

**AFPP – JOURNÉE D'INFORMATIONS TECHNIQUES ET SCIENTIFIQUES SUR LE NÉMATODE DU PIN
BORDEAUX– 22 OCTOBRE 2015**

LE NEMATODE DU PIN : DES PRELEVEMENTS D'ÉCHANTILLONS A L'ANALYSE DE ROUTINE

C. SARNIGUET ⁽¹⁾, T. END ⁽²⁾, A.-M. CHAPPE ⁽¹⁾

⁽¹⁾ ANSES ; laboratoire de la santé des végétaux ; unité de nématologie ; BP35327 ; 35653 Le Rheu cedex ; France

⁽²⁾ DRAAF-SRAL Bretagne ; 15 av de Cucillé ; 35047 RENNES cedex 9, France

RÉSUMÉ

Suite à la détection du nématode du pin en Europe en 1999, une surveillance obligatoire a été imposée par l'Union Européenne. Dans le cadre du plan de surveillance mis en place en France par le Ministère en charge de l'Agriculture, des prélèvements pour analyse sont réalisés aussi bien sur bois d'œuvre, bois d'emballage que dans les forêts. Les analyses sont réalisées par morphologie et PCR (Polymérase Chain Reaction) conventionnelle à l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV) de l'Anses. Le nombre d'échantillons prévu par le plan de surveillance a considérablement augmenté depuis 2000 et une méthode de détection sur extrait de bois par PCR en temps réel a été mise au point et validée par le LSV. Elle a permis de déléguer à partir de 2011 les analyses de routine à des laboratoires agréés par le Ministère de l'Agriculture. Le piégeage et l'analyse des insectes vecteurs du genre *Monochamus* est venu compléter le dispositif de surveillance depuis 2013.

Mots-clés : plan de surveillance, laboratoire agréé, *Monochamus*, PCR.

ABSTRACT

PINE WILT NEMATODE: FROM SAMPLING TO ROUTINE ANALYSIS

Following the detection of the Pine Wood Nematode in Europe, a mandatory survey is imposed by the European Union. In France, a national survey plan is implemented by the Ministry in charge of the agriculture. Within this framework, samples for analysis are carried out on lumber, lumber packaging material and trees in forests. The analyses are performed using morphology and conventional PCR at the nematology unit from the Plant Health laboratory of Anses (LSV). Since 2000 the number of samples provided for the survey plan has significantly increased and a direct detection method from wood by Polymerase Chain Reaction real time has been developed and validated by the LSV. It allowed to subcontract from 2011 routine analyses in laboratories approved by the Ministry in charge of Agriculture. Trapping and analysis of insect vectors of the genus *Monochamus* complete the survey in place since 2013.

Keywords: survey plan, approved laboratory, *Monochamus*, PCR.

INTRODUCTION

Le nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*) provoque de graves dégâts sur pins. Son introduction en France aurait de lourdes conséquences économiques et environnementales pour les forêts de pins.

Suite à la découverte d'un foyer de nématode du pin au Portugal en 1999 (Mota *et al*, 1999), une surveillance a été mise en place dans tous les Etats membres de l'Union Européenne dès 2000.

Cette surveillance monte en puissance en France depuis la détection du nématode en Espagne en 2008 (Aballeira, 2011). Le plan de surveillance français est ainsi passé de 300 échantillons de bois en 2000 à 1200 analyses de bois et d'insectes vecteurs depuis la campagne 2013, auxquelles il faut ajouter les contrôles à l'importation des pays tiers qui représentent environ 300 échantillons par an.

Les analyses sur insectes sont réalisées par l'unité de Nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV) de l'ANSES, les échantillons de bois sont partagés entre le LSV et des laboratoires agréés par le Ministère de l'Agriculture pour la réalisation d'analyses officielles.

Mais au-delà du nombre d'analyses réalisées, c'est de la pertinence des lieux de prélèvement, de la fiabilité des méthodes et de la qualité des analyses dont dépend l'efficacité de la surveillance du territoire français.

