

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA017 - Version 3

Décembre 2024

Détection de *Tilletia indica*, *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis* par filtration sélective et identification morphologique.

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence " tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023"

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
MGs/98/12 vA		1998	Version initiale
MHs/06/01 vA		2006	-
MHs/06/01 vB		Fev. 2007	-
MOA017 v1A*		Avril 2011	- Mise en forme évoluant vers le format des méthodes MOA Anses
MOA017 v2A**		Mars 2012	- Intégration de <i>Tilletia controversa</i> , <i>T. foetida</i> et <i>T. caries</i> dans les espèces recherchées.
MA017 v3***	Mineure	Décembre 2024	- Mise en forme évoluant vers le format actuel des MA Anses - Trois prises d'essai par lot, au lieu de deux, pour augmenter la probabilité de détection - Pesée des prises d'essai au lieu d'estimation de volume - Evolution des volumes de lavage et rinçage

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation de janvier à février 2011 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

** La version 2 a fait l'objet d'une consultation de novembre à décembre 2011 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

*** La version 3 a fait l'objet d'une consultation du 08/11/2024 au 06/12/2024 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie

Laboratoire National de Référence « autres champignons sur toutes matrices »

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été initialement mise au point, optimisée et évaluée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	8
1.1. Objets susceptibles d'être soumis à analyse :	8
1.2. Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse :	8
1.3. Grandeur des objets susceptibles d'être soumis à analyse :	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode	9
4.1 Recherche de <i>T. indica</i>	9
4.2 Recherche de <i>T. caries</i> , <i>T. controversa</i> et <i>T. laevis</i>	10
5. Réactifs et consommables	10
5.1 Réactifs	11
5.2 Consommables.....	11
6. Appareillage et matériels	11
7. Échantillons	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	12
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	12
8. Mode opératoire	13
8.1 Réalisation des trois prises d'essai par échantillon.....	13
8.2 Lavage des prises d'essai et filtrations sélectives pour la recherche de <i>T. indica</i>	13
8.3 Centrifugation et montage microscopique des culots de centrifugation pour la recherche de <i>T. indica</i>	14
8.4 filtrations sélectives pour la recherche de <i>T. caries</i> , <i>T. controversa</i> et <i>T. laevis</i>	14
8.5 Centrifugation et montage microscopique des culots de centrifugation pour la recherche de <i>T. caries</i> , <i>T. controversa</i> et <i>T. laevis</i>	15
8.6 Observation au microscope des culots de centrifugation pour la recherche de <i>T. indica</i>	15
8.7 Observation au microscope des culots de centrifugation pour la recherche de <i>T. caries</i> , <i>T. controversa</i> et <i>T. laevis</i>	15
9. Identification des téliospores de <i>Tilletia</i>	16
9.1 Caractéristiques des téliospores de <i>T. indica</i>	16
9.2 Caractéristiques des téliospores de <i>T. caries</i> , <i>T. controversa</i> et <i>T. laevis</i>	18
10. Résultats	19
10.1 Recherche de <i>T. indica</i>	19
10.2 Recherche de <i>T. caries</i> , <i>T. controversa</i> et <i>T. laevis</i>	19
11. Validation de la méthode	20
Bibliographie	21
ANNEXE 1 : photos des étapes de la méthode	22
ANNEXE 2 : images de téliospores de <i>Tilletia</i> spp	25

Introduction

Cette méthode qualitative s'applique premièrement à la détection du champignon *Tilletia indica* Mitra, 1931, agent de la carie de Karnal sur grains de céréales. Ce champignon est listé comme organisme de quarantaine dans l'annexe II partie B du règlement d'exécution (UE) 2019/2072. Ses plantes hôtes naturelles rapportées sont *Triticum aestivum*, *T. durum* et *T. aestivum* x *Secale cereale*.

Il existe d'autres espèces de *Tilletia* qui peuvent être confondues morphologiquement avec *T. indica*, mais qui infectent normalement d'autres céréales.

On citera par exemple *T. walkeri* infectant *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *T. horrida* infectant *Oryza* spp., et *T. ehrhartae* infectant *Ehrharta calycina*.

En Australie, il a été constaté que *T. walkeri* et *T. ehrhartae* contaminent les semences récoltées de *Triticum aestivum*. *T. walkeri* et *T. horrida* sont présentes aux États-Unis et sont également détectées dans les semences récoltées de *Triticum aestivum*, en particulier lorsque *Oryza* spp. et *Lolium* spp. sont cultivées en rotation avec *Triticum aestivum*.

La présence de ces trois espèces en Europe est incertaine, mais elles pourraient être présentes sur des céréales importées.

D'autres espèces de *Tilletia* agents de carie du blé sont présentes en France et en Europe : *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*. Elles sont fréquemment présentes dans les lots de grains, mais facilement distinguables de *T. indica* par leur morphologie. Cette méthode qualitative peut également s'appliquer à la détection de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis* (ex. *T. foetida*). Aucune de ces trois espèces n'est réglementée. Une publication récente semble indiquer que *T. caries* et *T. laevis* sont conspécifiques (N'Guyen et al., 2004), mais elles sont encore couramment citées comme deux espèces séparées, notamment par leurs différences morphologiques. Il est donc convenu de maintenir leur distinction dans cette méthode.

Cette méthode permet ainsi de détecter le champignon de quarantaine *T. indica*, et en ajoutant une étape supplémentaire de détecter si nécessaire les trois autres espèces endémiques *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*.

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de *T. indica* doit être en accord avec la réglementation en vigueur, adaptée selon la provenance des échantillons :

i) Echantillons d'importation

La détention et la manipulation de *T. indica* lors de ces analyses doivent être effectuées dans des conditions de précaution appropriées conformément au règlement délégué (UE) 2019/829. La manipulation et la conservation de cet agent pathogène à dissémination aérienne, ainsi que des échantillons d'importation nécessitent une décontamination des effluents aériens, solides et liquides.

ii) Echantillons prélevés sur le territoire français

Le territoire français étant officiellement indemne de *T. indica*, la manipulation et détention des échantillons de céréales prélevés en France nécessitent uniquement une désinfection des effluents solides et liquides.

Les téliospores de *Tilletia* spp. étant extrêmement volatiles, les risques de contaminations croisées sont élevés entre les différents échantillons à traiter. Il convient de prendre les précautions suivantes pour la manipulation des échantillons avant, pendant et après l'analyse :

- Bien séparer les échantillons,
- Porter des gants à usage unique au minimum jusqu'à l'étape de lavage et les changer entre chaque échantillon, se désinfecter les mains à l'éthanol à 70° (ou solution désinfectante équivalente) en cas de contact avec l'échantillon.
- Nettoyer et bien désinfecter le matériel et les pailles entre chaque échantillon.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant les différentes étapes de l'analyse doivent être détruits par autoclavage. La verrerie et les systèmes de filtration doivent être soigneusement désinfectés.

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 ou unités dérivées. 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).

Grandeur	EMT
Volume	Se référer à la norme ISO8655 ou utiliser les EMT suivantes : volume < à 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ volume > à 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ congélateur froid intense : $\leq -65^{\circ}\text{C}$
Dimension	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

1. Objet et domaine d'application

L'objectif de cette méthode est de détecter la présence de *T. indica*, ainsi que de *T. caries*, *T. controversa*, et *T. laevis*, par observation d'un nombre suffisant de téliosporos au microscope.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter chacune des espèces dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de chacune des espèces recherchées ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Afin de permettre la bonne mise en œuvre de cette méthode, la demande d'analyse doit clairement spécifier:

- soit la recherche de *T. indica*
- soit la recherche de *T. indica*, *T. caries*, *T. controversa*, et *T. laevis*,

1.1. Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

La méthode s'applique à toutes les semences (traitées et non traitées) ainsi qu'aux grains destinés à la consommation et/ou à la transformation de *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, et *Triticum aestivum* x *Secale cereale*.

1.2. Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, (propres, non avariés...). Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

1.3. Grandeur des objets susceptibles d'être soumis à analyse :

La méthode s'applique sur des échantillons constitués d'environ 1 kg de grains / semences. Dans le cas où la quantité de grains paraît significativement inférieure, le poids de l'échantillon peut être mesuré et reporté sur la fiche de suivi de l'échantillon, accompagné de réserve quant au résultat final obtenu.

2. Documents de référence

Cette méthode s'inspire des protocoles de diagnostic internationaux EPPO PM7/39 (3) *Tilletia indica* et ISPM 27 Annex 04 (2014) DP4 *Tilletia indica* Mitra.

3. Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP, etc.).

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 de la méthode d'analyse.

4. Principe de la méthode

4.1 Recherche de *T. indica*

La méthode consiste à collecter les téliospores de *T. indica* éventuellement présentes dans un échantillon de grains de céréales par leur lavage, et à filtrer le liquide de lavage obtenu à travers une série de deux filtres à mailles de dimensions différentes, permettant leur capture sélective. Après concentration par centrifugation, les téliospores sont observées et caractérisées par morphométrie au microscope (**Schéma 1**).

