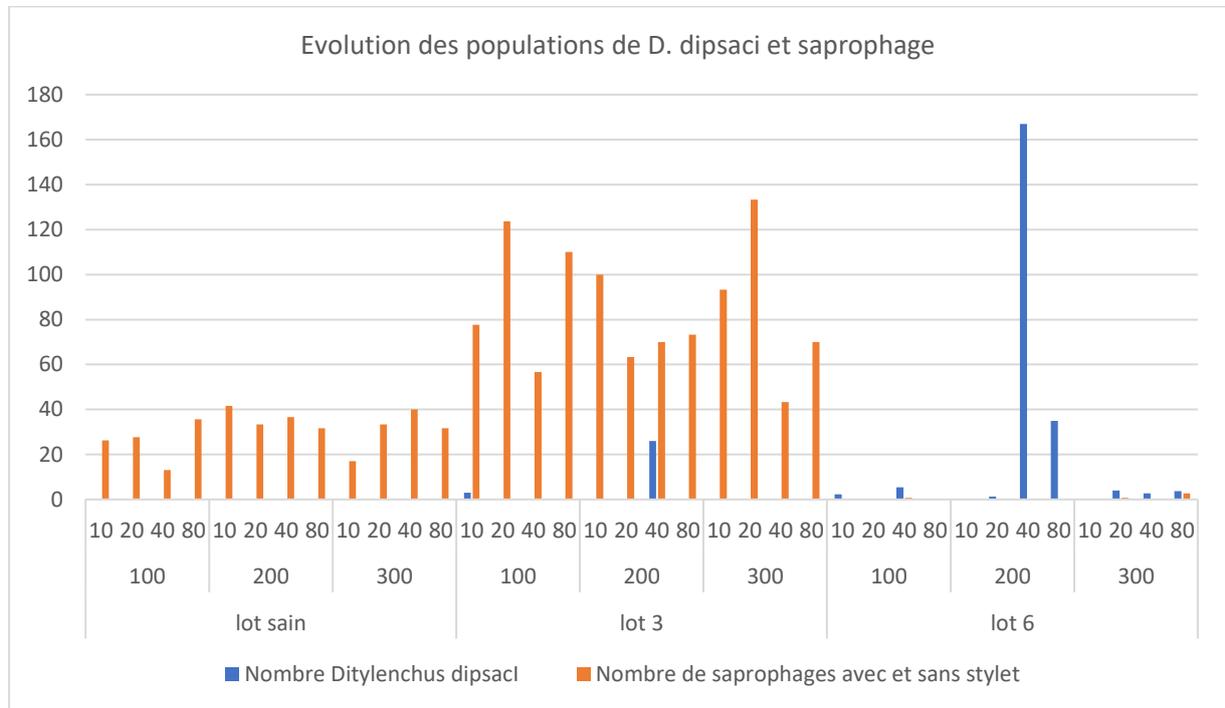


Figure 1 : Résultats des modalités d'échantillonnage analysés par méthode par filtration

La variation du nombre d'échantillons primaires (10, 20, 40 et 80), pour les 3 lots (sain, lot 3 et lot 6) n'a pas impacté le nombre de nématodes détectés (saprophages et *D. dipsaci*) au sein des échantillons de travail testés.

Les différents poids d'échantillons analysés (100, 200 et 300g) n'ont également pas permis de trouver une corrélation avec le nombre d'individus observés. L'augmentation du poids de l'échantillon de travail n'a pas permis pas de détecter plus de nématodes (saprophytes ou *D. dipsaci*).

De plus certains résultats sont très hétérogènes. Une des hypothèses de la non détection de *D. dipsaci* (ou en quantité très aléatoire) réside dans la mauvaise homogénéisation des sacs avant séparation au diviseur à rifle.

Ces résultats ont prouvé l'hétérogénéité de la contamination d'un lot par *D. dipsaci*. La conclusion étant donc de favoriser un nombre important d'échantillons primaires, afin de limiter cette hétérogénéité, en accord avec les règles ISTA, avec un minimum de 40 échantillons primaires pour les lots supérieurs à 20 tonnes. En revanche, aucune information n'a permis de faire évoluer la taille de l'échantillon de travail dont la référence reste 100g.

