



## Méthodes

### Organisation d'essais interlaboratoires de validation à l'échelle européenne pour la détection de *Gibberella circinata* dans les semences de pins

R. Ios (renaud.ios@anses.fr), C. Fourrier

Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité de mycologie, Nancy, France

R. Ios, C. Fourrier (2012). Organisation d'essais interlaboratoires de validation à l'échelle européenne pour la détection de *Gibberella circinata* dans les semences de pins, EuroReference, N° 6, ER06-12M03. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PND001.htm>

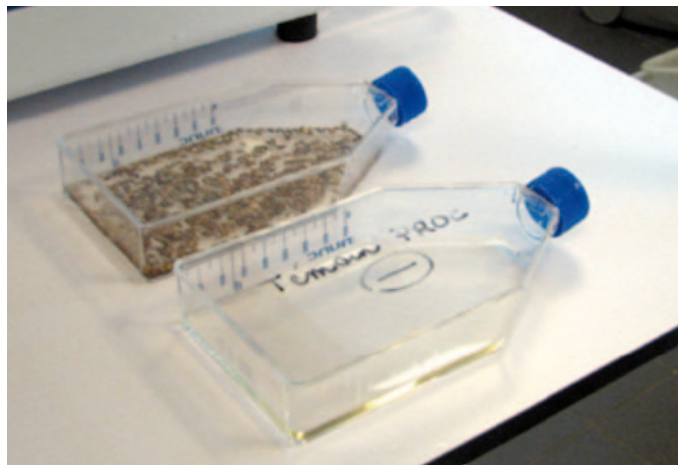


***Gibberella circinata* est un champignon parasite des pins faisant l'objet de mesures d'urgences phytosanitaires européennes depuis 2007. Les semences de pins sont les principaux moyens de dissémination à longue distance de ce champignon et des outils de détection fiables et pratiques sont requis pour contrôler la qualité sanitaire des lots de semences importés et commercialisés en Europe. Le Laboratoire de la santé des végétaux a pris le leadership d'un projet européen EUPHRESKO visant à sélectionner et évaluer par essai interlaboratoires un ou plusieurs protocoles de détection ciblant ce parasite, ainsi qu'une méthode d'échantillonnage appropriée. Ce projet permettra aux états membres, aux laboratoires de référence ainsi qu'aux acteurs de la filière de disposer d'un ou plusieurs protocoles consensuels et validés dont le niveau de performance aura été déterminé par le biais d'une collaboration internationale.**

*Gibberella circinata* (anamorphe *Fusarium circinatum*) est un champignon phytopathogène responsable de la maladie du chancre résineux des pins (pine pitch canker). Cette maladie affecte exclusivement les espèces de *Pinus* mais a été aussi décrite sur pin douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Cette maladie constitue une menace sérieuse sur les pins forestiers, causant des taux de mortalité important en cas d'attaque sévère, mais induisant *a minima* une réduction de la croissance et de la qualité du bois. Ce champignon peut en outre contaminer de façon cryptique les semences de pins, et causer des fontes de semis en pépinière. *G. circinata* est officiellement décrit aux USA, Mexique, Haïti, Afrique du Sud, Japon, Chili (Anonymous, 2005) et a été récemment rapporté en Europe, principalement dans des pépinières espagnoles, françaises et portugaises, mais aussi dans des zones limitées de milieu naturel en Italie et en Espagne (Wingfield *et al.*, 2008). *G. circinata* est

principalement un parasite de blessure et pénètre dans l'hôte par le biais de morsures d'insectes foreurs, les pratiques de taille, et les blessures liées aux événements climatiques. Le champignon se propage d'arbre en arbre par la dispersion aérienne de propagules asexuées (micro- ou macro-conidies), ou bien être véhiculé par les insectes (Gordon *et al.*, 2001). Néanmoins, sa dispersion à longue distance résulte de transport de matériel végétal infecté, comme les semences (Storer *et al.*, 1998). En effet, des semences de *Pinus* infectées sont très probablement responsables de l'introduction de l'agent du Pitch Canker en Californie (Gordon *et al.*, 2001) et en Afrique du sud (Britz *et al.*, 2001). Ce parasite est actuellement soumis à des mesures d'urgences réglementaires au niveau européen (Anonymous, 2007) et les pays membres ont l'obligation de conduire des plans de surveillance à son égard. L'EFSA a récemment présenté un avis concernant l'évaluation du risque phytosanitaire et des options de gestion de la maladie. Ses conclusions suggéraient que les semences de pin constituaient le facteur de risque le plus important pour la dissémination du parasite (EFSA Panel on Plant Health, 2010).