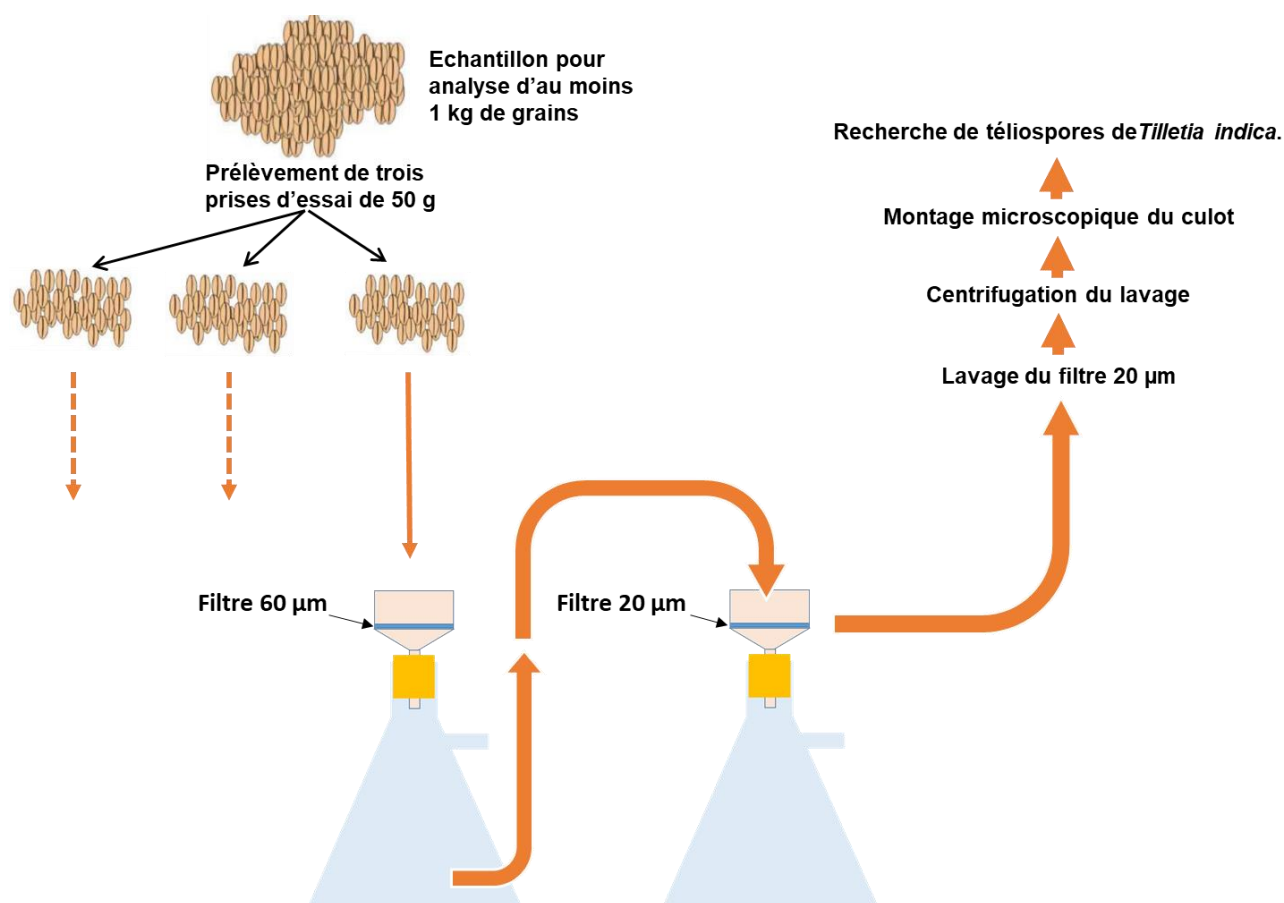


Schéma 1 : Principe général de la méthode de détection de *T. indica*.

4.2 Recherche de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*

La méthode consiste à collecter les téliospores de *Tilletia caries*, *T. controversa*, et *T. laevis* éventuellement présentes dans un échantillon de grains de céréales par leur lavage, et à filtrer le liquide de lavage obtenu à travers une série de trois filtres à mailles de dimensions différentes, permettant leur capture sélective. Après concentration par centrifugation, les téliospores sont observées et caractérisées par morphométrie au microscope.

Elle est entreprise à la suite de la recherche de l'espèce *T. indica*, à partir du filtrat obtenu après filtration à 20 μm (Schéma 2)

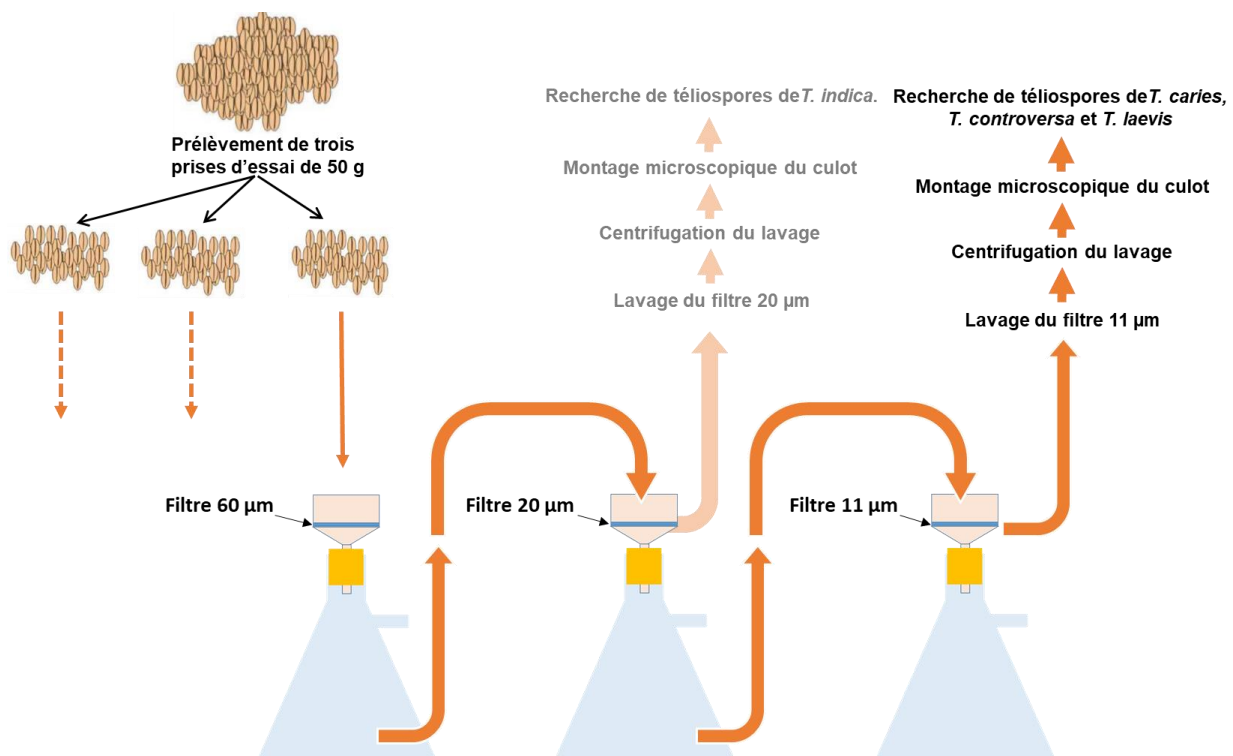


Schéma 2 : Principe général de la méthode de détection de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*, à la suite de la recherche de *T. indica*

5. Réactifs et consommables

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Réactifs

- Eau distillée ou osmosée.
- Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) titrant environ 1,6% de chlore actif.
- Solution de lavage : Ajouter environ une goutte de Tween 20 pur par litre d'eau osmosée. Des flacons de cette solution peuvent être préparés à l'avance et conservés à température ambiante.
- Ethanol à 70% ou solution désinfectante équivalente.
- Vernis à ongles transparent ou autre scellant de propriétés équivalentes.
- Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à environ 0,2% (uniquement en cas d'analyse de semences traitées).

5.2 Consommables

- Boîtes de Petri en verre ou en plastique.
- Tubes coniques de centrifugation en polypropylène, à usage unique (20 à 50 mL).
- Cônes de micropipettes à filtre de 100 ou 200 µL, 1000 µL et 5000 µL.
- Parafilm.
- Lames porte-objet et lamelles couvre-objet, pour microscope.
- Gants jetables en latex ou en nitrile.
- Filtres à dimension de maille d'environ 60 µm (± 10 µm), 20 µm (± 4 µm) pour la recherche de *T. indica*, et 11 µm (± 4 µm) pour la recherche des trois autres espèces (ex. Filtre filet en nylon hydrophile type NY11, NY20 et NY60 Merck-Millipore, ou toile). Dans le cas où une vérification métrologique n'est pas possible, un certificat du fournisseur attestant de la qualité des filtres peut être suffisant.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Matériel courant dans un laboratoire de microbiologie, et notamment :

- Récipient à fond plat de type plateau ou bac plastique pour l'étalement des échantillons de grains.
- Balance
- Micropipettes de 100 ou 200 µL, 1000 µL et 5000 µL.
- Pissette d'eau osmosée
- Microscope photonique à grossissement x 100 à x 400 minimum équipé d'un système de mesure et de prise de vue.
- Système de production de vide (type pompe à vide).
- Centrifugeuse de paillasse (permettant d'obtenir une vitesse d'environ 1000 tr/min) + rotor adapté aux tubes coniques utilisés (20 à 50 mL)
- Agitateur orbital à plateau (optionnel)

- Spatule ou cuillère pour les prises d'essai.
- Pincés

Verrerie :

- Erlenmeyers de 250 ou 500 mL.
- Fioles aspirantes de forme Erlenmeyer de 500 ou 1000 mL (équipées de bec pour branchement de l'aspiration)
- Entonnoir porte filtre de type Büchner de taille adaptée aux fioles aspirantes et au diamètre des filtres utilisés
- Eprouvettes graduées de 100 mL ou 200 mL.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés:

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : L'échantillon pour analyse doit être visuellement propre et sec, afin de permettre une filtration de la solution de lavage des grains.

Confection du colis : L'envoi des échantillons au laboratoire d'analyse se fait par voie postale ou transporteur, en enveloppant chacun des échantillons dans un sachet plastique différencié. Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine phytosanitaire » doit figurer à l'extérieur du colis.

Fiche de demande d'analyse : Inclure toutes les informations importantes sur l'échantillon à l'extérieur du colis en renseignant une fiche de demande d'analyse.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

A la réception de l'échantillon et jusqu'à l'analyse, l'échantillon peut être conservé indifféremment à température ambiante ou au frais avant analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (ici à température ambiante ou au frais), au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents est envoyé au laboratoire national de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.

8. Mode opératoire

8.1 Réalisation des trois prises d'essai par échantillon

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique. Chaque échantillon est traité individuellement. Les outils sont stérilisés (ex. : passés à la flamme puis refroidis) entre chaque échantillon. L'analyse comporte trois prises d'essai par échantillon.

- Le contenu du sac de grains est transféré dans un récipient plat (plateau ou bac plastique) suffisamment vaste pour étaler de façon homogène la totalité du matériel à analyser.
- A l'aide d'une spatule ou cuillère désinfectée, les grains sont mélangés puis des prélèvements aléatoires sont effectués afin de constituer trois prises d'essai chacune d'un poids de 50 g. Repérer l'éventuelle présence de grains « boutés », c'est-à-dire fortement contaminés par *Tilletia* spp. (**Figure 1**) et prélever préférentiellement ces grains. Les prélèvements s'effectuent en portant des gants à usage unique qui doivent être changés au minimum à chaque nouvel échantillon.
- Chaque prise d'essai est préparée/pesée directement dans un Erlenmeyer de 250 mL, qui est scellé au parafilm pour les différentes pesées d'ajustement.
- Ajouter 100 mL de solution de lavage (cf §5.1.) dans chaque Erlenmeyer et le sceller au parafilm avant de le sortir du PSM (**Figure 2**).