2. Méthode de criblage rapide de *D. dipsaci* dans les lots de semences

2.1 Mise au point de la méthode par Seed Extract PCR

La méthode officielle de détection de *D. dipsaci* dans les lots de semences (MOA013 partie A et B, 2010) consiste à immerger les semences pour permettre la migration des nématodes dans l'eau. Cette eau est ensuite filtrée et l'extrait obtenu est observé à la loupe binoculaire pour détection du genre *Ditylenchus*. Les

nématodes sont ensuite prélevés et observés au microscope pour identification de l'espèce. Cette méthode peut parfois s'avérer délicate à mettre en œuvre sans formation préalable. Elle ne permet pas d'analyser rapidement de gros volumes d'échantillons et un opérateur ne peut analyser qu'au maximum 20 à 30 échantillons par jour selon les populations de nématodes saprophages présentes et la propreté des lots de semences. Aussi, une méthode de pré-screening et identification par PCR permettrait un criblage plus rapide.

Les premières étapes de mise au point concernaient la partie PCR. Des essais préliminaires de comparaison ont permis de choisir le kit réactionnel adéquat pour ce protocole (Go Taq qPCR master Mix), de sélectionner une paire d'amorces (Jeske *et al.*, 2015) parmi 5 paires différentes (Esquibet *et al.*, 2003 ; Kerkoud *et al.*, 2007 ; Tableau 3), basé sur l'évaluation des critères de performance (sensibilité et spécificité diagnostique) suite à des essais sur une collection d'individus cibles et non cibles et de choisir le kit d'extraction d'ADN (*kit Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue*) parmi 5 kits différents.

Tableau 3 : Critères de performances des paires d'amorces

	Sensibilité Diagnostique	Spécificité Diagnostique
Kerkoud final point	97%	97%
Esquibet final point	76%	98%
NIAB final point	84%	100%
Clear Detection qPCR	83%	100%
Jeszke qPCR	97%	88%
Kerkoud qPCR	56%	100%

Dans un second temps, le choix de la matrice a été fait en comparant la capacité de la PCR à détecter la présence de 1 *D. dipsaci* dans un broyat de semence ou dans un macérat. La prise d'essai lors des tests sur broyats de semences n'a pas permis de détecter la présence de *D. dipsaci*. La quantité prélevée étant trop faible, le risque de ne pas détecter la présence d'un seul *D. dipsaci* présent est trop important. Dans une problématique de mettre au point une méthode dont le seuil de détection (sensibilité analytique) est de 1 *D. dipsaci*, il était primordial que la prise d'essai soit représentative de l'échantillon. Il fallait donc s'assurer de ne pas passer à côté de la présence d'un *D. dipsaci*. Il a donc été retenu de travailler sur filtrat, ce qui constituait la solution la plus adaptée pour répondre à la problématique étudiée. Il fallait donc concentrer la population de nématodes présents dans ce macérat dans un volume réduit. Actuellement, après macération du lot de semences, et filtration du macérat sur tamis de 250 µm puis sur tamis de 20 µm, ce dernier tamis est rincé avec un volume de 10-15 mL d'eau. Ce dernier représente un trop gros volume de départ pour l'extraction d'ADN.

En pratique, un filtre à maillage plus fin a été utilisé pour concentrer la population de nématodes.

L'étape de lyse et l'extraction d'ADN a été effectuée avec le kit *Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue* (NucleoSpin Tissue, protocole pour « animal tissue »). La PCR a été effectuée en temps réel avec les amorces Jeszke :

- DITuniF : CTG TAG GTG AAC CTG C
- DITdipR : GAC ATC ACC AGT GAG CAT CG

Le mix Promega, GoTaq qPCR MasterMix a été utilisé pour la PCR avec utilisation du CXR au 1/100^{ème} comme référence. La composition du mix PCR et le programme PCR utilisés sont indiqués Tableau 4.