PRELEVEMENTS SUR BOIS

Les prélèvements d'échantillons de bois destinés à l'analyse sont effectués dans toutes les régions françaises par les services officiels de l'état : SRAL (Service Régional de l'Alimentation) et FREDON (Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles) par délégation de service public. Ils concernent aussi bien les forêts que les bois d'œuvre et bois d'emballage. Les prélèvements sur bois et bois d'emballage importés de pays tiers sont effectués par les agents du SIVP (Service d'Inspection vétérinaire et phytosanitaire aux frontières)

Les modalités de prélèvements pour le nématode du pin sont détaillées dans les notes de service rédigées par le Ministère de l'Agriculture relatives à la surveillance du territoire (Note de service DGAL/SDQPV/N 2009-8095, lettre à diffusion limitée BSSV/2011-06-021, note de service DGAL/SDQPV/N 2013-8132) et à l'importation de bois (Lettre à diffusion limitée DGAL/SDASEI/L 2013-0234, lettre ordre de service LOS/BSV/2007-02-003).

SITES STRATEGIQUES A SURVEILLER

Deux types de sites sont ciblés dans le cadre du plan de surveillance du territoire, afin de favoriser la détection précoce du nématode : les sites dits sensibles et les sites où sont présents des peuplements de résineux hôtes.

Sites sensibles

Ils sont définis comme des lieux ponctuels recevant et stockant du bois, de l'écorce ou des végétaux de conifères, hors Thuya (lieux à partir duquel le nématode pourrait se disséminer). Ce sont des sites tels que des entreprises recevant des écorces du Portugal, les pépinières et jardinerie faisant du commerce de pins, les scieries, les usines de pâtes à papier, les aires de stockage de bois, les fabricants et négociants de palettes en bois, les lieux de concentration importante de palettes en bois, les ports recevant du bois, les gares ferroviaires, les voies de communications, etc.

Les matériels en bois à échantillonner en priorité sont ceux originaires du Portugal et d'Espagne. De même pour les végétaux à inspecter en jardinerie, pépinières, la surveillance porte exclusivement sur les végétaux originaires du Portugal ou autres états membres ayant déclaré des foyers. Les inspections doivent garantir la présence du Passeport Phytosanitaire Européen (PPE) sur les végétaux ainsi que la marque NIMP 15 attestant de la réalisation d'un traitement à la chaleur ou diélectrique (micro-ondes).

Pour les contrôles à l'importation, les prélèvements sont effectués en priorité sur le matériel en provenance de pays à risques (reconnus contaminés).

Zones où se situent des peuplements de résineux

Elles sont définies comme des zones présentant des peuplements d'espèces hôtes où le nématode est susceptible de s'établir et de proliférer. Il s'agit aussi bien de forêts, plantations forestières, bosquets, arbres en alignements le long de voies de communication et pins plantés dans des espaces verts.

On distingue parmi celles-ci les « zones sensibles », peuplements situés au voisinage de sites sensibles et les peuplements « hors zone sensible ».

L'inspection porte en priorité sur les peuplements présentant des signes de dépérissement ou morts ou présentant des symptômes d'attaque de *Monochamus*, puis sur les arbres ayant subi des incendies, dégâts de neige, vent etc.

Les services chargés de la surveillance identifient ces sites sensibles grâce à une analyse de risques. Pour les peuplements à surveiller ils s'appuient sur les signalements réalisés par les correspondants observateurs du Département Santé des Forêts (DSF).

MODALITES DES PRELEVEMENTS

La surveillance des sites sensibles, du bois à l'importation et des peuplements est réalisée après examen visuel par des prélèvements d'échantillons.

Sur le bois tels que rondins, grumes, arbres sur pied dépérissant, végétaux ou arbres abattus, bois d'emballage ou d'arrimage, les prélèvements sont réalisés à la scie ou à la perceuse.

Les recommandations suivantes sont à appliquer pour les prélèvements:

- Il convient d'échantillonner en priorité les bois présentant des symptômes de développement de champignons (bleuissement) ou présentant des trous d'émergence d'insectes.

- dans le cas de bois ronds, la prise est effectuée le plus près possible du houppier (zone de l'arbre où la présence du nématode est la plus probable en cas d'attaque récente).

- les morceaux de bois ne doivent pas dépasser 3cm x3cm x5cm afin de garantir l'absence d'envoi du vecteur vivant au laboratoire d'analyses.

- l'échantillon final doit être de 200 à 300g sauf dans le cas du bois d'emballage ou de prélèvements à l'importation où 150 à 200g sont suffisants.