En cas d'analyse de semences traitées, remplacer les 100 mL de solution de lavage par 100 mL de solution de NaOH à environ 0.2 % et laisser incuber 24 heures, avant d'ajouter 100 mL de solution de lavage dans l'Erlenmeyer. Le NaOH permet de dissoudre une bonne partie de l'enrobage des grains, et évitera de colmater les filtres dans les étapes suivantes. Poursuivre ensuite comme suit.

8.2 Lavage des prises d'essai et filtrations sélectives pour la recherche de *T. indica*

- Placer chaque Erlenmeyer sur un agitateur réglé à environ 200 tours/min, pendant environ 3 min, afin de libérer les éventuelles téliospores présentes à la surface des grains. A défaut d'agitateur, les Erlenmeyers peuvent être agités manuellement. Chacune des trois prises d'essai suivra individuellement les étapes suivantes.
- Préparer deux entonnoirs Büchner sur deux fioles à aspiration (**Figure 3**).
- Déposer un filtre de 60 µm sur le premier entonnoir Büchner et un filtre de 20 µm sur le second (**Figure 4**). Faire adhérer les filtres à l'entonnoir en les rinçant avec quelques mL d'eau osmosée.
- Brancher la pompe à vide sur le bec de la fiole à aspiration de filtrage à 60 µm et mettre en route l'aspiration par la pompe à vide.
- Verser délicatement sur le filtre de 60 µm le contenu de l'Erlenmeyer (grains + solution de lavage) (**Figure 5**). Si nécessaire, rincer à l'aide d'une pissette d'eau osmosée les parois internes de l'Erlenmeyer pour récupérer l'intégralité des grains et déposer le tout sur le filtre.
- Rincer délicatement et de façon homogène les grains sur le filtre à l'aide d'une pissette d'eau osmosée ou d'une éprouvette de façon à obtenir dans la fiole à aspiration un filtrat d'un volume compris entre

300 et 400 mL (**Figure 6**). Le filtrat à 60 µm est donc à ce stade intégralement recueilli dans la fiole à aspiration (**Figure 7**)

- g) Brancher la pompe à vide sur le bec de la fiole à aspiration de filtrage à 20 µm et mettre en route l'aspiration par la pompe à vide.
- h) Verser sur le filtre à 20 µm l'intégralité du liquide filtré à 60 µm et collecté dans la première fiole. Rincer les parois internes de l'Erlenmeyer à l'aide d'une pissette d'eau osmosée et déposer le tout sur le filtre à 20 µm. Les téliospores potentiellement présentes sont désormais retenues à la surface du filtre de 20 µm. ***Le filtrat est conservé si la recherche des autres espèces de *Tilletia* est demandée (cf §8.4)***.
- i) Retirer le filtre de 20 µm à l'aide de pinces (**Figure 8**), et rincer la surface ayant capturé les téliospores dans une boîte de Petri avec 10 à 15 mL d'eau osmosée, à l'aide d'une pipette P5000 ou une pissette (**Figure 9**). Répéter le rinçage en réutilisant si nécessaire le liquide récupéré dans la boîte de Petri à l'aide d'une micropipette, jusqu'à ce que la surface du filtre apparaisse le plus propre possible. Jeter ensuite le filtre dans une poubelle traitée pour destruction quarantaine.
- j) Aspirer l'intégralité du liquide de rinçage du filtre de la boîte de Petri (maximum 15 mL) et le transférer dans un tube de centrifugation de volume suffisant (**Figure 10**).

A la fin de ces étapes, les trois prises d'essai aboutissent à trois tubes de centrifugation.

8.3 Centrifugation et montage microscopique des culots de centrifugation pour la recherche de *T. indica*

- a) Centrifuger les tubes pendant environ 3 min à environ 1000 g
- b) A la fin de la centrifugation, pipeter délicatement le surnageant en veillant à ne pas toucher ni remettre en suspension le culot, de façon à laisser un minimum de volume résiduel de liquide (idéalement 50-100 µl) submergeant le culot. Ceci peut être réalisé à l'aide d'une pipette P5000 ou P1000 à cône à filtre à usage unique. Il est possible de conserver plus de liquide résiduel si le culot est trop épais.
- c) Remettre en suspension et homogénéiser le culot dans le volume résiduel, par aspiration refoulement à l'aide d'une pipette P100 ou P200 munie d'un cône à usage unique.
- d) Déposer et répartir l'intégralité de la suspension sur une ou plusieurs lames de microscope porte objet, à raison d'environ 20 µL par lame, jusqu'à épuisement du volume. Recouvrir les prélèvements d'une lamelle pour observation microscopique.

Pour chaque échantillon de blé, trois prises d'essais aboutissent chacune à l'observation de 1 à plusieurs lames microscopiques pour la recherche de *T. indica*.

8.4 filtrations sélectives pour la recherche de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*

- a) Brancher la pompe à vide sur le bec de la fiole à aspiration de filtrage à 11 µm et mettre en route l'aspiration par la pompe à vide.
- b) Verser sur le filtre à 11 µm l'intégralité du liquide filtré à 20 µm et collecté dans la deuxième fiole (cf. §8.2). Rincer les parois internes de l'Erlenmeyer à l'aide d'une pissette d'eau osmosée et déposer le tout sur le filtre à 11 µm. Les téliospores potentiellement présentes sont désormais retenues à la surface du filtre de 11 µm.
- c) Retirer le filtre de 11 µm à l'aide de pinces, et rincer la surface ayant capturé les téliospores dans une boîte de Petri avec 10 à 15 mL d'eau osmosée, à l'aide d'une pipette P5000 ou une pissette. Répéter le rinçage en réutilisant si nécessaire le liquide récupéré dans la boîte de Petri à l'aide d'une micropipette, jusqu'à ce que la surface du filtre apparaisse le plus propre possible.
- d) Aspirer l'intégralité du liquide de rinçage du filtre de la boîte de Petri (maximum 15 mL) et le transférer dans un tube de centrifugation de volume suffisant.

A la fin de ces étapes, les trois prises d'essai aboutissent à trois tubes de centrifugation supplémentaires.

8.5 Centrifugation et montage microscopique des culots de centrifugation pour la recherche de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*

- a) Centrifuger les tubes pendant environ 3 min à environ 1000 g
- b) A la fin de la centrifugation, pipeter délicatement le surnageant en veillant à ne pas toucher ni remettre en suspension le culot, de façon à laisser un minimum de volume résiduel de liquide (idéalement 50-100 µl) submergeant le culot. Ceci peut être réalisé à l'aide d'une pipette P5000 ou P1000 à cône à filtre à usage unique. Il est possible de conserver plus de liquide résiduel si le culot est trop épais.
- c) Remettre en suspension et homogénéiser le culot dans le volume résiduel, par aspiration refoulement à l'aide d'une pipette P100 ou P200 munie d'un cône à usage unique.
- d) Déposer et répartir l'intégralité de la suspension sur une ou plusieurs lames de microscope porte objet, à raison d'environ 20 µL par lame, jusqu'à épuisement du volume. Recouvrir les prélèvements d'une lamelle pour observation microscopique.

Pour chaque échantillon de blé, trois prises d'essais aboutissent chacune à l'observation de 1 à plusieurs lames microscopiques pour la recherche de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*.

8.6 Observation au microscope des culots de centrifugation pour la recherche de *T. indica*

Chaque lame obtenue après les étapes décrites au §8.3 est observée au microscope aux grossissements x100 ou x200. Chaque montage doit être observé intégralement, en balayant la surface de la lamelle de haut en bas et de gauche à droite (ou inverse), pour la recherche de présence de téliospores de *T. indica*, et éventuellement de cellules stériles de celle-ci.

En cas d'observation de téliospores, passer aux grossissements supérieurs et procéder à l'identification de l'espèce en prenant en compte leurs dimensions, leur couleur, leur ornementation, et noter leur nombre. Se référer au §9.1 et à la **table 1**, décrivant les caractéristiques des principales espèces qu'il est possible de rencontrer lors de l'analyse.

Dans le cas de l'observation de téliospores typiques de *Tilletia indica*, l'identification devra être systématiquement confirmée par le laboratoire national de référence (envoi de lame lutée + images + reliquat de grains dans un sac confiné « quarantaine »). **Des mesures immédiates de désinfection des locaux et du matériel utilisé devront être mises en œuvre si la manipulation ne s'est pas déroulée dans un local NS3 (cas des analyses sur grains de céréales prélevés en France).**

A la fin des observations, décontaminer l'ensemble du matériel utilisé par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis rincer à l'eau courante. Eliminer les consommables plastiques dans une poubelle destinée à l'autoclavage.

8.7 Observation au microscope des culots de centrifugation pour la recherche de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*.

Chaque lame obtenue après les étapes décrites au §8.5 est observée au microscope aux grossissements x100 ou x200. Chaque montage doit être observé intégralement, en balayant la surface de la lamelle de haut en bas et de gauche à droite (ou inverse), pour la recherche de présence de téliospores de *Tilletia caries*, *T. controversa*, et *T. laevis*.

En cas d'observation de téliospores, passer aux grossissements supérieurs et procéder à l'identification de l'espèce en prenant en compte leurs dimensions, leur couleur, leur ornementation, et noter leur nombre. Se référer au §9.2 et à la **table 2**, décrivant les caractéristiques des principales espèces qu'il est possible de rencontrer lors de l'analyse.

À la fin des observations, décontaminer l'ensemble du matériel utilisé par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis rincer à l'eau courante.

9. Identification des téliospores de *Tilletia*

9.1 Caractéristiques des téliospores de *T. indica*

Les **téliospores de *T. indica*** sont :

- Globuleuses à subglobuleuses avec parfois de petits fragments d'hyphes attachés (plus communément sur les téliospores immatures mais, à l'occasion, aussi sur les téliospores matures).
- Mesurent le plus souvent de 35 µm à 41 µm de diamètre en moyenne (min. 22 µm, max. 64 µm).
- De couleur ocre clair à brun rougeâtre foncé; les téliospores matures sont noires et opaques.
- Densément ornementées avec des échinulations à pointes aiguës à tronquées, parfois à l'extrémité recourbée, hautes de 1,4 µm à 5,0 µm (au maximum 7 µm), qui apparaissent en vue de surface soit comme des échinulations indépendantes (densément échinulées), soit comme de fines arêtes séparées par des espaces étroits (finement cérébriformes).