Tableau 4 : Composition du mix PCR (A) et Programme PCR (B)**A**

Mix PCR	Unité	[]	[] finale	Volume 1 tube
H2O nucl free				6.20
GoTaq qPCR mix	X	2	1	10
DITuniF	µM	5	0.2	0.8
DITdipR	µM	5	0.2	0.8
CXR au 1/100ème				0.2
Volume mix	µL			18
Matrice	µl			2
Volume total	µL			20

B

Programme PCR		
95°C	5 min	
95°C	15 sec	40 cycles
60°C	60 sec	
Melt curve 60-95°C		

Le seuil de détection (sensibilité analytique) de cette méthode Seed Extract (SE) PCR a été déterminé (Tableau 5). Différentes modalités contenant 1 *D. dipsaci* (1 *D. dipsaci* seul, 1 *D. dipsaci* dans une population de 25 saprophages et 1 *D. dipsaci* dans une population de 100 saprophages) ont été répétées trois fois et reproduites deux fois dans le temps par un opérateur différent.

Tableau 5 : Etude du seuil de détection (sensibilité analytique)

	résultats attendus	Rep 1		Rep 2		résultats obtenus	
		Ct	Tm	Ct	Tm		
1 ddi (1)	+	28,60	82,59	26,45	82,45	+	
1 ddi (2)	+	28,88	82,59	27,33	82,45	+	
1 ddi (3)	+	N/A	61,57	39,47	80,21	-	
1 ddi + 25 sapro (1)	+	27,21	82,59	26,10	82,59	+	
1 ddi + 25 sapro (2)	+	27,05	82,74	26,00	82,59	+	
1 ddi + 25 sapro (3)	+	26,53	82,74	27,20	82,59	+	
1 ddi + 50 sapro (1)	+	25,25	82,89	25,75	82,74	+	
1 ddi + 50 sapro (2)	+	26,79	82,89	27,08	82,74	+	
1 ddi + 50 sapro (3)	+	26,80	82,74	26,07	82,44	+	
1 ddi +100 sapro (1)	+	27,79	82,74	26,22	82,59	+	
1 ddi +100 sapro (2)	+	25,77	82,74	26,16	82,59	+	
1 ddi +100 sapro (3)	+	24,84	82,74	29,11	82,74	+	
T+ext (1ddi)	+	29,63	82,74	28,36	82,74	+	
T-ext	-	N/A	61,56	N/A	74,09	-	
T+PCR (D8)	+	26,45	82,74	Conforme	26,61	82,59	Conforme
Teau PCR	-	N/A	61,56	Conforme	N/A	61,58	Conforme

L'ensemble des résultats ont indiqué qu'en présence d'un *D. dipsaci* même au milieu d'une population de saprophage, la méthode était en capacité de le détecter. Le seuil de détection est donc de 1 *D. dipsaci* pour cette méthode de SE PCR.

Cette méthode a fait l'objet d'un test inter-laboratoire dans le but d'être validé à travers l'analyse des différents critères de performance.

2.2 Validation par test inter laboratoires et campagne de certification

Le test inter laboratoire a rassemblé deux participants. Pour chaque participant, les échantillons ont été analysés par méthode officielle (filtration et observation visuelle) ainsi que par la méthode de Seed Extract (SE) PCR. L'analyse des résultats a été réalisée de manière qualitative (positif/négatif) sur chaque échantillon testé. Les outils définis dans le guideline GEVES, basé sur la norme ISO 16140 ainsi que la méthode de Langton ont été utilisés. Ce guide est utilisé pour la validation de méthodes afin d'évaluer, la sensibilité et spécificité diagnostique, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Chaque participant a reçu 3 lots de semences différents, chacun contenant 3 échantillons différents. Ces données ont permis d'analyser la répétabilité de la méthode. Les résultats entre les deux laboratoires ont permis d'analyser la reproductibilité de la méthode. De plus, 6 tubes Eppendorf contenant diverses populations de nématodes ont été fournis en tant que témoin positif de processus (PPC) et témoin négatif de processus (NPC), afin de valider les étapes d'extraction d'ADN de PCR : deux tubes avec un mélange de nématodes saprophages et cinq individus cibles (PPC-1) ; deux tubes avec un individu cible (PPC-2) ; et deux tubes avec un mélange de saprophages (NPC). Un total de 15 échantillons (9 échantillons semences + 6 échantillons en tube) a été testé.

