

NEMATOOLS : Développement d'outils pour la maîtrise durable du risque nématodes en plant de pomme de terre et cultures en rotation

**Le Roux A-C.¹, Neveux M-S.¹, Huchet E.¹, Dewaegeneire P.¹, Berton L.¹, Demey' L.¹, Gobert V.¹,
Le Hingrat Y.¹, Ollivier F.², Chappé A-M.², Hotte H.², Montarry J.³, Fournet S.³, Esquibet M.³,
Fouville D.³, Mille B.³, Kerlan M-C.⁴, Coleno F-C.⁵, Iachia C.⁶, Mulet K.⁶, Castagnone P.⁶,
Grenier E.³, Folcher L.²**

¹ FN3PT/RD3PT, 43-45 rue de Naples, F-75008 Paris

² ANSES-LSV Nématologie, Domaine de la Motte au Vicomte, BP35327, F-35653 Le Rheu Cedex

³ INRAE – UMR 1349 IGEPP, Domaine de la Motte au Vicomte, BP35327, F-35653 Le Rheu Cedex

⁴ INRAE – UMR 1349 IGEPP, Keraiber, F-29260 Ploudaniel

⁵ INRAE UMR 1048 SAD-APT, BP1, F-78850 Thiverval-Grignon

⁶ INRAE UMR ISA, 400 route des Chappes, BP167, F-06903 Sophia Antipolis Cedex

Correspondance : anneclaire.leroux@fnpppt.fr

Résumé

Les actions conduites dans le cadre du projet de recherche Nematools visaient à renforcer les méthodes prophylactiques pour prévenir l'introduction et la dissémination des nématodes phytoparasites réglementés *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *Globodera pallida* et *G. rostochiensis*. Ces nématodes constituent des menaces sérieuses pour diverses cultures, dont la pomme de terre, et conduisent à repenser les stratégies de lutte afin de préserver l'état sanitaire privilégié du territoire national. Le projet a permis le développement de nouveaux outils moléculaires de détection des nématodes à galle dans des échantillons de sol, outils validés sur une collection de populations de nématodes constituée pendant la durée du projet. Les travaux portant sur l'analyse du risque de dissémination des nématodes, associés aux pratiques agricoles, ont conduit (1) à l'élaboration d'un modèle conceptuel permettant d'identifier les stratégies de gestion du matériel agricole à risque et (2) à mettre en évidence et à quantifier l'importance de la dispersion des nématodes à kyste par les travaux du sol et par le matériel agricole à l'échelle parcellaire et inter-parcellaire. Les travaux menés en partenariat avec des industriels ainsi qu'en stations expérimentales ont permis la production d'un outil interactif d'analyse de risque caractérisant les phases critiques de différents process de traitements des déchets et d'effluents. Il apporte des éléments de réponse sur les performances d'assainissement de différents procédés de décontamination comme le compostage, le lagunage, la méthanisation, la chloration et le traitement thermique. Ce projet a aussi permis de cribler, en conditions contrôlées, des espèces végétales non favorables à la multiplication des nématodes à galle *M. chitwoodi* et *M. fallax* et pouvant être proposées comme plantes de rupture sur des sites contaminés.

Mots-clés : Analyse de risques phytosanitaires, nématodes, détection, méthodes alternatives de lutte, désinfection de déchets, plantes de service.

Abstract: Development of innovative tools for the durable management of the risks associated with nematodes for seed potato production and other crops in rotation

Nematools project aimed at reinforcing prophylactic methods to prevent introduction and dissemination of regulated phytoparasites nematodes *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* which are serious threats for potato crops and to improve the control strategies in order to

preserve the privileged health status of the French territory. This project made it possible to develop new molecular tools for the detection of root-knot nematodes in soil samples, and later their validation on a collection of nematode populations established during the project. The risk analysis on the dissemination of nematodes related to agricultural practices have led firstly to the development of a conceptual model for the identification of management strategies for the use of agricultural equipment at risk and on the other hand to highlight and to quantify the importance of cyst nematodes dispersal by the soil practices and by soil-adhering to agricultural machinery at the field and at the farm scale. The actions carried out in partnership with industrials and with experimental stations made it possible to produce a user-friendly risk analysis tool characterizing the critical phases of different waste and effluent treatment processes and providing answers on the sanitizing performances of different decontamination processes such as composting, lagooning, anaerobic digestion, chlorination, and heat treatment. This project also allowed to screen, under controlled conditions, plant species which are not conducive to the development and propagation of root-knot nematodes such as *M. chitwoodi* and *M. fallax* and may be proposed as rapture plants on contaminated sites.

Keywords: Pest risk analysis (PRA), nematodes, detection, alternative control methods, waste disinfection, sanitizing plants.

Introduction

Contexte du projet :

Parmi les nématodes phytoparasites, ceux appartenant aux genres *Meloidogyne* et *Globodera*, constituent sans doute les groupes ayant l'importance scientifique et économique la plus marquée (Jones et al., 2013). Ils peuvent provoquer des pertes importantes en production, des déclassements de lots qui affectent durement la rentabilité de la culture et peuvent également engendrer des litiges à destination. A ce titre, les espèces *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* sont listées comme organismes nuisibles de quarantaine au titre de la directive 2000/29/EC. L'application en droit français de cette directive impose une lutte obligatoire et/ou des mesures de gestion spécifiques en cas de découverte de foyers contaminés par ces espèces avec des conséquences qui peuvent être importantes en matière d'incidence sur l'économie. Cela a été récemment illustré lors de la découverte de foyers de *Meloidogyne* sur cultures de pomme de terre mais aussi sur d'autres cultures-racines sensibles comme la carotte, la scorsonère, le radis ou lors de l'embargo imposé par la Russie aux exportations de pomme de terre provenant de l'Union européenne, suite à la présence de kystes de *Globodera* sur certains lots. Une fois introduits dans une parcelle ou une exploitation, il est extrêmement difficile, voire impossible, d'éradiquer ces nématodes. Les préjudices concernent toute la chaîne de production, depuis les agriculteurs et les commerciaux jusqu'aux industries de transformation et pouvoirs publics, qui mettent en place d'importants dispositifs réglementaires et d'indemnisation, destinés à prévenir la dissémination de ces organismes. Ces enjeux nationaux et internationaux importants, associés à un recours de plus en plus limité aux traitements nématicides du sol, coûteux et dangereux pour l'environnement, conduisent à la mise en place d'une gestion préventive visant à limiter, voire éviter, les risques d'introduction via le matériel végétal ou agricole ou via des apports extérieurs. Cette gestion préventive est donc le seul moyen réellement efficace pour fiabiliser la qualité de la production.

L'ambition du projet Nematools est de développer et de valoriser différents types d'innovations à la fois en termes d'outils (diagnostic, phénotypage, géniteurs, marqueurs) d'évaluation (démarche d'analyse de risques, base de données et biovigilance) et de maîtrise des risques via le raisonnement de stratégies de protection intégrée de la culture vis-à-vis d'un ensemble de bioagresseurs (identification de leviers de gestion potentiellement innovants, hiérarchisation et assemblage des leviers dans des

itinéraires techniques et dans les rotations) ou l'évaluation de techniques de désinfection sur différentes matrices et échelles, allant du laboratoire jusqu'au traitement de déchets industriels.

Objectifs poursuivis :

Face aux besoins communs des agriculteurs, commerciaux, pouvoirs publics, industriels, obtenteurs, etc, de développer des stratégies innovantes pour préserver la qualité des cultures et des territoires de production, ce projet propose une coopération entre acteurs de la recherche et du développement autour de technologies et d'études visant à accroître la compétitivité et la durabilité des filières de la production à la transformation, vis-à-vis des risques liés à ces nématodes. A ce titre, le *consortium* s'est attaché à :

- Développer de **nouveaux outils de détection et quantification** de ces nématodes adaptés aux matrices complexes (plantes, sols, effluents,...), afin notamment de mieux **évaluer les risques de dissémination** des nématodes liés aux process agricoles et industriels ;
- Élaborer de **nouvelles techniques** de maîtrise de ces risques depuis l'évaluation de l'efficacité des modes de traitement de matrices contaminées jusqu'à l'étude de nouveaux moyens de lutte, incluant l'utilisation de ressources génétiques en plantes de rupture, le choix de certaines espèces végétales pour les rotations, ou comme plantes de coupure, ou d'autres solutions alternatives visant à réduire les populations de ces nématodes.

Le projet Nematools, lauréat d'un financement CASDAR « Recherche Technologique » a été conduit sur la période 2014 à 2018. Porté par l'UMT InnoPlant, le projet a été réalisé par la FN3PT/RD3PT (porteur du projet), les UMR IGEPP, SAD-APT et ISA de l'INRAE et le laboratoire du LSV-Unité de nématologie de l'ANSES. Les 3 organisations de producteurs de plants de pomme de terre, Bretagne Plants, Comité Centre et Sud et le Comité Nord, ainsi que plusieurs acteurs du secteur industriel ont également activement contribué à la réalisation des actions du projet.

1. Identification et évaluation des risques associés aux nématodes

Cette action a consisté à mettre en place différents types de travaux visant à fournir des outils et connaissances pour mieux appréhender les risques de dégâts et de dissémination des nématodes et permettre la mise au point de nouveaux moyens de lutte.

1.1 Etude de la diversité de *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* et design de nouveaux outils de détection de ces espèces

Plusieurs espèces de nématodes à galles du genre *Meloidogyne* peuvent provoquer des dégâts sur le système racinaire de leurs hôtes en provoquant une baisse de rendement et la formation de galles et de nécroses internes sur les racines et sur les tubercules pour la pomme de terre. Les plus préjudiciables en Europe sont *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax*, espèces classées organismes réglementés de quarantaine. La prévention reposant sur le contrôle du matériel (végétal ou agricole) introduit, ou sur la gestion des apports extérieurs, reste le meilleur moyen pour se prémunir contre ce type de parasites (Le Roux, 2011 ; Mugniery, 2009). L'analyse des risques ainsi que l'élaboration de nouvelles stratégies de protection et de nouveaux outils de détection nécessitent la mise en œuvre de travaux de recherche plus fondamentaux pour approfondir les connaissances sur les nématodes. L'acquisition de données sur la variabilité génétique des espèces *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* a été réalisée ainsi que le développement et la validation d'outils de détection de ces nématodes dans des échantillons de sol.