Des images de téliospores de *T. indica* à différents grossissements sont visibles en annexe 2 (**Figures 11 à 18**)

Après les étapes de filtrations sélectives, et bien que rares, des **cellules stériles de *T. indica*** (**Figure 11**) peuvent être observées dans le culot monté au microscope. Si présentes, elles sont :

- Globuleuses, subglobuleuses à lacrymiformes (en forme de larme),
- De couleur ocre jaune,
- D'une dimension de 10 µm à 28 µm × 48 µm,
- Avec ou sans apicule (courte tige),
- Avec des parois lisses, ayant jusqu'à 7 µm d'épaisseur, et laminées.

L'utilisation de la **Table 1** permet de synthétiser les caractéristiques à observer pour l'identification de *Tilletia indica*. On y trouvera également, à titre de comparaison, celles des espèces proches morphologiquement, ou plus éloignées morphologiquement mais fréquemment présentes en France (**Figures 19 à 29**). La **Figure 30** montre un grain de pollen de blé, pollen qui peut être parfois présent dans les filtrats.

Table 1 : critères de distinction entre *T. indica* et les espèces proches morphologiquement (*T. horrida*, *T. walkeri*, *T. ehrhartae*) ou les espèces fréquemment présentes en France (*T. caries*, *T. controversa*, *T. laevis*)

Espèce	Taille maximale des téliosporos (µm)				Taille moyenne des téliosporos (µm)				Couleur				Echinulation en surface et en vue transversale				Plante Hôte	
	<25	<36	36-45	45-50	18-20	24-28	30-31	35-41	Ocre clair à brun rougeâtre foncé, spores matures noires à opaques	Jaune pâle à brun rougeâtre foncé (jamais noire ni opaque)	Châtain clair à châtain foncé. Peut être semi-opaque	Brun olivâtre très foncé quand mature. Peut être opaque	En vue de surface, spores densément échinulées ou avec de fines arêtes séparées par des espaces étroits (finement cérébriformes). En vue médiane, profil plus lisse et régulier en raison de la densité des échinules, dont les pointes sont parfois recourbées.	Agencement grossier +/- cérébriforme. En vue de surface, arêtes larges irrégulièrement cérébriformes. En vue médiane, le profil est irrégulier avec des espaces entre les échinules	Fréquemment recourbées et, en vue de surface, apparaissent comme des motifs polygonaux.	Échinules cylindriques ou légèrement fuselées. En vue de surface, spores rarement cérébriformes. Figures polygonales plus larges et marquées. En vue médiane, largement tronquées à légèrement arrondies au sommet		Réticulation polygonale marquée (P) ou absence de réticulation, lisse (L)
<i>T. indica</i>				✓				✓	✓ (Figure 11-12)				✓ (Figures 13-18)					<i>Triticum</i> spp.
<i>T. horrida</i>		✓			✓	✓					✓				✓ (Figures 21-23)			<i>Oryza</i> spp.
<i>T. walkeri</i>			✓				✓			✓				✓ (Figure 19-20)				<i>Lolium</i> spp.
<i>T. ehrhartae</i>	✓				✓							✓				✓		<i>Ehrharta</i> sp.
<i>T. caries</i>	✓									✓							✓ (P) (Figures 24-25)	<i>Triticum</i> spp.
<i>T. controversa</i>	✓									✓							✓ (P) (Figures 26-28)	<i>Triticum</i> spp.
<i>T. laevis</i>	✓									✓							✓ (L) (Figure 29)	<i>Triticum</i> spp.

9.2 Caractéristiques des téliospores de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*

Lorsque des téliospores sont présentes, se reporter à la **Table 2** présentant les trois espèces de *Tilletia* spp. et qui synthétise plus précisément les caractéristiques à observer pour l'identification.

Table 2 : caractéristiques morphologiques des téliospores de *Tilletia caries*, *T. controversa* et *T. laevis*.

	<i>T. caries</i>	<i>T. controversa</i>	<i>T. laevis</i>
Forme	Globuleuse ou subglobuleuse à ovoïde	Globuleuse à subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse à ovoïde
Couleur	Brun rougeâtre ou brun clair	Jaune à brun rougeâtre	Brun olivâtre
Aspect de la paroi*	Réticulation polygonale	Réticulation polygonale	Lisse à légèrement trouée
Hauteur des réticulations de la paroi	0,5 - 1,5 µm de haut	1,5 - 3 µm de haut	Sans objet
Largeur des réticulations de la paroi	< 3 µm	3-5 µm	Sans objet
Gaine	Absente	Présente, peu visible	Absente, parfois court fragment de mycélium attaché
Taille en µm (min.-moy.-max.)*	14 - <u>18,0</u> - 23	16 - <u>19,9</u> - 25	13 - <u>18,8</u> - 25

*D'après les fiches du Commonwealth Mycological Institute

L'**annexe 2** propose quelques images de microscopie illustrant les trois espèces (**Figures 24 à 29**).

10. Résultats

10.1 Recherche de *T. indica*

- Si au moins 10 téliospores aux caractéristiques correspondantes à celles de *T. indica* sont observées pour l'ensemble des trois prises d'essai, alors l'identification morphologique est suffisante, et la présence de *T. indica* est démontrée. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « **Tilletia indica détecté** ». Le nombre approximatif de téliospores observées sera précisé en commentaire.
- Si moins de 10 téliospores aux caractéristiques correspondantes à celles de *T. indica* sont détectées pour l'ensemble des trois prises d'essai, les caractéristiques morphologiques ne sont pas considérées comme suffisamment fiables pour garantir une identification sûre (OEPP, 2018). Dans ce cas, la présence de *T. indica* est suspectée. Le résultat sera exprimé par une phrase du type : « **Suspicion de présence de Tilletia indica** ». Le nombre de téliospores observées sera précisé en commentaire. Des analyses moléculaires complémentaires devront être entreprises par le Laboratoire National de référence.
- Si aucune téliospore aux caractéristiques correspondantes à celles de *T. indica* n'est observé, pour l'ensemble des trois prises d'essai alors la présence de *T. indica* n'est pas mise en évidence dans l'échantillon analysé. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « **Tilletia indica non détecté** ».

En cas de détection ou de suspicion de présence de *T. indica*, le résultat devra être systématiquement confirmé par le laboratoire national de référence sur les reliquats d'analyse (lames de microscope scellées, reliquat d'échantillon de grain).

10.2 Recherche de *T. caries*, *T. controversa* et *T. laevis*

Les téliospores observées après les trois étapes de filtration à 60, 20 et 11 µm seront identifiées comme *Tilletia caries*, *T. controversa* ou *T. laevis* si tous les critères spécifiques correspondant à l'espèce en question listés dans la **table 2** sont satisfaits.

- Si aucune téliospore de *T. caries*/*T. controversa*/*T. foetida* n'est observée sur l'ensemble des prises d'essai de l'échantillon, alors les prises d'essai sont déclarées négatives et le résultat sera exprimé par une phrase du type : « ***T. caries*/*T. controversa*/*T. laevis** non détecté(s) par filtration sélective et identification morphologique dans l'échantillon analysé** »
- Si une ou plusieurs téliospores de *T. caries*/*T. controversa*/*T. foetida* sont observées sur l'ensemble des prises d'essai de l'échantillon, alors l'échantillon est déclaré positif et le résultat sera exprimé par une phrase du type : « ***T. caries*/*T. controversa*/*T. laevis** détecté(s) par filtration sélective et identification morphologique dans l'échantillon analysé** ».

* ne retenir que le nom de l'espèce ou des espèces concernée(s)

11. Validation de la méthode

Cette méthode reprend le mode opératoire décrit dans les sections §3.2, §4.1, §4.2 et les appendix 1, 2 et 3 du protocole international EPPO PM 7/29 (3) *Tilletia indica*, et dans la section §4.1 du protocole international IPPC DP4 *Tilletia indica*, concernant la détection de *Tilletia indica* par la méthode de filtration sélective et d'identification morphologique.

Ces protocoles sont considérés comme adoptés et recommandés par la communauté scientifique internationale, et d'usage suffisamment répandu pour tenir lieu de validation de méthode.

Bibliographie

Commonwealth Mycological Institute. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria : Fiche n° 719 (*Tilletia caries*), fiche n° 720 (*Tilletia foetida*), fiche n° 746 (*Tilletia controversa*)

EPPO (2018). PM 7/29 (3) *Tilletia indica*. EPPO Bulletin, 48(1), 7-31. doi:10.1111/epp.12452

IPPC (2016). ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests. DP 4: *Tilletia indica* Mitra. In. Rome, Italy: FAO.
<https://www.ippc.int/fr/publications/dp-4-2014-tilletia-indica-mitra/>

Nguyen, H. D. T., Dettman, J. R., Redhead, S. A., Gerdis, S., Dadej, K., Tremblay, É. D., ... Hambleton, S. (2024). Genome sequencing, phylogenomics, and population analyses of *Tilletia*, with recognition of one common bunt species, *T. caries* (synonym *T. laevis*), distinct from dwarf bunt, *T. controversa*. *Mycologia*, 1–16.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2024.2418792>

ANNEXE 1 : photos des étapes de la méthode (tous crédits photo ANSES LSV, unité de mycologie, sauf indication contraire)



Figure 1 : grains présentant une nécrose apicale et un amas de téliospores de *Tilletia indica* d'aspect noir (grains « boutés »).

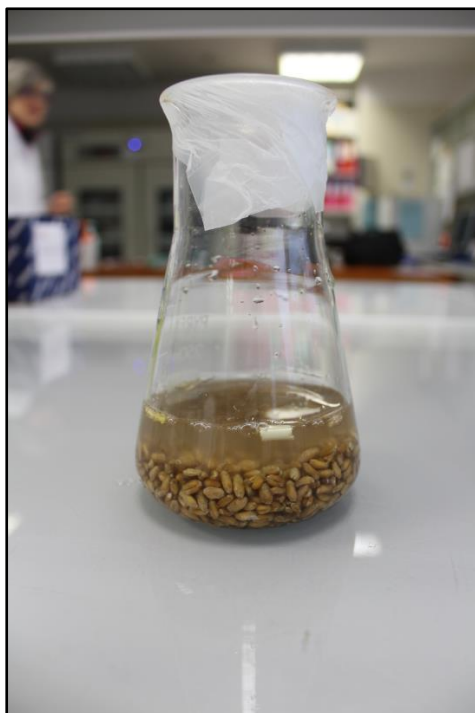


Figure 2 : Erlenmeyer scellé au parafilm contenant une prise d'essai (environ 50 g) et 100 mL d'eau osmosée, après homogénéisation à l'agitateur.