Les résultats obtenus ont démontré que la comparaison entre les observations visuelles de *D. dipsaci* et la détection de *D. dipsaci* par SE PCR a présenté de très bon taux de corrélation. Dans le détail, 100% des échantillons semences (1 à 9) observés visuellement ont été corrélés avec les résultats obtenus par qPCR et en accord avec les résultats attendus soit 100% de corrélation sur les échantillons de semences.

En revanche, pour les résultats obtenus sur les témoins (NPC, PPC-1 et PPC2), un témoin positif (PPC1-II) était négatif par qPCR dans un des laboratoires. Ce témoin contenait un seul *D. dipsaci*, l'hypothèse de la cause à l'origine de ce résultat a pu être le transport. Le nématode a pu se coller en haut de la paroi du tube ou dans le bouchon, ce qui a entraîné une mauvaise lyse et donc aucune d'amplification lors de la qPCR. Avec ce résultat, la corrélation sur les témoins entre les résultats attendus et les résultats obtenus est de 84%. Lors de l'analyse, les résultats issus des échantillons semences et témoins ont été séparés.

La méthode SE PCR a présenté 100% de sensibilité, de spécificité diagnostique, de répétabilité et de reproductibilité sur les échantillons de semences. En revanche, sur les témoins, la sensibilité diagnostique était de 87.5%, la spécificité diagnostique de 100%, la répétabilité était de 87.5% et la reproductibilité de 83% (Tableau 6).

Tableau 6 : Critères de performance de la méthode SE

	Semences	Témoins
Sensibilité diagnostique	100 %	87.5 %
Spécificité diagnostique	100 %	100 %
Répétabilité	100 %	83 %
Reproductibilité	100 %	87.5%

Après la validation de la méthode SE PCR lors du circuit inter laboratoire, cette méthode a été testée sur des échantillons issus de la campagne de certification. Une comparaison des résultats entre la méthode SE PCR et la méthode officielle par filtration a donc été réalisée. Un ensemble de 23 échantillons a été testé. Les échantillons positifs étant peu, voire pas présents, un spiking (ajout d'un *D. dipsaci* artificiellement dans l'échantillon analysé) a été réalisé dans 9 échantillons. Les résultats ont montré que tous les échantillons spikés étaient positifs par PCR. Ceci conforte donc l'étude du seuil de détection et la capacité de la méthode à détecter un *D. dipsaci* dans une population de saprophages. Les témoins étaient conformes et valident l'essai. En revanche, certains échantillons (891032 ; 886390 ; 886363) négatifs en observation visuelle étaient positifs en PCR. Ces résultats ont donc été considérés comme des « faux positifs » et ont conforté la sensibilité de la méthode à détecter des résidus de corps de *D. dipsaci* dans des échantillons ou aucun nématode « entier » n'est détecté.

A travers l'ensemble des étapes de validation (circuit et test sur des échantillons issus de la campagne de certification), la méthode a été validée avec des critères de performance supérieurs à 95% (sensibilité et spécificité diagnostique, reproductibilité et répétabilité) et un seuil de détection à un *D. dipsaci*.

3. Mise au point d'un test de viabilité des nématodes *D. dipsaci*

Lorsque les process industriels mis en œuvre n'éliminent pas physiquement le nématode mais le dénaturent ou le tuent (cas de la thérapie par ex.), la méthode de détection doit être en mesure de différencier les nématodes effectivement tués par le process. Ce test de viabilité doit permettre la validation de l'efficacité du process mis en œuvre mais également l'évolution de la méthode de contrôle en vue de la certification des lots.