1.1.1 Etude de la diversité génétique chez *M. chitwoodi* et *M. fallax*

- *Méthodes de travail utilisées*

Le premier objectif de cette action était le développement de loci microsatellites chez *M. chitwoodi* et *M. fallax*. Plusieurs stratégies ont été développées par les UMR IGEPP et ISA de l'INRAE pour mettre au point des outils suffisamment polymorphes utiles dans cette étude :

- Sélection de loci microsatellites réalisée à partir du séquençage haut débit (454) de banques enrichies en motifs microsatellites (Genoscreen) chez les espèces *M. chitwoodi* et *M. fallax*,
- Recherche de motifs microsatellites dans le génome disponible de l'espèce la plus proche, *M. hapla* (Opperman *et al.*, 2008) en utilisant le programme Msatfinder v2.0.9 (Thurston et Field, 2005),
- Recherche de motifs microsatellites dans une version provisoire de l'assemblage du génome de *M. chitwoodi* en utilisant la même approche que sur le génome de *M. hapla*.

Le deuxième objectif de cette action était de rassembler une collection de populations de *M. chitwoodi* et *M. fallax*, d'origines géographiques et d'hôtes différents afin de maximiser la diversité.

Le dernier objectif était de décrire la diversité génétique observée chez *M. chitwoodi* et *M. fallax*.

- *Résultats*

Au final, un total de 207 loci a été testé durant le projet mais seulement 4 loci se sont montrés polymorphes pour *M. chitwoodi* et aucun pour *M. fallax* (Tableau 1). La possibilité de transférer directement des loci identifiés précédemment chez *M. incognita* ou *M. hapla*, chez *M. chitwoodi* et *M. fallax* n'est pas apparue comme une solution alternative pertinente pour récupérer des loci. Ces résultats, décevants par rapport aux résultats classiquement obtenus chez les nématodes à kystes, montrent que l'obtention de marqueurs polymorphes est bien plus difficile à obtenir chez les *Meloidogyne* à reproduction mitotique ou méiotique que chez les espèces de nématodes à kyste étudiées jusqu'à présent.

Tableau 1 : Bilan de la sélection des loci microsatellites obtenus en comparaison avec ceux obtenus sur le nématode à kyste *Globodera rostochiensis*

	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>	<i>G. rostochiensis</i>
Loci testés (stratégies 1/2/3)	196	72	48
Amplifications réussies chez l'espèce cible	59 (30%)	1	22 (45%)
Loci polymorphes	4 (6.8%)	-	7 (31%)

Une core-collection de 13 populations de *M. chitwoodi* et 6 de *M. fallax*, rassemblant la plus grande part de la diversité génétique présente dans ces espèces, a pu être constituée. Les populations proviennent d'Europe, des Etats-Unis et de Turquie et sont maintenues en collection par l'ANSES LSV Nématologie.

Le nombre de marqueurs polymorphes et leur taux de polymorphisme étaient insuffisant pour réaliser l'étude de structuration génétique des populations de *M. chitwoodi* (et encore moins de *M. fallax*) initialement envisagée. Il a donc été décidé, suite au comité de pilotage réuni le 16 mars 2017, d'initier une nouvelle stratégie avec le développement de marqueurs SNPs via la technique de GBS (Genotyping-by-Sequencing). Cette approche permet d'identifier de nombreux SNPs et de caractériser leur fréquence dans différentes populations en une seule étape.

En conclusion, le travail réalisé dans cette action a permis l'identification d'un petit nombre de loci microsatellites polymorphes chez *M. chitwoodi* (4) et l'identification d'un premier set de marqueurs SNPs par les méthodes GBS. Les outils microsatellites semblent difficiles à développer chez les espèces à galles *M. chitwoodi* et *M. fallax*. Le développement d'une stratégie pour identifier les SNPs

sans avoir recours à un génome de référence pourrait constituer une piste intéressante à poursuivre, notamment en utilisant des outils d'analyse de données GBS comme UNEAK et DiscoSNP.

1.1.2 Développement et validation de nouveaux outils de détection et quantification

- *Méthodes de travail utilisées*

De nombreux tests moléculaires d'identification existent mais ils ne permettent pas la détection des nématodes directement dans des matrices variées (Gamel et al., 2014 ; Wishart et al., 2002 ; Zijlstra et al., 1995, 2000). Le premier objectif de cette tâche était de développer un outil moléculaire s'appuyant sur la technologie de PCR en temps réel, pour permettre une détection fiable et une quantification des nématodes présents dans les échantillons. Trois stratégies ont été envisagées pour développer cet outil.

Le deuxième volet de cette tâche était la validation et la caractérisation des outils développés précédemment selon le protocole PM7/98 (2) en vigueur à l'échelle européenne (EPPO, 2014).

- *Résultats*

- **Stratégie 1** : Parmi les couples d'amorces générés dans l'étude de la diversité des espèces *M. chitwoodi* et *M. fallax*, 4 ont été retenus après évaluation rapide de leur spécificité et de leur capacité à détecter les cibles. Cependant, le travail d'optimisation qui a été réalisé ainsi que celui portant sur le développement de sondes spécifiques des espèces recherchées n'ont pas donné de résultats compatibles avec l'utilisation envisagée et cette stratégie a été écartée.
- **Stratégie 2** : Le test Wishart et al. (2002), utilisé en PCR conventionnelle pour l'identification d'individus isolés, a été testé en PCR temps réel SYBRgreen sur des populations de *M. chitwoodi* et *M. fallax* isolées de matrices différentes et d'origines géographiques diverses, maximisant ainsi la diversité intra-spécifique. Les essais préliminaires réalisés sur des ADN de sols dopés par de l'ADN cible et sur des ADN extraits d'échantillons de sol naturellement contaminés ont montré que la transposition du test Wishart utilisé en PCR conventionnelle à la PCR temps réel était possible mais sans permettre de différencier les deux espèces car les valeurs de Tm sont proches.
- **Stratégie 3** : L'ADN de populations de *M. chitwoodi* et *M. fallax* sélectionnées pour couvrir au mieux la diversité intra-spécifique a été extrait puis amplifié en PCR conventionnelle avec les amorces JMV1-JMV2 de Wishart et al. (2002). Les fragments obtenus ont été clonés puis séquencés. Les données issues du séquençage ont été nettoyées et alignées à l'aide du logiciel commercial Geneious à l'ANSES et à l'aide du logiciel CLC pour la FN3PT. Sur chaque jeu de données (*M. chitwoodi* et *M. fallax*), plusieurs primers et sondes ont été dessinés et testés *in silico*, avant de tester les plus spécifiques sur des ADN cibles. Parmi tous les couples d'amorces testés, deux semblaient répondre à nos attentes et ont été évalués plus précisément lors de l'étude des critères de performances.

Les étapes de validation de ces outils ont été réalisées sur des ADN extraits provenant des populations cibles et non cibles pour l'étude de la sensibilité et de la spécificité, sur des extraits de sol dopés par une gamme de larves de l'espèce cible (1 à 15 larves (J2)) pour déterminer le seuil de détection et tester la répétabilité et la reproductibilité. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2.

Une comparaison inter-laboratoire (ANSES, FN3PT) a été organisée sur 52 échantillons de sol testés dans le cadre des missions du laboratoire ANSES, en utilisant la méthode officielle MA024 en comparaison avec les deux méthodes développées dans cette étude. Les statuts des échantillons étaient conformes et identiques à ceux attendus quel que soit le laboratoire et le test mis en œuvre.

Tableau 2 : Critères de performance de la méthode Wishart adaptée en SYBRgreen et des nouveaux outils, *M. chitwoodi* et *M. fallax*

	Méthode Wishart SYBRgreen		Nouveaux outils MC / MF	
	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>
Sensibilité-inclusivité	100 %	100 %	100 %	100 %
Spécificité-exclusivité	100 %	100 %	100 %	100 %
Exactitude	100 %	100 %	100 %	100 %
Seuil de détection	1J2	2J2	10J2	2J2
Répétabilité	100% ≥ 1J2	100% ≥ 5J2	100% ≥ 10J2	100% ≥ 2J2
Reproductibilité	100% ≥ 1J2	100% ≥ 5J2	100% ≥ 10J2	100% ≥ 2J2

En conclusion, le test Wishart adapté en PCR temps réel SYBRgreen donne des résultats équivalents au test utilisé dans la méthode officielle pour ce qui est du statut positif/négatif de l'échantillon, mais ne permet pas de déterminer laquelle des deux espèces est présente. Ce test pourra être utilisé à des fins de criblage des échantillons (positif ou négatif). Un deuxième test sera nécessaire pour identifier l'espèce cible présente dans l'échantillon. Les nouveaux outils de détection de *M. chitwoodi* et *M. fallax* par PCR temps réel TaqMan ont également donné des résultats au moins équivalents à ceux utilisés dans la méthode officielle, voire même meilleurs pour ce qui est du seuil de détection pour l'espèce *M. fallax*.

Pour compléter ce travail et être dans les mêmes configurations d'analyse qu'actuellement avec la MOA024, il conviendrait de développer un témoin interne d'amplification (TIA). Ce témoin permettrait de valider les résultats négatifs pour l'organisme cible recherché (*M. chitwoodi* ou *M. fallax*) et ainsi vérifier l'absence d'effet inhibiteur dans l'extrait testé pouvant générer un résultat faussement négatif. Ce travail pourra alors faire l'objet d'une valorisation au travers la rédaction d'un article scientifique.

1.2 Analyse du risque de dissémination des nématodes associé aux pratiques agricoles et industrielles

Ce volet visait à mieux analyser les voies de dissémination des nématodes par les pratiques agricoles et industrielles. Il comprenait une partie enquêtes, en lien avec les professionnels (agriculteurs et industriels), la construction d'un modèle conceptuel de la gestion du matériel agricole et l'étude du potentiel dispersif des engins via une approche expérimentale avec des billes de plastique ainsi que la détection des nématodes présents sur les engins agricoles. Une évaluation des risques de dissémination des nématodes liés aux process industriels, stations expérimentales et laboratoires a aussi été menée.