Figure 3 : dispositif de filtration composé de deux portes filtre entonnoir de type Büchner, de deux fioles à aspiration, et d'une pompe à vide. Le premier porte filtre est équipé d'un filtre à 60 µm, le second d'un filtre à 20 µm.



Figure 4 : Installation d'un filtre à 60 μm , qui sera suivi d'un rinçage à la pissette d'eau osmosée, pour lui permettre de bien adhérer au porte filtre.

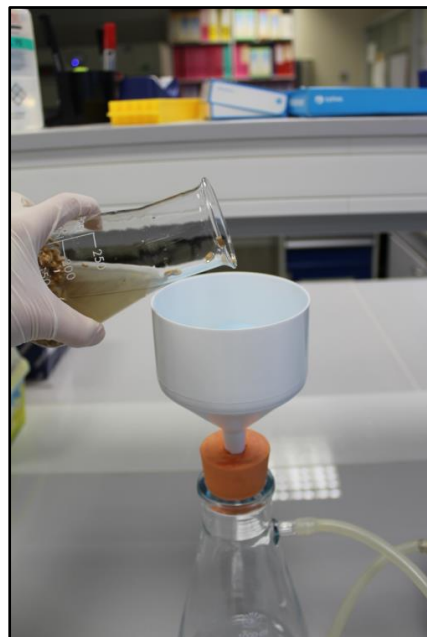


Figure 5 : la prise d'essai de 50 g et la solution de lavage sont versées sur le filtre de 60 μm , pendant que la fiole aspire.

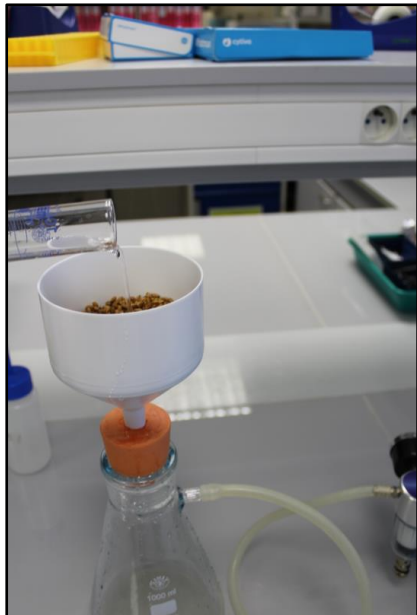


Figure 6 : Les grains sont ensuite rincés avec le rinçage des parois de l'Erlenmeyer ayant servi à laver les grains et un supplément d'eau osmosée.

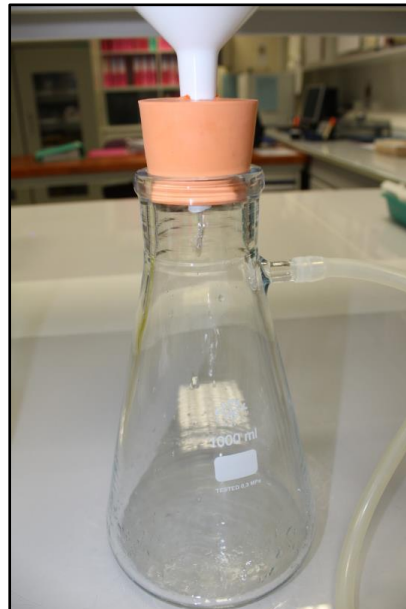


Figure 7 : la solution de lavage, plus l'eau osmosée ayant servi à rincer l'Erlenmeyer et à rincer les grains sont recueillies après filtration à 60 μm au fond de la première fiole à aspiration. Un volume de 300 à 400 mL peut être récupéré pour filtration dans le second dispositif équipé d'un filtre à 20 μm .

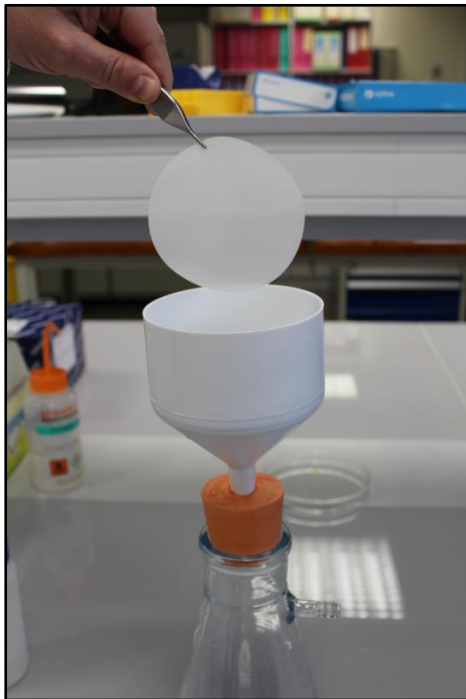


Figure 8 : Après la seconde filtration sur le filtre à 20 μm , ce dernier a capturé les particules de tailles compatibles avec *T. indica*. Le filtre est délicatement récupéré à l'aide de pinces pour être rincé.



Figure 9 : le filtre à 20 μm est rincé sur sa face supérieure, à l'aide d'une pissette d'eau osmosée ou une micropipette, à raison de 10 à 15 mL. Le liquide de rinçage peut être réutilisé plusieurs fois si une micropipette à cône à usage unique est utilisée. Réaliser des rinçages du haut vers le bas, pour détacher, et faire « descendre » du filtre les particules capturées.

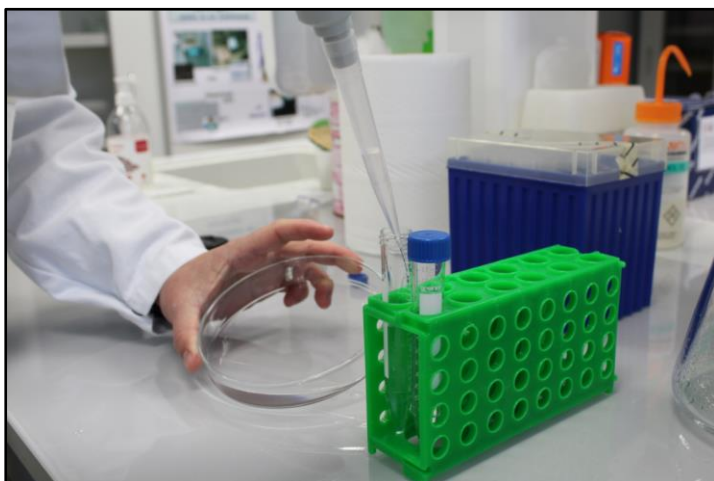


Figure 10 : Les 10 à 15 mL d'eau de rinçage du filtre à 20 μm sont récupérés et transférés dans un tube à centrifugation à fond conique. A chacune des trois prises d'essai correspondra un tube.

ANNEXE 2 : images de téliospores de *Tilletia* spp.

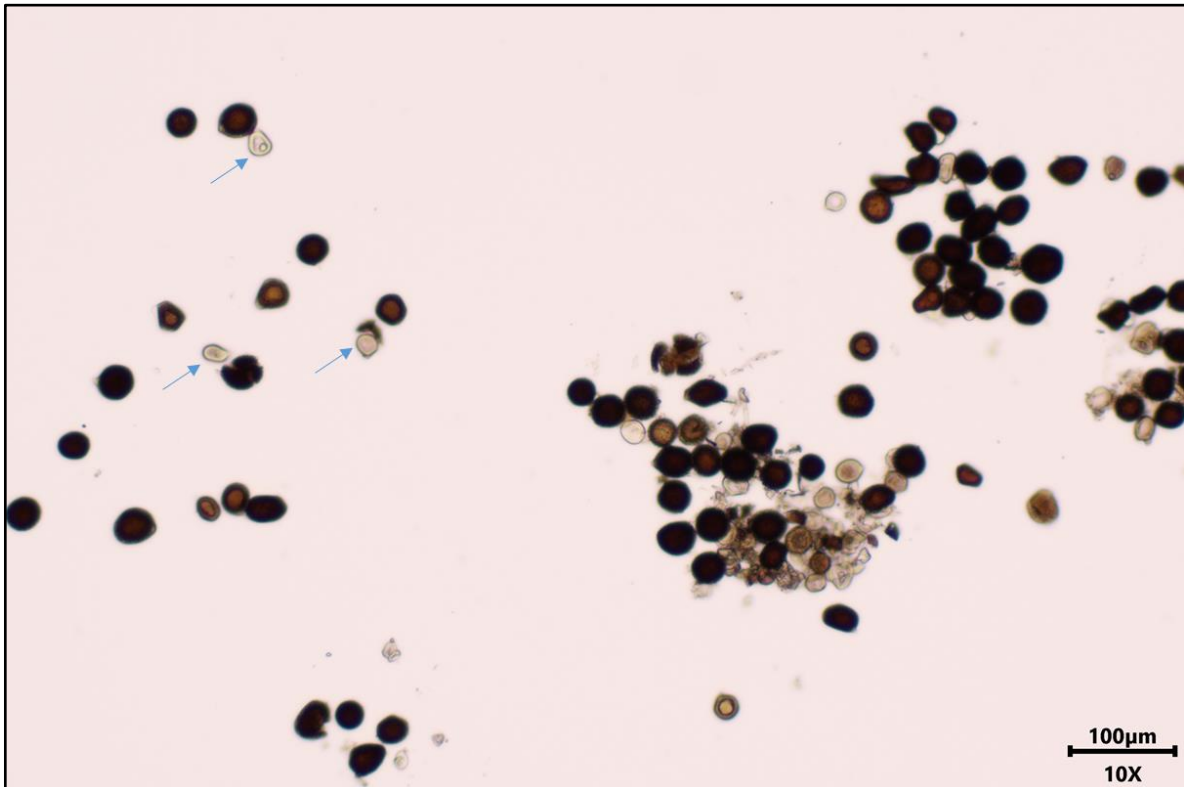


Figure 11 : Télisporos de *Tilletia indica* observées au grossissement x 100 après montage du culot de centrifugation. Noter les flèches bleues indiquant des cellules stériles.