La méthode actuelle de détection de *D. dipsaci* dans les lots de semences (MOA013, 2010) permet d'observer si les nématodes sont mobiles (vivants) ou non après passage dans un tamis et stagnation pendant plusieurs heures dans l'eau. Dans le cas de nématodes non mobiles, il n'existe actuellement pas de preuve que ces nématodes sont morts ou simplement immobiles. Les techniques actuelles de PCR donnent un résultat positif, même dans des cas de nématodes morts et observés dégradés car l'ADN reste détectable.

Quatre types de techniques ont été proposées à l'étude pour appréhender la viabilité des nématodes dans cette action (ajout de filtres papiers, traitement à la soude, PMA PCR et technique de coloration).

Les deux premières techniques ont montré très rapidement leurs limites :

(i) Concernant la technique buvard, une ou plusieurs feuilles de papiers buvards ont été déposées au fond du tamis de 250 µm afin de ne laisser migrer que les nématodes vivants, en retenant au niveau du tamis les nématodes morts. Les résultats ont mis en évidence la présence des *D. dipsaci* morts dans toutes les modalités et même avec 3 feuilles de buvards. Les nématodes morts ont donc la capacité de passer à travers ces filtres buvards malgré leur immobilité (résultats non montrés).

(ii) Un traitement des nématodes à la soude incite les nématodes vivants à se mouvoir (Esquibet et Sarniguet, communication personnelle). Lors de l'application de ce produit, le corps des individus morts reste totalement immobile tandis que les individus vivants (*D. dipsaci* et saprophage) vont se tordre dans tous les sens jusqu'à s'enrouler sur eux-mêmes et mourir (résultats non montrés). Cependant l'application de ce produit est nocive pour la santé des personnes qui le manipulent (produit CMR : Cancérogènes, mutagènes, Reprotoxiques). De plus l'observation d'une coupelle, le dénombrement et l'identification des individus présents est difficilement réalisable en simultané avec l'application de la soude pour dissocier les morts des vivants.

(iii) Le prétraitement par propidium monoazide (PMA) combiné aux méthodes de PCRq (v-PCR ou Viability-PCR) a été utilisé pour détecter et quantifier des microorganismes viables (Nocker *et al.*, 2006). L'utilisation du PMA en nématologie, a été décrite pour la première fois pour les nématodes à kyste du

genre *Globodera*, *G. pallida* et *G. rostochiensis* (Christoforou *et al.*, 2014). Le PMA, Biotium, Inc, est un intercalant photoréactif qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin. L'ADN lié à l'intercalant ne peut être amplifié par PCR. Les membranes intactes des organismes vivants font barrière et empêchent toutes liaisons entre le PMA et l'ADN. Au contraire, les nématodes morts perdant l'intégrité de leurs membranes, l'ADN est rendu accessible aux molécules de PMA. Après un prétraitement par PMA, seul l'ADN des nématodes vivants est donc amplifiable et quantifiable par PCRq. Cette méthodologie permet de détecter la présence d'une larve vivante en mélange avec des individus morts. Toutefois au-delà d'un certain nombre d'individus morts (dizaine) la différence de Ct (Cycle threshold : seuil, mesure relative à la concentration en ADN de l'organisme cible suite à une réaction PCR) n'était pas suffisante pour différencier le lot d'individus morts, d'un lot ne contenant qu'un seul individu si celui-ci est viable (résultats non montrés). En présence de lots hétérogènes en nombre de larves (notamment de lots fortement infestés), il existait donc un risque de refuser un lot ne contenant que des individus morts post-process. Au vu des limites de la méthode et de la norme, cette méthode n'a pas été retenue.