Dans tous les cas, une désinfection du matériel de prélèvement est nécessaire entre chaque prise d'échantillon par trempage dans de l'alcool ou à la chaleur.

PERIODES

Les inspections sont réalisées tout au long de l'année pour les matériaux en bois et pour l'importation.

Pour les prélèvements en peuplements de résineux, les prélèvements sur arbres abattus sont réalisés en hiver, après la période d'abattage. Les prélèvements sur arbres symptomatiques ou morts ont lieu suite aux signalements des correspondants observateurs du DSF.

ENVOIS

Les prélèvements effectués sur bois d'emballage et bois à l'importation sont expédiés exclusivement à l'unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses (LSV) pour des raisons de rapidité de réponse en cas de consignation de marchandises.

Les autres prélèvements de bois sont homogénéisés et répartis en 2 sacs, portant le même numéro d'échantillon, ils sont expédiés dans un des laboratoires agréés par le Ministère en charge de l'agriculture pour réaliser les analyses officielles. L'analyse y sera réalisée sur un des sacs et le doublon sera expédié pour confirmation au LSV en cas de résultat de test positif.

PIEGEAGE DES INSECTES

Les évolutions de techniques de piégeage de l'insecte vecteur et de détection du nématode dans le corps de l'insecte ont permis de compléter le dispositif de surveillance par le recours à un réseau de pièges depuis la campagne 2013. La méthode de piégeage est décrite dans la note de service du Ministère en charge de l'Agriculture DGAL/SDQPV/ N2013-8102.

Ces insectes vecteurs piégés dans toutes les régions de France sont destinés à être analysés pour déterminer s'ils sont porteurs du nématode.

PERIODES

Les vols peuvent se produire dès avril dans le sud de la France. Ailleurs, ils sont observés dès que les températures dépassent les 18-20°C. Le pic de vol ayant lieu généralement entre juin et août, il est conseillé de placer les pièges durant cette période, la durée de piégeage est fixée à 40 jours.

SITES

En forêt, les pièges sont placés en zone ouverte à l'intérieur de peuplements de pins et autres conifères. Les parcelles à privilégier sont celles âgées de 20-40 ans comportant si possible du bois mort au sol, ayant subi des incendies ou proches de sites sensibles (scieries, ports, zones de stockage par exemple).

METHODE

-le piège d'interception choisi est de type Crosstrap® (figure 1)

-les attractifs utilisés sont de la marque Galloprotect®, ils contiennent une phéromone d'agrégation (hormone produite par l'un ou l'autre sexe, elles attirent les insectes adultes des deux sexes), des substances kairomonales (molécules odorantes qui permettent à un insecte de repérer les plantes dont il se nourrit, des sites de pontes ou des proies) et des terpènes (classe d'hydrocarbures, produits par les conifères, composants majeurs de la résine).

-les pièges sont équipés dans leur partie inférieure d'un bol de récolte à fond grillagé, au fond duquel est placé un filet traité avec un insecticide autorisé pour cet usage (cyperméthrine).

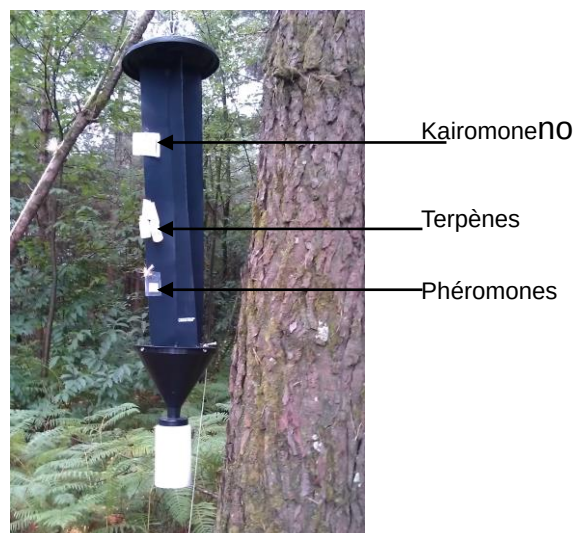


Figure 1 : piège de type Crosstrap® (photo DRAAF-SRAL Bretagne)

-Les relevés de piégeages sont réalisés au minimum tous les 10 jours durant les 40 jours de la surveillance.