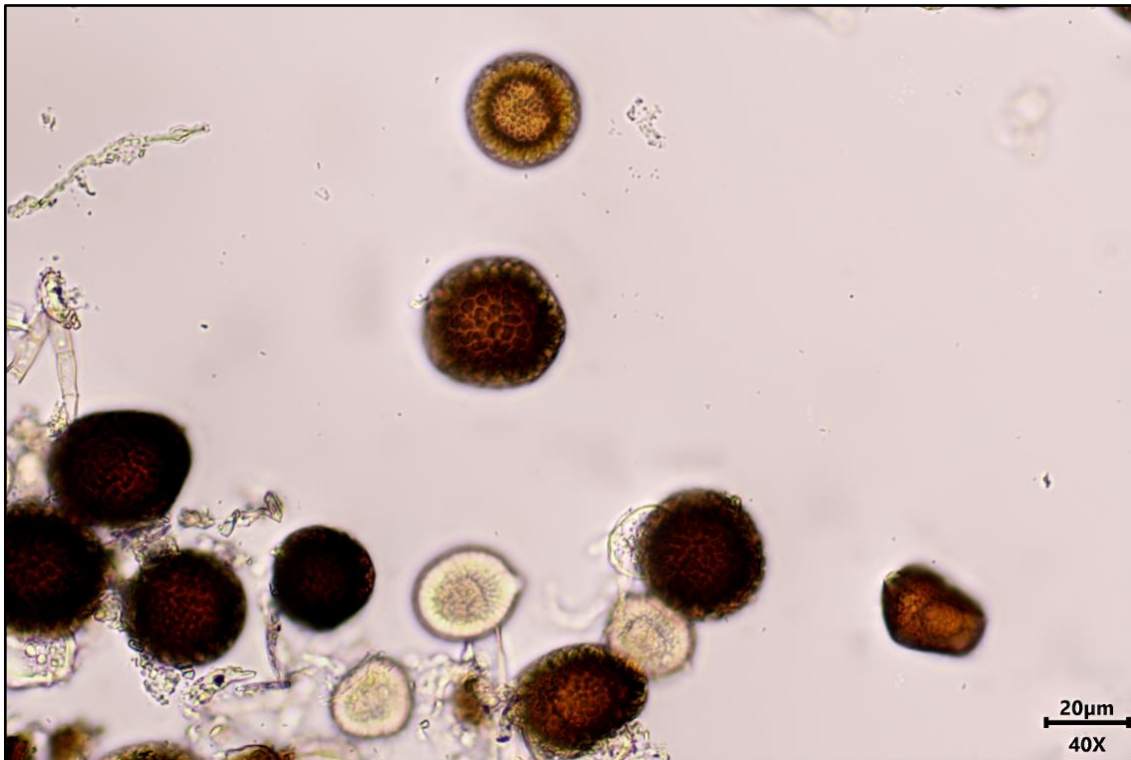


Figure 12 : Télisporés de *Tilletia indica* observées au grossissement x 400

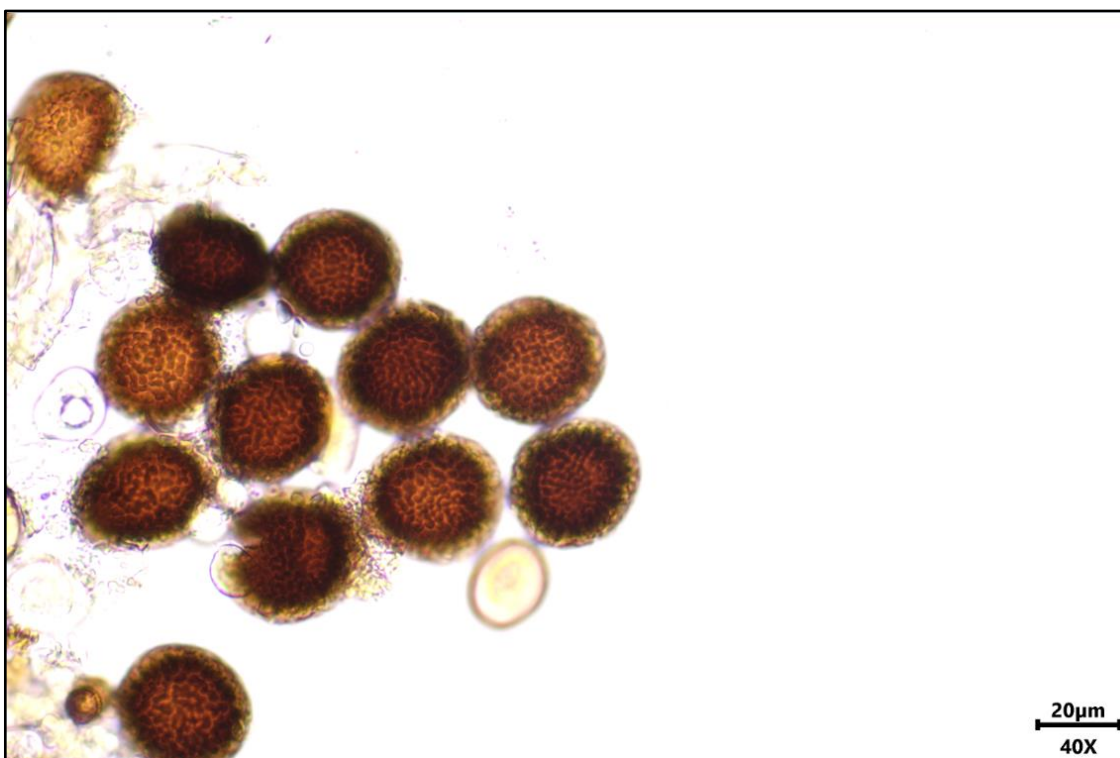


Figure 13 : Télisporés de *Tilletia indica* observées au grossissement x 400. L'éclairage par transmission est très intense afin de bien visualiser les ornements cérébriformes. En conséquence, l'aspect naturel opaque n'est plus aussi visible.

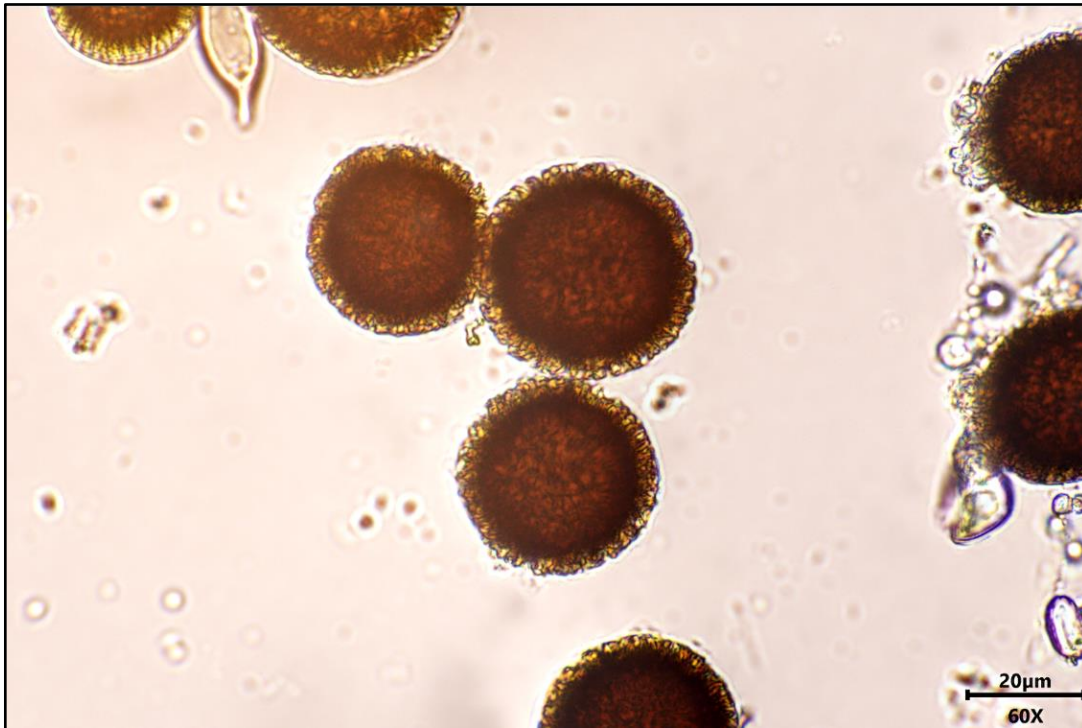


Figure 14 : Télisporos de *Tilletia indica* observées au grossissement x 600



Figure 15 : Télisporés de *Tilletia indica* observées au grossissement x 600. La profondeur de champ est réglée sur la surface des télisporés afin de distinguer les motifs cérébriformes de l'échinulation. Cf Figure 16 pour les mêmes télisporés observées en coupe équatoriale.

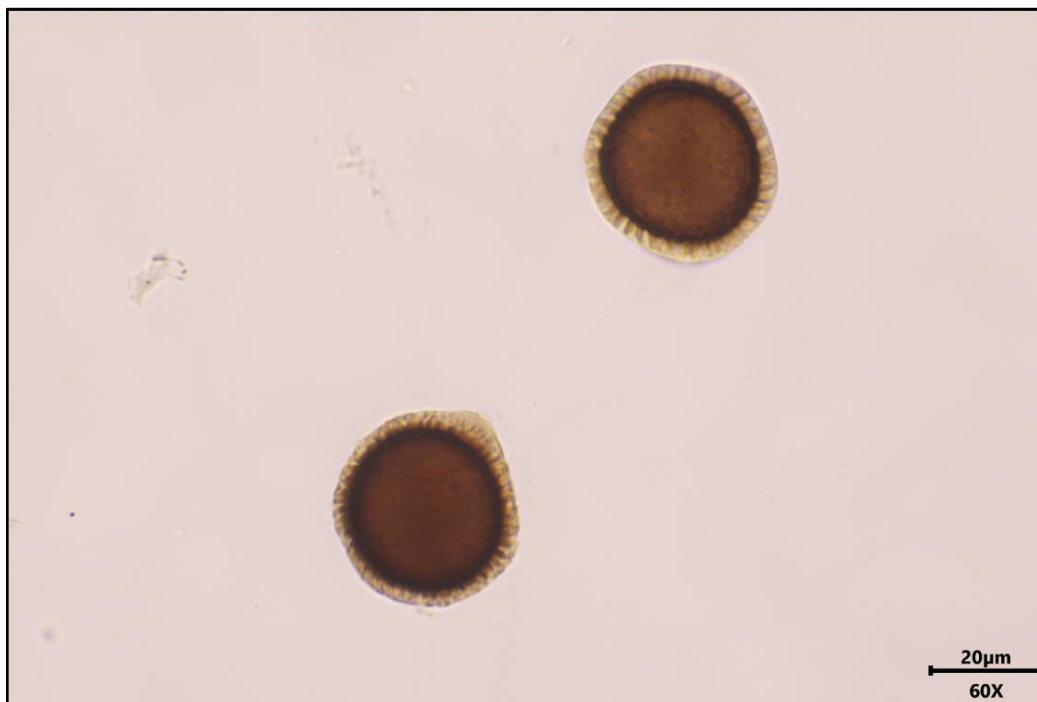


Figure 16 : Télisporés de *Tilletia indica* observées au grossissement x 600. La profondeur de champ est réglée en coupe équatoriale des télisporés afin de distinguer la hauteur et l'aspect de l'ornementation en coupe. Cf Figure 15 pour les mêmes télisporés observées dans une autre profondeur de champ.