(iv) Enfin, des techniques de coloration pour différencier les nématodes morts des vivants ont été testées. Des essais basés sur l'utilisation de colorants vitaux (Tétrazolium) et létaux (Bleu d'Evans) ont été réalisés récemment sur une population de *D. dipsaci*. Non répertoriés dans la bibliographie, ces colorants utilisés pour évaluer la viabilité de différents pathogènes (spores de *Tilletia* sp., oospores de *Phytophthora* sp.) n'ont pas donné de résultat exploitable (Serandat *et al.*, 2014). La recherche bibliographique a permis d'identifier différents colorants utilisés pour évaluer la viabilité des nématodes : New Blue R (Southey *et al.* 1986 ; Sheperd *et al.*, 1962 ; Moriarty, 1964), MTT-formazan (James et Davey, 2007 ; Comley *et al.*, 1989), Nile blue A (Ogiga et Esky, 1974) Eosin-Y, Acridine orange et Diacétate de fluorescéine (Meyer *et al.* 1988). Après contact de fournisseurs, trois colorants ont été testés : Eosine Y, Diacétate de fluorescéine et Acridine Orange. Tous ont montré de bons résultats, avec la capacité à différencier les *D. dipsaci* morts des vivants (Figure 3).

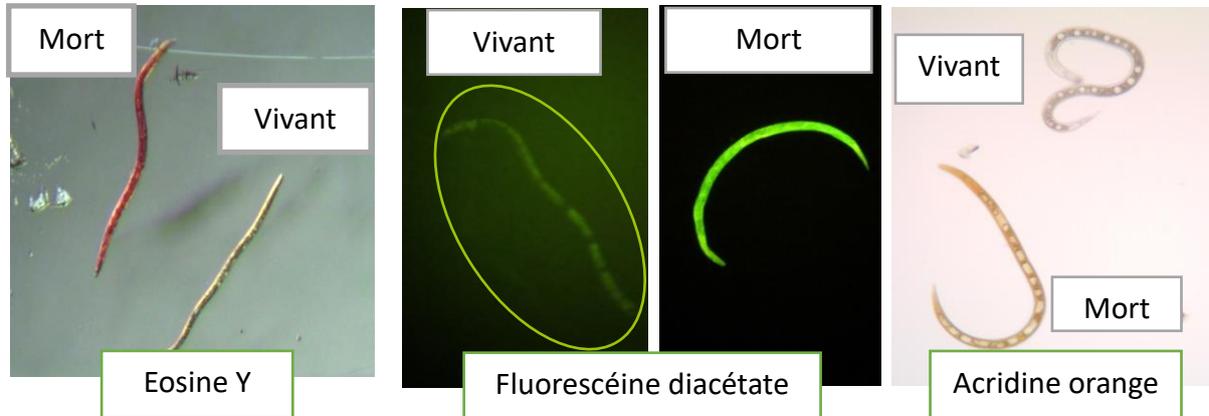


Figure 3 : Aspect des *D. dipsaci* mort et vivant testés avec différents colorants

Dans le principe, ces colorants pénètrent dans les tissus et colorent les tissus morts. L'éosine Y est solubilisée dans de l'éthanol à 96% tout comme l'acridine orange. L'éosine Y a mis en évidence les individus morts avec une coloration rouge tandis que l'acridine orange entraînait une coloration orange des individus morts lorsqu'ils étaient observés au microscope traditionnel. En revanche, le temps d'incubation favorisant la coloration était plus court avec l'Eosine Y (15 min vs 60 min). L'utilisation de la fluorescéine diacétate a démontré une fluorescence accrue des *D. dipsaci* morts comparée aux vivants. Cependant, la réhydratation du colorant dans de l'acétone est un inconvénient majeur car ce produit est considéré comme CMR (Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques) et donc nocif à l'emploi.

Les résultats de ces essais méthodologiques ont permis de choisir l'Eosine Y comme colorant final. Avec un temps d'incubation plus court et surtout une solubilité dans de l'éthanol à raison de 0,5%, ce colorant a permis de faire la discrimination entre les individus morts et les individus vivants.

Conclusion

L'ensemble des actions définies dans le montage du projet a été réalisé. L'action 1 sur l'échantillonnage des lots de luzerne a montré la grande hétérogénéité des résultats quels que soient la taille d'échantillon ou le nombre d'échantillons primaires. Les discussions lors du comité de pilotage ont permis d'aboutir sur la définition d'une taille standard d'échantillon (100g). Cette taille d'échantillon donne des résultats homogènes sur lot fortement contaminés (ex : test d'homogénéité). Néanmoins, des problèmes d'hétérogénéité étant toujours observés sur des lots faiblement contaminés, il apparaît primordial de standardiser un nombre de prélèvements primaires autour de 40 en accord avec les règles ISTA.