Un opérateur trie les *Monochamus* qui sont envoyés au LSV pour analyse. Les autres insectes sont envoyés au Laboratoire National d'Entomologie forestière de l'Office National des Forêts (11500 Quillan) pour identification.

METHODES OFFICIELLES D'ANALYSES PRATIQUES DANS LE CADRE DU PROCESSUS OFFICIEL

Trois méthodes d'analyses pour la détection de *B. xylophilus* ont été mises au point et validées par l'unité de Nématologie du LSV de l'ANSES puis officialisées par le Ministère en charge de l'Agriculture. Elles respectent les recommandations développées par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) pour le diagnostic des organismes réglementés (OEPP, 2009).

- Une méthode dite « de criblage » qui est réalisée par amplification génomique en temps réel (RT-PCR, voir définition dans encadré ci-dessous) référencée MOA 020 partie A (Anses, 2011a). Elle permet de traiter un grand nombre d'échantillons car elle est réalisée directement sur l'extrait de bois et ne demande aucune compétence en morphologie. Elle a ainsi pu être transférée à des laboratoires agréés par le Ministère en charge de l'Agriculture. Cette méthode se base sur les outils décrits dans les publications de François *et al* (2007) et Ioos *et al*. (2009). En cas de test trouvé positif, la partie doublon de l'échantillon concerné est envoyée au LSV pour confirmation. Elle y sera traitée selon la méthode officielle citée ci-après.
- Une méthode d'identification qui s'appuie sur une approche morphologique, suivie d'une analyse par PCR conventionnelle (voir définition dans encadré ci-dessous) sur individus isolés référencée MOA 020 partie B (Anses, 2011b). Cette méthode est utilisée uniquement au LSV, pour l'analyse de bois de palettes et d'importation et pour les confirmations d'échantillons

trouvés positifs par les laboratoires agréés. Elle a été mise au point à partir des outils publiés par Braasch (2008), l'OEPP (2009) pour la partie morphologie et par Matsunaga et Togashi (2004) pour la partie PCR.

- Une méthode de détection du nématode dans l'insecte référencée MOA 020 partie C (Anses, 2015), qui repose sur le test de PCR temps réel déjà décrit dans la MOA 020 partie A.

LES ACTEURS

Les analyses sont réalisées par l'unité de Nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux de l'Anses (LSV) mais également depuis 2011, pour répondre à l'augmentation du nombre d'échantillons, par des laboratoires agréés par le Ministère en charge de l'Agriculture pour la réalisation d'analyses officielles. Les agents des laboratoires agréés ont été formés par le LSV aux techniques de détection. Comme l'agrément le prévoit, ces laboratoires sont suivis par le LSV et leur aptitude évaluée régulièrement par des Essais Inter Laboratoires organisés par le LSV.

Les analyses sont conduites sous assurance qualité et selon la norme 17025. A ce titre les agents en charge des analyses sont formés et habilités, leur habilitation vérifiée par des suivis de compétence. Les processus sont maîtrisés grâce à l'utilisation de contrôles, de procédures écrites. De plus, les laboratoires sont accrédités par le Comité français d'accréditation (COFRAC).

METHODES DE DETECTION A PARTIR DU BOIS

Extraction des nématodes à partir du bois

La première étape de l'analyse, commune aux différentes méthodes d'analyses à partir du bois, consiste à extraire les nématodes de leur matrice.

La méthode d'extraction recommandée, dite méthode par migration ou technique de Baermann (1917) modifiée (OEPP, 2013), utilise la capacité des nématodes libres à quitter leur milieu naturel et à se déplacer dans l'eau en se dirigeant vers le bas par gravité.

-Les échantillons de bois reçus au laboratoire sont placés sur un support tel qu'un tamis ou une passoire (Figure 2) qui repose dans l'eau d'une cuvette.

-Le tout est laissé à incuber pendant 24 heures, temps nécessaire aux nématodes présents dans l'échantillon pour migrer dans l'eau de la cuvette.



Figure 2 : migration sur tamis des échantillons
(Photo Anses-LSV)

-L'eau de trempage est ensuite filtrée sur un tamis à mailles très fines qui va retenir les nématodes, le contenu du tamis est récupéré dans un pot de lecture. Cet extrait est conservé au froid.