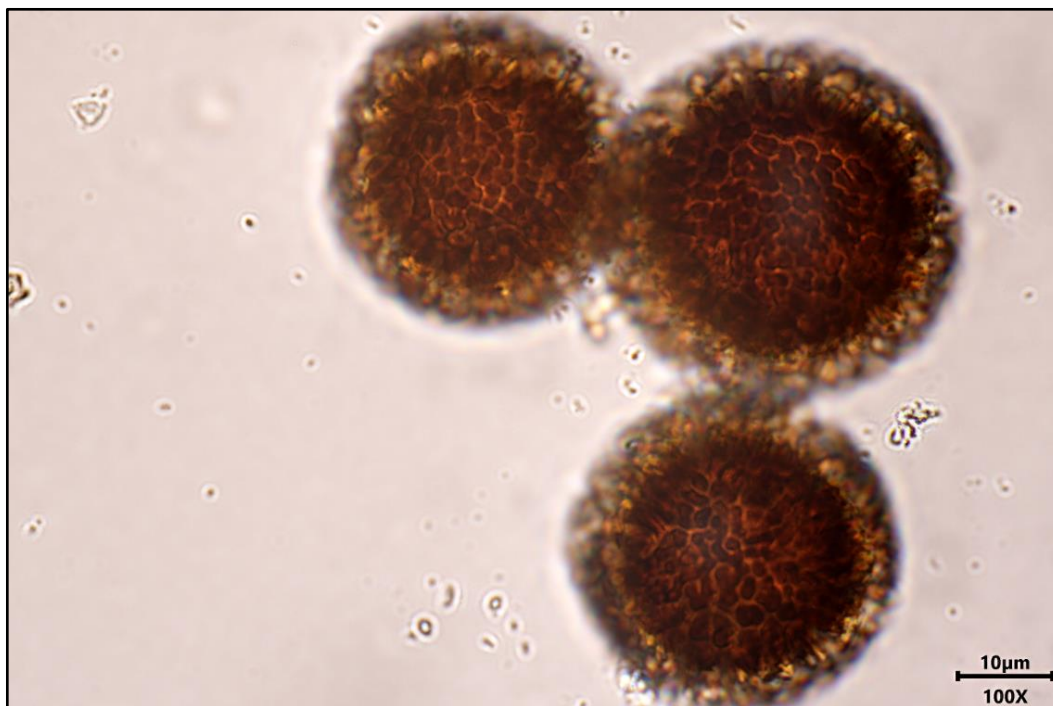


Figure 17 : Télisporos de *Tilletia indica* observées au grossissement x 1000. La profondeur de champ est réglée sur la surface des télisporos afin de distinguer les motifs cérébriformes de l'échinulation. Cf Figure 18 pour les mêmes télisporos observées en coupe équatoriale.

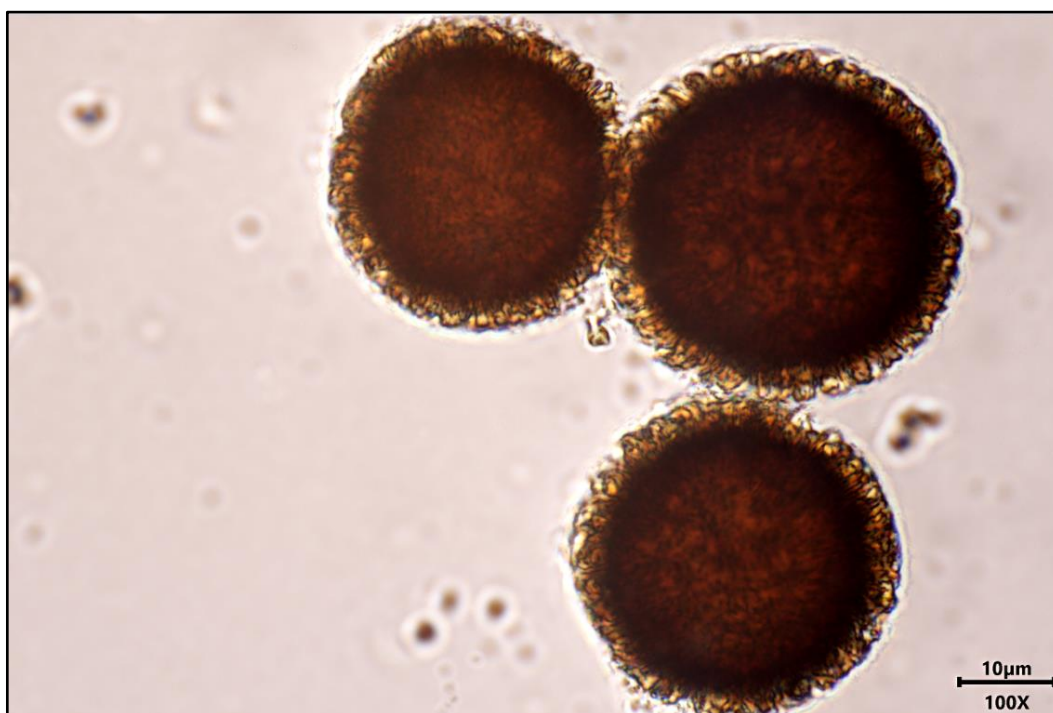


Figure 18 : Télisporos de *Tilletia indica* observées au grossissement x 1000. La profondeur de champ est réglée en coupe équatoriale des télisporos afin de distinguer la hauteur et l'aspect de l'ornementation en coupe. Cf Figure 17 pour vue des mêmes télisporos dans une autre profondeur de champ.



Figure 19 : Télisporos de *Tilletia walkeri* (Crédit Photo L. Riccioni, CREA Italie). La profondeur de champ est réglée sur la surface de les télisporos afin de distinguer les motifs grossiers plus ou moins cérébriformes de l'échinulation. Cf Figure 20 pour les mêmes télisporos observées en coupe équatoriale.

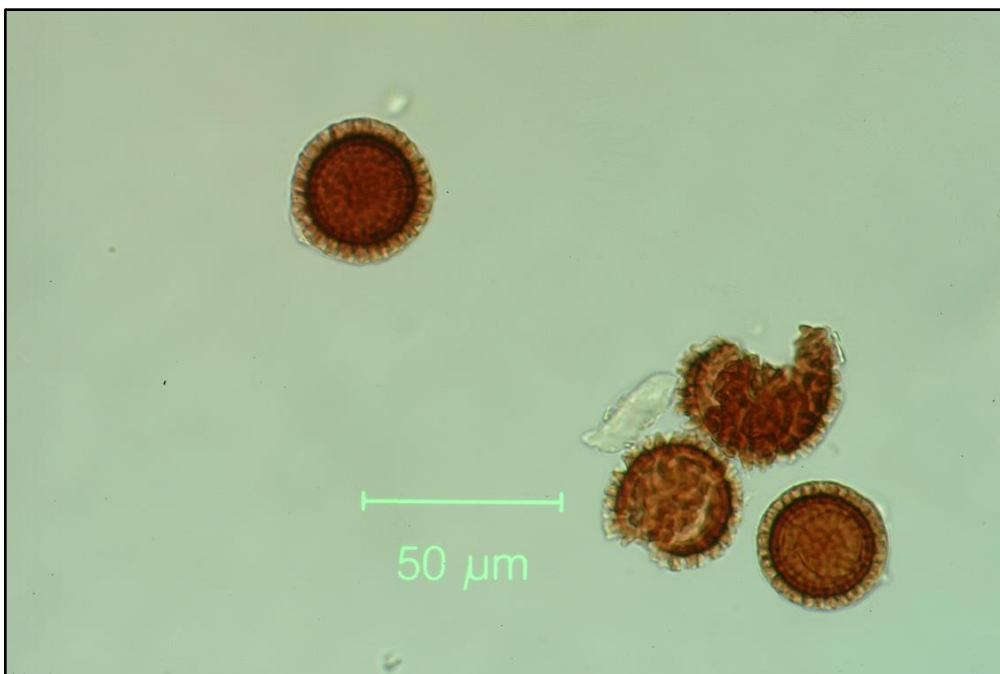


Figure 20 : Télisporos de *Tilletia walkeri* (Crédit Photo L. Riccioni, CREA Italie). La profondeur de champ est réglée en coupe équatoriale des télisporos afin de distinguer la hauteur et l'aspect de l'ornementation en coupe (profil irrégulier avec des espaces entre échinules). Cf Figure 19 pour vue des mêmes télisporos dans une autre profondeur de champ.



Figure 21 : Télisporé de *Tilletia horrida* (Crédit Photo L. Riccioni, CREA Italie), qui présente des réticulations plutôt polygonales.



Figure 22 : Télisporos de *Tilletia horrida* (Crédit Photo L. Riccioni, CREA Italie). La profondeur de champ est réglée en coupe équatoriale des télisporos afin de distinguer la hauteur et l'aspect de l'ornementation en coupe (fréquemment recourbée). Cf Figure 23 pour vue des mêmes télisporos dans une autre profondeur de champ.



Figure 23 : Télisporos de *Tilletia horrida* (Crédit Photo L. Riccioni, CREA Italie). La profondeur de champ est réglée sur la surface de les télisporos afin de distinguer les motifs plutôt polygonaux de l'échinulation. Cf Figure 22 pour les mêmes télisporos observées en coupe équatoriale.