1.2.1 Construction d'un modèle conceptuel de la gestion du matériel agricole

L'objectif des travaux était d'analyser les règles de circulation du matériel agricole sur le territoire des exploitations afin de :

- Caractériser les différentes stratégies de gestion de ce matériel.
- Identifier les stratégies de gestion à risques.
- Construire une modélisation de l'allocation dans le temps et dans l'espace du matériel agricole collectif, permettant au mieux de satisfaire un critère d'efficacité lié à la réalisation des tâches agricoles, mais aussi un critère de réduction de la dissémination anthropique des nématodes par le machinisme agricole.
- *Méthodes de travail utilisées*

Nous avons, dans un premier temps, réalisé un travail d'enquête auprès d'agriculteurs, de conseillers agricoles et de responsables de la FN3PT. Ce travail d'enquête a reposé sur des entretiens (15) d'une

durée d'une à deux heures, sur la base de questionnaires semi-directifs. Les données recueillies ont par la suite été croisées avec des données secondaires (issues de la littérature et de la documentation professionnelle) afin d'assurer une triangulation des données (Yin, 2003).

- *Résultats obtenus*

Ces enquêtes ont permis de mettre en évidence différentes logiques techniques combinant durées des rotations et nettoyage (ou absence de nettoyage du matériel) ainsi que trois types de matériel agricole présents sur les exploitations :

- **Le matériel commun** qui est utilisé pour toutes les productions (labour, tracteur, épandeur...). Ce matériel peut être en propriété propre ou bien partagé avec d'autres agriculteurs. Dans ce cas, il n'y a pas de règles d'utilisation de ce matériel en faveur de la production de plant.
- **Le matériel dédié** à la production de pomme de terre (planteuse, arracheuse...). Ce matériel peut être en propriété propre ou d'usage partagé. Dans ce cas, trois modalités de gestion ont été identifiées : (i) le matériel n'est utilisé qu'en production de plant ; (ii) le matériel est d'abord utilisé sur les parcelles de production de plant, puis est utilisé sur les parcelles de pomme de terre de consommation ; et (iii) il n'existe aucune règle de priorité en faveur de la production de plant.
- **Le matériel dédié à d'autres productions** et présentant un risque fort pour la propagation de nématodes (arracheuse à betterave ou d'oignon par exemple). Dans tous les cas que nous avons rencontré, ce matériel est à usage partagé.

Le modèle de simulation sur 10 ans a permis de considérer deux niveaux de risque (médian et fort) qui correspondent aux situations les plus nombreuses. Deux types de rotations ont été considérées, des rotations longues avec un délai de retour de 6 ans et des rotations courtes avec un délai de retour de 3 ans. Enfin, le nettoyage du matériel (notamment les arracheuses) a été pris en compte également en considérant qu'il avait un impact sur la probabilité d'infestation des parcelles ; des probabilités de contamination de 0,2 et 0,5 ont été utilisées selon que les arracheuses étaient nettoyées ou pas. La Figure 1 illustre les résultats issus des simulations. Ils mettent en évidence que le risque de contamination par le matériel en usage partagé est toujours présent, même si un nettoyage permet de réduire ce risque. Par ailleurs, la modélisation a permis de classer l'impact relatif des différentes mesures de gestion. Ainsi le nettoyage, même partiel, des arracheuses semble constituer la pratique qui a l'impact le plus fort sur le risque de contamination des parcelles. Ces résultats nécessitent toutefois d'être affinés en réalisant des analyses de sensibilité aux différents paramètres.

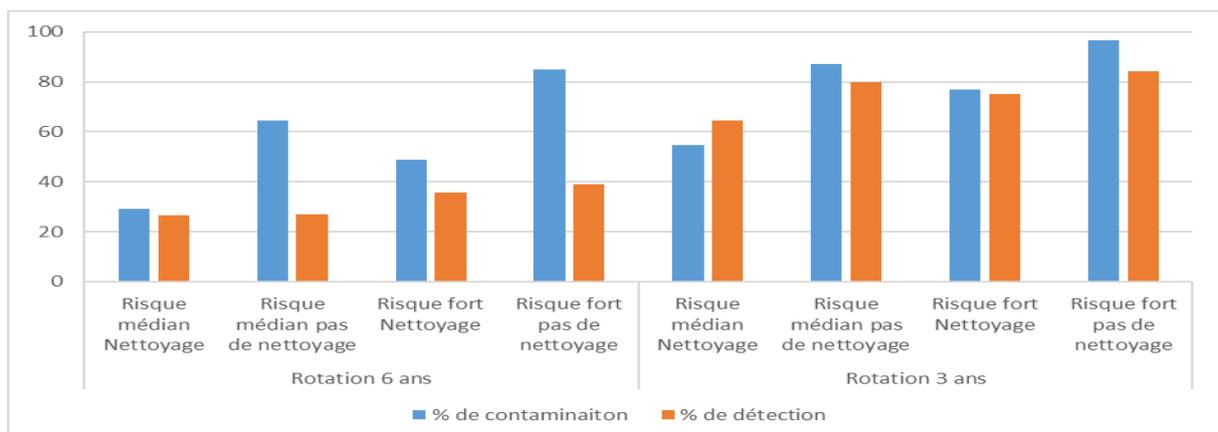


Figure 1 : Pourcentage des parcelles infestées et détectées en fonction des situations

1.2.2 Potentiel dispersif de différents engins agricoles

- *Méthodes de travail utilisées*

Deux approches ont été utilisées pour caractériser la dispersion par différents engins agricoles. La première approche est une approche indirecte. Elle a consisté en l'étude du suivi du déplacement de particules inertes (billes de plastique de couleur) à partir d'une zone source. L'utilisation de différentes couleurs pour les billes de plastique a permis de tracer leurs déplacements en fonction des outils de travaux du sol utilisés, et de leurs successions (itinéraires de production, rotations de cultures). Le suivi est assuré en premier lieu par la recherche des particules sur l'outil et le tracteur, en second lieu par l'observation des particules visibles à la surface du sol, et enfin par des prélèvements de sol.

La deuxième approche menée fût une approche directe. Elle a consisté en la réalisation d'échantillonnages directement sur des engins (arracheuses, déterreur) afin de montrer la présence de nématodes à kystes dans la masse terreuse déplacée au cours des chantiers de récoltes. Des régions différentes ont été ciblées afin de représenter des conditions de sol et des machines un peu variées. Les échantillonnages ont eu lieu à l'occasion de chantiers d'arrachage sur des parcelles dans lesquelles des kystes de *Heterodera* avaient été détectés antérieurement.

- *Résultats*

Les expérimentations conduites aux champs avec utilisation de particules de plastique ont été les suivantes :

En petites parcelles sur le site INRAE du Rheu, nous avons évalué la dispersion des particules en fonction de différents types d'outil puis de leur utilisation successive au cours d'une culture de pomme de terre. Cet essai comportait 2 sous-parcelles avec les modalités suivantes :

- Dépôts de particules avant la plantation, des particules bleues entre 0 et 10 cm et des particules noires entre 10 et 20 cm sur 4 rangs (4 répétitions)
- Dépôt de particules lors de la plantation sur un tubercule sur 4 rangs (4 répétitions)
- Itinéraire de culture : plantation de Bintje - le désherbage de la parcelle ayant été trop tardif, de nombreuses mottes herbeuses subsistent en surface. Ces mottes ont pu être entraînées lors de la plantation sur des distances importantes - 2ème buttage (24 avril 2017) - désherbages manuels sans incidence sur la dispersion des particules - arrachage et récolte des pommes de terre

En zones de production « grandes cultures », sur le domaine expérimental du Rheu, nous avons évalué la dispersion des particules lors des cultures d'homogénéisation des parcelles sur différentes productions (maïs ensilage, fèverole, blé). Différents itinéraires techniques entre le dépôt et la recherche des particules ont été mis en place.

L'essai en petites parcelles de culture de pomme de terre a montré que la herse vibrante est un des engins disséminant le plus et que la dispersion peut atteindre 4m de distance à la source après passage d'une simple combinaison d'outils. Après arrachage, nous n'avons pas retrouvé de particule sur les roues du tracteur, les roues et les socs de l'arracheuse. Par contre, des particules (noires uniquement) ont été trouvées dans la tare terreuse et les mottes herbeuses coincées dans l'arracheuse.

Les essais en production « grandes cultures » ont montré que toutes les particules ne sont pas retrouvées et donc que la dispersion est sous-estimée. Néanmoins, il apparaît clairement que les particules sont entraînées dans le sens des passages d'outils. Ainsi, les dispersions les plus importantes sont observées suivant la direction d'implantation de culture, dans les 2 sens et jusqu'à 3 m de la source. Au contraire, la dispersion perpendiculaire à l'implantation de culture n'est observée que jusqu'à 1 m de la source, dans les 2 sens. L'état structural du sol est un élément essentiel dans la

dissémination des particules que l'on retrouve en plus grand nombre dans les zones d'accumulation de terre fine.

Concernant les résultats obtenus la première année par l'approche directe, 4 à 6 prélèvements ont été réalisés sur chaque arracheuse au niveau de différentes zones d'accumulation de terre et ce à différents moments au cours du chantier d'arrachage. Les résultats ont montré que 100% des échantillons réalisés sur les arracheuses étaient positifs pour la présence de kyste à l'exception d'un site. Ce dernier résultat peut s'expliquer par un niveau d'infestation de la parcelle extrêmement faible (1 kyste / 300 g de sol). Le nombre de kystes détectés sur les arracheuses et les déterreurs de sites plus contaminés était entre 5,8 et 12,7 kystes en moyenne / 300 g de sol. Ces premiers résultats ont donc validé la possibilité d'un transport passif de nématodes par les arracheuses. Ce transport passif doit encore être mieux caractérisé pour appréhender les facteurs influençant la quantité de kystes véhiculés et pour évaluer le risque de dissémination entre deux chantiers de récolte en fonction de la distance parcourue.

Lors de la deuxième campagne d'échantillonnage seulement 3 prélèvements ont été réalisés au niveau des zones de plus forte accumulation de kystes (à l'arrière de la machine, sous les tapis roulants, ou à l'avant au niveau du socle et sous les tapis roulants). Lorsque cela a été possible, la même arracheuse a été échantillonnée également après son retour à la ferme ou à son arrivée sur la parcelle suivante. Les résultats ont montré qu'on retrouvait entre 40% et 160% du niveau d'infestation de la parcelle. De plus, même après un trajet de 7,5 km sur route et sans aucun nettoyage à la sortie de la parcelle récoltée, 100% des points échantillonnés sur l'arracheuse sont toujours positifs pour la présence de kystes. Pour des niveaux d'infestation faibles à modérés, de l'ordre de 18 kystes / 300 g de sol, un nettoyage rapide des excédents de terre aux différents points d'accumulation semble suffisant pour qu'à l'arrivée sur la parcelle suivante la terre encore présente sur l'arracheuse soit indemne de kystes.