Il existe actuellement plusieurs méthodes morphologiques et moléculaires pour confirmer l'identité du champignon isolé en culture pure ou pour le détecter directement *in planta*. Les méthodes qui ont été décrites dans le protocole de diagnostic OEPP PM 7/91(1) (Anonymous, 2009) incluent des tests PCR-RFLP (Polymerase Chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), des tests PCR conventionnels et en temps réel. Plusieurs de ces protocoles utilisent en partie ou totalement des techniques développées par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des végétaux (Ios *et al.*, 2009). L'objectif majeur de ce projet consistait à évaluer différents de ces protocoles sur des semences de pins *via* des essais interlaboratoires de validation impliquant des laboratoires de référence européens. *In fine*, l'analyse des résultats obtenus devrait permettre de produire des valeurs de performances pour ces protocoles afin d'aider les laboratoires de référence européens et les organisations phytosanitaires des pays



Semences de pins et contrôle négatif en cours d'enrichissement biologique



## Méthodes

membre à choisir et utiliser le protocole qui correspond le mieux à leur attente en matière de seuil de détection, et de sensibilité et spécificité relatives.

### Le projet EUPHRESKO

EUPHRESKO (<http://www.euphresco.org/>) est un projet financé par le réseau EU FP6 ERA-NET (European Research Area - Network) sur la période 2006-2010. EUPHRESKO vise à améliorer la coopération et la coordination des programmes de recherche phytosanitaire (phytopathogènes et ravageurs réglementés ou émergents) au niveau européen à travers la mise en place de réseaux d'activités de recherche et l'ouverture mutuelle de programmes nationaux. Pour ce projet spécifique d'essais interlaboratoires sur *Gibberella circinata*, le mécanisme financier qui a été retenu par les pays partenaires était le système non compétitif, dans lequel chaque organisation de recherche de chaque pays est responsable de son propre financement.

L'unité de mycologie du Laboratoire de la santé des végétaux a proposé de prendre en charge l'organisation et le suivi de ce projet: i) préparation et rédaction du projet soumis aux pays membre pour demande d'accord de partenariat, ii) préparation d'un calendrier pour le projet, iii) préparation de l'organisation générale des essais interlaboratoires (définition de la nature et du nombre d'échantillons) et coordination de son déroulement, iv) traitement statistique des résultats et rédaction du rapport final.

### Recrutement des laboratoires participants et sélection des protocoles

Un appel à participation a été lancé fin 2010 via le réseau EMN (*European Mycological Network*) qui rassemble les unités de mycologie de nombreux laboratoires européens de référence en charge de la santé réglementaire des végétaux. Douze laboratoires représentant 11 pays ont au final manifesté leur intérêt à participer à ce projet (Tableau 1).

Un total de neuf protocoles est disponible dans la littérature (Tableau 2). Afin de réduire les coûts pour les participants et d'augmenter la puissance statistique des essais, une première étape a consisté pour les 12 partenaires à voter pour trois protocoles parmi les neuf, en motivant leur choix par i) la maîtrise actuelle du protocole, ii) la facilité de mise en œuvre du protocole, ou encore iii) la perspective d'utiliser en routine le protocole. Les trois protocoles ayant remporté le plus de suffrages ont été retenus pour les essais interlaboratoires (Tableau 2). Les participants devant par la suite choisir de tester individuellement un, deux ou trois de ces protocoles.

### Taille des échantillons

La norme ISPM N°31 (International Plant Protection Convention, 2008) traite de façon complète le problème de l'échantillonnage. Dans le domaine des affaires phytosanitaires, et d'après ces normes, un échantillonnage statistiquement fondé est basé sur un certain pourcentage d'infection avec un niveau de confiance

Tableau 1. Liste des partenaires impliqués dans le projet « *Gibberella circinata* »