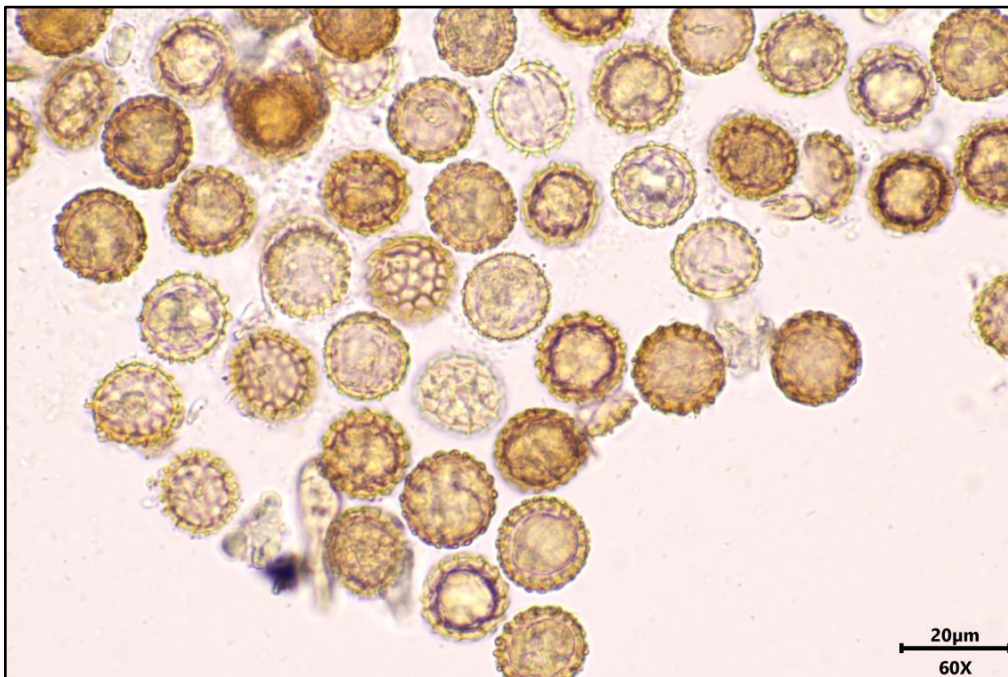


Figure 24 : Télisporés de *Tilletia caries*. La profondeur de champ est réglée sur une majorité de coupes équatoriales de télisporés. Noter le diamètre moyen < 25 μm , la coloration jaunâtre. Cf. Figure 25 pour les mêmes télisporés en vue de surface supérieure.

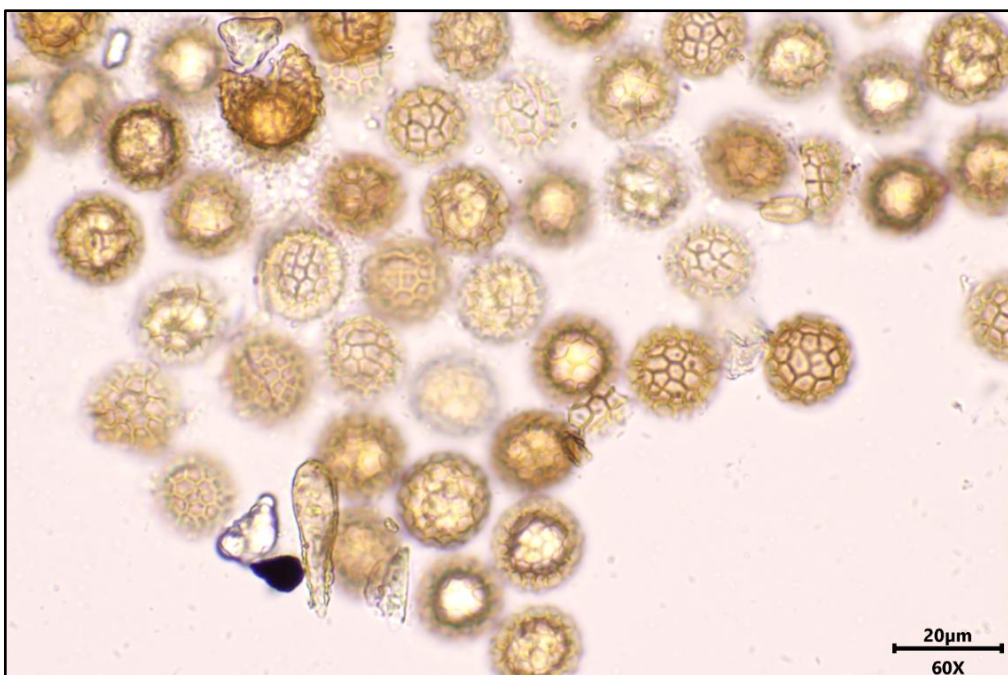


Figure 25 : Télisporés de *Tilletia caries*. La profondeur de champ est réglée sur une majorité de surfaces supérieures des télisporés. Noter la réticulation polygonale marquée. Cf. Figure 24 pour les mêmes télisporés en coupe équatoriale.



Figure 26 : Télisporos de *Tilletia controversa*. Noter le diamètre moyen < 25 μm, et la réticulation polygonale prononcée.



Figure 27 : Télisporés de *Tilletia controversa*. Noter la réticulation polygonale prononcée. La profondeur de champ est réglée sur une majorité de coupes équatoriales des télisporés, pour vue en surface cf. Figure 28.



Figure 28 : Télisporés de *Tilletia controversa*. Noter le diamètre moyen < 25 µm, et la réticulation polygonale prononcée. La profondeur de champ est réglée sur une majorité de vue en surface des télisporés, pour vue en coupe équatoriale cf. Figure 27.

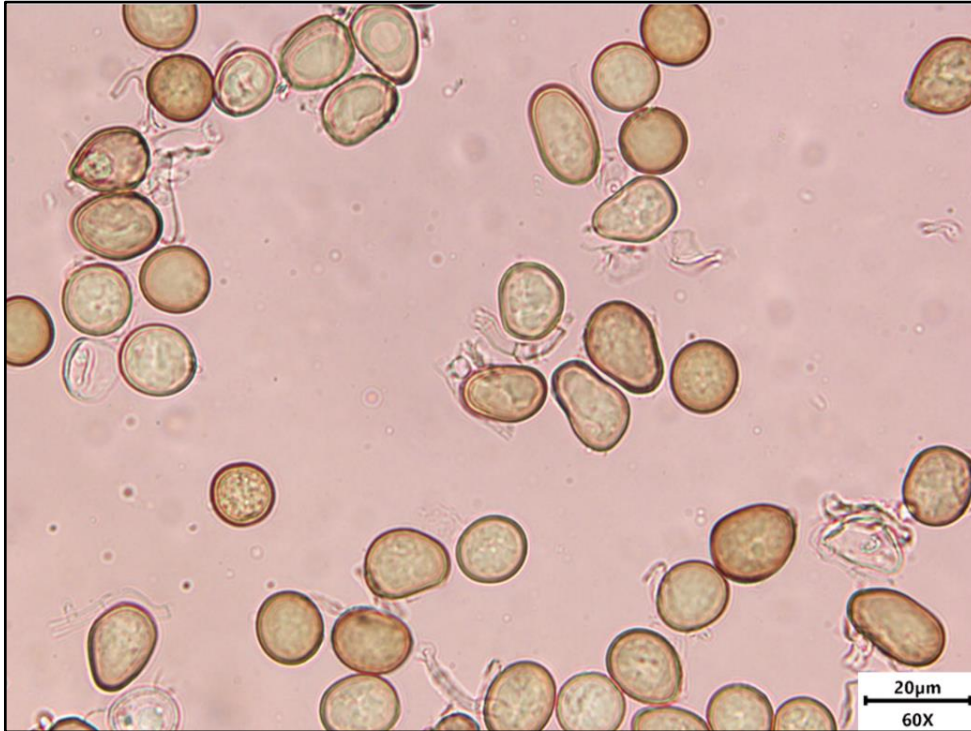


Figure 29 : Télisporés de *Tilletia laevis*. Noter le diamètre moyen < 25 μm et la paroi lisse.

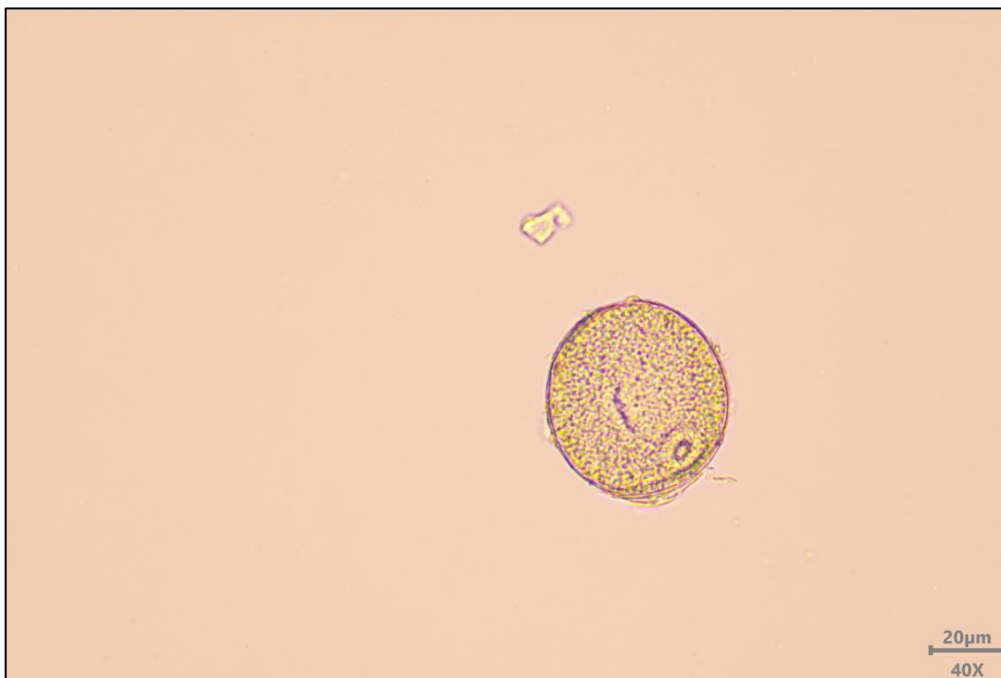


Figure 30 : Grain de pollen de blé.