Dans un dernier temps, nous avons développé une méthodologie pour permettre la détection de nématodes à kystes dans les échantillons de terre prélevés sur l'arracheuse. Le protocole permet, après éclatement des kystes à l'aide d'un broyeur à billes, de faire une extraction d'ADN à partir de la nématofaune totale de l'extrait (formes libres et formes enkystées). L'application des outils développés dans Gamel *et al.* (2017) sur les extraits d'ADN obtenus à partir des sols prélevés sur les arracheuses montre que les résultats de détection sont en parfait accord avec les données de présence de kystes dans l'échantillon analysé. Par contre, il n'est pas possible d'avoir des résultats utilisables en terme quantitatif à partir de cette PCR.

1.2.3 Evaluation des risques : process industriels, laboratoires et stations expérimentales

La découverte de nouveaux foyers de *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et ceux de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis*, détectés sur diverses cultures et dans différentes régions françaises, montre la nécessité d'avancer rapidement sur l'étude des facteurs de risque d'introduction et de dissémination de ces nématodes. La terre, les déchets végétaux, les effluents... générés par différentes structures (usines de transformation, stations expérimentales, centres de conditionnement, laboratoires d'analyses...) peuvent constituer des moyens de dissémination des nématodes. Les objectifs de ce volet étaient donc d'évaluer les risques inhérents aux pratiques industrielles (à réception de la marchandise et aux cours du process) et d'élaborer un guide de bonnes pratiques.

- *Méthodes de travail utilisées*

Un guide d'entretien (données qualitatives) a été élaboré et a permis de recueillir des données auprès de 4 sites industriels visités lors du projet. Les volets abordés lors des entretiens portaient sur l'entreprise/le site, le transport et la réception des échantillons sur le site, les process industriels développés par le site et le traitement des déchets. Les réponses apportées ont permis d'une part, de recenser le type de déchets reçus ou produits à réception de la marchandise et leur devenir, et d'autre

part, de connaître les traitements industriels subis par les marchandises (cuisson, coupe, pelage) tout au long du process et d'évaluer alors les risques sur les produits qui sortent du process industriel.

Dans un second temps, ce guide a été décliné sous forme de questionnaire destiné à être envoyé auprès d'un plus grand nombre de sites, couvrant à la fois des industriels, mais aussi des stations expérimentales et des laboratoires agréés ou non. Cette enquête a fait l'objet d'une diffusion globale via le Réseau Français de la Santé des Végétaux (RFSV) et celui du réseau de laboratoires agréés par le Ministère de l'agriculture. Une diffusion spécifique aux partenaires du projet a également été réalisée.

- **Résultats**

L'exploitation des données des entretiens a contribué à l'élaboration d'un outil d'analyse de risque, notamment pour caractériser les phases critiques des différents process industriels appréhendés lors des 4 visites de sites. L'outil interactif proposé comme livrable a vocation à être utilisé par tous et doit contribuer, d'une part à la réalisation de cette évaluation de risque pour les sites susceptibles d'être concernés, de guider sur les orientations des mesures de gestion appropriées selon les phases de risque rencontrées mais doit aussi permettre la promotion pédagogique, voire une certaine forme de prise de conscience par les opérateurs quant à ces risques.

Concernant l'enquête, malgré deux relances et une prolongation des délais, seules 11 réponses ont pu être recueillies. Le contexte très sensible qui concerne des déchets susceptibles d'être contaminés par des nématodes réglementés de quarantaine a probablement fortement limité le taux de réponse à cette enquête. L'exploitation des résultats obtenus à partir des 11 réponses rend toutefois compte des informations suivantes :

- **Matrices travaillées et réception des échantillons :**

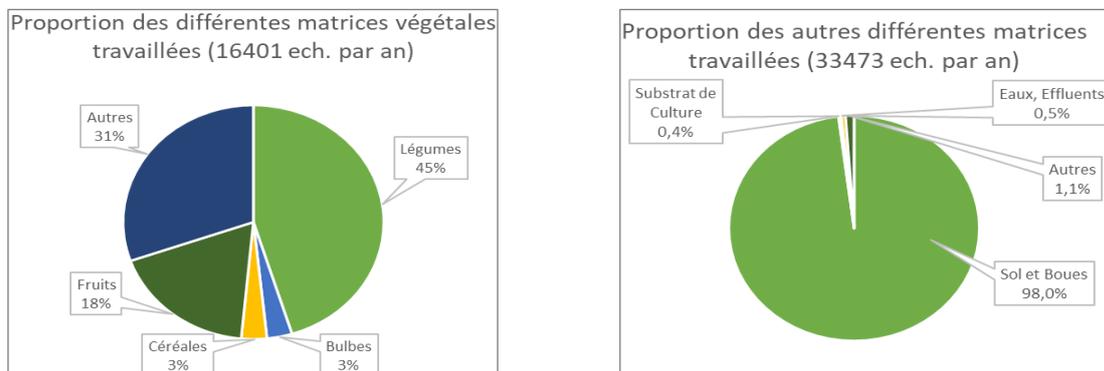


Figure 2 : Proportions des différentes matrices travaillées végétales (à gauche) et autres (à droite)

Les légumes travaillés sont principalement la tomate et la pomme de terre (Figure 2). Les autres matrices végétales (31%) correspondent principalement à des essences forestières et ornementales. Pour les autres matrices travaillées, la catégorie « Autres » (1,1%) correspond généralement à des insectes. A réception, 64% des échantillons sont ouverts dans une salle dédiée. 100% des échantillons non-conformes reçus sont détruits.

- **Traitement des déchets et effluents :**

L'autoclave et la chloration sont les modes de traitement les plus utilisés (Figure 3). Les températures utilisées pour les autoclaves varient de 120°C à 134°C, avec des durées de traitement systématiquement supérieures à 15 min, quelle que soit la matrice traitée. La concentration en chlore employée varie de 0,074% de chlore actif (740 PPM) pendant 120 min à 1,5% de chlore actif (15000 PPM) pendant 20 min.

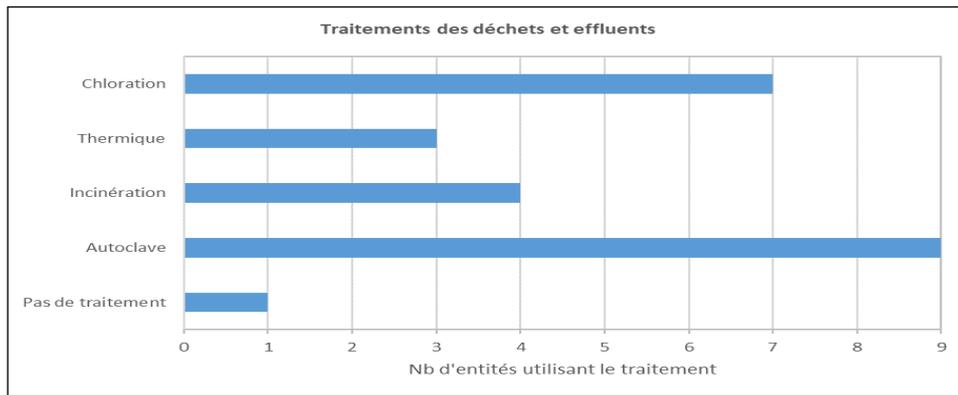


Figure 3 : Modes de traitement des déchets et effluents utilisés par les 11 entités répondantes

▪ Procédures de contrôle après traitement :

Des contrôles d'efficacité des traitements sont mis en place et vont de l'analyse des eaux et effluents après traitement, à l'inoculation d'organismes cibles avant traitement et dénombrement après traitement. Lorsque des déchets sont incinérés, les bordereaux de confirmation de destruction sont conservés.

2. Développement d'outils de maîtrise des risques associés aux nématodes

2.1 Evaluation de l'efficacité des modes de traitement / désinfection en laboratoires et stations expérimentales

L'application de la directive 2008/61/CE et sa déclinaison en droit français vise à garantir le confinement des parasites de quarantaine (au titre de la directive 2000/29/CE, JOCE, 2000) et rend ainsi la désinfection des effluents obligatoire (JOUE, 2008). La terre, les déchets végétaux, les effluents de laboratoires et d'industries de transformation contaminés par les nématodes à galles ou à kyste peuvent constituer des moyens de dissémination de ces nématodes phytoparasites. Ces produits font parfois l'objet de traitements, mais il y a peu d'informations disponibles sur leur effet nématicide.

2.1.1 Méthodes de travail utilisées

Les objectifs de ce volet étaient d'évaluer l'efficacité des modes de traitement utilisés pour détruire les nématodes éventuellement présents dans les déchets et effluents issus de sites industriels, de laboratoires et de stations expérimentales et de proposer des recommandations aux laboratoires, producteurs et industriels sur les méthodes de désinfection. Cinq procédés de décontamination ont été retenus pour cette étude, résultant à la fois de données bibliographiques ou d'informations obtenues dans le cadre d'enquêtes ou d'échanges initiés avec des groupes de travail européens (OEPP). Les expérimentations destinées à évaluer l'efficacité nématicide par les procédés thermique et chloration ont été réalisées en laboratoire confiné de niveau 2. Les autres procédés de traitement étudiés dans le cadre de cette étude (méthanisation, compostage et lagunage) ont été évalués sur des sites industriels (1 site pour le compostage et 3 sites pour le lagunage) ou des plateformes expérimentales (2 sites pour la méthanisation). Ces études ont été conduites par du personnel de la FN3PT et de l'ANSES. Parmi tous les nématodes phytoparasites susceptibles d'être disséminés par les effluents, le modèle nématode à kystes, forme de conservation la plus résistante, a été retenu pour la conduite des expérimentations. L'espèce *Globodera tabacum*, non réglementée et proche des deux espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis*, a été choisie pour pouvoir travailler sur les sites industriels.