Belgique (Wallonie)	Portugal	France
Anne Chandelier [chandelier@cra.wallonie.be] Walloon Agricultural Research Centre (CRAW) Department of Life Science Marchal Building, rue de Liroux, 4 B-5030 Gembloux	Eugénio Luís de Fraga Diogo [eugenio.diogo@inrb.pt] Instituto Nacional de Recursos Biológicos, IP/L-INIA, Unidade de Investigação de Proteção de Plantas (UIPP), Laboratório de Micologia Edifício 1 – Tapada da Ajuda 1349 - 018 Lisboa	Céline fourrier [celine.fourrier@anses.fr] Anses Laboratoire de la santé des végétaux Unité de Mycologie Domaine de Pixérécourt, BP 90059, 54220 Malzéville
Belgique (Flandres)	Irlande	Italie
Sven Inghelbrecht [sven.inghelbrecht@ilvo.vlaanderen.be] Institute for Agricultural and Fisheries Research Plant Sciences Unit - Crop protection Burg. van Gansberghelaan 96 bus 2, 9820 Merelbeke	James Choiseul [James.Choiseul@agriculture.gov.ie] Department of Agriculture, Fisheries and Food DAFF Laboratory Complex, Backweston, Celbridge, Co. Kildare	Luca Riccioni and Tiziana Annesi [luca.riccioni@entecra.it] Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura. Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale (CRA-PAV) Via C.G. Bertero 22, I-00156 Rome
Royaume-Uni	Espagne	Danemark
Victoria Barton [Victoria.Barton@fera.gsi.gov.uk] The Food and Environment Research Agency 04GA08/09, Sand Hutton YO41 1LZ	Ana M <sup>a</sup> Pérez Sierra [aperesi@eaf.upv.es] Grupo de Investigación en Hongos Fitopatogénos Instituto Agroforestal Mediterráneo Universidad Politécnica de Valencia Camino de Vera s/n - 46022 Valencia	Henrik Jørskov Hansen [hjh@pdir.dk] Seed and Plants, Diagnostic Laboratory in Plants, Seed and Fodder, Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Plantedirektoratet Skovbrynet 20, 2800 Kgs. Lyngby
Lettonie	Roumanie	Pays-Bas
Kristine Paruma [kristine.paruma@vaad.gov.lv] State Plant Protection Service National Phytosanitary Laboratory Lielvārdes str. 36/38, Rīga, LV-1006, Latvia	Adam Mariana [adam.mariana@lccf.ro] Central Laboratory for Phytosanitary Quarantine. 11 Afumati. 077190 Bucharest	Patricia van Rijswijk [p.van.rijswijk@minlnv.nl] Plant Protection Service Wageningen, The Netherlands



## Méthodes

spécifique, et requiert donc que les « clients » potentiels des analyses (e.g. organisations nationales chargées de la protection des plantes, ONPP) déterminent *a priori* certains des paramètres interdépendants suivants: niveau acceptable de contamination, niveau de détection, degré de confiance, efficacité de détection, et taille de l'échantillon analysé. Certains de ces paramètres sont déterminés par la performance de la méthode, d'autres sont des choix assumés du « client »; et *in fine*, la taille appropriée d'échantillon à analyser peut en être déduite.

De plus, la méthode d'échantillonnage la plus appropriée doit être choisie. Étant donné l'épidémiologie du parasite et sa nature cryptique dans les semences qu'il infecte (pas de symptôme externe visible), la distribution de – et le taux de contamination par – *G. circinata* dans un lot de semence est imprédictible. La méthode d'échantillonnage aléatoire simple est donc la plus appropriée dans ce cas de figure.

Un autre des objectifs de ce projet EUPHRESKO « *Gibberella circinata* » est de questionner les différentes ONPP afin de recenser les différentes valeurs envisageables des paramètres cités plus haut. Une proposition d'homogénéisation de ces derniers sera proposée par le laboratoire de la santé des végétaux, ce qui permettra de définir une taille d'échantillon statistiquement valide. Dans l'attente de ce retour d'enquête, la taille de 400 graines/lot, déjà proposée par la norme ISTA (International Seed Testing Association, 2002) a été retenue, pour des raisons pratiques. Cette taille pourra donc être réévaluée à l'issue du processus de consultation des ONPP.

### Nature et préparation des échantillons

En accord avec les recommandations de l'OEPP (Anonymous, 2010) et de la norme ISO 16140 (International Standardization Organization, 2003), chaque série d'échantillons à tester devait à minima comporter trois types de statut :

- i) lots témoins négatifs (semences indemnes de *G. circinata*);
- ii) lots contaminés légèrement au-dessus de la limite de détection (supposée correspondre à une semence contaminée parmi 400, à minima pour le protocole par isolement mycologique);
- iii) lots contaminés à un niveau correspondant à dix fois la limite de détection (i.e. 10 semences contaminées parmi 400).

De plus, iv) des contrôles négatifs de spécificité ont été introduits par l'organisateur. Ces lots de semences ont été contaminés avec d'autres espèces de *Fusarium* spp., proches de *Fusarium circinatum* d'un point de vue morphologique (permet de vérifier la spécificité du protocole utilisant l'identification morphologique), ou phylogénétique (permet de vérifier la spécificité du protocole utilisant des tests moléculaires). En revanche, afin de réduire les coûts pour les participants, le nombre de réplicats à tester par type de contamination a été réduit de huit à trois. Au final, pour chaque protocole testé, chaque participant aura à tester quatre types de contamination x 3 réplicats, soit 12 échantillons de 400 semences.