L'action 2, malgré les problèmes rencontrés au cours de la mise au point, a permis d'aboutir à une méthode de screening des lots après récolte. Cette méthode, validée lors d'un EILV (Essai Inter-Laboratoire de validation) et qualifiée de Seed Extract PCR, est en phase d'intégration dans le processus de certification.

L'action 3 a également permis de mettre au point et valider, suivant le guideline GEVES, une méthode permettant la différenciation des nématodes morts des vivants. Cette différenciation n'étant pas prise en compte dans le schéma de certification actuellement, les partenaires ont fait savoir leur intérêt pour que ce critère mort/vivant soit applicable en certification.

L'ensemble de ces méthodes a été représenté dans un workflow (Figure 4) et a été soumis à la section fourragère du GNIS qui a souhaité faire remonter ces résultats auprès du SOC et de la DGAL dans le but de faire évoluer le schéma de certification. Une étude de coût a également été réalisée.

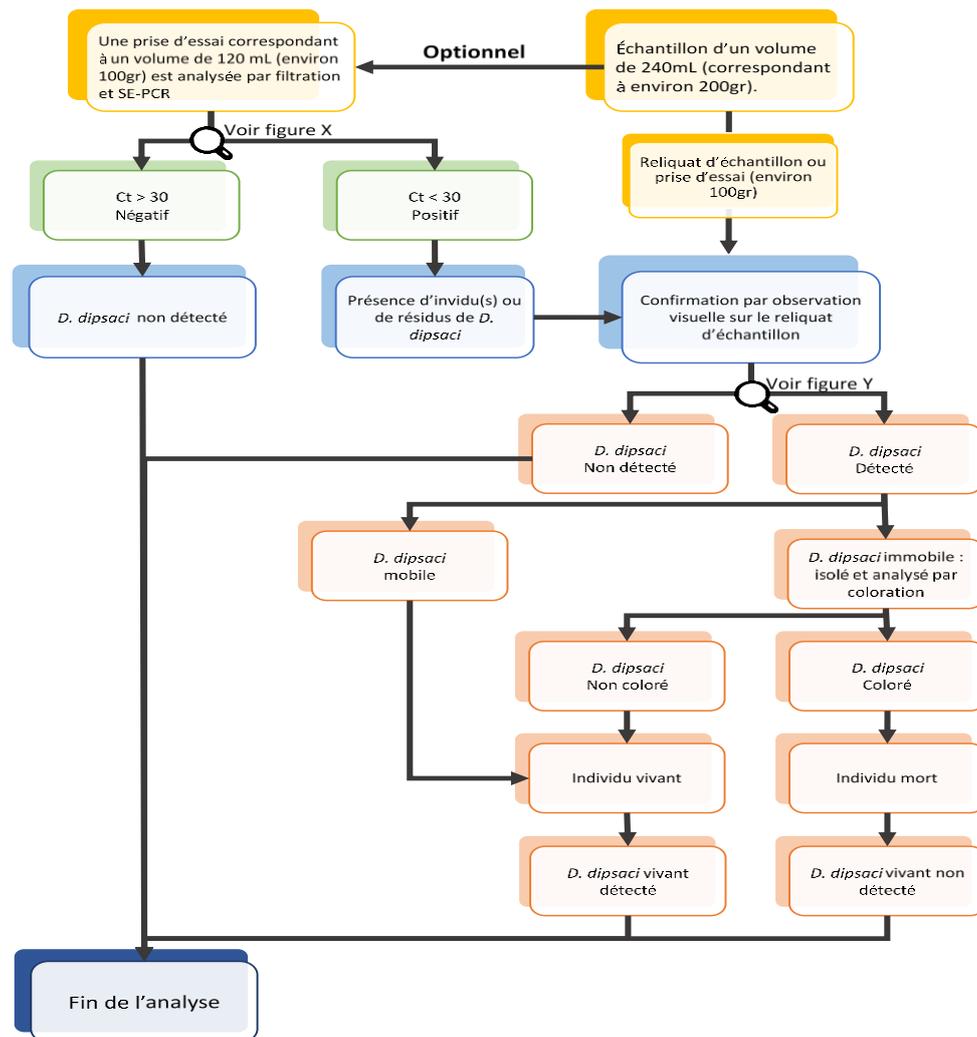


Figure 4 : Workflow de la détection par SE PCR et confirmation par identification morphobiométrique et viabilité