Détection directe dans l'extrait de bois (MOA020partie A)

Cette première méthode concerne les échantillons de bois prélevés dans le cadre du plan de surveillance français (hors bois d'emballage). C'est une méthode dite de « criblage » car elle permet d'analyser de manière standardisée un nombre important d'échantillons et éliminer la majorité des échantillons négatifs. Cette méthode ne fait pas appel à des connaissances de morphologie et ne nécessite pas pour cette raison d'une grande expérience en nématologie c'est pourquoi elle a pu aisément être déléguée à des laboratoires agréés sans perdre en efficacité et fiabilité.

Principe de la méthode

L'extrait obtenu après migration est décanté dans un tube à fond conique. Le décantât est prélevé et centrifugé dans un micro-tube. Après broyage avec des billes de verre, une extraction d'ADN à l'aide d'un kit commercial est réalisée sur le culot broyé. L'ADN analysé par PCR en temps réel (voir définition dans encadré ci-dessous) nous informe sur l'absence ou non de *Bursaphelenchus xylophilus* mais également sur la qualité des différentes étapes de la manipulation. En effet, les analyses sous assurance qualité imposent d'intégrer des échantillons témoins (Figure 3) à chaque étape critique du processus. Ainsi, une analyse est jugée conforme et les résultats validés uniquement si tous les témoins donnent le résultat attendu.

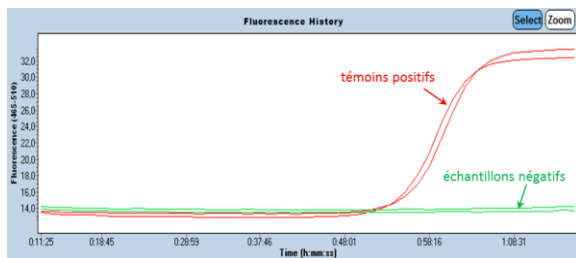


Figure 3 : Exemple de résultats obtenus lors d'une amplification par PCR temps réel

Un résultat de test positif par cette méthode, bien que fiable, nécessite cependant la confirmation de la présence du nématode par une méthode mettant en œuvre l'observation morphologique d'un individu.

Identification des nématodes par analyse morphologique et PCR conventionnelle (MOA020partie B)

Cette méthode est mise en œuvre sur le bois d'emballage et les prélèvements à l'import mais également pour confirmer un résultat de test positif d'un laboratoire agréé. Cette confirmation réalisée par le LSV, **constitue le résultat officiel de l'analyse**. Elle est réalisée sur le doublon du prélèvement.

Principe de la méthode

-L'extrait obtenu après migration est observé à la loupe binoculaire.

-Les nématodes proches du genre *Bursaphelenchus* sont montés entre lame et lamelle pour une observation au microscope à fort grossissement (Figure 4).



Figure 4 : *B. xylophilus* au microscope
Grossissement x 400 (photo Anses-LSV)

-Les critères caractéristiques de l'espèce *B. xylophilus* sont recherchés au microscope à grossissement x1000:

Un spicule long et arqué chez le mâle (Figure 5) et chez la femelle l'extrémité de la queue arrondie (Figure 6) et un fort recouvrement vulvaire et (Figure 7).

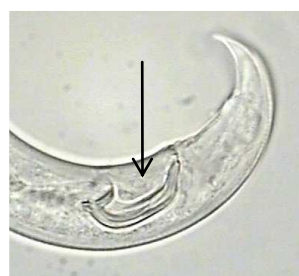


Figure 5 : spicules ♂



Figure 6 : ♀ extrémité de la queue arrondie
Photos Anses-LSV , grossissement x 1000

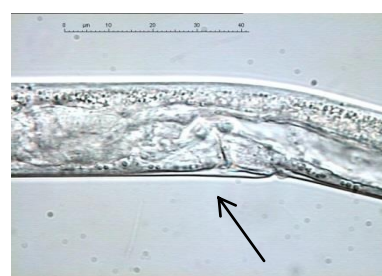


Fig 7: ♀ recouvrement vulvaire

Lorsque tous les critères spécifiques sont observés, l'échantillon peut-être déclaré positif vis-à-vis de *B. xylophilus* mais une confirmation par PCR conventionnelle (voir définition dans encadré ci-dessous) selon le test développé par Matsunaga et Togashi (2004) est systématiquement réalisée pour confirmer l'identification.