La préparation des échantillons artificiellement contaminés a été confiée à l'institut Italien CRA PAV, partenaire du projet (Tableau 1). Le coût de la préparation et de l'expédition des échantillons de graines était à la charge de chaque participant. Pour l'importation de lots de semences artificiellement contaminés par *G. circinata*, organisme réglementé, chaque

**Tableau 2. Liste des protocoles disponibles pour la détection de *Gibberella circinata* dans des semences de pins. Les protocoles en gras ont été finalement retenus après vote de sélection par les partenaires du projet.**

	Protocole	Technique	Référence
1	Isolement / identification morphologique	Isolement mycologique sur milieu Komada + identification par caractérisation morphologique	Protocole EPPO <i>G. circinata</i> PM 7/91(1)
2	<b>Isolement / identification morphologique</b>	Isolement mycologique sur milieu DCPA + identification par caractérisation morphologique	Protocole EPPO <i>G. circinata</i> PM 7/91(1)
3	Isolement / analyse PCR-RFLP*	Isolement mycologique sur milieu DCPA + amplification du gène H3 par PCR + analyse RFLP	Steenkamp <i>et al.</i> (1999)
4	<b>Isolement / test PCR conventionnel (ou SybrGreen) sur IGS**</b>	Isolement mycologique sur milieu DCPA + PCR conventionnelle (ou SybrGreen) ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS à partir d'extraits d'ADN de culture pure	Protocole EPPO <i>G. circinata</i> PM 7/91(1) et Schweigkofler <i>et al.</i> (2004)
5	Incubation sur papier-filtre	Incubation sur papier-filtre aspergé de milieu liquide PCNB et caractérisation morphologique	ISTA (2002)
6	Enrichissement biologique / test PCR conventionnel (IGS)	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test PCR conventionnel ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS	Schweigkofler <i>et al.</i> (2004) et loos <i>et al.</i> (2009)
7	Enrichissement biologique / test qPCR SybrGreen (IGS)	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test qPCR SybrGreen ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS	Schweigkofler <i>et al.</i> (2004) et loos <i>et al.</i> (2009)
8	Enrichissement biologique / test PCR conventionnel duplex	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test PCR conventionnel duplex ciblant des marqueurs SCAR** spécifiques de <i>G. circinata</i>	Ramsfield <i>et al.</i> (2008) et loos <i>et al.</i> (2009)
9	<b>Enrichissement biologique / test qPCR à sonde d'hydrolyse</b>	Enrichissement biologique suivi d'un broyage et d'une extraction d'ADN total puis test qPCR à sonde d'hydrolyse ciblant des régions spécifiques de <i>G. circinata</i> dans l'IGS	loos <i>et al.</i> (2009)

\* Restriction fragment length polymorphism. \*\* InterGenic Spacer. \*\*\* Sequence Characterized Amplified Region.





## Méthodes

partenaire a dû produire une lettre officielle d'autorisation, en accord avec la directive 2008/61/CE (Anonymous, 2008) attestant qu'il disposait des infrastructures de biosécurité, de personnel formé et averti, et de procédures de travail appropriées. La contamination des semences a été réalisée par trempage dans des solutions calibrées de microconidies de *Fusarium* spp. produites en culture pure, puis séchage en conditions stériles pour stabiliser la contamination. Le succès de contamination (100 %) a été ensuite vérifié par isolement mycologique sur des graines prises aléatoirement dans les lots contaminés.

### Calendrier prévisionnel du projet et diffusion des résultats

Le Tableau 3 présente le calendrier prévisionnel du projet. Ce dernier a été officiellement lancé le premier janvier 2011 et devrait s'achever en mars 2012. Un meeting sera programmé début 2012 afin de faire un bilan de ce projet avec les partenaires. Une publication dans une revue scientifique à comité de lecture est prévue pour synthétiser les résultats de ce projet : obtention de critères de performances pour plusieurs protocoles et comparaison objective des performances des trois protocoles retenus, définition d'une taille consensuelle d'échantillon à analyser fondée statistiquement.