D'une façon générale, les dispositifs installés sur sites industriels/expérimentaux ont reposé sur l'utilisation de sac-filets contenant 10 kystes de *G. tabacum*. Pour chaque modalité (profondeur/durée de traitement, couple température/durée...), le dispositif comprenait trois répétitions (3 sac-filets de 10

kystes). Dans le cas des essais conduits en conditions contrôlées (laboratoire confiné), et en particulier l'essai de désinfection par traitement thermique, les espèces de quarantaine *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* ont également été testées.

A l'issue des essais de désinfection, la viabilité des nématodes était contrôlée en plaçant les kystes dans de l'exsudat racinaire de pomme de terre et en comptant le nombre de larves écloses après 30 jours d'incubation. Les kystes étaient ensuite disséqués pour compter également les larves non écloses et vérifier leur viabilité (selon Chen et Dickson, 2000).

2.1.2 Résultats obtenus

■ Production de kystes

Plusieurs productions de kystes ont été lancées pour les besoins des expérimentations. 5 419 kystes de *G. tabacum* ont été produits en 2015 et 15 712 en 2016. 5 308 kystes de *G. pallida* et 8 356 kystes de *G. rostochiensis* ont également été produits en 2016.

■ Evaluation de l'effet nématocide du compostage

Deux séries d'essais ont été implantées sur un site industriel réalisant du compostage. La première série d'essai a été mise en place en 2016 dans 4 casiers afin d'évaluer l'effet du compostage. Les cages contenant les sac-filets de kystes étaient placées au centre du casier de compost, à 3 niveaux de profondeur, surface, milieu et fond. Une cage était récupérée pour chacun des emplacements au retournement du tas et une autre cage à la fin du compostage. Les durées de traitement avant et après retournement sont représentées sur la Figure 4. Les relevés des capteurs de température montrent de très grandes variations de températures au cours du compostage et selon les casiers, les valeurs fluctuant beaucoup plus en surface que pour les deux autres niveaux (Figure 5).

La deuxième série d'essais a été mise en place en 2017. L'effet nématocide du compostage a été évalué seulement en surface du tas de compost, zone *a priori* la plus favorable à la survie des nématodes. L'expérimentation a été répétée dans 4 casiers différents, selon le même dispositif que celui décrit précédemment, avec des durées de traitement avant et après retournement plus courtes (Figure 4).

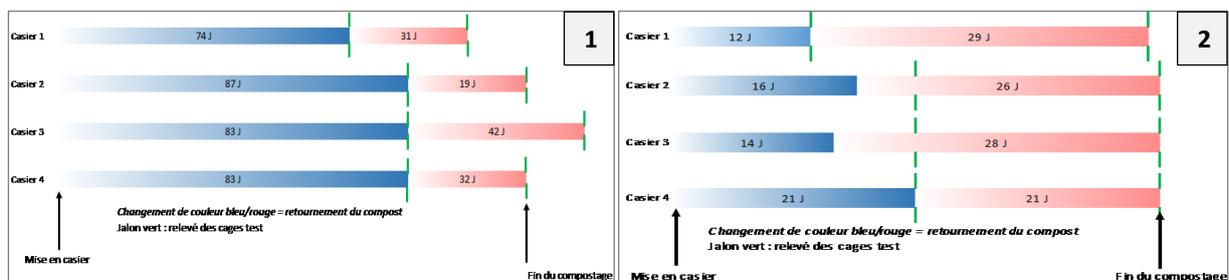


Figure 4 : Durée du compostage pour chaque cage relevée lors des deux séries d'expérimentation (1 & 2)

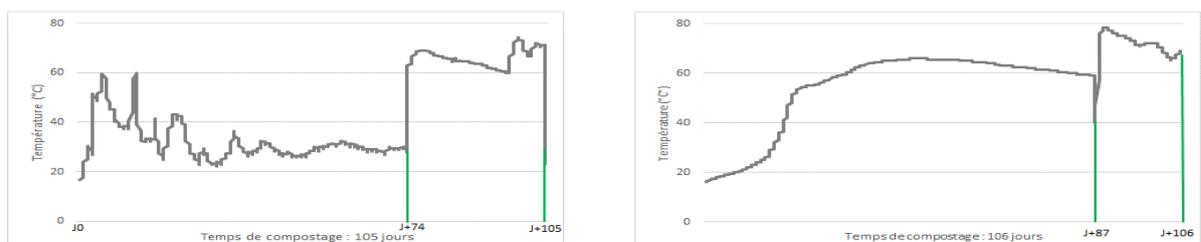


Figure 5 : Températures relevées en surface du casier 1 (à gauche) et au milieu du casier 2 (à droite) pour la série d'expérimentations 1

Les tests de viabilité mis en œuvre à l'issue de ces expérimentations n'ont pas mis en évidence de larve vivante. L'efficacité nématocide du compostage appliqué dans ces conditions a été prouvée.

▪ Evaluation de l'effet nématocide du lagunage

Les essais ont été conduits dans trois sites industriels de transformation et/ou de lavage de légumes.

Le 1^{er} site industriel est une station de lavage de légumes. Les eaux de lavage et les sédiments sont stockés dans des lagunes de décantation. L'expérimentation a été mise en place dans la première lagune, positionnée juste en sortie d'usine et dont la profondeur est de 3 mètres. Deux essais ont été réalisés : un premier mis en place fin juillet 2016 pour une durée de 9 mois et le deuxième mis en place fin novembre 2017 pour une durée de 5 mois. Les cages contenant les sachets de kystes ont été placées à 3 niveaux de profondeur (surface, milieu et fond) pour le 1^{er} essai et à deux niveaux (surface et fond) pour le 2nd.

Les tests de viabilité concernant l'essai 1 ont montré qu'après 1 mois de lagunage, la survie des kystes était déjà très faible avec des taux d'éclosion inférieurs à 1%. Il n'y avait pas de différence statistique du pourcentage d'éclosion entre les 3 niveaux de profondeur. Le pH est resté stable entre 7 et 7,2. Les températures ont fluctué selon la saison avec des valeurs comprises entre 1,9 et 26,5°C en surface, entre 7 et 23,5°C au milieu et entre 8,5 et 18,5°C au fond. Concernant l'essai 2, les résultats (Figure 6) ont montré un taux de survie plus important que lors de l'essai réalisé en 2016. Les températures étaient comprises entre 1,5 et 21°C en surface et entre 1 et 15,5°C au fond.

En conclusion, le lagunage appliqué sur ce site et dans ces conditions d'expérimentation, n'est pas un moyen efficace pour une destruction totale des nématodes à kyste lorsque la durée de lagunage est inférieure à 7 mois mais semble avoir un effet nématocide pour des durées supérieures à 9 mois.

Le site 2 est une industrie de transformation de légumes. Les effluents passent par une station de traitement qui sépare les boues des eaux sales et des autres déchets de type terre et végétaux. Les eaux épurées sont stockées dans une lagune d'une profondeur de 4 mètres. Un seul essai a été mis en place sur cette lagune en décembre 2016 pour une durée de 16 semaines. Les cages contenant les sachets de kystes étaient placées à trois niveaux de profondeur (surface, milieu et fond) et la viabilité des nématodes testée selon la même procédure que précédemment. Les températures ont fluctué entre 4 et 14 °C et le pH était autour de 7,9. Les résultats obtenus n'ont montré aucune diminution de la capacité des kystes de *Globodera tabacum* à éclore. Les pourcentages d'éclosion sont demeurés similaires à ceux des différents témoins. Dans ces conditions d'expérimentation (période hivernale), le lagunage n'a pas eu d'effet nématocide.

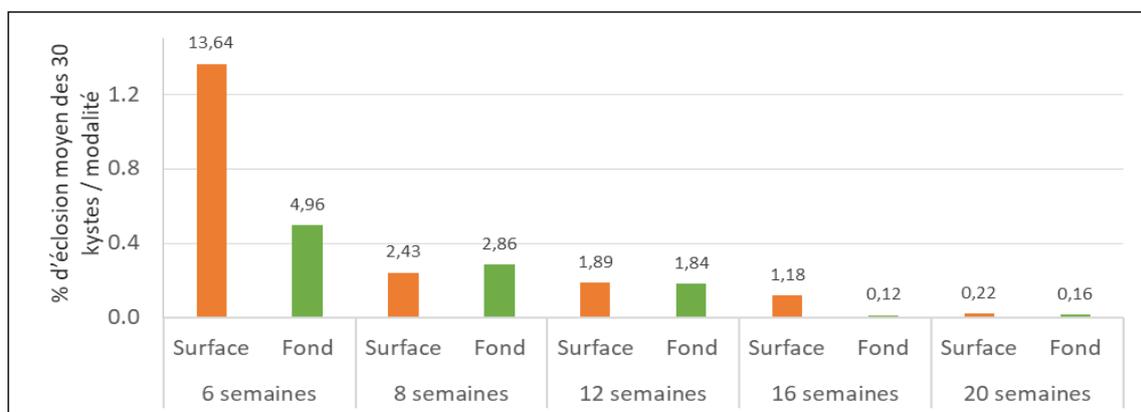


Figure 6 : Pourcentages d'éclosion obtenus en fonction du temps de lagunage et de la profondeur (pour le site 1, essai 2)

Le site 3 est une entreprise de transformation de légumes en activité 4-5 mois/an. Les eaux terreuses sont stockées dans une lagune de décantation d'une profondeur de 3,5 mètres. Un essai a été mis en place en février 2018 pour une durée de 32 semaines. Les cages contenant les sachets de kystes étaient placées à trois niveaux de profondeur (surface, milieu et fond) et la viabilité des nématodes testée selon la même procédure que précédemment. Le pH relevé sur cette lagune oscillait entre 7 et 8,2. Les résultats sont présentés sur la Figure 7.

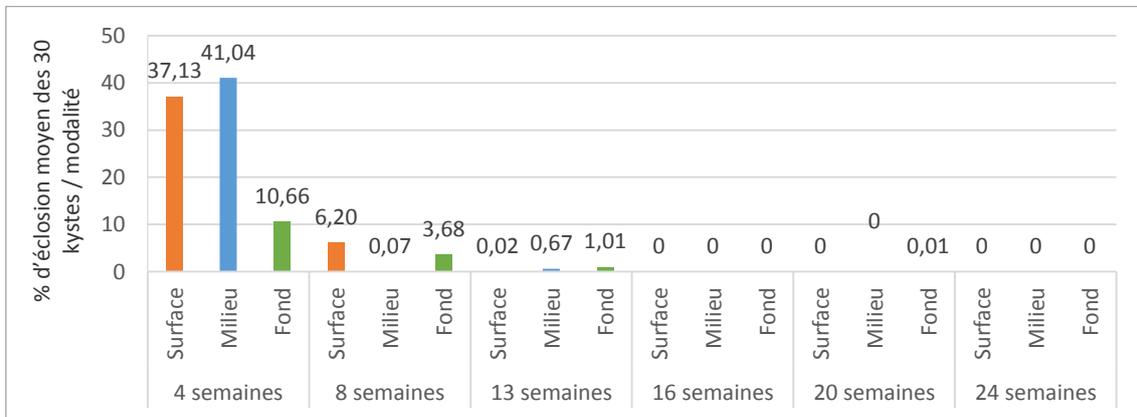


Figure 7 : Pourcentages d'éclosion obtenus en fonction du temps de lagunage et de la profondeur – site 3

Les résultats ont montré une diminution de la capacité des kystes de *Globodera tabacum* à éclore lorsque le temps de lagunage augmentait. Dans ces conditions d'expérimentation, le lagunage n'est pas un procédé nématocide efficace à 100% lorsque la durée de lagunage est inférieure à 6 mois.

En conclusion, le lagunage qui est une technique très répandue pour traiter les effluents, est réalisé dans des conditions très variables selon les sites industriels. L'effet nématocide de cette technique n'a pu être montré que pour des durées de lagunages longues, dans des effluents bruts relativement chargés et semble plus efficace en conditions estivales (flore probablement plus abondante).

- Evaluation de l'efficacité nématocide du procédé de méthanisation

Les essais de méthanisation ont été réalisés sur deux sites expérimentaux permettant un accès à la cuve pour mettre en place et retirer les filets de kystes.

Le 1^{er} site est une plateforme expérimentale. Deux expérimentations ont été réalisées dans des méthaniseurs pouvant contenir environ 11 L de digestat. Dans chacun des méthaniseurs, une cage contenant 30 kystes de *G. tabacum* était immergée dans le digestat à une température constante de 38°C. La durée des essais était dépendante des activités de la plateforme expérimentale qui accueillait les essais. Deux méthaniseurs liquides contenant des digestats de déchets de restauration collective ont été utilisés pour le 1^{er} essai. Le temps de méthanisation était de 28 jours. Pour le 2^{ème} essai, 3 méthaniseurs liquides, contenant du lisier de bovins auquel était ajouté soit de l'ensilage de maïs, soit du fumier de bovin, ont été utilisés. Le temps de méthanisation était de 129 jours.

Aucune larve vivante n'a été détectée suite à ces traitements. Les résultats ont montré que la méthanisation mésophile de déchets de restauration collective pendant 28 jours et de lisier de bovins pendant 129 jours est un moyen efficace pour la destruction des nématodes à kystes.

Le 2nd site expérimental est une unité de méthanisation pilote équipée de deux digesteurs de 20m³ chauffés à 38°C. Cette installation produit du biogaz à partir de lisier de porc. Deux essais ont été réalisés sur ce site. Lors du 1^{er} essai, les cages sont restées dans le méthaniseur pendant 4 jours, 1, 2, 4, 6 et 8 semaines alors que pour le 2^{ème} essai, les durées d'immersion dans le digestat étaient de 14, 24 et 48h.

Aucune larve vivante n'a été détectée suite à ces traitements. Les résultats obtenus dans ces conditions d'expérimentation ont montré que la méthanisation mésophile dans du lisier de porc pendant une durée minimale de 14h est un moyen efficace pour la destruction des nématodes à kystes.

▪ Evaluation de l'efficacité nématocide du traitement thermique

L'effet nématocide de vingt couples « temps-température » a été testé sur l'espèce *G. tabacum*. Pour cela, 3 sac-filets de 10 kystes étaient plongés dans des effluents de laboratoire chauffés à la température souhaitée. Parmi les vingt couples testés, dix-sept se sont révélés efficaces (Tableau 3).

Tableaux 3 et 4 : Efficacité nématocide des couples temps températures sur différentes espèces de nématodes (Tableau 3 sur *G. tabacum* et Tableau 4 sur les espèces réglementées)

	90°C	85°C	80°C	75°C	70°C	65°C	60°C	55°C	50°C	45°C
60 min					✓	✓	✓			X
30 min				✓					✓	X
15 min								✓	X	
5 min		✓		✓	✓		✓			
3 min	✓	✓	✓				✓			

✓	Effet nématocide
X	Larves viables
	Modalité non testée

	T°C	Durée	Efficacité
<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	60	3 min	✓
	50	30 min	✓
<i>G. pallida</i> et <i>G. rostochiensis</i>	60	3 min	✓
	50	30 min	✓
	45	2 jours	✓
	45	4 jours	✓
	45	6 jours	✓
	40	2 jours	X
	40	6 jours	X

Les deux couples températures / durées de traitement 60°C-3min et 50°C-30min, efficaces sur *G. tabacum*, ont ensuite été validés sur des kystes des espèces réglementée *G. pallida* et *G. rostochiensis* et sur des masses d'œufs des espèces à galles *M. chitwoodi* et *M. fallax*. L'effet de températures plus basses couplées à des temps d'action plus longs a également été évalué sur les espèces de nématodes à kystes réglementés. Une température de 45°C maintenue pendant une durée supérieure à 2 jours a un effet nématocide sur les larves de *G. pallida* et *G. rostochiensis*. Par contre, une température de 40°C n'est pas efficace contre les nématodes même si la durée du traitement est de 6 jours (Tableau 4).

▪ Evaluation de l'efficacité nématocide du traitement par chloration

Des résultats, obtenus suite à des essais préliminaires menés par l'ANSES, en collaboration avec différents partenaires, pour évaluer l'efficacité de onze couples dose-temps d'action sur des effluents liquides ont montré que le traitement par chloration était complexe. Outre le pH, les facteurs susceptibles d'influencer l'effet nématocide du chlore sont les caractéristiques physico-chimiques des effluents (matière organique, ammoniacale, composés azotés, température...). L'objectif des tests menés dans ce projet était de tester un panel d'effluents (7) provenant de différents laboratoires afin de prendre en compte la diversité des activités analytiques associées à la nature variable des effluents. Deux couples dose de chlore et temps d'action ont été évalués : 740 ppm (0.074% de Chlore Actif) pendant 4h et 600 ppm (0.06% Ca) pendant 16h sur environ 400 larves de *Globodera pallida* placées dans 5L d'effluent. Une neutralisation au bisulfite a été appliquée pour se positionner au plus proche de la réalité des pratiques.

Les résultats obtenus sur la base des différents essais conduits montrent une grande variabilité du pH des effluents, avec un pH moyen de $7,65 \pm 0,47$. Seul 1 essai sur 5 de la modalité 740 ppm / 4h a montré la présence de 4 larves vivantes. L'hypothèse la plus probable de ce résultat est que ces larves observées encore vivantes sont dues à une erreur de manipulation.

En conclusion, le traitement par chloration réalisé dans ces conditions d'expérimentations, est un moyen efficace pour la destruction des nématodes à kystes à 740 ppm pendant 4h dans 4 cas sur 5.

Les deux essais réalisés à un traitement à 600 ppm pendant 16h ont montré qu'aucune larve vivante n'a été observée, mais le faible nombre de répétitions limite nos conclusions. Quelles que soient les recommandations qui peuvent être faites sur les couples dose de chlore actif / temps de contact à appliquer, la mesure d'efficacité de ces dernières reste strictement dépendante de la nature des effluents considérés et de la quantité en chlore actif disponible dans le volume total d'effluent traité. Il est donc particulièrement critique et indispensable de vérifier l'efficacité des couples appliqués pour chaque nature d'effluent, et par voie de conséquence, pour chaque type d'activité analytique pratiquée.

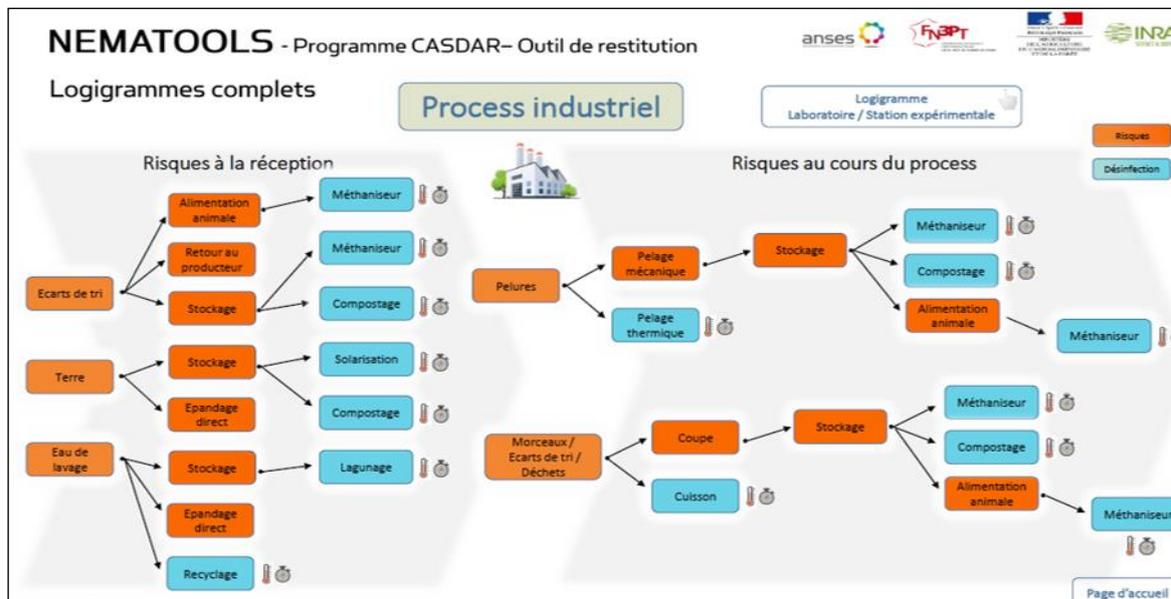


Figure 8 : Présentation du logigramme de l'outil d'analyse de risques

L'ensemble des résultats obtenus sur les volets portant sur l'évaluation des risques liés aux process industriels, laboratoires et stations expérimentales, ainsi que l'évaluation des méthodes de désinfection, a permis la production d'un outil d'analyses de risque interactif (Figure 8). Il caractérise les phases critiques de différents process de traitement d'effluents et apporte des éléments de réponse sur différents procédés de décontamination qui pourront être largement exploités pour le choix et la mise en place de méthodes de décontamination pour les laboratoires, les stations de conditionnement, les industriels de la transformation agro-alimentaires, etc. Les protocoles et les fiches synthétiques des résultats obtenus dans le cadre de ces expérimentations sont rattachés à cet outil interactif. L'outil est disponible sur le site de l'UMT InnoPlant, www.umt-innoplant.fr

2.2 Vers de nouveaux moyens de lutte : ressources génétiques et solutions alternatives

Dans un contexte d'agriculture durable et productive, il est important de proposer des mesures de gestion des foyers *M. chitwoodi* et *M. fallax* mais aussi d'anticiper leur éventuel développement en étudiant des moyens efficaces et respectueux de l'environnement, tels que la résistance génétique et les solutions alternatives. Ces deux approches ont été étudiées dans ce volet, avec la mise en place d'essais en conditions contrôlées dans des structures confinées de niveau 2 et 3.

2.2.1 Utilisation de ressources génétiques comme plantes de rupture

L'objectif principal de ce Workpackage est d'utiliser comme plantes de rupture des sources de résistance criblées dans le précédent projet DREAM (EU-project QLRT-1999-1462) et maintenues dans le CRB BraCySol, afin de proposer des mesures de gestion des foyers de *M. chitwoodi* et *M. fallax*.

- *Méthodes de travail utilisées*

Dans le cadre de ce volet portant sur la possibilité d'exploiter des sources de résistance chez les espèces apparentées à la pomme de terre, il a été décidé d'investir prioritairement sur les sources *S. schenckii* et *S. sparsipilum* pour la résistance à *M. chitwoodi* et à *M. fallax*, respectivement. Trois clones issus de la source de résistance *Solanum schenckii* ont été retenus pour la résistance à *M. chitwoodi*. Les deux hybrides (01P.37. 1 et 02P.16. 2) pentaploïdes étaient issus du croisement direct entre l'espèce hexaploïde porteuse de la source de résistance *S. schenckii* et *S. tuberosum*, et ont été évalués résistants vis-à-vis de *M. chitwoodi* (D. Mugnière, 2004). L'hybride 05P.93.22 était issu du croisement entre le clone pentaploïde 01P.37.1 et la variété Joséphine (*S. tuberosum*) ; ce clone tétraploïde, plus proche agronomiquement de la pomme de terre cultivée, avait été évalué sensible lors de précédents essais. Huit clones diploïdes issus de la source de résistance *S. sparsipilum* (famille 00D.50) ont été sélectionnés pour la résistance à *M. fallax*. Six de ces clones ont été phénotypés résistants vis-à-vis de la population hollandaise Baexem et deux ont été phénotypés sensibles (00D50.9 et 00D50.57 ; Kouassi et al, 2006).

Deux populations de nématodes (une par espèce) ont été utilisées pour évaluer le comportement des génotypes. 15 tubercules par génotype sont plantés individuellement dans des pots contenant du sol infesté par les nématodes (deux niveaux d'infestation de sol ont été testés). Des modalités témoins sensibles (Désirée et Tomate) ainsi qu'un témoin sol nu ont été ajoutés au dispositif. Au terme de la période de végétation, les plantes ont été retirées des pots et ont été remplacées par des plantules de tomate afin de piéger les larves présentes dans le sol. La durée du piégeage était de 55 jours environ, temps nécessaire aux larves pour pénétrer dans les racines et y effectuer leur cycle jusqu'au stade masses d'œufs. Les systèmes racinaires des plantes (génotype et tomate piège) ont été récupérés, lavés puis colorés à l'éosine afin de compter plus facilement les masses d'œufs présentes le long des racines. Ce comptage permet d'estimer le nombre de larves ayant pénétré dans les racines et d'extrapoler ainsi le nombre de larves présentes dans le sol.

- *Résultats obtenus*

Concernant les essais menés vis-à-vis de *M. chitwoodi*, les résultats confirment que les hybrides pentaploïdes utilisant la source de résistance *Solanum schenckii* permettent bien de contrôler les populations de *M. chitwoodi* (Figure 9). Par contre, ces essais confirment également la perte de résistance lors du passage au niveau tétraploïde (génotype 05P.93.22).

Concernant l'espèce *M. fallax*, l'efficacité des génotypes à réduire les populations de nématodes par rapport à un sol nu est variable selon les génotypes (Figure 10) ; les hybrides 00D.50.12, 00D.50.33, 00D.50.80 et 00D.50.94 ont une efficacité égale ou supérieure à 90%, alors que les hybrides 00D.50.16 et 00D.50.88 ont une efficacité inférieure à 60 %. Les génotypes 00D.50.9 et 00D.50.57 favorisent quant à eux la multiplication des nématodes présents dans le sol. Le comportement des 8 clones diploïdes issus de la source de résistance *Solanum sparsipilum* est identique à celui observé par Kouassi et al. en 2006. L'évaluation du comportement de clones tétraploïdes agronomiquement plus adaptés se pose.

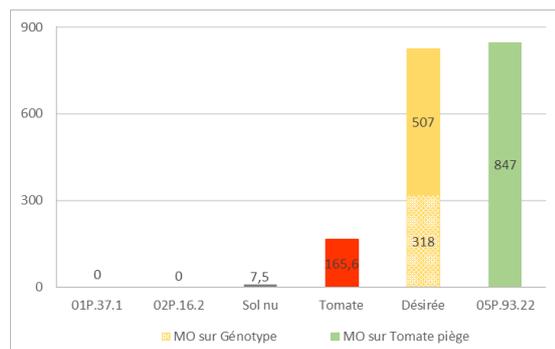


Figure 9 : Cumul du nombre de masses d'œufs (MO) de *M. chitwoodi* sur les systèmes racinaires

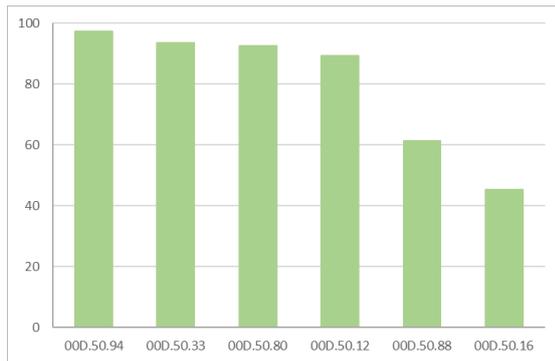


Figure 10 : Efficacité en % des plantes à réduire le niveau d'infestation des sols / sol nu

2.2.2 Effet de plantes de la rotation, de plantes de coupure et de plantes pièges sur le niveau d'infestation de parcelles

Meloidogyne chitwoodi et *M. fallax* sont deux espèces de nématodes très polyphages dont les gammes d'hôtes diffèrent un peu (Nijs et al., 2004). Plusieurs études ont également montré un effet "population" qui se traduit par des degrés de pathogénie variables sur les espèces végétales et entre variétés d'une même espèce végétale. Il est donc difficile de généraliser les informations obtenues aux deux espèces de *Meloidogyne* et aux populations d'une même espèce (Fargette et al., 2005 ; Van der Beek et Mugniery, 2008 ; Waeyenberge et Moens, 2001 ; Wesemael et Moens, 2012). L'objectif de ce volet est de développer des méthodes alternatives permettant de gérer les foyers et d'éviter la multiplication et la dispersion de ces ravageurs.

- *Méthodes de travail utilisées*

Trois séries d'essais en conditions contrôlées (confinement 2 et 3) ont été mis en place pendant toute la durée du projet, sur les sites de la FN3PT situés à Le Rheu (35) et à Achicourt (62). Ces essais visaient à évaluer l'effet de plantes entrant dans les rotations et de l'inter-culture sur les populations de nématodes (effet assainissant ou non de ces cultures). Les premiers essais avaient pour principal objectif le développement du pathosystème et la réalisation d'un premier screening d'espèces végétales et cultivars sélectionnés d'après les résultats d'études antérieures. Seul le travail réalisé sur la 3^{ème} série d'essais est présenté dans cet article. Ces essais avaient pour objectif de tester les cultures candidates les plus intéressantes sélectionnées en années 1 et 2 du projet sur plusieurs populations (4) des deux espèces de *Meloidogyne* étudiées (chaque site gérait une espèce). Le matériel végétal sélectionné pour cette 3^{ème} année rassemblait 3 variétés de Radis fourrager (Terranova, Carwoodi et Discovery), 2 variétés de Roquette (Tiara et Trio), le haricot variété Hawaii, la tomate St Pierre et la pomme de terre Désirée. Une modalité sol nu a aussi été ajoutée. Le nombre de répétitions par modalité est de 15 pots.

L'estimation du nombre de larves de nématode présentes dans le sol est mesurée de façon indirecte, par comptage du nombre de masses d'œufs présentes sur le système racinaire des plantes cultivées et des plantules de tomates pièges, en considérant qu'une masse d'œufs correspond à une larve de nématode ayant pénétré dans le système racinaire et ayant pu effectuer son cycle. La culture piège a été menée pendant 60 jours, temps nécessaire pour que le nématode réalise un cycle complet. La population initiale (P_i) a été estimée après piégeage sur tomates des nématodes présents dans les différents mélanges. La population finale (P_f) a été estimée en additionnant le nombre de masses d'œufs présentes sur les racines des plantes testées et le nombre de masses d'œufs dénombrées sur tomates pièges. L'efficacité des différentes espèces végétales à réduire ou non la charge de nématodes dans les sols a été calculée de la manière suivante : % de réduction = $1 - (P_f/P_i) \times 100$.

- *Résultats obtenus*

Les résultats obtenus (Figures 11 et 12) montrent que les radis Terranova et Carwoodi sont les espèces végétales les plus efficaces pour réduire le niveau d'infestation des sols, avec une efficacité supérieure

à 85% quelle que soit l'espèce et la population de *Meloidogyne* présente. La variété Discovery est également très efficace vis-à-vis des 4 populations de *M. chitwoodi* testées (>99%) ainsi que sur les populations B et D de *M. fallax* (>87%) mais l'est moins sur les populations A et C. Les deux variétés de Roquette montrent une variabilité plus importante de comportement face aux 8 populations testées, variabilité à la fois interspécifique et intra-spécifique. Le haricot a une efficacité supérieure à 50% quelle que soit la population testée, mais avec une grande variabilité selon les populations et les espèces.

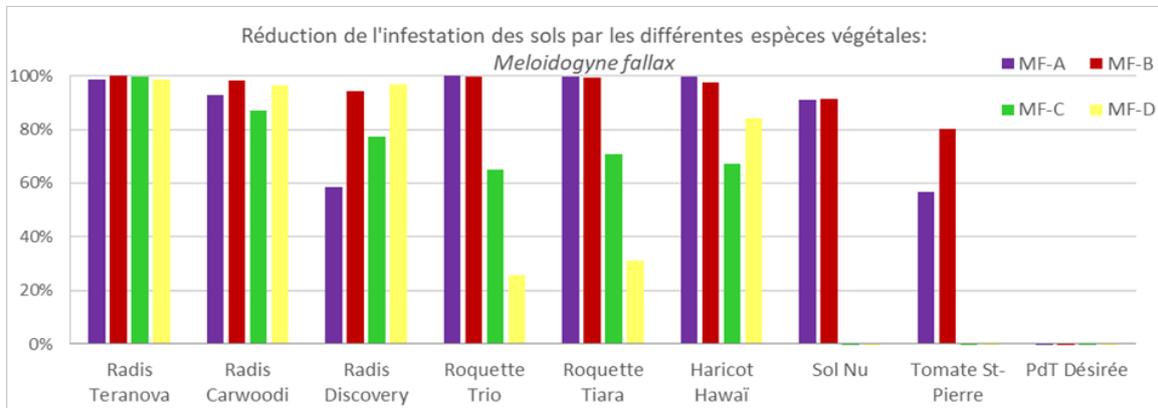


Figure 11 : Efficacité (en %) des espèces végétales à réduire le niveau d'infestation des sols contaminés par *M. fallax*

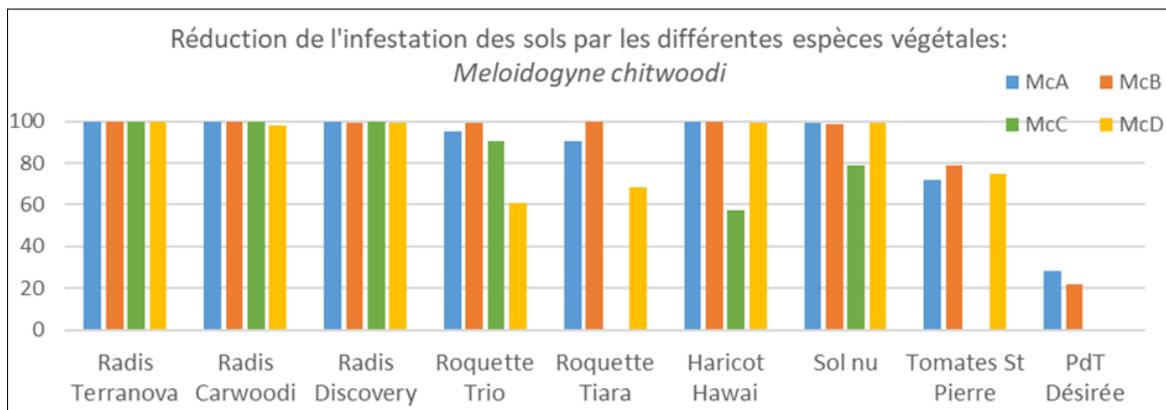


Figure 12 : Efficacité (en %) des espèces végétales à réduire le niveau d'infestation des sols contaminés par *M. chitwoodi*

En conclusion, les essais menés en conditions contrôlées ont permis de sélectionner des cultures ayant une efficacité pour réduire les niveaux d'infestation de parcelles infectées par *M. chitwoodi* et/ou *M. fallax*. Ces plantes (radis fourrager, phacélie, roquette, haricot), utilisées comme couverts végétaux, pourraient constituer une alternative intéressante à la jachère noire, actuellement mise en place lors de la découverte de foyers. En effet, ces plantes permettraient de limiter l'usage de désherbants pour maintenir les sols nus et améliorer l'activité biologique des sols tout en limitant son érosion.

Les résultats obtenus en conditions contrôlées doivent être validés par des essais conduits en conditions d'infestations naturelles, en tunnels dans un premier temps puis en plein champ. Les modes d'actions de ces cultures sur les nématodes sont également à déterminer afin d'évaluer si elles constituent des plantes non hôtes ou ont également un effet nématocide.

Conclusions et perspectives

Face aux enjeux techniques et économiques importants associés à la présence ou à l'introduction de nématodes, le projet Nematools a permis d'acquérir des connaissances précieuses dans l'évaluation des risques. Il a aussi permis de développer de nouveaux outils et des moyens de prévention et de lutte

pour réduire les populations et les dégâts de nématodes : outils de détection performants, outil d'analyse de risques, connaissances sur les voies de dispersion, méthodes de décontamination, plantes de rupture etc. Plus largement, le projet a permis d'acquérir un ensemble de connaissances nouvelles sur ces nématodes, qui devraient se traduire dans l'amélioration de leur prévention et maîtrise. A court terme, les suites envisagées sont de finaliser certains travaux et de poursuivre les actions de communication et de transfert des résultats du projet auprès des agriculteurs et des autres utilisateurs potentiels : pouvoirs publics, organismes de certification, laboratoires, obtenteurs, industriels, etc.

Les résultats de ce projet, qui ciblait la culture de la pomme de terre, bénéficieront à terme à l'ensemble des filières impactées par ces pathogènes pour en améliorer les moyens de prévention et de gestion.

Remerciements aux personnes impliquées dans la mise en place et le suivi des travaux, personnel des équipes, producteurs, industriels... Ce projet a bénéficié du concours financier du ministère de l'agriculture via le compte d'affectation spéciale « Développement agricole et rural » dans le cadre de l'appel à projets Recherche Technologique.

Références bibliographiques

- Chen S.Y., Dickson D.W., 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 32(1), 117-121.
- Den Nijs L.J.M.F., Brinkman H., Van der Sommen A.T.C., 2004. A Dutch contribution to knowledge on phytosanitary risk and host status of various crops for *Meloidogyne chitwoodi* Golden *et al.*, 1980 and *M. fallax* Karssen, 1996: an overview. *Nematology* 6, 303-312 DOI: 10.1163/1568541042360492
- EPPO, 2014. PM 7/98(2). Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* 44(2), 117-147
- EPPO, 2014. Phytosanitary risks associated with soil attached to potato tubers and potato waste. Workshop Lille, Fr, 11/12-02-2014
- Fargette M., Lollier V., Phillips M., Block V.C., Frutos R., 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *C.R. Biologies* 328, 455-462.
- Gamel S., Huchet E., Le Roux-Nio A.C., Anthoine G., 2014. Assessment of PCR-based tools for the specific identification of some temperate *Meloidogyne* species including *M. chitwoodi*, *M. fallax* and *M. minor*. *Eur. J. Plant Pathol*, DOI : 10.1007/s10658-013-0355-8.
- Gamel S., Letort A., Fouville D., Folcher L., Grenier E., 2017. Development and validation of real-time PCR assays based on novel molecular markers for the simultaneous detection and identification of *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* and *Heterodera schachtii*. *Nematology*, 19(7), 789-804.
- Jones J.T., Haegeman A., Danchin E.G., Gaur H.S., Helder J., Jones M.G., Kikuchi T., Manzanilla-López R., Palomares-Rius J.E., Wesemael W.M., Perry RN., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes. *Mol Plant Pathol*. 2013 Dec;14(9), 946-961.
- Journal Officiel des Communautés Européennes, 2000. Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les 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. L169/1 – L169/112.
- Journal Officiel de l'Union Européenne, 2008. Directive 2008/61/CE de la Commission du 17 juin 2008 fixant les conditions dans lesquelles certains organismes nuisibles, végétaux, produits végétaux et autres objets énumérés aux annexes I à V de la directive 2000/29/CE du Conseil peuvent être introduits ou circuler dans la Communauté ou dans certaines zones protégées de la Communauté pour des travaux à des fins d'essai ou à des fins scientifiques ou pour des travaux sur les sélections variétales. L158/41 – L158/55.
- Kouassi AB., Kerlan M.C., Caromel B., Dantec J.P., Fouville D., Manzanares-Dauleux M., Ellissèche D., Mugniery D., 2006. A major gene mapped on chromosome XII is the main factor of a quantitatively inherited resistance to *Meloidogyne fallax* in *Solanum sparsipilum*. *Theor. Appl. Genet.*, 112, 699-707

Le Roux-Nio A-C., 2011. Nématodes à galles : Difficile éradication. La Pomme de Terre Française, n°575 – 56-57.

Mugniery D., 2009. Rapport succinct portant sur les deux espèces de nématodes de quarantaine, *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax*, 30 janvier 2009, 35 pages.

Opperman CH., Bird DM., Williamson VM., Rokhsar DS., Burkner M., Cohn J., Cromer J., Diener S., Gajan J., Graham S., Houfek TD., Liu Q., Mitros T., Schaff J., Schaffer R., Scholl E., Sosinski BR., Thomas V. and Windham E., 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: a compact nematode genome for plant parasitism. PNAS 2008 Sep, 105(39), 14802-14807

Van der Beek H.J.G., Mugniery D., 2008. Variation in host status of *Brassica* spp. For isolates of the Columbia root-knot nematode, *Meloidogyne chitwoodi*, and potential mechanisms. Nematology 10, 767-775.

Waeyenberge L, Moens M., 2001. *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* in Belgium. Nematol. Medit., 29, 91-97.

Wesemael W., Moens M., 2012. Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance against temperate root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Pest Manag. Sci. 68, 702-708

Wishart J., Phillips M.S., Blok V.C., 2002. Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. Phytopathology 92, 884–892.

Zijlstra C., Lever A.E.M., Uenk B.J., Van Silfhout C.H., 1995. Differences between ITS regions of isolates of rootknot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology 85, 1231–1237.

Zijlstra C., 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology 106, 283–290.

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 ou DOI).