Pour cela des individus appartenant au genre *Bursaphelenchus* sont prélevés et broyés à l'aide de billes de verre dans un tampon contenant de la protéinase K. Une analyse en PCR conventionnelle est réalisée et les résultats observés après électrophorèse et révélation des produits amplifiés (Figure 8).

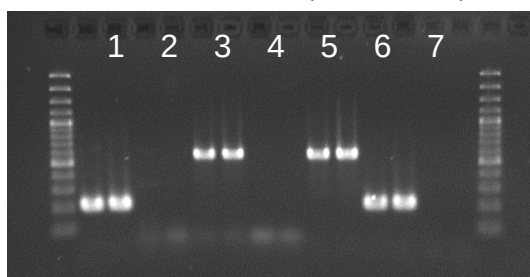


Figure 8 : Exemple de PCR selon Matsunaga et Togashi (2004) : identification de *B. mucronatus* et *B. xylophilus*

1 et 6 : *B. mucronatus* ; 2 : *B. fraudulentus* ; 3 et 5 : *B. xylophilus* ; 4 et 7 : témoins négatifs.

Cette méthode d'identification est pratiquée exclusivement au LSV, elle demande beaucoup d'expérience et de pratique pour la partie morphologie, elle ne peut être transférée à un autre laboratoire pour une analyse de routine.

METHODE DE DETECTION DANS L'INSECTE (MOA020 PARTIE C)

Les nématodes se trouvent dans le système respiratoire de l'insecte, la partie postérieure des insectes comprend environ 95% des nématodes (Naves *et al.*, 2006).

Les *Monochamus* reçus au laboratoire sont regroupés par 10 individus, ils sont coupés en 2 au niveau du prothorax (Figure 9), les parties thorax et abdomen sont broyées avec une bille d'acier dans du tampon.

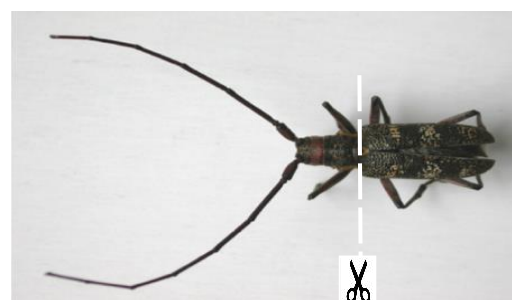


Figure 9 : schéma de coupe d'un *Monochamus* (photo Anses-LSV)

On réalise une extraction de l'ADN global provenant des insectes et des éventuels nématodes à l'aide d'un kit commercial sur le broyat obtenu. Cet ADN est analysé par PCR temps réel (François *et al.*, 2007) afin de détecter le nématode s'il est présent. Le bon déroulement de la manipulation est vérifié par l'amplification de l'ADN des insectes (Ioos *et al.*, 2009) et l'analyse des résultats des divers témoins inclus aux étapes critiques de l'analyse.

CONCLUSION

La France métropolitaine offre des conditions favorables à l'installation et à la dispersion du nématode du pin, à savoir : la présence avérée d'insectes vecteurs sur une large partie du territoire, un peuplement conséquent et parfois continu de conifères et des conditions climatiques favorables au développement du nématode et à l'expression des symptômes.

En accord avec les textes européens, L'Etat français a construit et développé une stratégie de surveillance depuis le début des années 2000 pour permettre aujourd'hui un suivi régulier de vecteurs du nématode, des peuplements de pins, mais aussi de sites sensibles. Le dispositif mis en place et ses acteurs contribuent à assurer une détection précoce du nématode s'il était présent.

Cette détection précoce est possible d'une part par l'application rigoureuse de consignes pour le repérage et le prélèvement de matériel pour analyse, et d'autre part par le recours à des techniques d'analyses sensibles et fiabilisées. Ces dispositions pratiques sont révisées régulièrement pour tenir compte de l'évolution des connaissances et traduites dans des notes de service ad hoc.

Dans l'hypothèse d'une détection positive, le Ministère en charge de l'Agriculture s'est doté d'un plan d'urgence incluant des mesures adaptées et qui serait déclenché selon les modalités de la note de service en vigueur (Lettre à diffusion limitée BSSV/2011-04-002) et de la réglementation européenne (décision d'exécution européenne 2012/535/UE).

Définition de la PCR

PCR est l'abréviation du terme anglais *Polymerase Chain Reaction*. C'est une technique de biologie moléculaire. Elle permet de multiplier un fragment d'ADN spécifique présent en une infime quantité au départ en un grand nombre de copies (multiplication exponentielle, de l'ordre du milliard de copies). Le grand nombre de copie du fragment ADN ainsi produit permet de détecter la présence d'un organisme cible.

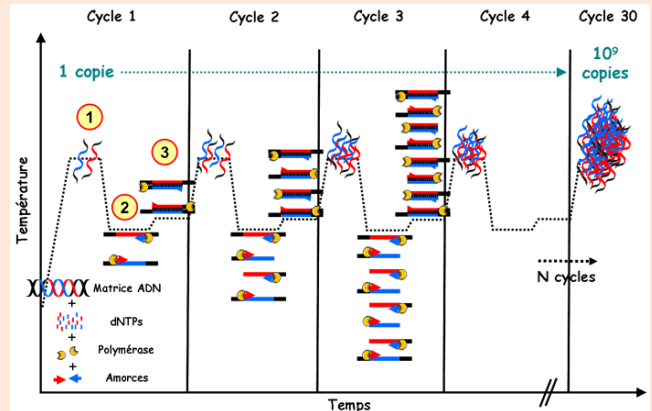
Principe de la technique :

Elle consiste à réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice d'ADN double brin.

Chaque réaction met en œuvre deux amorces (séquences courtes de nucléotides) spécifiques de l'organisme recherché, des bases nucléotidiques, et une enzyme (polymérase).

Chaque réaction est constituée de trois étapes réalisées à des températures différentes et spécifiques:

1. 95°C : séparation des doubles brins d'ADN
2. entre 50 et 60°C : accrochage des amorces spécifiques sur les ADN simple brin
3. 72°C : synthèse du brin complémentaire grâce à l'action de la polymérase.



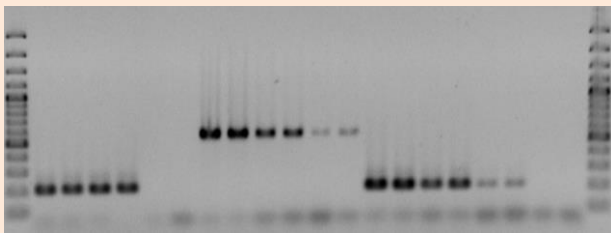
Exemple de cycles PCR (<https://ed414-openlab.unistra.fr/les-tp/adn-et-genetique-2009-2012/>)

Ces réactions s'opèrent dans un tube qui est placé dans un thermocycleur. C'est un appareil équipé d'un bloc chauffant qui permet de programmer des cycles de températures couplés à une durée. La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute et l'appareil fait entre 30 et 40 cycles pour une manipulation.

Les produits d'amplification sont visualisés:

- soit en fin de réaction (**PCR conventionnelle**) :

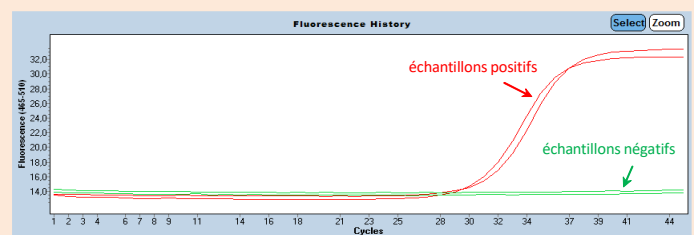
Dépôt du produit PCR dans un gel puis électrophorèse (migration en champ électrique) et révélation à l'aide d'un agent intercalant de l'ADN.



Exemple de gel après révélation

- soit à la fin de chaque cycle (**PCR temps réel**) :

Des fluorophores (substances chimiques émettant une fluorescence) sont intégrés dans le mélange de départ et à chaque fin de cycle, l'appareil vient lire la fluorescence du tube qui apparaît alors sur écran.



Exemple de graphique obtenu suite à une manipulation

BIBLIOGRAPHIE

Publications

Aballeira A., Picoaga A., Mansilla J.P., Aguin O., 2011 - Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* , causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant disease*, 95, 6, 776.

Anses, 2011a – MOA020 partie A version 1a : Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères. Disponible sur :

https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/LABO-Ft-MOA020A-Bursa-PCR_0.pdf

Anses, 2011b – MOA020 partie B version 1a : Détection et identification par analyse morphologique et biomoléculaire du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*. Disponible sur :

<https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/LABO-Ft-MOA020B-Bursa-confirm.pdf>

Anses, 2015 – MOA020 partie C version 1a : Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel dans un groupe d'insectes vecteurs. Disponible sur :

https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MOA020%20partie%20C%20version%201a_d%C3%A9tection%20PCR%20tps%20r%C3%A9el%20version%20finale.pdf

Baermann G., 1917 – Ein einfache methode zur auffindung von *Anklyostomum* (Nematoden) larven in erdproben. *Geneesk Tijdschr Nederlandsch-Indie*, 57,131-137.

Braasch H., 2008 - The enlargement of the *xylophilus* group in the genus *Bursaphelenchus*. In: Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems. Mota M. and Vieira P., Eds. Springer, 139-149.

François C., Castagnone C., Boonham N., Tomlison J., Lawson R., Hockland S., Quill J., Vieira P., Mota M. and Castagnone-Sereno P., 2007 - Satellite DNA as target for Taqman realtime PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8 (6), 803-809.

Ioos R., Fourrier C., Iancu G. and Gordon T.R., 2009 - Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology*, 99, 582-590.

Matsunaga K. and Togashi K., 2004 - A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species-specific polymerase chain reaction. *Nematology*, 6 (2), 273-277.

Mota M., Braasch H., Bravo M.A., Penas A.C., Burgermeister W., Metge K., Sousa E., 1999 – First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1, 727-734.

Naves P. M., Camacho S., Sousa E. M. and Quartau J. A. , 2006 - Entrance and distribution of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* on the body of its vector *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Entomologia Generalis*, 29, 71–80.

Nickle W.R., Golden A., Mamiya Y. and Wergin W.P., 1981 - On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Burher 1934) Nickle 1970. *Journal of Nematology*, 13, 385-392.

OEPP/EPPO, 2009 – PM 7/4 (2) Normes de diagnostic pour les organismes réglementés: *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO*, 39, 344-353.

OEPP/EPPO, 2013 – PM 7/119 (1) Nematodes extraction. *Bulletin OEPP/EPPO*, 43,3, 471-495.

Législation et réglementation

2012/535/UE - Décision d'exécution de la commission du 26 septembre 2012 relative aux mesures d'urgence destinées à prévenir la propagation, dans l'Union, de *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. (nématode du pin) [notifiée sous le numéro C(2012) 6543] *Journal Officiel de l'Union Européenne* L 266 du 02.10.2012, pages 42-52.

Lettre à diffusion limitée BSSV/2011-04-002 du 04 avril 2011 - Déclinaison régionale du plan d'urgence « nématode du pin ».

Lettre à diffusion limitée BSSV/2011-06-021 du 27 juin 2011 - Modification des modalités de prélèvements et d'envoi des échantillons dans le cadre du plan de surveillance relatif au nématode du pin.

Lettre à diffusion Limitée DGAL/SDASEI/L 2013-0234 du 16 décembre 2013 - Contrôle à l'importation des emballages en bois.

Lettre-Ordre de Service LOS/BSV/2007-02-003 du 01 février 2007 - Rappel de la réglementation relative au bois soumis au contrôle phytosanitaire pour entrer dans la Communauté et exigences particulières à respecter.

Note de service DGAL/SDQPV/N 2009-8095 du 23 mars 2009 - Plan annuel de surveillance relatif au nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*) en France.

Note de service DGAL/SDQPV/ N2013-8102 du 25 juin 2013 - Méthode de piégeage de coléoptères du genre *Monochamus* à mettre en oeuvre dans le cadre de la surveillance du nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*).

Note de service DGAL/SDQPV/N 2013-8132 du 31 juillet 2013 - Plan annuel de surveillance relatif au nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*) en France.