### Références bibliographiques

- Anonymous, 2005. *Gibberella circinata*. EPPO Bulletin 35, 383-6.
- Anonymous, 2007. Commission Decision of 18 June 2007 on provisional emergency measures to prevent the introduction into and the spread within the Community of *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (2007/433/EC). In: O.J.E.U., ed. 161. 66-9.
- Anonymous, 2008. Commission Directive 2008/61/EC of 17 June 2008 establishing the conditions under which certain harmful organisms, plants, plant products and other objects listed in Annexes I to V to Council Directive 2000/29/EC may be introduced into or moved within the Community or certain protected zones thereof, for trial or scientific purposes and for work on varietal selections. In: Union OJOTE, ed. L157.
- Anonymous, 2009. PM 7/91(1): *Gibberella circinata*. EPPO Bulletin 39, 298-309.
- Anonymous, 2010. PM 7/98 (1): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin 40, 5-22.
- Britz H, Coutinho TA, Gordon TR, Wingfield MJ, 2001. Characterisation of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. South African Journal of Botany 67, 609-14.
- Efsa Panel on Plant Health, 2010. Risk assessment of *Gibberella circinata* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. EFSA Journal 8, 1620.
- Gordon TR, Storer AJ, Wood DL, 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85, 1128-39.
- International Plant Protection Convention, 2008. ISPM N° 31. Methodologies for sampling of consignments. In: International Standards for phytosanitary measures. Rome, It.: FAO, 19. (ISPM N° 31; vol.).
- International Seed Testing Association, 2002. International rules for testing. 7-009: Detection of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. & Reinke on *Pinus taeda* and *P. elliotii* (Pine) In: Basseldorf, Switzerland.
- International Standardization Organization, 2003. ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. In: Geneva, Switzerland.

Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR, 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. Phytopathology 99, 582-90.

Ramsfield TD, Dobbie K, Dick MA, Ball RD, 2008. Polymerase chain reaction-based detection of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker disease. Molecular Ecology Resources 8, 1270-3.

Schweigkofler W, O'donnell K, Garbelotto M, 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. Applied And Environmental Microbiology 70, 3512-20.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, 1999. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini by Histone Gene Sequence Data. Applied And Environmental Microbiology 65, 3401-6.

Storer, Gordon, Clark, 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f.sp. pini, with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathology 47, 649-56.

Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, et al., 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. Australasian Plant Pathology 37, 319-34.



## Méthodes

Tableau 3. Calendrier prévisionnel du projet EUPHRESKO *Gibberella circinata*

Étape	Implication	Date de fin de réalisation
Questionnaire adressé aux participants potentiels : choix par ces derniers des trois protocoles parmi les neuf possibles	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Questionnaire envoyé avant le 01/01/2011 Réponse avant le 31/01/2011
Préparation des échantillons de semences artificiellement infectés (nombre total dépendant du nombre de participants et du nombre de protocoles testés par chacun)	CRA-PAV	Février – avril 2011
Études préliminaires de stabilité et d'homogénéité des échantillons artificiellement contaminés	CRA-PAV	Février – avril 2011
Questionnaire destinés aux NPPO sur la procédure d'échantillonnage	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie et tous les partenaires	Mars 2011
Préparation des lettres officielles d'autorisation (Directive CE/2008/61) et envoi au laboratoire de production des semences	Tous les partenaires	Avant mai 2011
Présentation d'un poster sur le projet durant la réunion annuelle du réseau EMN à Dublin	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie et tous les partenaires	Mai 2011
Test de pré-évaluation pour tous les participants afin de vérifier leur capacité à réaliser le test principal (un échantillon avec un niveau de contamination équivalent à dix fois la limite de détection pour chaque protocole testé)	CRA-PAV + tous les partenaires	Mai 2011
Préparation et distribution à tous les participants d'une feuille de résultats pour les protocoles choisis	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Mai 2011
Résultats du test de pré-évaluation à envoyer au leader du projet	Tous les partenaires	Juin 2011
Expédition aux participants des séries d'échantillons pour les tests inter-laboratoires choisis (une série de 12 échantillons par participant et par protocole testé)	CRA-PAV	Septembre 2011
Résultats des tests interlaboratoires à envoyer au leader du projet	Tous les partenaires	Novembre 2011
Résultat du questionnaire « échantillonnage » pour les ONPP à envoyer au leader du projet	ONPP respective de chaque partenaire	Novembre 2011
Analyse statistique des données des essais interlaboratoires pour les trois protocoles	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Décembre 2011
Préparation d'un rapport provisoire	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Décembre 2011
Meeting de fin de projet Présentation et discussion des résultats Accord sur le rapport définitif (recommandation du protocole le plus performant ?)	Tous les partenaires + CRA-PAV + Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Janvier 2012
Préparation d'un article scientifique Préparation d'un rapport final à destination du bureau des projets EUPHRESKO	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie	Février 2012
Soumission d'une l'article scientifique de synthèse des résultats	Anses Laboratoire de la santé des végétaux, unité de mycologie + CRA PAV	Mars 2012