Suite à de nombreux échanges être le GEVES, le SOC, la DGAL et l'ANSES, et fort de son nouveau rôle de Laboratoire National de Référence Santé des Végétaux, le GEVES a proposé l'officialisation de cette méthode. Elle a été officialisée au Bulletin Officiel du ministère en charge de l'Agriculture en Novembre 2020 et est désormais disponible et appliquée au GEVES.

Remerciements

Ces travaux ont bénéficié du soutien financier de l'ONEMA, dans le cadre du Plan Ecophyto 2015.

Références bibliographiques

Directive 2000/29/CE. 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, 8 mai 2000

Méthode Officielle d'Analyse MOA013 partie A, 2010. Détection du genre *Ditylenchus* sur sols, substrats et organes végétaux (bulbes, rhizomes, caïeux, cormus, tubercules, graines) Note de service DGAL/SDQPV/N2010-8236.

Méthode Officielle d'Analyse MOA013 partie B, 2010. Identification morphobiométrique de *Ditylenchus dipsaci* et *D. destructor*. DGAL/SDQPV/N2010-8236.

Christoforou M., Pantelides I.S., Kanetis L., Ioannou N., Tsaltas D., 2014 Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide. *Plant Pathology*, 63(5), 1185-1192.

Comley J.C. et al., 1989. Colorimetric quantitation of filarial viability, *Int Jour Parasitol.* 19(1), p77-83.

Esquibet M., Grenier E., Plantard O., Andaloussi F., Caubel G., 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome*, 46: 1077-1083.

ISTA, 2017. International Rules for Seed Testing, Chapter 2, p-2-44 (50) <http://doi.org/10.15258/istarules.2017.02>

James C.E., Davey M.W., 2007. A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro, *Parasitology research*, vol. 101, no4, ISSN 0932-0113: 975-980.

Jeszke A., Dobosz R., Obrępańska-Stęplowska A., 2015. A fast and sensitive method for the simultaneous identification of three important nematode species of the genus *Ditylenchus*. *Pest management science*, 71(2), 243-249.

Kerkoud M., Esquibet M., Plantard O., Avrillon M., Guimier C., Franck M., Lechappe J., Mathis R., 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European journal of plant pathology*, 118(4), 323-332.

Meyer S.L.F., Sayre R.M., Huettel R.N., 1988. Comparison of selected stains for distinguishing between live and dead eggs of plant parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Proc. Helminthol Soc. Wash.* 55(2): 132-139.

Moriarty F., 1964. The efficacy of Chrysoïdin, New blue R and Phloxine B for determining the viability of beet eelworm, *Heterodera Schachtii* Schm. *Nematologica*, 10: 644-646.

Nocker A., Cheung C.Y., Camper A.K., 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods*, 67(2), 310-320.

Ogiga J.R., Estey R.H., 1974. The use of Meldola blue and Nile blue A, for distinguishing dead from living nematodes. *Nematologica*, 20: 271-276.

Serandat I., Grimault V., Blouin V., Gombert J., Lesprit E., Sarniguet C., Straëbler M., Lemaire H., Forsberg G., 2014. *Ditylenchus dipsaci* on alfalfa seeds: obtaining and testing for healthy seeds. 7th ISTA Seed Health Symposium – Edinburgh 12-14th June, 2014

Sheperd A., 1962. New blue R, a stain that differentiates between living and dead nematodes. *Nematologica*, 8: 201-208.

Southey J., 1986. Stains for distinguish live from dead nematodes, Handling, Fixing, staining and mounting nematodes, in *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Her Majesty's stationary office, London (GB) p74-75

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL).