



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture



Convention Internationale
pour la Protection
des Végétaux

DEVELOPPEMENT DES CAPACITÉS

04
2020

FR

Guide pour la Prestation de Services de Diagnostic Phytop sanitaire



Ministry for Primary Industries
Manatū Ahu Matua





Guide pour la Prestation de Services de Diagnostic Phytosanitaire

Publié par
l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
et
le Comité de Liaison Europe-Afrique-Caraïbes-Pacifique
Rome, 2020

Citer comme suit:

FAO et COLEACP. 2020. *Guide de prestation de services de diagnostic phytosanitaire*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca6374fr>

Les appellations employées dans ce produit d'information et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ou du Comité de Liaison Europe-Afrique-Caraïbes-Pacifique (COLEACP) aucune prise de position quant au statut juridique ou au stade de développement des pays, territoires, villes ou zones ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Le fait qu'une société ou qu'un produit manufacturé, breveté ou non, soit mentionné ne signifie pas que la FAO ou le COLEACP approuvent ou recommandent ladite société ou ledit produit de préférence à d'autres sociétés ou produits analogues qui ne sont pas cités.

Les opinions exprimées dans ce produit d'information sont celles du/des auteur(s) et ne reflètent pas nécessairement les vues ou les politiques de la FAO ou du COLEACP.

ISBN 978-92-5-133414-0 [FAO]

© FAO, 2016 (Edition anglaise)

© FAO, 2020



Certains droits réservés. Cette œuvre est mise à la disposition du public selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Partage dans les Mêmes Conditions 3.0 Organisations Intergouvernementales (CC BY NC SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/legalcode.fr>).

Selon les termes de cette licence, cette œuvre peut être copiée, diffusée et adaptée à des fins non commerciales, sous réserve que la source soit mentionnée. Lorsque l'œuvre est utilisée, rien ne doit laisser entendre que la FAO cautionne tels ou tels organisation, produit ou service. L'utilisation du logo de la FAO n'est pas autorisée. Si l'œuvre est adaptée, le produit de cette adaptation doit être diffusé sous la même licence Creative Commons ou sous une licence équivalente. Si l'œuvre est traduite, la traduction doit obligatoirement être accompagnée de la mention de la source ainsi que de la clause de non-responsabilité suivante: «La traduction n'a pas été réalisée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). La FAO n'est pas responsable du contenu ni de l'exactitude de la traduction. L'édition originale [langue] est celle qui fait foi.»

Tout litige relatif à la présente licence ne pouvant être résolu à l'amiable sera réglé par voie de médiation et d'arbitrage tel que décrit à l'Article 8 de la licence, sauf indication contraire contenue dans le présent document. Les règles de médiation applicables seront celles de l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle (<http://www.wipo.int/amc/fr/mediation/rules>) et tout arbitrage sera mené conformément au Règlement d'arbitrage de la Commission des Nations Unies pour le droit commercial international (CNUDCI).

Matériel attribué à des tiers. Il incombe aux utilisateurs souhaitant réutiliser des informations ou autres éléments contenus dans cette œuvre qui y sont attribués à un tiers, tels que des tableaux, des figures ou des images, de déterminer si une autorisation est requise pour leur réutilisation et d'obtenir le cas échéant la permission de l'ayant-droit. Toute action qui serait engagée à la suite d'une utilisation non autorisée d'un élément de l'œuvre sur lequel une tierce partie détient des droits ne pourrait l'être qu'à l'encontre de l'utilisateur.

Ventes, droits et licences. Les produits d'information de la FAO sont disponibles sur le site web de la FAO (www.fao.org/publications) et peuvent être obtenus sur demande adressée par courriel à: publications-sales@fao.org. Les demandes visant un usage commercial doivent être soumises à: www.fao.org/contact-us/licence-request. Les questions relatives aux droits et aux licences doivent être adressées à: copyright@fao.org.

Table des matières

Abréviations et acronymes	ix
Remerciements	x
1. INTRODUCTION	1
Pourquoi un guide des laboratoires de diagnostic ?	1
Comment utiliser ce guide	3
Structure du guide	4
Section 1 - Laboratoire de diagnostic	7
Introduction	7
1. BASE OPÉRATIONNELLE DU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC	8
Introduction	8
1.1 Considérations relatives à la durabilité	8
1.2 Plans stratégiques	9
1.3 Mécanismes de financement	10
1.4 Conseil juridique	11
1.5 Ressources humaines	11
1.6 Formation du personnel de laboratoire	12
2. INFRASTRUCTURE MATÉRIELLE DU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC DES VÉGÉTAUX	14
Introduction	14
2.1 Fonctions du laboratoire de diagnostic	14
2.2 Site du laboratoire	15
2.3 Les installations de laboratoire	16
2.4 Plans d'urgence - laboratoire de quarantaine	18
2.5 Hygiène	19
2.6 Collections de référence	19
2.7 Services du laboratoire	20
2.8 Contrôles environnementaux (ventilation, température et humidité)	20
2.9 Pratiques de travail normalisées	20
2.10 Équipements du Laboratoire	21
2.11 Pratiques de travail sécurisées	22
2.12 Élimination des déchets de quarantaine	22
3. INFRASTRUCTURE NON MATÉRIELLE	25
Introduction	25
3.1 Système qualité	25
3.2 Responsabilités de la direction	29
3.3 Gestion des ressources	32
3.4 Mesure, analyse et amélioration	34
3.5 Exigences techniques	37
3.6 Documents modèles	42
3.7 Système de gestion de l'information de laboratoire	50
3.8 Références	52

Section 2 - Déroulement du travail de laboratoire.....	53
Aperçu	53
4. GESTION DES ÉCHANTILLONS	54
Introduction.....	54
4.1 Réception de l'échantillon	54
4.2 Exemple d'enregistrement.....	54
4.3 Examen de l'échantillon	55
5. DIAGNOSTIC.....	59
Introduction.....	59
5.1 Méthodes de diagnostic	59
5.2 Vérification des nouvelles méthodes.....	64
5.3 Formation du personnel de laboratoire.....	65
5.4 Méthodologies de diagnostic.....	65
5.5 Informations complémentaires	84
5.6 Bibliographie.....	86
6. ÉCHANTILLONS D'IMAGERIE.....	88
Introduction.....	88
6.1 Pourquoi prendre des images pour le diagnostic ?	88
6.2 Qu'est-ce qu'une image scientifique ?.....	88
6.3 Procédure de travail.....	88
7. TÉLÉDIAGNOSTIC POUR LES ORGANISMES NUISIBLES	90
Introduction.....	90
7.1 Qu'est-ce que le télédiagnostic et pourquoi en avons-nous besoin ?	90
7.2 Méthodes de communication pour la microscopie à distance en temps réel.....	94
7.3 Processus de diagnostic à distance pour l'éducation et la formation.....	95
7.4 Conclusions.....	98
8. COLLECTIONS DE RÉFÉRENCE.....	100
Introduction.....	100
8.1 Exigences générales.....	100
8.2 Collection entomologique de référence	103
8.3 Collection nématologique de référence	118
8.4 Collection de phytopathogènes et herbier de référence	119
8.5 Autres collections de référence.....	126
9 . RAPPORTS.....	128
10. LE DEVENIR DE L'ÉCHANTILLON	129
Introduction.....	129
10.1 Mise au rebut.....	129
10.2 Conservation de l'échantillon ou du spécimen.....	129
Section 3 - Autres sources d'information	131
Introduction.....	131
Bibliographie.....	132

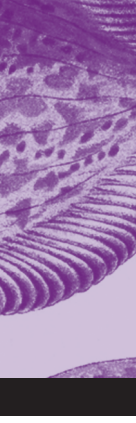
Abréviations et acronymes

ASP	Société américaine de phytopathologie
AQIS	Service australien de quarantaine et d'inspection
BSPP	Société britannique de phytopathologie
DAS	Méthode ELISA sandwich à double anticorps
DIC	Microscope à contraste interférentiel différentiel
DMZ	Data management zone
DOI	Digital object identifier
DPV	Descriptions of plant viruse
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Essai immuno-enzymatique
EPPO	Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des végétaux
UE	Union européenne
Fera	Fera Science Ltd
FTP	Protocole de transfert de fichiers
OGM	Organisme génétiquement modifié
HTTP	Protocole de Transfert Hypertexte
HVAC	Chauffage, ventilation et climatisation
IAA	Isopentanol
ID	Identification
IDCR	Centres d'enquête de diagnostic et d'intervention
IgG	Immunoglobuline G
IP	Protocole Internet
CIPV	Convention internationale pour la protection des végétaux
ISO	Organisation internationale de normalisation
NIMH	Normes internationales pour les mesures phytosanitaires
ISPP	Société internationale de phytopathologie
IT	Technologies de l'information
LAMP	Amplification isotherme en boucle
LAN	Réseau local
LFD	Dispositif d'écoulement latéral
SGL	Système(s) de gestion de l'information de laboratoire
M-MLV	Virus de la leucémie murine de Moloney
MON	Modes opératoires normalisés
MPI	Ministère des industries primaires, Nouvelle-Zélande
MSDS	Fiches de données de sécurité
NASH	Hybridation par tache d'acide Nucléique
NCBI	Centre national d'information sur la biotechnologie
NPPO	Organisation nationale de la protection des végétaux
PBST	Solution saline tamponnée au phosphate contenant du Tween
PCR	Amplification en chaine par polymérase
PDA	Gélose dextrosée à la pomme de terre

PHEL	Laboratoire de santé végétale et d'environnement
PQR	Système de recherche de données des espèces végétales de quarantaine de l'OEPP
ProMED	Programme de surveillance des maladies émergentes
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QIF	Amélioration de la qualité
SMQ	Système de gestion de la qualité
R&D	Recherche et développement
ORPV	Organisation régionale de la protection des végétaux
RT	Transcription inversée
SDS	Sulfate de dodécyle de sodium
SDWS	Eau distillée stérile
SPS	Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires de l'OMC
TAF	Solution de triéthanolamine, de formaldéhyde et d'eau
TAS	Technique ELISA à triple-anticorps
TE	Tampon Tris EDTA
UV	Ultra-violet
WAN	Réseau étendu (externe)
OMC	Organisation mondiale du commerce

Remerciements

Ce guide a été co-produit par le COLEACP, dans le cadre du programme FFM-SPS financé par l'Union Européenne à la demande du Groupe des États ACP.



Introduction

Le Secrétariat de la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV), sous la supervision du Comité de renforcement des capacités de la CIPV, a élaboré une série de ressources techniques destinées à soutenir la mise en œuvre de la CIPV au niveau national. Ces ressources visent à fournir des informations et des solutions à l'appui de la mise en œuvre des droits, responsabilités et obligations nationaux dans le cadre de la CIPV.

Ce guide fournit de l'information à l'appui de l'établissement, de l'exploitation et de l'entretien de laboratoires et de services de diagnostic afin d'appuyer les systèmes phytosanitaires nationaux.

Pourquoi un guide des laboratoires de diagnostic ?

Les systèmes phytosanitaires sont importants pour prévenir l'introduction et la propagation des organismes nuisibles.

La CIPV est l'accord juridique international qui constitue le fondement des mesures phytosanitaires. La CIPV a été adoptée par 182 parties contractantes, qui coopèrent pour garantir la sécurité alimentaire, protéger l'environnement et faciliter le commerce international.

La CIPV adopte des normes internationales pour les mesures phytosanitaires (NIMP) qui fixent des exigences pour différents types d'actions. Ces NIMP servent de base aux pays qui adoptent des mesures phytosanitaires pouvant avoir des conséquences importantes, reconnues par l'Accord sur les mesures sanitaires et phytosanitaires de l'Organisation mondiale du commerce (OMC-SPS). Selon le texte de la Convention, les mesures phytosanitaires doivent être techniquement justifiées et compatibles avec le risque présenté. Pour être techniquement justifiées, bon nombre des procédures et systèmes phytosanitaires exigés par la CIPV reposent sur des diagnostics précis. Les services de diagnostic sont donc essentiels

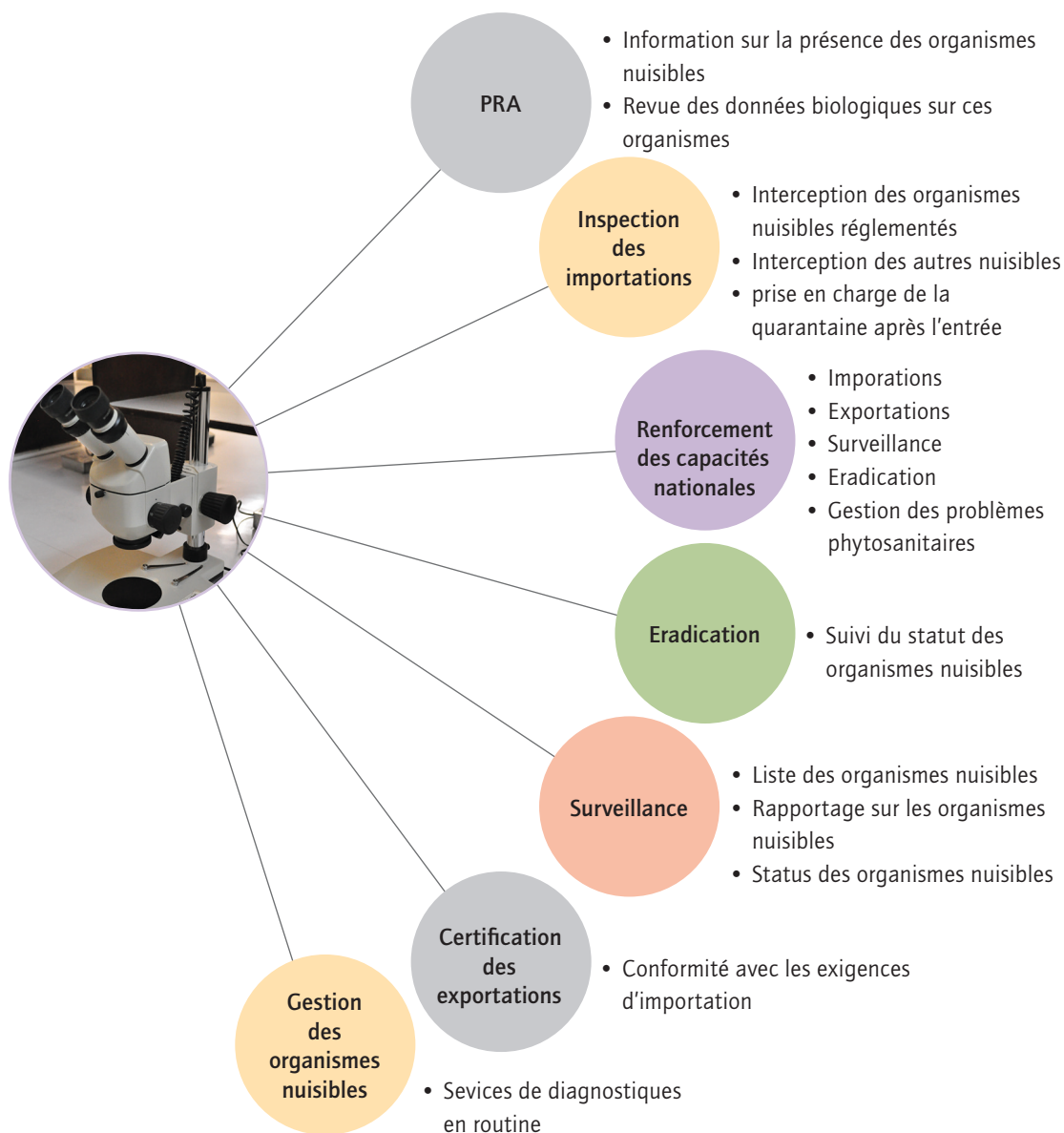
pour s'acquitter des obligations et responsabilités découlant de la CIPV, ainsi que de l'accord SPS de l'OMC.

Les responsabilités et obligations de l'ONPV qui dépendent des diagnostics incluent (Figure 1) :

- l'analyse des risques phytosanitaires (article IV.2(f) de la CIPV ; NIMP 2 et 11), car les diagnostics peuvent fournir des informations essentielles pour clarifier les risques phytosanitaires spécifiques devant être analysés
- la mise en place de mesures phytosanitaires appropriées à l'importation (article VII ; NIMP 20), car ces mesures devraient être fondées sur une analyse des risques phytosanitaires, qui devrait être étayée par des diagnostics
- la vérification à l'importation (article VII ; NIMP 20) et l'inspection (article VII ; NIMP 20) et la notification de non-conformité (article VII ; NIMP 13), car les diagnostics sont essentiels pour assurer l'identité exacte de l'organisme nuisible intercepté
- (Article VII.2(j) ; NIMP 6), parce que les diagnostics fournissent des informations essentielles sur les organismes collectés par des enquêtes spécifiques, afin de fournir des informations précises sur le statut des organismes nuisibles (Article VII.2(j) ; NIMP 8), ce qui contribue aux actions réglementaires telles que l'inclusion des organismes nuisibles dans les listes des organismes réglementés (NIMP 19) et dans les rapports phytosanitaires (NIMP 17).

Le diagnostic est donc fondamental pour les mesures phytosanitaires fondées sur la science. La capacité d'offrir des services de diagnostic précis et opportuns mais aussi de rendre compte des résultats de ces diagnostics est donc d'une importance cruciale pour le fonctionnement d'une organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et pour la mise en œuvre de la CIPV. Alors que

Figure 1 : Eventail des programmes phytosanitaires auxquels l'information et l'expertise diagnostique peuvent contribuer



de nombreuses ONPV entreprennent d'exploiter elles-mêmes un laboratoire de diagnostic, d'autres sous-traitent une partie du travail nécessaire. Ce guide traite des besoins physiques, financiers et en personnel auxquels les ONPV doivent pouvoir faire appel pour remplir leurs obligations. Il propose également des suggestions sur la manière de mener diverses activités.

Le guide a été préparé par :

- Qing Hai Fan, Santha France, Olwyn Green, Disna Gunawardana, Wellcome Ho, Lalith Kumarasinghe, Bénédicte Lebas, Carol Muir, Sumathi Murugan, Thérèse Oliver: Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, Nouvelle-Zélande
- Gary Kong : Plant Biosecurity Cooperative Research Centre, LMB, University of Canberra, Australie

- Julian Smith, Rebecca Weekes : Fera Science Ltd. (Fera), Royaume-Uni
- Orlando Sosa : CIPV, FAO, Italie
- Mark Stanaway : Queensland University of Technology, Australie
- Michael Thompson ; CAB International, Serdang, Selangor, Malaisie.

Comment utiliser ce guide

Ce guide est destiné aux responsables de programmes techniques au sein des ONPV afin de mettre en place et de maintenir un laboratoire de diagnostic fonctionnel. Il compile certaines des considérations opérationnelles et fonctionnelles qui sous-tendent la prestation d'un service de diagnostic. Il s'agit notamment d'établir un laboratoire de diagnostic et de donner des conseils sur les types de politiques et de procédures qui doivent être mises en place, en se fondant sur l'expérience des laboratoires établis. Le contenu a été compilé à partir d'informations et d'expériences fournies par des experts de différentes disciplines et de différents pays, avec la contribution du Comité de développement des capacités de la CIPV et du Secrétariat de la CIPV. Toutefois, étant donné que chaque laboratoire et service doit être conçu en fonction de ses objectifs et de son contexte particulier, le lecteur ne doit utiliser ce guide qu'à titre de source d'information générale. Il existe d'autres sources d'information et d'expériences pratiques spécifiques (dont certaines sont énumérées à la section 3). Les ONPV sont encouragées à explorer différentes approches.

Ce guide couvre le travail des laboratoires officiels fournissant des services de diagnostic aux procédures ONPV telles que la surveillance, l'analyse du risque phytosanitaire, la certification des exportations et la vérification des importations. Certains laboratoires de diagnostic ONPV remplissent de multiples fonctions. Par exemple, une politique nationale peut donner à un laboratoire de diagnostic le mandat de fournir des diagnostics phytosanitaires officiels à des fins réglementaires en plus des services de diagnostic à d'autres fins, tels que des programmes nationaux qui peuvent inclure des services sans rendez-vous pour les producteurs et d'autres personnes qui ont besoin d'une certification de statut d'organisme nuisible. En outre, dans un

pays, il peut y avoir d'autres laboratoires qui ne fournissent pas de diagnostics phytosanitaires, mais qui offrent d'autres fonctions de diagnostic, par exemple, liées à la recherche, à l'éducation et aux services sans rendez-vous pour les producteurs. Ce guide ne couvre pas l'autorisation de ces laboratoires pour les services de l'ONPV¹.

En ce qui concerne les procédures de diagnostic et les méthodes spécifiques discutées, le guide ne se veut pas exhaustif ou prescriptif. Le lecteur doit garder à l'esprit qu'il peut y avoir d'autres méthodes pertinentes qui peuvent être utilisées. Cependant, peu importe les méthodes choisies, le personnel chargé du diagnostic devrait suivre les "meilleures pratiques" pertinentes nécessaires pour atteindre les résultats escomptés.

Notez que ce guide n'est pas destiné à :

- discuter en détail des options concernant l'autorisation ou la supervision des laboratoires ou des prestataires de services externes - une NIMP de la CIPV sur ce sujet est en cours d'élaboration ;
- fournir des conseils détaillés sur l'utilisation de techniques diagnostiques spécifiques ;
- fournir une orientation prescriptive sur la façon dont les diagnostics devraient être effectués ou sur les procédures de gestion de la qualité utilisées.

¹ La NIMP 5 (Glossaire des termes phytosanitaires) contient la définition du terme „officiel”, qui couvre les activités qu'une organisation nationale de protection des végétaux (ONPV) peut mener auprès de toute composante du système phytosanitaire d'une partie prenante sous sa propre responsabilité et autorité. Officiel signifie : établi, autorisé ou exécuté par une organisation nationale de protection des végétaux (NIMP 5). A de nombreuses reprises, l'utilisation du terme „accréditation” a été discutée dans le cadre de la CIPV, pour faire référence à l'autorisation d'entités autres que les ONPV d'effectuer des actions phytosanitaires au nom des ONPV mais toujours sous la responsabilité de l'ONPV. Ces discussions ont abouti à la conclusion que les ONPV n'ont pas légalement le droit d'agir en tant qu'organismes d'accréditation au niveau national et que la façon préférée de s'exprimer devrait suivre la terminologie utilisée dans la définition du terme „officiel” : utiliser „autorisation d'entités autres que les ONPV de réaliser des actions phytosanitaires au nom des ONPV”.

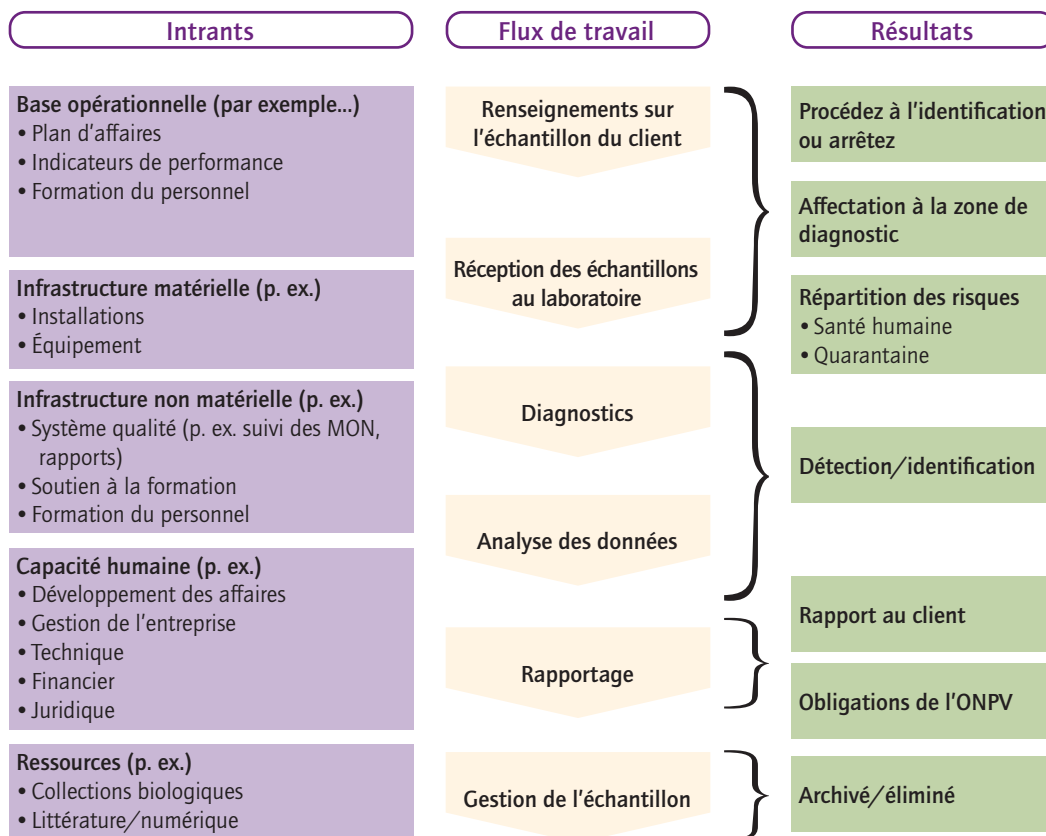
Dans les cas où des renseignements techniques sont fournis, il s'agit d'une illustration des procédures fonctionnelles qui ont été utilisées ailleurs, mais qui ne devraient pas être interprétées comme la seule procédure correcte à utiliser.

Structure du guide

Le guide est organisé en deux sections principales qui traitent respectivement de la mise en place et de la gestion d'un laboratoire de diagnostic et du flux de travail des échantillons. La première section examine la base opérationnelle du laboratoire et l'infrastructure matérielle et logicielle nécessaire à la prestation des services de diagnostic. La deuxième section examine les étapes par lesquelles un échantillon progresse dans le processus de diagnostic, de la réception initiale jusqu'au sort final de l'échantillon. Dans la troisième section, le guide suggère des sources d'information et d'expertise que les ONPV peuvent souhaiter utiliser.

Les intrants constituent la base nécessaire à la prestation du service et font l'objet de la section 1. Le chapitre 1 explique la nécessité d'une base opérationnelle solide pour le service de diagnostic, y compris le personnel, les compétences nécessaires et un plan d'affaires pratique qui assure l'avenir du laboratoire. L'infrastructure matérielle (Chapitre 2) couvre non seulement les types d'installations et d'équipements nécessaires, soit dans le laboratoire de l'ONPV, soit chez un fournisseur extérieur, mais aussi la gestion de ces installations. L'infrastructure non matérielle (chapitre 3) comprend les systèmes d'assurance de la qualité et les systèmes de suivi et les modes opératoires normalisés (MON) dont dépendent ces systèmes. Sont également inclus ici les systèmes de rapportage qui garantissent que l'information sur des diagnostics spécifiques parvient aux parties prenantes qui exigent cette information. Certains de ces rapports constituent une obligation formelle, d'autres sont une question

Figure 2 : Le fonctionnement du laboratoire de diagnostic est divisé en deux domaines principaux - intrants et résultats - qui se reflètent dans la structure du guide



de bonnes pratiques et de transparence. Un dernier intrant est l'information supplémentaire nécessaire pour vérifier les diagnostics.

La section 2 reflète le déroulement du processus de travail que bon nombre des échantillons reçus par le laboratoire vont subir (Figure 2). Le processus commence (chapitre 4) par l'arrivée d'un échantillon, accompagné d'informations sur le contexte dans lequel il a été obtenu. L'échantillon doit être enregistré et examiné afin de déterminer ce qu'il faut en faire. Le chapitre 5, qui constitue l'essentiel de la section, porte sur le diagnostic : quelles méthodes sont disponibles, quelles disciplines doivent être impliquées, la

nécessité d'enregistrer des images utiles de l'échantillon, le potentiel du diagnostic à distance et l'utilisation et la maintenance des collections de référence. Le chapitre 6 propose une introduction à la création d'images utiles des échantillons, un élément essentiel du diagnostic à distance (chapitre 7). Les collections de référence, essentielles à un bon diagnostic, sont traitées au chapitre 8. Un diagnostic vérifié doit être communiqué à toutes les parties intéressées (chapitre 9) et des décisions doivent être prises quant au sort final de l'échantillon (chapitre 10), qui peut devoir être détruit, archivé comme preuve ou comme référence ou, dans certains cas, retourné à son propriétaire.

Section 1 : Diagnostic en laboratoire

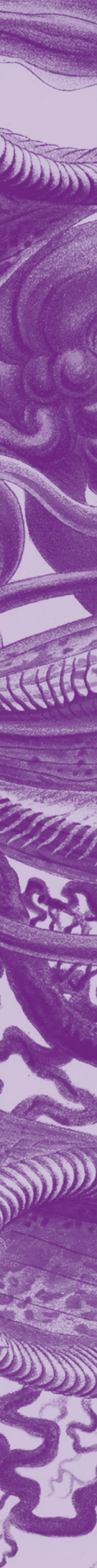
Introduction

L'ONPV, comme l'exige la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*), est responsable de "réaliser" ou "autoriser" les services d'identification des organismes nuisibles des végétaux qui soutiennent la surveillance ou les enquêtes phytosanitaires nationales. Pour s'acquitter de cette obligation, divers modèles d'exploitation peuvent être envisagés, allant des services internes à la sous-traitance à des entités indépendantes autorisées, avec des possibilités de combinaison entre ces modèles opérationnels.

Ce guide présente les méthodes qui permettent d'identifier tous les types d'organismes nuisibles dans une perspective où ces méthodes étaient logées dans une seule ONPV. Il est reconnu qu'il s'agit là d'un modèle idéalisé et que la coopération et la coordination de

ressources techniques limitées pour des ONPV et particulièrement à travers une organisation régionale de protection des végétaux (ORPV), est une activité nécessaire, et qui s'inscrit dans l'esprit de la Convention.

Bien que ce document soit un "Guide technique" pour l'identification des organismes nuisibles, il est important de reconnaître le contexte opérationnel qui rend possible les capacités techniques. Dans les chapitres qui suivent, nous exposons certaines de ces considérations opérationnelles auxquelles il faudrait accorder une priorité élevée dans l'établissement, l'exploitation et le maintien d'une capacité d'identification des organismes nuisibles. Une ONPV ne sera pas efficace si elle néglige ces domaines en mettant trop l'accent sur l'acquisition de compétences techniques et d'infrastructures.





1. Base opérationnelle du laboratoire de diagnostic

Introduction

L'ONPV devrait toujours viser l'excellence dans la prestation des services. Elle devra donc identifier les programmes et activités prioritaires et veiller à ce que des ressources suffisantes soient disponibles. Les ONPV ont besoin d'une base de financement stable et adéquate. Dans de nombreux cas, les dispositions budgétaires gouvernementales en faveur des ONPV sont insuffisantes et peuvent changer d'année en année en fonction des priorités gouvernementales. Le cas échéant, les ONPV doivent s'assurer que le cadre juridique national prévoit des dispositions adéquates pour la facturation des services. Ils doivent également négocier un arrangement selon lequel une partie ou la totalité de ces redevances est conservée pour l'exploitation et l'amélioration constante de l'ONPV.

Notez que l'ONPV n'est pas tenue de posséder toutes les compétences et installations requises, mais elle doit certainement y avoir accès. Les institutions collaboratrices et les prestataires de services devraient être identifiés pour tous les programmes phytosanitaires, y compris la surveillance, le diagnostic, le traitement et la réglementation des importations. Des services externes peuvent être engagés par le biais de systèmes de collaboration ou d'autorisation, lorsque les services sont fournis mais que la responsabilité ultime demeure celle de l'ONPV.

1.1 Considérations relatives à la durabilité

Le rôle du laboratoire phytosanitaire de l'ONPV dans la contribution au développement national dépend de la durabilité de ses services. La durabilité devrait donc être prise en compte dans l'établissement de l'ONPV pour s'assurer qu'elle fonctionne efficacement et de manière prévisible. L'ONPV devrait s'assurer que son laboratoire de diagnostic phytosanitaire possède les conditions qui contribuent à sa durabilité afin de soutenir les

différents programmes phytosanitaires de l'ONPV qui dépendent de ses services. Les conditions à considérer sont les suivantes :

- un nombre suffisant d'employés, ayant reçu une formation appropriée et possédant les niveaux de compétence requis
- une bonne politique de formation et de maintien du personnel
- l'accès aux ressources et des sources de financement sûres
- des ressources pour faire face aux urgences et aux crises phytosanitaires
- l'accès à une expertise complémentaire par l'intermédiaire de tiers (nationaux ou internationaux) si le laboratoire ne les possède pas.

Dans de nombreux pays, les services de diagnostic sont fournis gratuitement aux utilisateurs. Cependant, même dans de tels cas, l'ONPV devrait s'assurer que les ressources nécessaires sont prises en compte dans son budget pour assurer la fourniture à long terme de services de la qualité et de la fiabilité attendues par ses utilisateurs.

1.1.1 Compétences et ressources partagées

Afin d'offrir la gamme de services qui aura été déterminée par les priorités nationales, le laboratoire de diagnostic phytosanitaire a besoin de diverses compétences et aptitudes spécialisées. Par exemple, il peut être nécessaire d'avoir recours à des spécialistes pour effectuer des diagnostics en entomologie, en phytopathologie, en nématologie, en malherbologie ou autres. Bien que l'ONPV ne soit pas tenue de posséder toutes les compétences requises, elle doit y avoir accès. Cela peut se faire par le biais de systèmes de collaboration ou d'autorisation, mais la responsabilité en incombe à l'ONPV. L'utilisation d'un système d'autorisation devrait être appuyée par un mécanisme de recouvrement des coûts. Lors de l'établissement

(et de l'exploitation) d'un laboratoire de diagnostic phytosanitaire, la partie contractante doit connaître les organismes nationaux, régionaux et internationaux qui pourraient être en mesure de fournir des ressources complémentaires à celles de l'ONPV. Les institutions nationales telles que les universités, les institutions de recherche pertinentes, les organisations régionales (par exemple les ORPV), les centres d'excellence phytosanitaire, les entreprises privées et les organisations internationales sont toutes des sources de compétences qui peuvent être exploitées.

Les conditions préalables à la réussite du partage des ressources sont les suivantes :

- L'ONPV ou la partie contractante devrait établir des instruments de collaboration (par ex. autorisation, lettres d'accord, contrats, mémorandums d'accord) avec ces institutions collaboratrices et fournisseurs de services pour s'assurer que ses laboratoires sont desservis en temps opportun.
- Les institutions collaboratrices et les prestataires de services devraient être informés des obligations nationales à remplir en vertu des conventions internationales pertinentes.
- Des protocoles, des manuels ou des procédures de travail standardisées devraient être élaborés à l'intention des institutions participantes et celles-ci devraient recevoir une formation sur ces protocoles, manuels ou procédures afin de s'assurer que l'intégrité de leurs contributions n'est pas compromise.
- Les institutions collaboratrices agissant au nom de l'ONPV devraient être autorisées, contrôlées, auditées et tenues aux exigences d'approbation établies par l'ONPV.
- Le rendement et les instruments de collaboration devraient être examinés, au besoin.

1.2 Plans stratégiques

Un plan stratégique indique vers laquelle l'organisation souhaite se diriger à moyen et à long terme, comment elle y parviendra et comment elle saura si elle y est parvenue. Le processus de planification permet aux partenaires et au personnel de l'ONPV d'établir un langage commun

et d'atteindre ensemble leurs objectifs. Le plan comprendra une vision claire, un énoncé des missions, des objectifs stratégiques et une culture organisationnelle, ainsi que des plans d'action détaillés.

Les objectifs stratégiques de l'ONPV devraient être définis pour une période déterminée (par exemple cinq ans) et guidés par le désir de remplir son mandat, tel que défini par la CIPV. Les NIMP constituent la base de l'application des mesures phytosanitaires. Dans le contexte du développement national, les objectifs généraux peuvent être les suivants :

- protéger les ressources végétales nationales par la mise en œuvre de mesures phytosanitaires appropriées durant les importations ;
- faciliter l'accès au marché et la sécurité du commerce international des végétaux et des produits végétaux par un système solide de certification des exportations.
- réduire les menaces à l'environnement et à la sécurité alimentaire nationale en protégeant les ressources végétales

Chaque objectif stratégique devrait être appuyé par des activités et des résultats définis et réalisables. La réalisation des objectifs stratégiques dépend en grande partie des ressources disponibles et de l'appui des parties prenantes.

La fourniture de services de diagnostic par un laboratoire phytosanitaire devrait être reflétée dans le plan stratégique de l'ONPV et il est donc important que le personnel soit impliqué dès les premières étapes du développement du plan. Le laboratoire de diagnostic phytosanitaire lui-même peut développer ses propres plans stratégiques. Ces plans doivent cependant être compatibles avec le cadre stratégique élaboré par l'ONPV. Une attention particulière devrait être accordée dans tous les plans stratégiques pour traiter les questions opérationnelles, telles que l'adoption d'une bonne politique de déploiement du personnel (nombre requis, compétences et spécialisations du personnel, et attention à la formation et aux salaires compétitifs), ainsi que la fourniture en temps voulu des ressources opérationnelles nécessaires pour que le laboratoire puisse effectuer les tests requis avec le niveau de confiance requis.

1.3 Mécanismes de financement

Les mécanismes de financement des opérations d'un laboratoire de diagnostic phytosanitaire sont largement basés sur les arrangements institutionnels dans lesquels l'ONPV est intégrée et son niveau d'autonomie. Les laboratoires de diagnostic phytosanitaire sont plus efficaces et efficaces lorsqu'ils disposent d'une base de financement adéquate et stable. Dans de nombreux pays, les ONPV sont financées par des allocations gouvernementales et des droits perçus. Cette section décrit les principales sources de financement.

1.3.1 Budget du gouvernement

Lorsque les ONPV dépendent uniquement du financement gouvernemental, elles peuvent concurrencer d'autres institutions nationales. Comme les priorités gouvernementales changent parfois, la réaffectation des fonds peut avoir un effet négatif sur les programmes de l'ONPV, y compris le fonctionnement du laboratoire de diagnostic phytosanitaire. De plus, les allocations peuvent changer d'année en année, ce qui affectera la capacité de l'ONPV à poursuivre ses objectifs stratégiques. Le financement public est généralement lié aux plans de travail approuvés et peut limiter la souplesse d'affectation des fonds d'urgence. Le nombre d'employés peut être limité par les politiques d'approbation et les affectations du gouvernement.

1.3.2 Frais d'utilisation

Les droits d'utilisation permettent à l'ONPV et, par extension, aux laboratoires de diagnostic phytosanitaire de recouvrer tout ou partie des coûts des services. Un système de recouvrement des coûts soutient l'amélioration continue des services phytosanitaires. Dans de nombreux pays, cependant, les frais d'utilisation vont directement dans le Trésor public et les priorités gouvernementales déterminent la part qui sera éventuellement réallouée à l'ONPV pour améliorer ses services. Il semble y avoir une tendance croissante dans laquelle une partie ou la totalité des droits d'utilisation perçus sont transférés à l'ONPV. Dans ces cas, il est important que des fonds soient alloués pour couvrir le personnel et les ressources opérationnelles du laboratoire.

Les frais d'utilisation devraient être :

- équitables, uniformes et liés au coût de la prestation du service
- raisonnables et ne présentant pas d'obstacle au commerce des importations et des exportations
- revus à intervalles réguliers.

1.3.3 Fonds de prévoyance et autres fonds d'urgence

L'ONPV a besoin d'avoir accès à des ressources financières extraordinaires pour pouvoir répondre aux urgences phytosanitaires. Il s'agit notamment de la fourniture de services de diagnostic pour répondre à la demande accrue de ses services pendant le confinement ou l'éradication d'un organisme de quarantaine introduit ou d'une autre foyer d'organismes nuisibles. Dans une situation idéale, l'ONPV aurait un plan d'urgence qui prend en compte le soutien nécessaire au diagnostic des organismes nuisibles et les fonds fournis par le gouvernement et les donateurs de l'industrie. Sans un tel fonds d'urgence, l'ONPV peut être incapable de réagir rapidement à la dissémination d'un organisme de quarantaine, rendant ainsi son éradication difficile ou impossible.

1.3.4 Subventions, aides et autres contributions

L'ONPV peut obtenir des investissements importants pour l'amélioration de ses services et de ses infrastructures grâce à des allocations extraordinaires du Trésor public, du cofinancement ou du partenariat avec le secteur privé, et du soutien financier d'organisations internationales ou régionales. Les prêts et subventions d'investissement peuvent être obtenus par le gouvernement ou une ONPV autonome d'un pays développé, ou par une institution de prêt dans les cas où des objectifs clairs peuvent être atteints et procurer des avantages significatifs pour le pays.

1.3.5 Sécurisation des fonds

L'ONPV doit avoir une bonne capacité d'accès aux ressources financières pour assurer sa durabilité. L'affectation des fonds gouvernementaux est influencée par les priorités du gouvernement en place. L'ONPV doit être positionnée correctement

dans la liste de ses priorités afin d'être assurée d'un financement adéquat. Elle doit donc informer toutes les parties prenantes, y compris les politiciens et les consommateurs, sur l'importance de ses services de diagnostic et plus particulièrement:

- les obligations et fonctions nationales spécifiques des parties contractantes, telles que définies par la CIPV
- les coûts et les avantages de l'exercice de ces fonctions
- les problèmes d'accès ou de maintien des marchés d'exportation en raison du manque de crédibilité de la certification des exportations ou de l'établissement d'accords de reconnaissance d'équivalence comme mesures sanitaires et phytosanitaires de remplacement
- les implications et les conséquences de l'introduction d'un organisme de quarantaine sur l'économie nationale, la sécurité alimentaire et l'environnement, et les impacts potentiels d'une exclusion inadéquate des organismes nuisibles sur les moyens de subsistance.

Par conséquent, le laboratoire de diagnostic, soutenu par son ONPV, devrait articuler et préconiser un niveau acceptable de ressources en fonction de l'importance de ses services. Le plaidoyer de l'ONPV devrait être reflété dans son plan stratégique afin de renforcer sa capacité à obtenir les fonds et les ressources nécessaires pour fournir des services satisfaisants à sa clientèle.

1.4 Conseil juridique

Le travail de l'ONPV doit être effectué à partir d'une base légale informée qui est consciente de toutes les implications que l'information qu'elle divulgue au domaine public peut avoir. C'est particulièrement vrai dans le contexte de l'identification des organismes nuisibles, où les conclusions tirées sur l'identité ou la détection d'un organisme nuisible peuvent avoir des conséquences commerciales importantes et entraîner des pertes financières importantes pour les secteurs commerciaux touchés. Par conséquent, l'ONPV doit avoir accès à des conseils juridiques professionnels appropriés, soit par l'intermédiaire du personnel interne, soit par l'intermédiaire de tiers.

1.5 Ressources humaines

Le personnel d'une ONPV est sa principale ressource. Malheureusement, il y a un manque de personnel qualifié à travers le monde. Les ressources humaines sont donc un élément clé, travaillant avec la direction pour offrir des possibilités efficaces de formation du personnel, de perfectionnement professionnel et de planification de la relève. Voir également les sections 3.2 et 3.3 du chapitre 3 Systèmes qualité.

1.5.1 Rôles et responsabilités du personnel de laboratoire

La section suivante décrit les compétences génériques importantes pour le fonctionnement d'un laboratoire de diagnostic. Le nombre d'employés dans chacun des rôles dépendra de la demande globale pour les services de diagnostic. Outre les contraintes financières de base, la capacité des ressources humaines et le degré de spécialisation du personnel dépendent de l'origine, de la diversité et du volume des échantillons traités, des délais d'exécution prévus et de la nécessité d'accroître rapidement la capacité d'intervention en cas d'événements critiques comme une intervention liée à l'invasion d'une espèce.

1.5.1.1 Support technique

Le personnel de soutien technique participe à diverses activités en laboratoire. Les principaux domaines de responsabilité sont les suivants :

- la réception des échantillons et leur enregistrement dans la base de données (peut également être effectué par le soutien administratif)
- la préparation et le traitement des échantillons pour l'identification
- l'élimination d'échantillons ou la préparation de spécimens en vue de leur inclusion dans une collection de référence
- la préparation de spécimens d'imagerie pour la banque d'images
- l'identification préliminaire du ravageur
- le maintien de collections de référence et d'images

1.5.1.2 Expert en diagnostic

Les experts en diagnostic fournissent des services de diagnostic et de conseil pour les ravageurs et les maladies, exotiques et émergents, affectant les végétaux ou l'environnement terrestre dans le cadre de programmes de surveillance, d'investigation, d'identification aux frontières et, après les frontières, de quarantaine post-entrée. Les principaux domaines de responsabilité sont les suivants :

- l'identification définitive de l'échantillon
- l'analyse scientifique, l'établissement de rapports et la prestation de conseils par l'examen critique des données, l'interprétation des résultats, l'analyse des tendances et leurs répercussions
- les conseils sur les normes nationales de diagnostic
- la direction de projets
- la préparation d'images pour la bibliothèque d'images.

1.5.1.3 Services de gestion des installations et de soutien administratif

La nature technique des services de diagnostic des organismes nuisibles exige une solide gestion des installations et un soutien administratif, en particulier dans les domaines de l'équipement, des installations et de l'entretien. Il est essentiel pour le fonctionnement quotidien des laboratoires de disposer d'un personnel ayant les compétences nécessaires pour entretenir l'équipement et organiser les réparations contractuelles. Il est également essentiel de comprendre les coûts associés à l'amortissement et au remplacement de l'équipement et des installations. L'intégration de ces coûts dans le plan d'activité est une partie nécessaire des opérations de l'ONPV. Les principaux domaines de responsabilité sont les suivants :

- la gestion des ressources financières
- l'achat et l'inventaire du matériel et des fournitures
- la gestion des systèmes de technologie de l'information (TI)
- l'entretien des bâtiments (chauffage, ventilation, air conditionné, plomberie, etc.)
- le maintien du bon fonctionnement des systèmes de gestion des biodéchets et des systèmes de biosécurité.

1.5.1.4 Directeur de laboratoire

Le rôle de la direction doit être défini et il est souvent préférable de confier ce rôle à des personnes ayant des fonctions de gestion désignées. Ces personnes assument la responsabilité d'une variété de tâches non scientifiques, mais s'assurent surtout que les tâches techniques sont réalisées avec une efficacité maximale. La direction a pour rôle de surveiller le fonctionnement du service en usant d'indicateurs clés de rendement. Les résultats essentiels du perfectionnement professionnel et de la planification de la relève font également partie du rôle de la direction.

Les principaux domaines de responsabilité sont les suivants :

- la direction opérationnelle
- la gestion des ressources humaines (dotation, besoins en formation, etc.)
- le business plan et la stratégie
- les finances et les contrats.

1.6 Formation du personnel de laboratoire

Selon l'Article IV.2(h) de la CIPV, les responsabilités de l'ONPV officielle doivent inclure "la formation et le développement du personnel". Une formation efficace, la possibilité d'acquérir de l'expérience et de démontrer des compétences sont autant d'éléments qui assureront la réussite et la robustesse du diagnostic.

Un certain nombre de séances de formation peuvent être nécessaires jusqu'à ce que le formateur et le stagiaire conviennent que le stagiaire est compétent pour effectuer la tâche sans supervision, et toutes les séances de formation devraient être documentées. Toutes les étapes de la formation doivent être enregistrées et couvrir :

- Étape 1 - Lire les instructions pertinentes (p. ex. MON)
- Étape 2 - Observation de la tâche effectuée par un membre du personnel qualifié
- Étape 3 - Exécution de la tâche sous supervision
- Étape 4 - Évaluation de la compétence à exécuter la tâche sans supervision.

Dans la mesure du possible, les preuves ou l'expérience utilisée dans le cadre de l'évaluation des compétences devraient être consignées. La

compétence est évaluée à l'aide d'au moins un des éléments suivants, dans la mesure du possible :

- expériences de récupération à pointes
- répéter l'analyse d'échantillons déjà analysés
- l'analyse de matériaux de référence ou d'essais d'aptitude
- comparaison des résultats du formateur et du stagiaire.

Les critères d'acceptation sont documentés et sont normalement fixés aux limites d'acceptation du contrôle de la qualité de la méthode. La date d'autorisation d'exécution d'une intervention non supervisée est inscrite sur le formulaire avec la confirmation par le supérieur hiérarchique. Les gestionnaires hiérarchiques devraient s'assurer que les éléments probants présentés et documentés sont exacts et appropriés.

Il est acceptable que le personnel puisse s'autoformer à certaines procédures (p. ex. procédures administratives ou techniques expérimentales simples) en lisant les MON. Dans ce cas, la personne indiquera sur le dossier de formation qu'il y a eu autoformation.

Les laboratoires essaient souvent de participer à des programmes d'essais d'aptitude. Les essais d'aptitude déterminent la performance de chaque laboratoire pour des essais ou des mesures spécifiques et servent à surveiller en continu la performance des laboratoires. Ces tests fourniront également la preuve de la compétence actuelle d'une personne.



2. Infrastructure matérielle du laboratoire de diagnostic des végétaux

Introduction

Les recommandations de ce chapitre s'appuient principalement sur les pratiques existantes dans les Laboratoires Phytosanitaires et Environnementaux (PHEL) établis dans les Investigation and Diagnostic Centres and Response (IDCR) du Ministry for Primary Industries, Nouvelle Zélande. Les références suivantes ont également été prises en compte :

- **Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, L. & Phan, H.T.** 2008. *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam*. ACIAR Monograph No. 129. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research. 210 pp. Available at http://aciar.gov.au/files/node/8613/mn129_diagnostic_manual_for_plant_diseases_in_viet_13726.pdf (last accessed 17 September 2015).
- **WHO Regional Office for South-East Asia.** 2008. *Guidelines on establishment of virology laboratory in developing countries*. New Delhi, World Health Organization Regional Office for South-East Asia. Available at http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B4249.pdf?ua=1 (last accessed on 17 September 2015).
- Setting up a diagnostic laboratory. In **M.A. Connolly, ed.** *Communicable disease control in emergencies - a field manual*. Geneva, World Health Organization, pp. 253-267. Available at <http://www.unhcr.org/456c3ce92.pdf> (last accessed 17 September 2015).
- **Skoglund, L.G. & Blunt, T.** 2012. *The plant diagnostic lab experience*. St Paul, MN, American Phytopathological Society. APS Features 2012-05. DOI: 10.1094/APSFeature-2012-05. Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/diagnostician.aspx> (last accessed 17 September 2015).

2.1 Fonctions du laboratoire de diagnostic

Le diagnostic rapide et précis des problèmes phytosanitaires est le principal service du laboratoire de diagnostic et est essentiel au maintien de fermes, de cultures, de forêts, de paysages et d'espaces publics sains, ainsi qu'à la protection des pays contre les ravageurs et les maladies exotiques par-delà les frontières.

Le laboratoire de diagnostic est responsable de :

- fournir un diagnostic rapide et précis des ravageurs et des maladies
- l'enregistrement et la tenue à jour de données sur la présence d'organismes nuisibles
- la détection et le suivi des ravageurs nouveaux et envahissants
- faciliter les réponses aux clients
- la prestation de services rapides et rentables.

Le laboratoire de diagnostic peut soutenir la vulgarisation, la recherche et la formation au niveau de l'État ou du pays et peut inclure des travaux d'enquête sur les cultures et des services de réglementation phytosanitaire.

Le laboratoire de diagnostic peut fournir des services de diagnostic dans les disciplines suivantes : bactériologie, botanique, entomologie, mycologie, nématologie et virologie. Les tests suivants peuvent être effectués en laboratoire :

- Bactériologie et mycologie : L'isolement et la culture des champignons et des bactéries permettent leur identification par des analyses morphologiques, biochimiques et moléculaires. Le maintien d'une collection de cultures de champignons et de bactéries exotiques (témoins positifs) est nécessaire pour permettre la réalisation de tests comparatifs permettant une identification précise.
- Botanique²: L'identification des mauvaises herbes et des plantes-hôtes malades pour d'autres disciplines

2 La botanique peut être intégrée à d'autres disciplines ou le service peut être fourni par les herboristeries locales, les musées et les universités.

- Entomologie: Les invertébrés peuvent être identifiés à l'aide d'un examen morphologique, d'une comparaison avec les clés d'identification et les spécimens de référence, et de méthodes moléculaires si nécessaire. Les invertébrés immatures peuvent être élevés jusqu'à des stades ultérieurs ou à des adultes afin de permettre une détermination taxonomique plus précise, ou pour recueillir du matériel de référence. Si l'on soupçonne que l'organisme est exotique, il faut l'élever dans une salle d'élevage en confinement. Tous les invertébrés élevés devraient être tués à la fin des travaux.
- Nématologie : Extraction des nématodes des substrats et identification par analyses morphologiques et moléculaires.
- Virologie : Diverses méthodes peuvent être utilisées pour identifier et caractériser les virus, les viroïdes et les organismes non cultivables tels que les phytoplasmes et *Liberibacter*. Selon les maladies, les tests suivants peuvent être effectués : microscopie électronique à transmission, indexage par plante et greffe, sérologie et méthodes moléculaires.

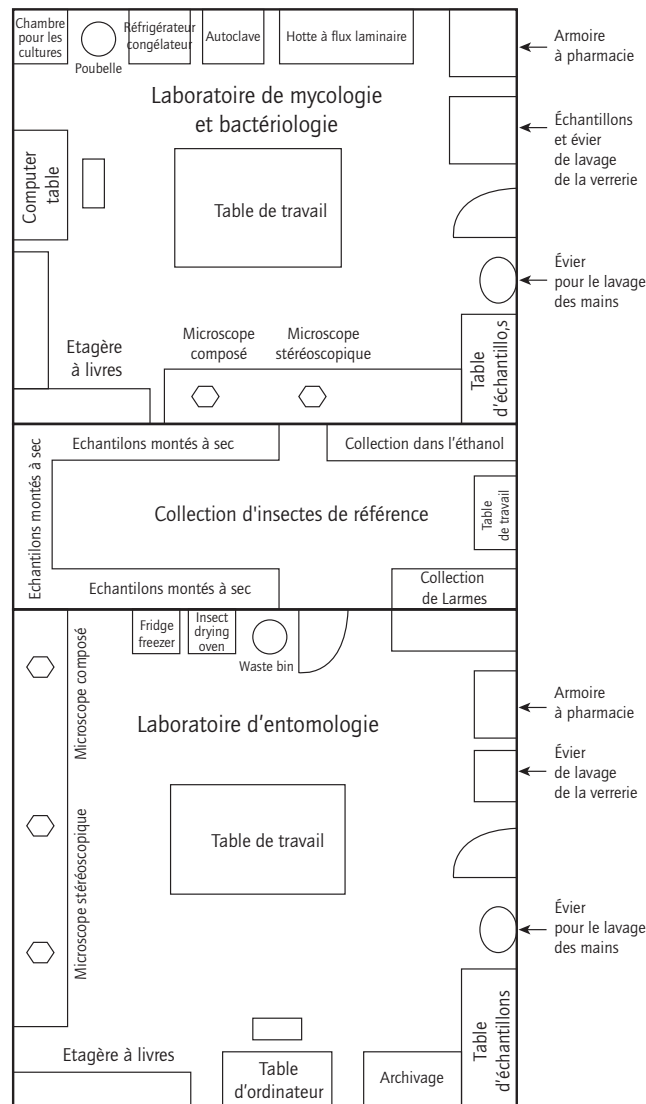
Le laboratoire de diagnostic doit respecter les principes suivants :

- il devrait être en mesure d'effectuer les types d'essais requis
- il doit être suffisamment grand pour traiter le débit d'échantillons requis
- il doit être sûr et confortable pour le personnel
- il devrait être durable à long terme.

Pour répondre à ces besoins, le laboratoire doit avoir :

- un bâtiment ou une (des) pièce(s) convenable(s), aménagé(s) et meublé(s) de façon appropriée
- un nombre adéquat d'employés formés et compétents pour les tests à effectuer
- un contrôle de la qualité interne et externe pour assurer l'uniformité et l'exactitude des extrants
- une politique de sécurité fondée sur les essais effectués et les risques posés par les organismes
- un soutien technique et logistique.

Figure 3 : Plan indicatif du laboratoire, montrant la séparation des zones de travail pour les différentes disciplines

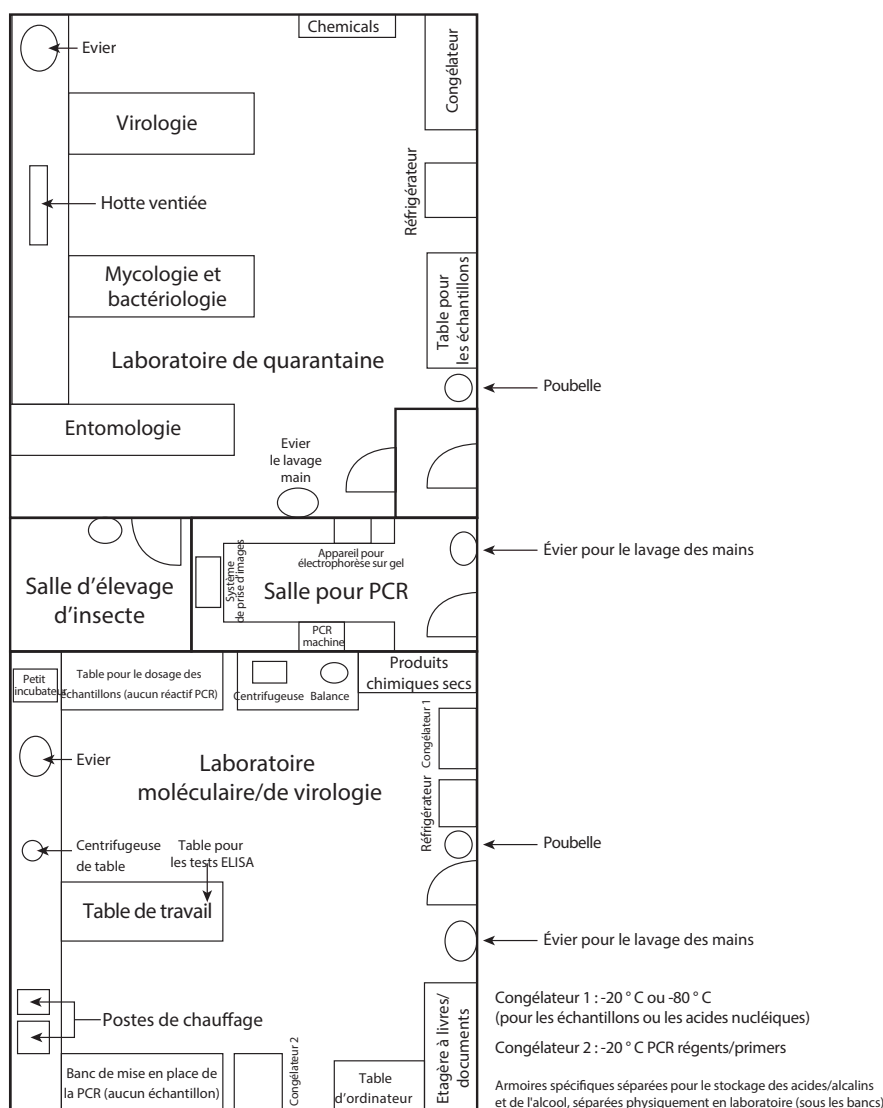


2.2 Site du laboratoire

Le laboratoire de diagnostic doit être installé dans un bâtiment permanent dont la structure est solide. Les murs intérieurs et les planchers doivent être scellés avec de la peinture ou un produit d'étanchéité approprié afin qu'ils puissent être facilement nettoyés ou désinfectés.

De préférence, le laboratoire de diagnostic devrait être divisé en laboratoires de bactériologie et de mycologie, d'entomologie et de nématologie et de virologie (figures 3 et 4). Si cela n'est pas possible, toutes les disciplines pourraient se trouver

Figure 4 : Séparation des unités moléculaires et virologiques au sein du laboratoire de diagnostic



dans la même pièce avec des zones bien désignées.

Des zones définies pour la préparation des échantillons, la préparation des réactifs PCR et l'amplification de l'ADN doivent être physiquement séparées l'une de l'autre pour éviter la contamination croisée de l'ADN. Si cela n'est pas possible, ces zones doivent être au moins bien espacées l'une de l'autre dans la même pièce pour éviter la contamination croisée, et le personnel doit suivre des pratiques de laboratoire strictes (p. ex. changer de gants entre les deux zones ; aucun mouvement des pipettes entre les zones ; des pointes de pipettes présentes dans chacune des différentes zones).

Le laboratoire peut travailler avec des échantillons dont le risque potentiel pour la

biosécurité varie, comme des échantillons provenant d'interceptions à la frontière et d'installations transitoires. Le traitement de ces échantillons à risque élevé devrait être effectué dans un laboratoire distinct. Les spécimens suspectés d'être des invertébrés exotiques peuvent être rendus non viable avant d'être identifiés dans le laboratoire, ou être analysés en dehors de la zone de confinement.

2.3 Les installations de laboratoire

2.3.1 Laboratoire de diagnostic

- Les tables de travail, sièges et autres surfaces de laboratoire doivent être conçus pour faciliter le nettoyage, doivent posséder des surfaces

lisses, être imperméables à l'eau et résistantes aux acides, alcalis et solvants organiques. Les paillasse doivent être d'une hauteur appropriée (90 cm pour les paillasse de travail et 75 cm pour les paillasse de microscope).

- Les sièges de laboratoire doivent être suffisamment hauts pour permettre une position de travail confortable sur la paillasse (tabourets ou chaises réglables en hauteur) et doivent pouvoir être décontaminés avec des désinfectants si nécessaire.
- Les espaces ouverts entre et sous les paillasse, les cabines et les équipements doivent être accessibles pour le nettoyage.
- L'espace d'entreposage à l'intérieur ou à l'extérieur du laboratoire doit être suffisant pour contenir les fournitures, évitant ainsi l'encombrement sur le dessus des paillasse et dans les allées.
- Un autoclave est nécessaire pour stériliser le milieu et le tampon.
- Les fenêtres et les portes devraient être munies de serrures. S'ils sont munis de fenêtres ouvrantes, celles-ci doivent être équipées de moustiquaires. Toutes les portes intérieures devraient avoir un panneau de vision. Les portes extérieures ne doivent pas s'ouvrir directement sur le laboratoire, mais sur un couloir de service.
- Des installations pour les effets personnels, les vêtements d'extérieur, ainsi que des salles de pauses et des toilettes devraient être prévues à l'extérieur de la zone de travail du laboratoire.
- Des lavabos à main avec de l'eau courante devraient être installés dans chaque salle de laboratoire, de préférence près de la porte de sortie.

2.3.2 Laboratoire de confinement

- Un symbole de danger biologique avec des restrictions d'accès au laboratoire devrait être placé bien en vue près de l'entrée du laboratoire.
- Lorsque le laboratoire est ventilé mécaniquement, un flux d'air directionnel est maintenu dans le laboratoire par l'extraction de l'air ambiant.
- Un laboratoire de confinement ne devrait pas avoir de fenêtres ouvrantes.
- Les laboratoires de confinement devraient être

équipés d'un bassin pour le lavage des mains, placé près des sorties.

- Une douche d'urgence devrait être prévue dans le laboratoire pour la décontamination chimique.
- Une douche oculaire devrait être prévue.
- Un piège à insectes électrique devrait être installé dans le laboratoire de confinement et être opérationnel en tout temps.
- Une bombe d'aérosol contre les mouches devrait être conservée dans le laboratoire de confinement afin d'abattre les insectes volants en cas de fuite pendant la procédure de traitement. La pulvérisation anti-mouches ne doit pas être utilisée dans la salle d'élevage des insectes.
- Les meubles doivent être ergonomiquement adaptés à l'usage auquel ils sont destinés.
- Les paillasse, planchers, murs, sièges et autres surfaces de laboratoire doivent être conçus de manière à faciliter le nettoyage. Ils doivent être faits de surfaces lisses, imperméables à l'eau et résistantes aux acides, alcalis et solvants organiques.
- Des contenants pour les matières infectieuses et un approvisionnement en désinfectants étiquetés à des fins de décontamination devraient être fournis.
- Un congélateur ou un réfrigérateur-congélateur devrait être installé à l'intérieur du laboratoire de confinement afin de tuer ou d'endormir les invertébrés, pour l'entreposage de matériel végétal malade ou infecté, pour l'entreposage de réactifs et de produits chimiques, ainsi que pour l'entreposage provisoire de matériel hôte et d'emballages infestés, avant d'être placés dans la poubelle de quarantaine pour destruction.
- Une poubelle de quarantaine devrait avoir une paroi doublée et la doublure intérieure (c.-à-d. celle dans laquelle les déchets sont placés) doit être marquée comme contenant un danger biologique.
- Un autoclave devrait être placé à l'intérieur du laboratoire de confinement pour stériliser le matériel infectieux avant son élimination dans la poubelle de quarantaine.
- Lorsque des quantités importantes d'aérosols ou de spores infectieux sont susceptibles d'être produites, il convient d'utiliser une enceinte de

classe II pour les risques biologiques (sécurité biologique).

2.4 Plans d'urgence - laboratoire de quarantaine

Tous les accidents et incidents impliquant la perte ou la fuite d'organismes exotiques (y compris les organismes génétiquement modifiés (OGM) mis au point à des fins de diagnostic) seront signalés aux organisations compétentes dès que l'événement est constaté (par exemple, dans les 24 heures suivant la détection de l'infraction).

Les éléments suivants seront immédiatement signalés au directeur du laboratoire ou à l'exploitant de l'installation :

- tout accident ou incident impliquant des organismes exotiques
- toute perte ou fuite d'organismes exotiques
- toute perte ou brèche dans l'enceinte de confinement
- tout sabotage ou sabotage présumé de l'installation de confinement.

Gérer les déversements qui peuvent impliquer des micro-organismes ou d'autres substances biologiques dangereuses. La gestion des risques biologiques en cas de déversement dépend du groupe de risque de la matière et du volume de la matière déversée. En général, les déversements présentant un risque biologique dans les installations de confinement sont d'une nature peu dangereuse et le volume potentiel de déversement est faible.

Les travaux doivent être planifiés de manière à minimiser les risques de déversement. Le matériel et l'équipement de nettoyage devraient être conservés dans des endroits appropriés et comprendre : panneaux « Ne pas entrer » et « Danger biologique » ; matériel de désinfection approprié ; matériaux absorbants ; vêtements de protection (p. ex. gants, manteaux) et contenants appropriés.

2.4.1 Procédure en cas de fuite d'invertébrés

- Aviser tout autre utilisateur de l'établissement.
- S'assurer que tous les spécimens vivants sont en sécurité avant de quitter le laboratoire de quarantaine.

- Scellez la zone, fermez les portes.
- Empêcher les personnes de se déplacer dans la zone, en verrouillant les portes si nécessaire.
- Cherchez les invertébrés qui se sont échappés dans la zone adjacente.
- Déchargez la quantité appropriée de produit de pulvérisation contre les mouches et laissez s'écouler une période de saturation de cinq minutes avant de pénétrer de nouveau dans la zone adjacente.
- Élargir la recherche dans les régions avoisinantes si les invertébrés ne peuvent être localisés.
- Aviser le directeur du laboratoire dès que possible.
- Examiner les procédures et adopter des mesures correctives pour éviter que l'incident ne se reproduise.

2.4.2 Procédure à suivre après un déversement impliquant de nouveaux microorganismes

- Aviser tout autre utilisateur de l'établissement.
- Mettre des vêtements de protection tels que des gants et des blouses de laboratoire si ce n'est déjà fait.
- Si le déversement est de nature liquide et que le volume est tel que la propagation constitue un danger, limitez la propagation en laissant tomber des matériaux absorbants tels que des essuie-tout sur le déversement.
- Utiliser des agents désinfectants ayant une concentration finale de 1 % d'hypochlorite de sodium ou tout autre désinfectant disponible dans le commerce.
- Laisser l'agent désinfectant sur le déversement pendant au moins 30 min pour une désinfection efficace, avant de nettoyer le déversement.
- Utilisez la solution désinfectante d'hypochlorite de sodium pour essuyer toute zone environnante susceptible d'être contaminée.
- Transférer tout le matériel contaminé et la solution désinfectante dans le flux de déchets de quarantaine du laboratoire.
- Enlever tout vêtement de protection des sacs d'autoclave (ou des poubelles de quarantaine s'ils sont jetables) et se laver soigneusement les mains.

- Aviser le directeur du laboratoire et l'opérateur dès que possible.
- Examiner les procédures et adopter des mesures correctives pour éviter que l'incident ne se reproduise

2.4.3 Procédure de décontamination personnelle

- Mettre immédiatement (si ce n'est déjà fait) ou changer (si nécessaire) les vêtements de protection tels que les gants et les vêtements de protection.
- Si les vêtements, la peau ou les cheveux sont contaminés par des spores ou des aérosols, mettre de nouveaux vêtements de protection et laver la peau ou les cheveux contaminés.
- Conseillez aux autres personnes travaillant dans la même zone de prendre des mesures de protection.
- Prendre des mesures pour empêcher tout dégagement supplémentaire de spores ou d'aérosols et nettoyer la zone.
- Placer les vêtements de protection et les vêtements et chaussures contaminés dans des sacs séparés pour un nettoyage approprié et sécurisé (il peut être nécessaire de passer à l'autoclave avant de les laver).
- Signaler l'incident au directeur du laboratoire.

2.4.4 Procédure en cas d'incendie

- Le laboratoire doit être équipé d'un système d'alarme incendie.
- Utilisez un extincteur s'il est possible de le faire en toute sécurité.
- Suivre immédiatement la procédure d'évacuation en cas d'incendie et d'évacuation d'urgence.

2.4.5 Procédure pour prévenir le vol et le sabotage de la salle de confinement

- L'enlèvement non autorisé d'organismes exotiques viables n'est pas permis.
- Seuls les utilisateurs autorisés auront accès aux installations de confinement.
- Les laboratoires de confinement sont fermés à clé après les heures d'ouverture.

2.5 Hygiène

Le nettoyage régulier des paillasse, des sols et de l'équipement de laboratoire permettra de maintenir un haut niveau de propreté des installations.

L'équipement de nettoyage utilisé dans le laboratoire de quarantaine ne doit être utilisé qu'à cette fin et doit demeurer dans l'installation.

- **Nettoyage humide** : Pour le nettoyage des sols, on utilisera une serpillère humidifiée avec une solution à base de détergent. Le seau sera équipé d'une essoreuse attachée. Ces équipements seront dédiés à l'installation de confinement et stockés à l'intérieur de celle-ci.
- **Nettoyage à sec** : Le nettoyage à sec, s'il est utilisé, sera effectué avec une serpillère qui a des propriétés de rétention de la poussière.
- **Nettoyage par aspiration** : Un aspirateur ne sera pas utilisé.
- **Balayage** : Les balais ne seront pas utilisés, car ils produisent de la poussière en suspension dans l'air qui peut augmenter la contamination du travail en laboratoire.

2.6 Collections de référence

Les collections de référence, où les organismes nuisibles sont préservés et conservés à long terme pour référence future, constituent une ressource inestimable dans le processus de diagnostic. La collection de référence doit être établie dans un bâtiment permanent structurellement solide avec des murs, un toit, un plancher, un plafond et une porte solides. Aucune fenêtre ou puits de lumière ne doit être installé car la lumière du soleil pourrait endommager les spécimens. La collection de référence doit être protégée contre les conditions atmosphériques telles que l'humidité et contre les ravageurs capables de détruire les spécimens, et les conditions suivantes sont souhaitables.

Température recommandée :

- 18-19 °C pour les collections d'entomologie et d'herbiers
- Congélateur à -80 °C pour les extractions d'ADN, les cultures vivantes et le matériel végétal infecté servant de témoins positifs.

Humidité relative recommandée :

- moins de 50 % (pour les collections d'entomologie et de pathologie).

Aucun effet de vibration.

Voir le chapitre 8 sur les collections de référence pour des spécifications plus détaillées.

2.7 Services de laboratoire

- Un approvisionnement adéquat en eau est essentiel et un système de purification peut être requis si l'approvisionnement en eau présente un risque de contamination. Le laboratoire devra également disposer d'une eau déminéralisée.
- L'approvisionnement en électricité doit être suffisant. Si les approvisionnements locaux en électricité sont intermittents ou inadéquats, un générateur peut être nécessaire. La capacité du générateur sera régie par la charge prévue et selon qu'il est nécessaire pour une utilisation continue ou occasionnelle. Si toute l'électricité du laboratoire provient de son propre générateur et si une partie de l'équipement du laboratoire doit fonctionner en continu, un générateur de secours est essentiel. Si l'alimentation de la ville est intermittente, un système automatique de commutation vers le générateur est nécessaire en cas de panne de l'alimentation.
- L'alimentation en gaz est nécessaire pour les brûleurs Bunsen.
- Un système de drainage adéquat doit être prévu. Si le système de drainage public est utilisé, un piège adéquat doit être installé sur le système de collecte de déchets du laboratoire pour permettre le piégeage de tout déversement chimique ou biologique afin d'éviter la contamination du système public.
- Système adéquat pour l'élimination des déchets de quarantaine (p. ex. incinérateur) ; vérifiez auprès des autorités locales.
- Les insectes, les rongeurs et tout autre ravageur doivent être tenus à l'écart du laboratoire pour éviter une contamination secondaire.

2.8 Contrôles de l'environnement (ventilation, température et humidité)

- La ventilation et le débit d'air dans un laboratoire de diagnostic de base peuvent généralement être assurés par des fenêtres et des portes. Toutes les fenêtres devraient être

munies d'un dispositif pour les protéger du soleil.

- Dans les laboratoires où des agents pathogènes sont manipulés, un flux d'air unidirectionnel à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire devrait être maintenu lorsque l'installation est utilisée, afin de protéger le personnel du laboratoire.
- Le bon fonctionnement du laboratoire n'est pas facile à maintenir en cas de températures extrêmes (>30 °C) et d'humidité importante. Il convient également de noter que le déroulement de certains tests de diagnostic n'est pas optimal à des températures supérieures à 28 °C. L'ensemble du laboratoire doit être climatisé pour maintenir un environnement exempt de poussière et une température ambiante de 22-25 °C. La recirculation de l'air conditionné n'est pas adaptée aux laboratoires microbiologiques en raison de la recirculation possible d'agents pathogènes.
- Les ventilateurs ne doivent pas être utilisés pour éviter la dissémination des micro-organismes.

2.9 Pratiques de travail standard

- L'accès à l'installation est limité à certains membres du personnel.
- Le personnel du laboratoire doit aviser le personnel d'entretien des risques microbiologiques ou autres risques particuliers qui existent dans le laboratoire.
- Les portes des installations sont fermées en tout temps.
- Les laboratoires de confinement sont fermés à clé en dehors des heures de travail.
- Les utilisateurs autorisés reçoivent une formation sur les procédures et les exigences en matière de confinement ainsi qu'une formation sur la manipulation des organismes exotiques. Tous les utilisateurs autorisés reçoivent une formation de recyclage annuelle.
- L'élevage d'organismes exotiques devrait se faire dans une salle d'élevage séparée.
- Des vêtements de laboratoire et des chaussures fermées doivent être portés en tout temps dans les installations de confinement. Les blouses doivent être enlevées à la sortie du laboratoire et laissées sur les crochets prévus à cet effet.
- Il est interdit de boire, manger ou fumer dans les laboratoires.

- Le personnel du laboratoire doit toujours se laver les mains lorsqu'il quitte le laboratoire.

2.10 Matériel de laboratoire

L'équipement requis pour le laboratoire dépend des fonctions, du volume de travail, du type d'échantillons, du budget, etc. Les listes d'équipement fournies ci-dessous ne sont que des lignes directrices et ne sont pas exhaustives. De plus, il est possible de partager de l'équipement pour différentes applications dans le laboratoire à travers les disciplines.

2.10.1 Identification morphologique

2.10.1.1 Entomologie

Pour identifier les bactéries, champignons et nématodes, le laboratoire a besoin :

- un microscope composé équipé de lentilles grossissantes x5, x20, x40, x60 et x100 (à immersion dans l'huile) et avec une échelle intégrée dans un seul oculaire pour effectuer des mesures.
- une loupe binoculaire (de préférence 2-3 selon le nombre d'utilisateurs) avec un grossissement de x50 et une échelle graduée intégrée dans un oculaire pour effectuer des mesures.
- un réfrigérateur-congélateur pour conserver le matériel et tuer les insectes
- une bibliothèque contenant des livres, des manuels et des documents de recherche
- un ordinateur avec accès à Internet pour la recherche d'informations, l'accès à des banques d'images et la communication par courrier électronique.

2.10.1.2 Bactériologie, mycologie et nématologie

Pour identifier les bactéries, champignons et nématodes, le laboratoire a besoin :

- une loupe binoculaire pour l'examen d'échantillons de plantes à la recherche de structures fongiques et d'extractions de nématodes, avec une échelle graduée intégrée dans un oculaire pour la mesure de ces structures
- un microscope composé équipé de lentilles grossissantes x10, x40 et x100 (à immersion dans l'huile) et d'une échelle graduée intégrée dans un seul oculaire pour la mesure.

- un flux laminaire pour le coulage de milieux et l'isolement à partir de tissus végétaux
- un réfrigérateur-congélateur pour le stockage des milieux dans des bouteilles et des boîtes de Petri avec milieux de culture
- des balances électroniques d'une précision de 0,1 g et de 0,001 g sont recommandées
- un bain-marie
- un pH-mètre
- des autoclaves (un pour la stérilisation et un pour la décontamination)
- un four à air chaud pour la stérilisation d'objets en verre
- de grandes tables de travail pour le traitement des échantillons, l'examen microscopique et l'entretien des cultures
- une bibliothèque contenant des livres, des manuels et des documents de recherche.

2.10.1.3 Virologie

Pour identifier les virus, le laboratoire a besoin :

- une hotte (pour la purification des virus)
- un réfrigérateur ou congélateur (-20 °C ; -80 °C pour la conservation des tissus végétaux)
- un pH-mètre
- un agitateur magnétique et une plaque chauffante
- une balance électronique pour peser les produits chimiques (avec une précision de 0,001 g)
- une centrifugeuse de table
- des pipettes (1.000 µl, 200 µl) et des embouts sans filtre
- de la verrerie comme des fioles jaugées, des éprouvettes graduées, des bouteilles de stockage (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1.000 ml)
- un système de purification ou de distillation de l'eau
- un autoclave (pour la stérilisation)
- une machine à fabriquer de la glace
- des équipements de broyage : broyeur ELISA, ou mortier et pilon, ou sac en plastique avec un rouleau
- un four à air chaud pour le séchage de la verrerie (optionnel)
- des microtubes à centrifuger (1,5 ml ou 2 ml)
- des étagères et armoires pour produits chimiques
- des armoires de stockage de produits chimiques : une pour les solutions inflammables et une pour les solutions corrosives

- des blouses de laboratoire, gants, masques et lunettes de protection
- des poubelles (une normale et une pour déchets de quarantaine)
- des lingettes nettoyantes et désinfectantes
- un microscope électronique à transmission avec appareil photo
- des pinces et grilles
- des colorants (acétate d'uranyle ou acide phosphotungstique)
- des centrifugeuses rapides et ultra-rapides (optionnelles ; uniquement pour la purification des virus)
- une centrifugeuse de table réfrigérée
- des récipients en plastique pour centrifugeuse.
- un mélangeur vortex (optionnel)
- des étagères et armoires pour produits chimiques
- 2 armoires de stockage de produits chimiques : une pour les solutions inflammables et une pour les solutions corrosives
- des blouses de laboratoire, gants, masques et lunettes de protection
- des poubelles (une normale et une pour déchets de quarantaine)
- des lingettes nettoyantes et désinfectantes
- un incubateur (optionnel : dépend de la température à laquelle les tests ELISA doivent être incubés)
- un lecteur de plaques ELISA
- un laveur de plaques ELISA ou des flacons souples à presser.

2.10.1.4 Tests immunologiques

Pour effectuer des tests immunologiques, le laboratoire a besoin :

- un réfrigérateur et des congélateurs (-20 °C et -80 °C)
- un pH-mètre
- un agitateur magnétique et une plaque chauffante
- une balance électronique pour peser les produits chimiques (avec une précision de 0,001 g)
- une centrifugeuse de table
- des pipettes (1 000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl) et des embouts sans filtre
- de la verrerie comme des fioles jaugées, des éprouvettes graduées, des bouteilles de stockage (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1 000 ml)
- un réservoir d'azote liquide et des gants isothermes (optionnel ; utile pour broyer les tissus très durs)
- un système de purification ou de distillation de l'eau
- des autoclaves : un pour la stérilisation et un pour la décontamination
- une machine à fabriquer de la glace
- des équipements de broyage : broyeur ELISA, ou mortier et pilon, ou sac en plastique avec un rouleau
- un four à air chaud pour le séchage de la verrerie (optionnel)
- des microtubes à centrifuger (1,5 ml, 2 ml)

2.10.1.5 Essais moléculaires

Pour effectuer des tests moléculaires, le laboratoire a besoin de :

- une hotte (optionnel si vous utilisez des kits commerciaux pour l'extraction)
- un réfrigérateur et des congélateurs (-20°C ; -80°C pour les acides nucléiques et certaines parties du kit de clonage)
- un pH-mètre
- un agitateur magnétique et une plaque chauffante
- une balance électronique pour peser les produits chimiques (avec une précision de 0,001 g)
- une centrifugeuse de table
- des pipettes (1 000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl) et des embouts avec filtre ; des pipettes et embouts spécifiquement dédiés aux réactifs PCR et à l'enrichissement en acide nucléique
- de la verrerie comme des fioles jaugées, des éprouvettes graduées, des bouteilles de stockage (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1.000 ml)
- un réservoir d'azote liquide et des gants isothermes (optionnel : utile pour broyer les tissus très durs)
- un système de purification ou de distillation de l'eau
- des autoclaves : un pour la stérilisation et un pour la décontamination

- une machine à fabriquer de la glace
- des équipements de broyage : broyeur ELISA, ou mortier et pilon, ou sac en plastique avec un rouleau
- un four à air chaud pour le séchage de la verrerie (optionnel)
- des microtubes à centrifuger (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)
- un mélangeur vortex (optionnel)
- des étagères et armoires pour produits chimiques
- 2 armoires de stockage de produits chimiques : une pour les solutions inflammables et une pour les solutions corrosives
- des blouses de laboratoire, gants, masques et lunettes de protection
- des poubelles (une normale et une pour déchets de quarantaine)
- des lingettes nettoyantes et désinfectantes
- des étuves à chaleur sèche (au moins 2, à régler à des températures différentes)
- un four à micro-ondes
- un spectrophotomètre (suffisamment sensible pour lire la quantité et la qualité des acides nucléiques)
- une machine PCR (conventionnelle et en temps réel)
- un appareil d'électrophorèse sur gel
- un transilluminateur UV ou boîte à lumière bleue (plus sûr que la lumière UV)
- un bain-marie (pour le clonage)
- un incubateur-vérificateur (pour le clonage)
- des armoires de biosécurité de Classe II (pour le clonage).

2.11 Pratiques de travail sécurisées

La sécurité du personnel du laboratoire devrait être une considération prioritaire lors de la mise en place du laboratoire. La sécurité du travail en laboratoire dépend de l'application des mesures de sécurité de base et de la bonne formation du personnel en matière de sécurité et de bonnes pratiques de travail. Le laboratoire doit disposer d'un document écrit sur les pratiques sûres, qui doit être respecté en tout temps.

2.11.1 Principes généraux de sécurité

- Une trousse de premiers soins doit être fournie et au moins deux ou trois membres du personnel

doivent être formés aux premiers secours et doivent être présents en tout temps lorsque le laboratoire travaille.

- Seul le personnel du laboratoire et les utilisateurs agréés devraient être autorisés à pénétrer dans la zone de travail du laboratoire.
- Le personnel du laboratoire doit porter des vêtements de protection qui doivent être enlevés au moment de quitter le laboratoire. Il ne doit pas être porté dans les zones administratives des laboratoires, comme les bureaux des membres du personnel.
- Des chaussures fermées devraient être portées. Les chaussures ouvertes aux extrémités ne conviennent pas au laboratoire.
- Des gants, des lunettes de protection et des masques devraient être fournis et portés lorsque l'on travaille avec des matières dangereuses et dans le laboratoire moléculaire. Les gants et les masques ne doivent pas être réutilisés et doivent être jetés avec les déchets de laboratoire.
- Tous les matériaux contaminés (par exemple, la verrerie) doivent être décontaminés avant le lavage
- Des contenants appropriés (poubelles pour objets tranchants, sacs en plastique, contenants de désinfectant) et du désinfectant doivent être fournis.
- Des douches oculaires et une douche d'urgence doivent être prévues.
- Manger, boire et fumer devraient être interdits dans le laboratoire.
- Les paillasses doivent être nettoyées et désinfectées après chaque utilisation.
- Le personnel du laboratoire doit se laver les mains avant de quitter le laboratoire (même lorsqu'il porte des gants pendant le travail).
- Tous les déversements et autres accidents doivent être signalés au superviseur du laboratoire.

2.12 Élimination des déchets de quarantaine

2.12.1 Microorganismes

Les microorganismes (bactéries, champignons, virus, viroïdes, phytoplasmes) destinés à l'élimination sont classés comme matériel infectieux. Ils seront

recueillis dans un sac de plastique robuste portant le symbole de danger biologique et stérilisés à la vapeur sous pression (c.-à-d. stérilisés à l'autoclave) dans un contenant solide.

Une fois stérilisé à l'autoclave, le col du sac est tordu et attaché avec du ruban adhésif et placé dans un sac en plastique très résistant. Lorsque ce sac est considéré comme plein (ne pas le laisser devenir trop lourd pour pouvoir être facilement déplacé), le col est tordu et attaché avec du ruban adhésif, replié et scotché de nouveau ("col de cygne"). Le sac est placé dans une poubelle de quarantaine rigide, fermant à clé et doublée, puis transporté à une installation de traitement des déchets de quarantaine pour élimination.

Note : Ceci inclut les déchets chimiques et médicaux (ainsi que les déchets de quarantaine). L'utilisation d'une société de gestion des déchets enregistrée n'exige pas l'obtention d'un permis de transfert.

2.12.2 Matériel végétal

Le matériel végétal destiné à l'élimination sera contenu dans un sac en plastique robuste portant le symbole de danger biologique. Le col du sac doit être torsadé, attaché avec du ruban adhésif, replié et collé de nouveau ("col de cygne"). Ce sac est placé dans un sac en plastique très résistant. Le goulot de ce deuxième sac est à nouveau tordu, attaché avec du ruban adhésif, replié et scotché, puis les déchets en double sachet sont placés dans une poubelle de quarantaine dure, verrouillable et doublée. Lorsque la poubelle est pleine de déchets placés en double sac, le sac de doublure est attaché de la même manière. La poubelle verrouillée est transportée vers une installation de traitement des déchets de quarantaine pour élimination.

2.12.3 Lignées cellulaires, etc.

Les lignées cellulaires, les vecteurs bactériens, le matériel dérivé de lignées cellulaires, les milieux et autres solutions aqueuses qui sont entrés en contact avec des vecteurs bactériens ou des lignées cellulaires sont traités de la même manière pour élimination.

Tous les déchets contenant des OGM seront considérés comme des matières infectieuses et devront être éliminés en toute sécurité. Les protocoles suivants pourraient être suivis :

- Les liquides sont stérilisés à l'autoclave ou chimiquement. En raison de la durée variable de l'atténuation des solutions par autoclavage, il peut être préférable de stériliser chimiquement les solutions plutôt que d'utiliser un autoclave.
- La verrerie est stérilisée chimiquement si elle a été contaminée par un OGM ou un micro-organisme, lavée normalement avec un détergent de laboratoire, puis stérilisée à l'autoclave avant utilisation (si nécessaire).
- Les seringues, aiguilles, pipettes Pasteur en verre et lames de rasoir doivent être soumises à un traitement thermique à haute température ou être stérilisées à la vapeur. Ces déchets doivent être placés dans des seaux en plastique dur approuvés, qui doivent être scellés lorsqu'ils sont pleins et transportés dans une installation de traitement des déchets de quarantaine pour élimination.
- Le matériel en plastique (vaisselle en plastique, tubes, embouts de pipettes et flacons), gants, gélules et lingettes contaminées, gels d'agarose contenant de l'ADN recombinant et pipettes en plastique dur jetables doivent être traités à haute température ou stérilisés à la vapeur et éliminés comme des déchets médicaux.

Les déchets doivent être placés dans de petits sacs en plastique, qui sont solidement attachés avant de quitter le laboratoire ou la hotte où les déchets ont été produits.

Ces sacs en plastique sont placés dans un sac en plastique plus grand, marqué du symbole "Biohazard". Lorsque ce sac est plein, il faut tordre le col, le nouer avec du ruban adhésif, le replier et le refermer avec du ruban adhésif ("col de cygne"). Ce sac est placé dans un sac en plastique résistant, dont le col est torsadé, attaché avec du ruban adhésif, replié et scotché de nouveau ("col de cygne") et placé dans une poubelle de quarantaine rigide, verrouillable et doublée, puis transporté vers une installation de traitement des déchets.

3. Infrastructure non matérielle

Introduction

L'infrastructure non matérielle désigne l'ensemble des services de soutien nécessaires au fonctionnement d'un laboratoire de diagnostic. Il donne une orientation sous la forme de procédures de travail normalisées (PNE) et d'un système de gestion de l'information pour façonner le laboratoire de diagnostic. C'est l'élément le plus important pour faire du laboratoire un environnement productif, novateur et sans risque.

3.1 Système qualité

3.1.1 Importance du système qualité

Il existe de nombreux éléments à prendre en compte pour qu'une organisation puisse mettre en œuvre un système de management de la qualité, tels que :

- les exigences pour répondre aux attentes des clients
- les besoins d'un organisme de réglementation
- les demandes des marchés d'affaires internes et externes
- l'identification et la gestion des éléments critiques (gestion des risques) pour stimuler la croissance de l'entreprise.

Les éléments clés d'un système de gestion de la qualité sont les personnes, les processus et l'information (Figure 5). L'interaction de ces éléments crée un système qualité bien géré pour répondre aux besoins des clients et donc aux objectifs de qualité de l'organisation.

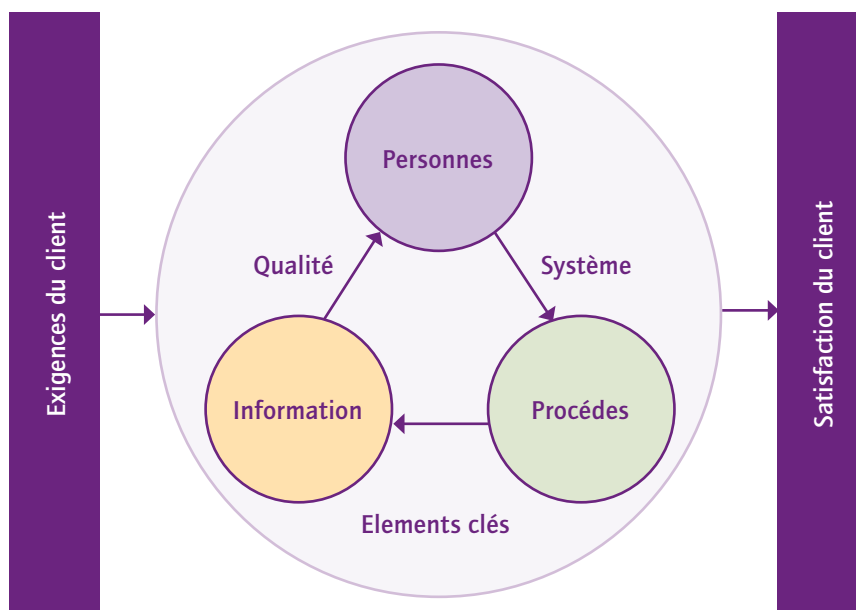
L'élaboration et la mise en œuvre d'un système de gestion de la qualité entraînent des coûts par l'investissement dans plus de personnel, d'équipement, d'installations, les modes de fonctionnement de l'organisation et, enfin, dans la formation du personnel pour s'adapter aux nouvelles exigences de qualité. Cependant, les avantages de l'intégration des principes du système de gestion de la qualité l'emportent sur les coûts. Les avantages de la mise en place d'un système qualité sont les suivants :

- améliorer l'uniformité et la fiabilité des processus de production des services et des produits
- se mettre en conformité pour répondre aux exigences des organismes de réglementation applicables aux clients, etc.
- atteindre un haut niveau de satisfaction de la clientèle grâce à l'application efficace du système, notamment des processus d'amélioration continue et de prévention des non-conformités
- améliorer les relations commerciales par la mise en place de systèmes qualité
- améliorer l'efficacité et la productivité des essais et accroître la crédibilité des résultats et des produits à l'échelle nationale et internationale
- maintenir un niveau de service élevé dans des environnements en constante évolution, complexes sur le plan technologique et en évolution rapide
- améliorer la traçabilité des dossiers, des matériaux de référence, etc.
- mettre en place des programmes de formation standardisés et de meilleure qualité et créer pour le personnel des programmes de présentation du système qualité
- utiliser des méthodes techniquement validées et évaluées par des experts techniques indépendants dans le domaine.

Lorsque le système qualité de l'organisation a été certifié, cette reconnaissance officielle confirme la compétence technique de l'organisation après une évaluation de ses processus, ressources, ses installations, son personnel et autres facteurs clés liés à la qualité du service fourni et ayant une incidence sur celle-ci.

De plus, le plein potentiel d'un système de management de la qualité sera évident lorsque l'organisation sera confrontée à un défi soudain pour combattre une situation inattendue, par exemple, dans un laboratoire où des tests sont requis pour

Figure 5 : Éléments clés d'un système de management de la qualité



une épidémie causée par une nouvelle maladie ou pour apporter une réponse – par exemple à l'égard de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (bactérie responsable de la maladie du chancre du kiwi) ou d'une invasion de mouches des fruits - quand des milliers d'échantillons arrivent dans un contexte de situations à évolution rapide. La situation ci-dessus peut être facilement gérée grâce à des tests de laboratoire pratiques et efficaces, supportés par des systèmes documentaires en place pour la réalisation des tests, l'enregistrement, la traçabilité des échantillons et la formation du nouveau personnel.

Une approche systématique des activités quotidiennes nécessite peu d'intervention de la part de la direction, ce qui lui permet de se concentrer sur les domaines où de l'initiative, des changements ou des améliorations sont nécessaires. En d'autres termes, les systèmes de gestion de la qualité peuvent améliorer 80 pour cent de ce que nous faisons de sorte que nous n'avons pas besoin de faire appel à notre initiative pour chaque décision. Nous pouvons alors utiliser notre temps sur les 20 pour cent d'activité restants, là où de réels problèmes doivent être résolus et où de vraies améliorations doivent être identifiées et mises en œuvre.

3.1.2 Structure du système qualité

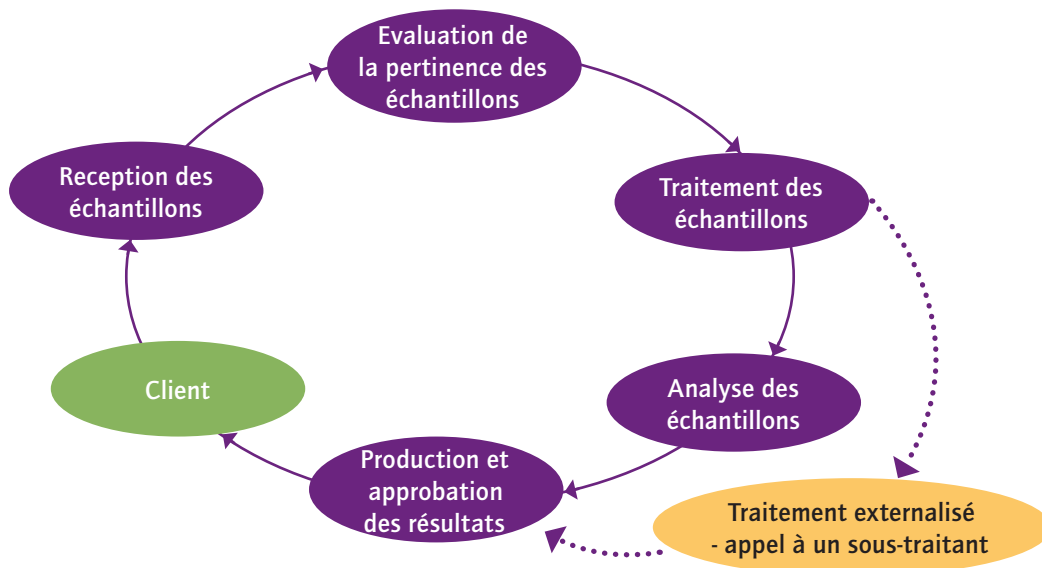
Deux exigences majeures doivent être prises en compte lors de l'établissement d'un système qualité : les exigences générales du système de management de la qualité (SMQ) et les exigences techniques. Les exigences en matière de gestion sont principalement liées au fonctionnement et à l'efficacité du système de gestion de la qualité au sein du laboratoire ou de l'entreprise. Les exigences techniques portent sur la compétence du personnel, la méthodologie, l'équipement d'essai et d'étalonnage et les méthodes d'essai.

3.1.3 Système de gestion de la qualité

3.1.3.1 Exigences générales

Lorsqu'une organisation souhaite développer un système de gestion de la qualité conforme aux exigences générales relatives à la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (ISO/CEI 17025), ou à toute autre norme ISO, la norme internationale recommande de posséder une connaissance pratique détaillée de toutes les exigences de la norme. La norme internationale encourage également une "approche par processus" pour le développement et la mise en œuvre d'un SMQ, où l'interaction entre les processus individuels et leurs liens avec les processus du système global peut être contrôlée.

Figure 6 : Guide des processus de base au sein d'un laboratoire d'essais



Pour qu'une organisation fonctionne avec succès, elle doit établir, documenter, mettre en œuvre, maintenir et améliorer continuellement son SMQ en :

- identifiant et gérant clairement les activités ou les processus du SMQ (figure 6)
- documentant les processus identifiés
- comprenant les séquences ou l'interaction de ces processus et décrire comment les résultats d'un

processus constituent un intrant pour un autre processus

- déterminant les critères permettant d'assurer le fonctionnement et le contrôle efficaces des processus en cause (ex : les critères d'acceptation des échantillons avant qu'ils puissent être prélevés pour les essais, les niveaux de rendement de l'équipement essentiels pour obtenir les résultats souhaités)

Figure 7 : Guide d'identification des processus supports requis dans un laboratoire d'essais



- planifiant la gestion et du contrôle des processus externalisés qui peuvent avoir une incidence sur les résultats prévus
- établissant des méthodes spécifiques requises pour le fonctionnement et le contrôle de chaque processus impliqué dans le SMQ - celles-ci peuvent prendre la forme d'instructions de travail, de manuels, d'une liste de contrôle de l'installation, etc.
- s'assurant que les ressources et l'information nécessaires au fonctionnement et à la surveillance de ces processus sont disponibles - les ressources comprennent les installations, l'équipement, le personnel, les produits chimiques et les réactifs (Figure 7) ; l'information comprend les feuilles de travail, les instructions de travail, les horaires de travail, etc.
- surveillant, mesurant et analysant ces processus pour vérifier la performance du SMQ à l'aide d'audits internes
- mettant en œuvre les mesures nécessaires pour atteindre les résultats escomptés et en améliorant continuellement ces processus.
- d'autres procédures documentées, à la discrétion de l'organisation, pour démontrer l'efficacité de la mise en œuvre du SMQ.
- une procédure documentée pour la gestion des enregistrements qui peuvent être soit sur papier, soit sous forme électronique - cette procédure détaille comment les enregistrements relatifs à la qualité sont identifiés, stockés, contrôlés, conservés, éliminés et modifiés.

Il est important que tous les documents et enregistrements qui font partie du SMQ soient contrôlés adéquatement.

3.1.3.3 Contrôle des documents

Un document est une information écrite ou enregistrée sur papier ou par voie électronique. Un document peut préciser les exigences (p. ex. un dessin ou une spécification technique), fournir une orientation (p. ex. un plan de qualité) ou montrer les résultats ou les preuves des activités réalisées (p. ex. des données enregistrées).

3.1.3.2 Exigences en matière de documentation

L'élaboration de documents pour le SMQ d'une organisation dépend de sa taille, des types d'activités qu'elle mène et de la complexité de ses activités. Le SMQ doit inclure :

- la politique de qualité et les énoncés d'objectifs de qualité
- le Manuel Qualité détaillant le fonctionnement du SMQ
- des procédures documentées pour au moins les six domaines suivants:³
 - contrôle des documents
 - contrôle des dossiers de qualité
 - audit interne
 - contrôle des non-conformités
 - mesures correctives
 - mesures préventives
- Tous les documents qui font partie d'un processus du SMQ doivent être contrôlés. L'organisation doit avoir sa propre procédure documentée pour les documents papier et électroniques, couvrant les éléments suivants.
- Comment un document est compilé (style, modèle, etc.) et examiné - les documents doivent aussi être facilement identifiables quant à leur objet et leur portée
- Comment les documents sont approuvés pour utilisation et par qui - seuls les documents approuvés seront utilisés.
- Comment les documents sont émis ou mis à disposition pour utilisation - si vous décidez de conserver certains documents à divers endroits, mettez en place une certaine forme de contrôle de la distribution afin que chacun utilise la version la plus récente du document.
- Comment les documents sont révisés et mis à jour - déterminer périodiquement s'il est nécessaire de mettre à jour ou de réviser la documentation du SMQ et, si les documents sont modifiés, ils doivent être approuvés de nouveau pour en vérifier la pertinence.
- Comment les informations de révision du document sont enregistrées sur le document

³ Les procédures pour plusieurs activités peuvent être combinées en une seule procédure documentée (par exemple, action corrective et action préventive) ou pour documenter une activité donnée en utilisant plus d'une procédure documentée (par exemple, audits internes).

- identifiez les modifications apportées aux documents, afin que les utilisateurs sachent exactement ce qui a changé.
- Comment la lisibilité et la récupérabilité des documents sont assurées - examiner régulièrement l'état des documents papier fréquemment utilisés afin de déterminer s'ils doivent être remplacés.
- Comment les documents sont conservés et stockés - les documents obsolètes peuvent poser de nombreux problèmes s'ils ne sont pas contrôlés ; si des documents informatisés sont utilisés, ne rendez accessible que la version actuelle aux postes de travail en mode lecture seule ; les documents obsolètes doivent être supprimés immédiatement ; dans le cas des documents papier, retirez les documents obsolètes en contrôlant leur distribution.
- Comment les documents sont archivés - assurez-vous que tous ces documents sont correctement identifiés, indexés et classés et, de préférence, que leur accès est contrôlé ou restreint.
- Un index principal mentionnant tous les documents actuels ainsi que leur date de publication et dates de modification.

Note : Les non-conformités à l'encontre du processus de contrôle des documents sont l'une des constatations les plus fréquentes lors des audits.

3.1.3.4 Directives pour la rédaction de documents

En écrivant :

- rester simple, pratique et flexible
- veiller à avoir "juste assez" d'informations et pas plus
- écrire clairement et simplement
- utiliser un langage simple, que votre personnel connaît et utilise
- utiliser des organigrammes ou des représentations graphiques, s'il y a lieu
- veiller à ce que chaque document soit le plus clair et le plus court possible
- ne rédiger un document (qu'il s'agisse d'une procédure, d'un formulaire, d'une liste de contrôle, etc.) que s'il est nécessaire.

3.1.3.5 Contrôle des enregistrements dans un système qualité

Un enregistrement est un document spécial qui fournit la preuve des résultats obtenus ou de l'activité réalisée, des feuilles d'essai, des dossiers d'étalonnage, des feuilles de formation, etc.

- Veiller à ce qu'il existe une procédure documentée pour le contrôle des dossiers de qualité qui précise l'autorité, la façon dont les dossiers sont identifiés, stockés, protégés, récupérés, conservés et éliminés. Celles-ci doivent être définies pour les documents qui sont sur support papier ou électronique.
- S'assurer que les documents sont lisibles, facilement identifiables et récupérables.
- S'assurer qu'aucune modification non autorisée des dossiers n'est permise et que les changements doivent être paraphés et datés. L'information originale doit encore être visible.
- Veiller à ce que les registres soient tenus de manière à minimiser les dommages, la détérioration ou la perte.
- Veiller à ce que les documents soient entreposés de façon ordonnée pour faciliter la récupération (indexation et classement des documents papier ou électroniques).
- Tenir une liste de toutes les différentes catégories de documents et définir les délais de conservation associés à chaque catégorie (inspection et essai, ventes et achats, revue de direction, étalonnage, formation, etc. Les délais de conservation sont déterminés par les exigences et les politiques du client, de la réglementation, de l'industrie ou de l'organisation.
- Éliminer les documents à la fin de la période d'entreposage requise. L'élimination pourrait aller de la destruction permanente des documents par incinération ou déchiquetage, à leur entreposage permanent dans des archives sécurisées sur place ou hors site.

3.2 Responsabilités de la direction

3.2.1 Politique de qualité et objectifs de qualité

La politique de qualité et les objectifs de qualité sont des éléments pertinents pour atteindre les objectifs

et les attentes de l'organisation et les besoins des clients de l'organisation. Cet énoncé de politique doit orienter les efforts d'une organisation en matière de qualité. Par conséquent, ils devraient être :

- être à jour et adaptés au travail de l'organisation et aux services qu'elle fournit à ses clients
- s'appuyer sur les valeurs, la vision, la mission et la stratégie d'affaires de l'organisation
- se conformer à la loi et être pertinents par rapport aux normes nationales et internationales
- fournir un cadre pour l'établissement et la révision des objectifs de qualité
- être élaborés et entièrement appuyés par la direction générale
- faire l'objet d'un examen continu à intervalles fixes (p. ex., chaque année) lors des réunions de la direction générale pour s'assurer que la politique et les objectifs répondent aux objectifs opérationnels
- sensibiliser tous ceux qui participent à l'élaboration, à la mise en œuvre ou au maintien du système qualité.

Note : La politique de qualité est un document dynamique qui devrait changer à mesure que les besoins, les orientations et les activités commerciales de l'organisation changent.

Il convient de préparer des objectifs de qualité à partir de la politique de qualité de l'organisation pour s'assurer que les engagements pris par l'organisation dans sa politique de qualité sont atteints. Les objectifs sont ensuite documentés et examinés par la direction générale. Ces objectifs devraient être :

- constructifs
- mesurables (ce que vous voulez accomplir et comment vous le mesurez)
- attribués avec des responsabilités pour leur établissement, leur réalisation, l'évaluation de leur performance.

La direction générale doit déterminer les plans d'action nécessaires pour atteindre ces objectifs. Ils doivent démontrer leur engagement envers l'amélioration continue, puis documenter les objectifs de communication à tous ceux qui participent au SMQ.

3.2.2 Manuel qualité

Le manuel qualité démontre et documente l'engagement d'une organisation à maintenir un niveau élevé de qualité et de services opérationnels. L'organisation doit établir et tenir à jour un manuel qualité. Le manuel qualité décrit un SMQ et indique comment il doit fonctionner. Il doit contenir :

- la portée du SMQ avec les détails de toute exclusion réclamée par l'organisation
- les procédures documentées établies pour que le SMQ gère l'entreprise (procédures, politiques, formulaires, listes de contrôle, etc.) ou la référence à ces procédures documentées
- une description de l'interaction entre les processus du SMQ.

Le manuel qualité peut être combiné avec d'autres manuels du système de gestion (manuels de l'entreprise), mais il est recommandé de le garder simple et séparé des manuels de l'entreprise. Un seul manuel peut suffire pour les besoins d'une petite entreprise, alors qu'une grande organisation peut en avoir besoin de plusieurs.

Il est recommandé de demander à une tierce partie d'examiner le SMQ et son manuel avant de faire une demande de certification.

3.2.3 Responsabilités et pouvoirs de gestion

La direction générale d'une organisation doit définir les fonctions opérationnelles et leurs interrelations au sein de l'organisation, y compris les responsabilités et les pouvoirs.

- Qui a la responsabilité générale de la gestion de l'organisation ou de l'entreprise ?
- Qui a la responsabilité générale de veiller à ce que le SMQ soit maintenu et amélioré et que les problèmes du système soient résolus en temps opportun ?
- Qui est responsable du maintien de la qualité et de la mise en œuvre du SMQ au sein de l'équipe ou du groupe ?
- Qui est responsable du fonctionnement technique de l'entreprise et qui sont leurs adjoints pour assumer ce rôle en leur absence ?
- Qui est responsable d'élaborer, de maintenir, de superviser, de rendre compte et de faciliter la gestion continue des systèmes qualité par l'orientation, la formation, le travail d'équipe et l'aide ?

Un rôle important de la direction générale consiste à nommer comme 'Représentant Qualité' un membre de la direction qui a suffisamment d'autorité pour s'acquitter efficacement des responsabilités du SMQ. Il est préférable que cette personne soit membre de la direction générale, mais il n'est pas nécessaire qu'elle le soit.

La direction générale peut avoir à prouver la nomination du Représentant Qualité en affichant un avis de nomination, en assistant aux réunions d'examen du SMQ et en fournissant un soutien, une autorisation et des ressources pour les activités du SMQ. Le représentant de la direction peut être une personne à temps plein ou un sous-traitant.

3.2.3.1 Rôle du représentant de la qualité

- Communiquer, déléguer, habiliter, rendre compte, superviser et interagir avec les personnes à tous les niveaux de l'organisation et à l'extérieur.
- Assister les responsables de processus, en développant leurs processus et en appliquant les exigences standard pertinentes.

- Rendre compte du rendement du SMQ à la direction générale lors de réunions d'évaluation de la gestion ou d'autres réunions.

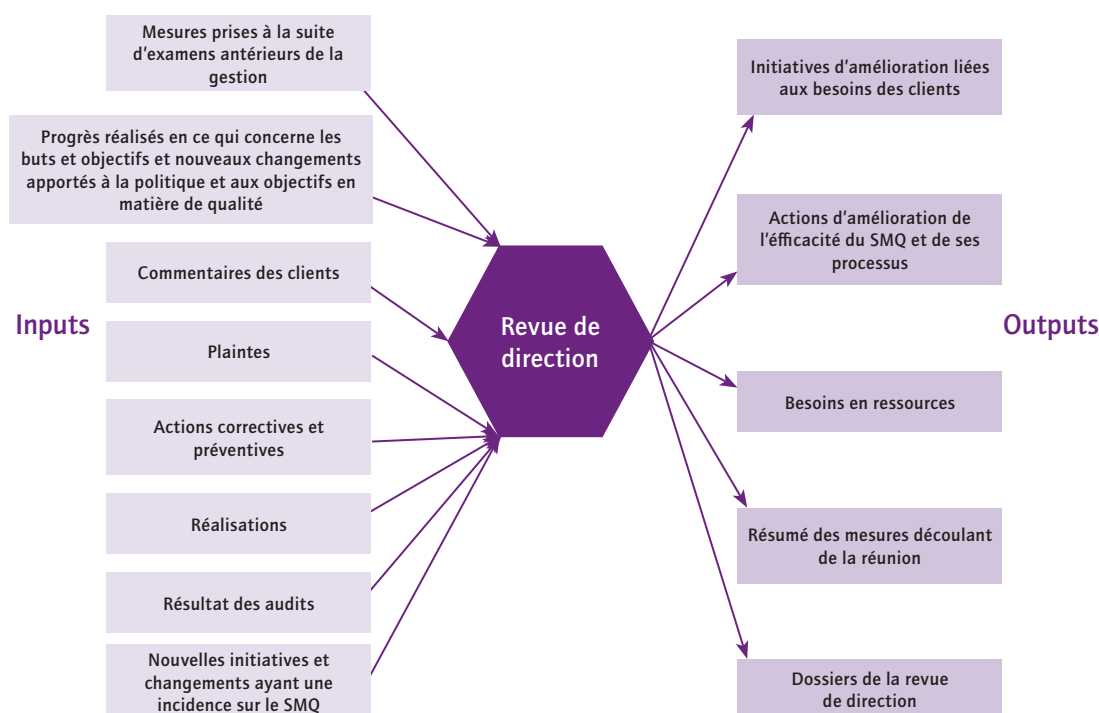
L'organisation doit s'assurer que la responsabilité, l'autorité et les interrelations du personnel qui gère, exécute et vérifie le travail qui affecte la qualité sont définies et documentées. Ces responsabilités doivent être communiquées au personnel afin de faciliter une gestion efficace de la qualité.

La structure, la position et le rôle du personnel au sein de l'organisation peuvent être présentés sous forme d'organigramme.

3.2.4 Revue de direction

Les revues de direction sont des processus d'examen interne effectués par des cadres supérieurs qui examinent le SMQ de l'organisation pour s'assurer de sa pertinence et de son efficacité continues et pour apporter toute modification ou amélioration nécessaire, y compris à la politique et aux objectifs de qualité de l'organisation. Un schéma du processus d'examen est présenté à la figure 8.

Figure 8 : Schéma du processus d'examen du management



3.2.4.1 Représentant qualité

Le représentant qualité rendra compte de la performance du SMQ à la direction générale lors des réunions d'examen de la gestion. Les informations nécessaires au rapport proviendront des résultats des exigences en matière de mesure et de surveillance (p. ex. les vérifications internes et les rapports de vérification commentaires sur la satisfaction de la clientèle). Ces informations sont compilées à partir de tous les responsables de processus.

3.2.4.2 Analyse des inputs

L'examen des inputs au management comprennent, sans toutefois s'y limiter, la performance actuelle et les possibilités d'amélioration.

3.2.4.3 Analyse des outputs

L'examen des outputs du management comprennent, sans toutefois s'y limiter, les décisions prises et les actions réalisées.

3.3 Gestion des ressources

La direction générale a la responsabilité de s'assurer que des ressources sont disponibles pour élaborer et maintenir le SMQ. Il est important de disposer de ressources adéquates pour répondre aux besoins des clients, faute de quoi il est possible que des non-conformités (c.-à-d. des écarts par rapport aux exigences procédurales) surviennent en raison d'une utilisation insuffisante ou inappropriée des ressources. Par exemple, il est nécessaire de vérifier que le personnel, le matériel et l'équipement sont disponibles pour assurer la production et la livraison en temps opportun des produits, des essais et des services.

Les ressources peuvent comprendre :

- Le personnel
- Les équipements
- Les réactifs et matériaux
- Les informations (peuvent être des procédures ou des instructions de travail)
- Les installations
- Le milieu de travail
- Les finances.

Il est bon de commencer par déterminer la nature des besoins en ressources pour chaque processus et de déterminer la disponibilité des

ressources dans la planification des activités. Le montant réel des ressources nécessaires peut varier d'un jour à l'autre et sur de plus longues périodes, de sorte que la direction générale doit examiner le rendement du SMQ à intervalles réguliers.

Il faut envisager d'élaborer des indicateurs de performance pour chaque grande catégorie de ressources utilisées, comme les appareils et l'équipement, les ressources humaines, les installations et l'environnement, le transport et les systèmes de communication, pour évaluer le recours réel à ces ressources.

3.3.1 Ressources humaines

Le personnel compétent est tenu de produire des produits, des essais et des services conformément à la documentation du produit ou aux exigences définies pour le service. Les membres du personnel doivent être compétents et posséder la formation, les compétences et l'expérience appropriées.

La direction générale, lorsqu'elle planifie les besoins en ressources, doit s'assurer de:

- la détermination des critères de compétence, l'évaluation des compétences et l'identification des besoins de formation du personnel travaillant dans chaque processus qui affecte la qualité du produit ou du service
- l'élaboration des exigences pour une formation individualisée dans le cadre du processus annuel de planification de la performance et l'évaluation de l'efficacité de cette formation lors de l'examen de la performance - il est utile de disposer d'un planning de formation où les compétences et la formation suivie par les individus peuvent être consignées et consultées en vue d'une planification future
- la sensibilisation du personnel à son rôle et à ses responsabilités dans l'exécution du travail - cela sera indiqué dans la fiche de poste et le plan de performance de l'employé
- la sensibilisation du personnel aux exigences de qualité dans son domaine de travail - promouvoir la sensibilisation à la qualité par des réunions d'équipe et la participation à la planification de la qualité
- l'élaboration de listes de contrôle pour l'intégration et l'évaluation des compétences

- la détermination des enregistrements qui doivent être conservés en ce qui concerne les études, la formation, les compétences et l'expérience - ces enregistrements doivent démontrer le fonctionnement efficace du personnel qui travaille dans le SMQ, par exemple. dans un dossier de formation
- la création d'une procédure pour décrire le processus d'accueil requis pour tous les nouveaux employés, la gestion des formation internes et externes, la tenue des dossiers de formation du personnel et la façon dont l'évaluation et la formation des compétences sont effectuées, afin de s'assurer que tous les employés reçoivent une formation conforme aux exigences afin que seuls les employés formés aux compétences requises ou supervisés par un membre de l'équipe qualifié effectuent le travail.

Par exemple : tous les membres du personnel peuvent se voir remettre un dossier de formation préparé pendant leur formation initiale ; ce dossier est :

- étiqueté avec le nom du membre du personnel
- divisé en sections comme le montre la figure 9.

3.3.2 Infrastructure, installation et environnement

Les exigences relatives aux types de ressources d'infrastructure nécessaires à une organisation peuvent inclure :

- Les bâtiments
- Les espaces de travail
- Le matériel et les logiciels
- Les services de soutien.

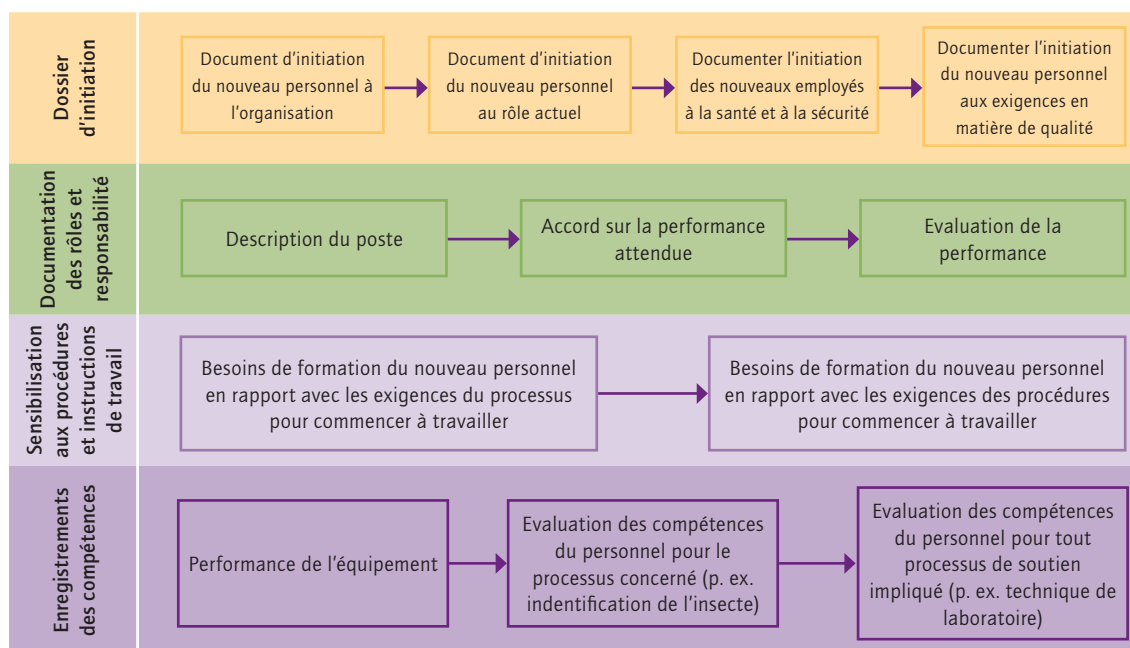
Cette infrastructure doit être identifiée, équipée et entretenue par la direction générale. En outre, des systèmes devraient être en place pour la maintenance réactive et préventive de l'infrastructure.

Les principaux facteurs à prendre en compte pour la planification de l'infrastructure sont les suivants :

- La disponibilité et capacité actuelles
- Les besoins ultérieurs
- L'expansion pour la croissance
- La planification des mesures d'urgence et les liens avec les programmes actuels et futurs.

Afin d'obtenir des produits et des services de qualité conformes aux exigences des clients,

Figure 9 : Composantes du dossier de formation du personnel



L'organisation doit décider des conditions de l'environnement de travail et les gérer.

L'environnement de travail est lié aux conditions dans lesquelles le travail est effectué, y compris les facteurs physiques, environnementaux et autres, tels que le bruit, la température, l'humidité, l'éclairage, les conditions météorologiques, l'ergonomie, l'hygiène, la propreté, la pollution, les installations particulières (cantine, cafétéria, toilettes), les règlements en matière de santé et sécurité, la propreté des locaux pour éviter la contamination.

En fonction de la taille du laboratoire, des risques et d'autres considérations, les facteurs environnementaux listés ci-dessus peuvent s'appliquer à toute l'organisation ou à seulement certaines parties. L'accent devrait être mis sur la sécurité des employés, le bien-être et la conformité des produits. Les exigences pour l'industrie et d'autres réglementations aideront à fournir des lignes directrices sur les normes acceptables pour le milieu de travail.

3.4 Mesure, analyse et amélioration

L'organisation doit planifier et mettre en œuvre des procédures pour mesurer, analyser et améliorer l'efficacité de son SMQ. L'accent doit être mis sur :

- La conformité des produits et services aux exigences du client
- La conformité des procédés utilisés aux exigences standards
- L'amélioration continue de l'efficacité du SMQ.

3.4.1 Surveillance et mesure

L'organisation peut commencer à surveiller et à mesurer grâce à des objectifs axés sur la satisfaction des besoins des clients, puis élaborer lentement des objectifs plus significatifs pour les processus clés et les processus à risque, à mesure que les objectifs initiaux sont atteints.

La surveillance et la mesure dans les domaines suivants doivent être abordées.

3.4.1.1 Satisfaction de la clientèle

L'organisation doit surveiller l'opinion des clients sur le rendement des services de base de l'organisation. Les commentaires des clients peuvent être

recueillis à partir de sondages auprès des clients, de sondages d'opinion auprès des utilisateurs, de commentaires sur les produits et services fournis, d'analyses commerciales perdues, de compliments, de plaintes, etc. La direction générale doit décider comment, quand, par qui et quel type d'information sera recueilli auprès du client. Un exemple de questionnaire qu'un laboratoire d'analyse peut inclure dans son sondage de satisfaction clients est donné à la figure 10.

L'organisation peut également offrir aux clients la possibilité d'accéder à l'installation ou au laboratoire pour voir comment les essais sont effectués. Cela crée de la bonne volonté et offre une occasion supplémentaire de recueillir des informations sur les besoins des clients.

3.4.1.2 Audits internes

Les audits doivent être effectués conformément à une procédure documentée afin de fournir un feedback à la direction sur l'efficacité du SMQ en place.

La dernière étape du processus de mise en œuvre du SMQ consiste à entreprendre un audit interne de la qualité afin de déterminer les incohérences, le cas échéant, dans le nouveau système mis en œuvre.

Il est important d'effectuer ce type d'audit régulièrement, même après la mise en place du SMQ dans l'organisation, afin de suivre la performance par rapport aux objectifs fixés. Les résultats de l'audit doivent être communiqués à la direction générale. Le personnel interne doit être formé pour effectuer de tels audits. Les enregistrements des audits et des résultats doivent être conservés comme une source clé de données.

Les objectifs de l'audit comprennent :

- l'évaluation du système actuel par rapport à la conformité aux normes, aux processus et aux procédures de l'organisation pour examiner la performance à l'aide d'une portée claire et de méthodes de vérification claires
- l'identification des possibilités d'amélioration du système existant
- la détermination des lacunes du SMQ
- la démonstration de l'amélioration continue qui s'est produite.

Figure 10 : Formulaire d'enquête de satisfaction client

Note : Utiliser l'échelle de 1 à 5 où 1 correspond à une très mauvaise norme et 5 à une excellente norme.

1. Comment évalueriez-vous le laboratoire ou l'entreprise par rapport à chacune des caractéristiques de service suivantes ?

Rapidité avec laquelle les résultats sont obtenus	<input type="text"/>
Crédibilité technique	<input type="text"/>
Format des rapports	<input type="text"/>
Informations et conseils fournis	<input type="text"/>
Accessibilité et convivialité	<input type="text"/>
Flexibilité pour répondre à vos besoins	<input type="text"/>
Prix	<input type="text"/>
Performance globale	<input type="text"/>

2. Selon vous, quel est le meilleur aspect des services offerts par le laboratoire ou l'entreprise ?

3. Y a-t-il des services qui, selon vous, pourraient être améliorés ? Comment pourrait-on les améliorer ?

4. De quelle manière pensez-vous que le laboratoire pourrait améliorer sa communication avec vous ?

5. Si vous pouviez accéder à l'information via intranet, quel type d'information serait utile ?

6. Tout autre commentaire

Nom de l'interviewé : Intervieweur :

Fonction de l'interviewé :

Organisation :

Lieu :

Date:

3.4.1.3 Surveillance et mesure du produit (contrôle de la qualité)

La qualité des produits, des tests et des services est contrôlée et mesurée pour s'assurer que les besoins et les exigences des clients sont satisfaits. Pour ce faire, on procède à des inspections et à des essais en relation avec :

- La mesure des caractéristiques du produit et les caractéristiques des essais
- La vérification des résultats aux différentes étapes des processus
- L'apport de la preuve de la conformité aux critères d'acceptation par l'utilisation régulière de matériaux de référence certifiés
- La participation à des comparaisons inter-laboratoires ou à des programmes d'essais d'aptitude
- L'autorisation de mise en circulation du produit
- La réplication des essais à l'aide de méthodes identiques ou différentes
- La répétition des essais au besoin
- L'achèvement des activités prévues avant la livraison.

Des procédures doivent être mises en place pour surveiller la validité des tests et des résultats, pour analyser les données afin d'identifier les tendances et les résultats non conformes, pour enquêter sur les défaillances et les tendances identifiées et pour empêcher l'envoi de résultats erronés.

L'information produite par les activités de surveillance et de mesure de l'organisation doit être recueillie et analysée dans le but d'améliorer continuellement l'efficacité du SMQ. Des données supplémentaires provenant des audits internes, des suggestions des employés et des plaintes des clients peuvent également être utilisées à cet égard

3.4.1.4. Contrôle des produits non-conformes

Malgré les meilleures intentions, la formation et les communications régulières, certaines parties du SMQ et les activités de l'organisation peuvent ne pas être efficaces ou suffisantes pour prévenir des défauts du produit, des lacunes dans les services et des plaintes.

L'identification des non-conformités pourrait être effectuée à divers endroits du système de

management et des opérations techniques (p. ex. le contrôle de la qualité, les audits, les plaintes, l'étalonnage de l'équipement, les standards, les contrôles ou les consommables sont hors des spécifications). Mais lorsque de telles situations se présentent, il est nécessaire que le SMQ s'occupe de gérer ces déficiences. Ces cas doivent être enregistrés comme des non-conformités et les processus doivent être mis en œuvre pour répondre aux problèmes soulevés et les résoudre.

La procédure doit prévoir :

- Qui est responsable de prendre des décisions lorsque des travaux non conformes sont identifiés, p. ex. l'arrêt des travaux ?
- Quelles mesures immédiates doivent être prises lorsque des travaux non conformes sont identifiés (p. ex. documentation, notification à des cadres supérieurs) ?
- Comment évaluer l'importance des travaux non-conformes
- La notification au client et le rappel des résultats d'essais ou des produits
- Les mesures correctives à prendre et identifier la possibilité que des travaux non conformes se reproduisent.

3.4.2 Amélioration

L'amélioration est un processus proactif pour identifier les possibilités d'amélioration, plutôt qu'une réaction à l'identification de problèmes (non-conformités) ou de plaintes.

L'organisation doit continuellement améliorer l'efficacité de son SMQ par l'utilisation de la politique qualité, des objectifs qualité, des résultats des audits, des actions correctives et préventives et de la revue de direction. L'amélioration continue du SMQ est une exigence essentielle d'une stratégie efficace de gestion de la qualité.

3.4.2.1 Mesures correctives

Des mesures correctives sont prises lorsqu'il y a un écart par rapport à une procédure ou à une politique approuvée. La non-conformité est habituellement identifiée à la suite d'un audit mais il peut y avoir des cas où des non-conformités sont relevées en dehors d'un audit, par exemple à la suite de plaintes ou d'examen de gestion.

Une procédure documentée doit être établie par l'organisation pour éviter que des non-conformités ne se reproduisent.

- Désigner les autorités appropriées pour la mise en œuvre des mesures correctives.
- Identifier la nature et la cause profonde de la non-conformité.
- Identifier et mettre en œuvre les mesures correctives nécessaires pour éviter que la non-conformité ne se reproduise - cela peut nécessiter un changement des pratiques de management pour créer, modifier ou réviser les contrôles, tels que les procédures ou la formation, afin d'éviter que la non-conformité ne se reproduise.
- Pensez à ce qui peut être fait et à ce qui sera fait pour surveiller les mesures correctives.
- Consigner tout changement apporté aux procédures documentées à la suite de la mesure corrective.

Note : Un formulaire ou un enregistrement (figure 11) peut être conçu pour encoder une non-conformité qui est relevée, puis transmise au personnel désigné pour qu'il prenne les mesures correctives nécessaires.

3.4.2.2. Mesures préventives

Une procédure documentée est nécessaire pour éviter les non-conformités potentielles. Pour ce faire, l'organisation doit identifier et traiter activement les causes des non-conformités potentielles ou des possibilités d'amélioration à l'aide des outils de gestion de la qualité totale.

Établissez une procédure qui :

- identifie le membre du personnel chargé de mener à bien l'action requise pour mettre en œuvre l'amélioration
- fixe le calendrier convenu pour l'achèvement des travaux
- surveille l'avancement des travaux au moyen d'un système de suivi
- détermine si des mesures de suivi sont nécessaires et les organise pour qu'elles soient prises
- nécessite une signature par une personne autorisée lorsque la mesure est prise
- tient un registre de la documentation des travaux achevés pour classement dans le SMQ.

Note : Un formulaire ou un enregistrement (figure 12) peut être prévu pour encoder une opportunité d'amélioration qui a été identifiée, puis remise au personnel désigné pour qu'il prenne les mesures nécessaires.

3.5 Exigences techniques

De nombreux facteurs déterminent l'exactitude et la fiabilité des tests effectués par le laboratoire, y compris, mais sans s'y limiter :

- les achats
- les facteurs humains
- les conditions d'installation et environnementales
- les méthodes d'essai et leur validation
- la traçabilité des équipements et de leurs mesures
- la manipulation des éléments d'essai.

3.5.1 Les achats

L'organisation doit réduire et prévenir tout problème au moyen d'un système d'achat efficace pour fournir des produits et services de qualité. Par conséquent, tout ce qui est acheté doit répondre aux exigences spécifiées par l'organisation grâce à :

- l'établissement de méthodes d'évaluation des fournisseurs ou entrepreneurs
- l'établissement de critères de sélection pour la sélection des produits achetés, des fournisseurs et des sous-traitants - la documentation produite lors de l'achat (p. ex. bon de commande, carte de crédit ou autre reçu, bordereau d'expédition), y compris les données décrivant les services et les fournitures commandés, doit être examinée et approuvée pour le contenu technique avant la livraison afin de réduire les risques qu'un produit incorrect soit livré.

Lorsque le service ou l'approvisionnement est finalement reçu, il doit y avoir un processus pour s'assurer qu'il répond aux besoins et aux exigences de l'organisation.

3.5.2 Le personnel

La direction du laboratoire doit veiller à ce que tout le personnel travaillant dans le laboratoire reçoive une formation sur les techniques de laboratoire et l'utilisation des instruments afin que seul le personnel ayant reçu une formation adéquate ou

Figure 11 : Formulaire d'enregistrement des non-conformités

Numéro de la non-conformité :	Source : Équipement/Contrôle de la qualité/ Réclamation/ Audit	
NON CONFORMITÉ <i>Décrire la nature de la non-conformité</i>	ÉQUIPE	
DATE DE SIGNALEMENT	SIGNATURE	
ANALYSE DE LA CAUSE <i>Identifier les causes profondes de la non-conformité</i>	Personne qui analysera la cause	
	Date d'achèvement	
DATE DE RÉALISATION	SIGNATURE	
<i>Personne effectuant l'analyse de cause</i>		
ACTION(S) CORRECTIVE(S) (qu'a-t-on fait pour mettre en œuvre les mesures correctives ?) <i>Mesures les plus susceptibles d'éliminer le problème et d'empêcher qu'il ne se reproduise</i>		
DATE DE RÉALISATION	SIGNATURE	
<i>Personne qui prend des mesures en cas de non-conformité</i>		
SUIVI/CLÔTURE	Audit de suivi requis:	Oui / Non
<i>Qu'a-t-on fait et qu'est-ce qui sera fait pour surveiller les mesures correctives ?</i>		
DATE DE CLÔTURE	SIGNATURE	

supervisé de manière appropriée effectue les tests, évalue les résultats et signe les rapports de test. Le personnel qui suit une formation doit être supervisé de façon appropriée lorsqu'il entreprend des tests.

La direction est responsable de :

- identifier les compétences requises pour le personnel travaillant dans le domaine

- veiller à ce que l'évaluation et la formation soient effectuées
- s'assurer que le formateur est compétent
- s'assurer que les modules de formation choisis sont appropriés et que les critères de formation sont respectés pour exécuter les procédures de laboratoire qu'ils sont sensés pouvoir exécuter

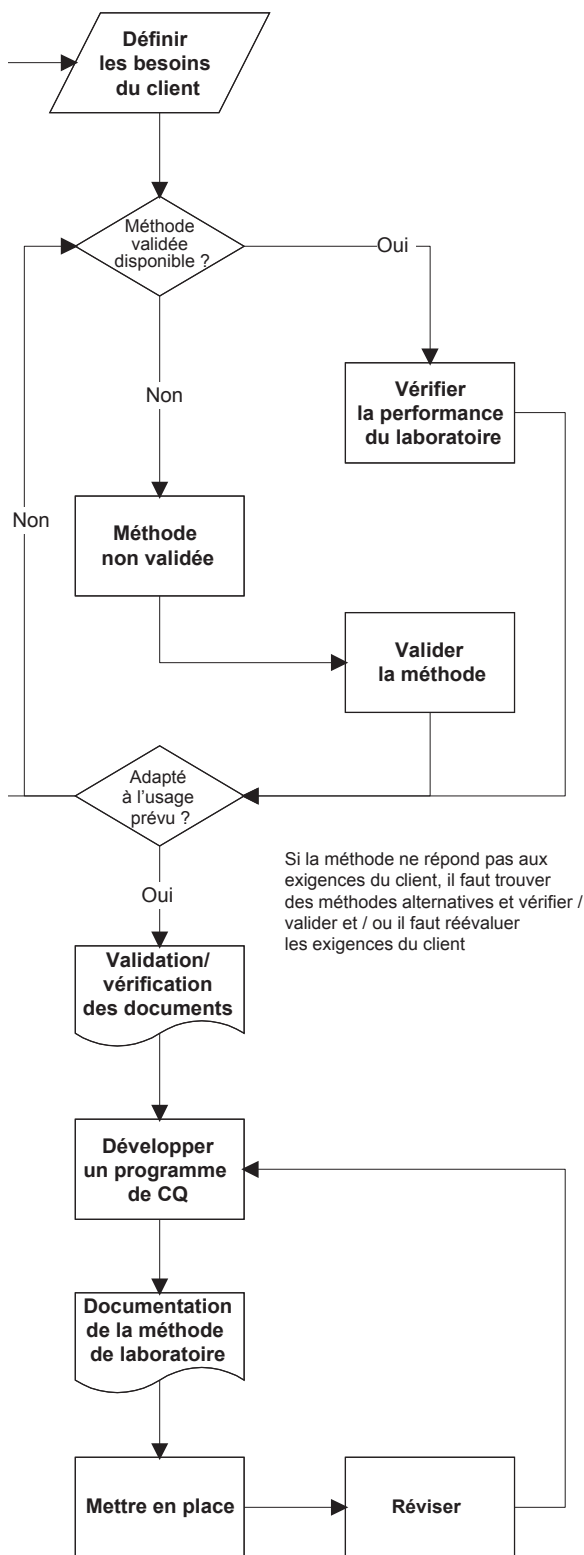
Figure 12 : Formulaire pour l'enregistrement de l'amélioration de la qualité (FAQ)

Numéro de l'amélioration de la qualité :		Source : Équipement/Contrôle de la qualité/ Réclamation/ Audit	
AMÉLIORATION DE LA QUALITE			
<i>Identifier les sources possibles d'amélioration</i>			
DATE DE SIGNALEMENT		SIGNATURE	
MESURES PRISES POUR METTRE EN ŒUVRE L'AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ			
Personne qui accomplira l'amélioration		Date d'achèvement convenue	
DATE DE RÉALISATION		SIGNATURE	
<i>Personne qui prend des mesures pour mettre en œuvre l'amélioration de la qualité</i>			
SUIVI/CLÔTURE		Audit de suivi requis: Oui / Non	
<i>Quelles mesures ont été et seront prises pour surveiller l'amélioration de la qualité (s'il y a lieu, inclure des preuves objectives dans le FAQ complété) ?</i>			
DATE DE CLÔTURE DE LA FAQ		SIGNATURE	

- s'assurer que le stagiaire ne participe pas aux méthodes d'essai en laboratoire jusqu'à ce que les enregistrements de sa formation démontrent ses compétences de base pour le travail en laboratoire
- s'assurer que les stagiaires n'utilisent pas les équipements décrits comme les plus importants dans les principaux modules jusqu'à ce que les enregistrements de leur formation démontrent leur compétence à utiliser ces appareillages importants.

Pour plus de détails, se reporter à la section 1.5 Ressources humaines.

Figure 13 : Processus généraux de validation des méthodes dans les laboratoires d'essais biologiques



Essais biologiques

Les besoins des clients doivent être définis et devraient inclure, sans toutefois s'y limiter :

- pourquoi les tests sont-ils effectués ?
- y a-t-il une limite de spécification ?
- quelle précision est requise ?
- quelle limite de détection/précision est requise ?
- délai d'exécution ?
- coût (y compris le développement) ?

Obtenir une **méthode validée** à partir des :

- normes internationales
- normes nationales
- autres méthodes validées (p.ex. ASTM, AOAC, AOCS, APHA, etc.)

Vérifier la performance du laboratoire :

- vérification des compétences
 - documents de référence
 - détermination de la limite de détection
 - détermination de la répétabilité
 - détermination de la reproductibilité
 - consommables vérifiés
- Des méthodes non validées peuvent être obtenues auprès de :

- journaux
- clientèle
- en interne

Toutes les méthodes doivent être **validées**, par exemple par :

- vérification des compétences
- documents de référence
- confirmation de linéarité
- confirmation de spécificité
- évaluation de la robustesse
- effets de matrice/spiking
- détermination de la limite de détection
- détermination de la répétabilité/reproductibilité
- consommables vérifiés

Élaborer un **programme de contrôle de la qualité de routine**, par exemple

- reproductions
- crampons
- documents de référence
- vérification des compétences

Après la mise en œuvre, un programme de révision devrait être lancé

Source : International Accreditation, Critères d'accréditation spécifiques à la Nouvelle-Zélande - Essais biologiques, utilisés avec l'autorisation de l'IANZ

3.5.3 Conditions d'installation et d'environnement

Les installations de laboratoire utilisées pour les essais devraient permettre une exécution correcte des essais. Les exigences techniques relatives aux conditions d'installation et aux conditions environnementales qui peuvent influencer sur les résultats des essais doivent être documentées dans les procédures techniques. Il est également nécessaire de surveiller, de contrôler et d'enregistrer les conditions (stérilité biologique, poussière, humidité, température, alimentation électrique, etc.) comme l'exigent les spécifications pertinentes lorsqu'elles influent sur la qualité des essais. Une attention particulière doit être portée à l'accès à certaines zones d'essai, à la bonne tenue des lieux et à la séparation efficace des activités incompatibles, afin de prévenir les contaminations croisées.

3.5.4 Méthode d'essai et validation de méthode

Le laboratoire doit utiliser des procédures d'essai normalisées et acceptées à l'échelle internationale ou nationale, ou des procédures non normalisées (méthodes internes) qui ont été validées de manière appropriée et qui sont effectuées régulièrement. Lorsque le laboratoire applique des méthodes normalisées, il doit les maintenir à jour. Le laboratoire doit vérifier qu'il est en mesure d'appliquer correctement les méthodes normalisées afin d'obtenir des limites appropriées de détection, de sélectivité, de répétabilité et de reproductibilité avant de débiter les essais.

Les méthodes non standard sont des méthodes internes qui pourraient inclure :

- des méthodes développées au sein du laboratoire
- des méthodes d'essai normalisées modifiées tirées de publications scientifiques mais non validées.

Le laboratoire doit valider ces méthodes pour s'assurer qu'elles sont adaptées à l'usage auquel elles sont destinées et conserver tous les documents qui y sont associés pour référence. Voir la Figure 13 pour les processus généraux de validation des méthodes.

3.5.5 Les équipements et leur traçabilité des mesures

Le laboratoire doit contenir tout le matériel d'essai nécessaire à l'exécution correcte des essais. Les étalonnages et les mesures qu'il effectue doivent être

conformes aux exigences des normes internationales et être entièrement traçables. La direction est responsable de :

- s'assurer que chaque pièce d'équipement du laboratoire est identifiée de façon unique
- s'assurer que la validation ou l'étalonnage initial du nouvel équipement a lieu avant son utilisation, afin de confirmer que l'article satisfait aux critères d'achat et de démontrer que l'équipement et les composants fonctionnent conformément aux spécifications utilisées pour les critères d'acceptation initiale
- s'assurer que l'équipement utilisé pour les essais est capable d'atteindre la précision prévue pour les essais
- s'assurer que les exigences en matière d'entretien, d'étalonnage et de maintenance sont planifiées et respectées en temps opportun pour tous les équipements utilisés pour les essais
- s'assurer que la documentation (p. ex. les registres des utilisateurs, les dossiers d'entretien) est tenue à jour
- si nécessaire, veiller à ce que des mesures correctives appropriées soient prises
- s'assurer que la procédure est rédigée de manière à couvrir l'utilisation et l'entretien de l'équipement et que l'équipement est utilisé par le personnel autorisé en suivant des instructions à jour
- s'assurer que l'état d'étalonnage est indiqué sur l'équipement
- s'assurer que les étalonnages sont traçables au Système International d'Unités (unités SI), s'il y a lieu.

3.5.6 Manipulation des éléments d'essai

Le laboratoire devrait élaborer une procédure documentée pour la réception, la manipulation, la protection, l'entreposage, le transport, la conservation et l'élimination des éléments d'essai reçus aux fins d'analyse dans le laboratoire. Cette procédure devrait préciser :

- comment identifier de façon unique chaque élément d'essai dans le laboratoire afin que cette identification soit conservée tout au long du processus d'essai
- la façon de consigner les éventuelles anomalies des éléments d'essai, et la consultation du client pour obtenir les instructions ou les mesures supplémentaires nécessaires
- comment éviter la détérioration pendant la manipulation, l'entreposage et la préparation.

3.5.7 Sous-traitance des essais

Si le laboratoire veut sous-traiter certains travaux, il doit tenir compte des critères suivants :

- s'assurer que les travaux sont exécutés par des sous-traitants compétents et appropriés
- s'assurer que le client est informé de ces dispositions
- s'assurer que la responsabilité du travail du sous-traitant incombe au laboratoire

- s'assurer qu'un registre des sous-traitants est tenu à jour et qu'une preuve de la compétence de chaque sous-traitant pour le travail concerné est consignée.

3.6 Documents modèles

Manuel Qualité

Titre du Manuel Qualité

Enregistrement des informations de contrôle des documents

Version N°	Date de mise en service	Description	Rédacteur	Réviseur	Editeur	Approbateur

Table des matières
[selon les sections suivantes]

Manuel Qualité de XYZ

1. Objet
[Décrivez la raison d'être de la procédure, par exemple le manuel du système de gestion de la qualité, qui décrit en détail la politique de qualité de l'organisation, les objectifs, les responsabilités du personnel, le système de gestion, etc.]

2. Portée
[Décrivez à quoi ou à qui s'appliquent les procédures.]

3. Actions
[Inclure l'information pertinente pour le sujet décrit par le texte et/ou l'organigramme. Cela identifiera les personnes responsables du contrôle efficace de l'activité.]

3.1 Introduction à l'organisation et à ses fonctions

3.2 Politique qualité

Signé (par le propriétaire de l'organisation) Date

3.3 Objectifs qualité

Signé (par le propriétaire de l'organisation) Date

Manuel Qualité (suite)**3.4 Descriptions de poste**

[Décrivez les rôles et les responsabilités du personnel, y compris les exigences en matière de qualité. Les descriptions de poste doivent être signées par le personnel.]

3.5 Accord de performance

[Comprend le processus par lequel l'organisation ou l'entreprise développe la performance de ses employés et l'évaluation continue de la compétence dans l'organisation. Cela aidera et confortera les gestionnaires à améliorer les compétences et les capacités du personnel. Il est bon d'élaborer des plans de performance annuels pour tout le personnel permanent.]

3.6 Code de conduite

[Le Code de conduite énonce ce que votre organisation (en tant qu'employeur) attend de ses employés et ce que les employés peuvent attendre de l'employeur. Ecrivez les détails dans cette section.]

3.7 Gestion et accessibilité des procédures du système de management

[Décrivez où accéder aux versions validées des manuels de procédures et des instructions de travail.]

3.8 Revue de direction

[Décrivez qui organise la réunion, ce qui sera discuté, à quelle fréquence, etc.]

3.9 Audits

[Décrivez tout ce qui concerne les audits internes et externes et la façon dont ils sont gérés au sein de l'organisation, y compris la fréquence des audits, la liste de contrôle, les rapports, le suivi des audits, etc.]

3.10 Traitement des compliments et des plaintes

[Décrivez le traitement des compliments/plaintes reçus des clients, du personnel ou d'autres parties au sujet des activités de l'organisation, y compris la façon de recevoir une plainte, la tenue des dossiers, le traitement d'une plainte, l'examen et la surveillance des plaintes, les vérifications, etc.]

3.11 Traitement des mesures correctives et amélioration de la qualité

[Décrivez le traitement des non-conformités et les possibilités d'amélioration identifiées à partir des résultats des essais /des produits, quand il est démontré qu'un équipement préalablement validé n'a pas été étalonné, ou lorsque les étalons, les références ou les consommables sont hors spécifications, ou en cas de défaillances détectées par le programme de contrôle de la qualité, etc.]

3.12 Système de gestion des documents

[Décrivez comment une procédure est rédigée, examinée, autorisée, émise, gérée et conservée, les rôles, responsabilités et politiques associées au système de gestion des documents et les modèles à utiliser pour la rédaction de nouvelles procédures.]

3.13 Confidentialité garantie pour le client**3.14 Revue de contrat**

Manuel Qualité (suite)

[Décrivez comment l'organisation évaluera sa capacité d'entreprendre un nouveau projet ou comment un nouvel essai qui n'est pas de l'ordre du travail en routine sera réalisé.]

3.15 Service à la clientèle

[Décrivez la politique de l'organisation en matière de service à la clientèle et la façon dont un client peut demander à visiter l'entreprise pour observer les travaux.]

3.16 Enquête auprès des clients

[Décrivez comment les sondages de rétroaction des clients seront entrepris et à quelle fréquence, qui organise et compile le sondage et les résultats.]

3.17 Responsabilités de la direction et du personnel

[Décrivez qui détient et assume la responsabilité globale du système de management de la qualité de l'organisation, assure le suivi de la mise à jour et de l'amélioration du système de qualité et veille à ce que les problèmes du système soient résolus en temps opportun, la responsabilité du personnel, décrit l'organigramme de l'organisation pour décrire la structure de l'organisation, etc.]

3.18 Responsabilités techniques et délégations

[Décrivez tous ceux qui ont une responsabilité technique ou dans l'exploitation du laboratoire et qui sont leurs remplaçants en leur absence.]

4. Liste des documents de références / des instructions de travail

Manuel du système de gestion des documents

Titre du Manuel du système de gestion des documents pour XYZ

Enregistrement des informations de contrôle des documents

Version N°	Date de mise en service	Description	Rédacteur	Réviseur	Editeur	Approbateur

Table des matières

[selon les sections suivantes]

Manuel du système de gestion des documents pour XYZ

1. Objet

[Décrivez les rôles et responsabilités et les politiques connexes du système de gestion des documents, la façon dont une procédure est compilée, examinée, autorisée, émise, contrôlée et conservée, et les modèles à utiliser pour de divers formulaires.]

2. Portée

[Décrivez à quoi ou à qui s'applique la procédure.]

3. Actions

[Inclure l'information pertinente pour le sujet décrit dans le texte et/ou dans l'organigramme. Il identifiera les personnes responsables de la gestion efficace de l'activité].

3.1 Description de la procédure

[Décrivez les procédures, lorsqu'elles sont élaborées, et qui est responsable de s'assurer qu'il existe des procédures pour le bon fonctionnement du système qualité.]

3.2 Rôles et responsabilités

[Décrivez les rôles et les responsabilités du personnel impliqué dans le système de gestion des documents.]

3.3 Système de numérotation

[Décrivez comment un numéro de document unique sera attribué à chaque procédure, qui est responsable et comment est maintenu le système de numérotation.]

3.4 Procédures - Préparation, style et format

[Décrivez comment réaliser une procédure, puis son style et son format pour les éléments suivants :

Manuel du système de gestion des documents (suite)

Titre ; numéro du document MON ; numéro de page ; enregistrement de l'information sur le contrôle des documents ; en-tête, pied de page, document justificatif de référence ; modèle pour différents types de procédures, par ex. procédure relative à l'équipement, méthodes d'essai, etc.]

3.5 Gestion des procédures

[Décrivez la gestion du processus de gestion des documents pour satisfaire à la norme ISO 17025, y compris l'index principal de toutes les MON courants et leurs dates de publication et/ou de modification.]

3.6 Procédure à suivre

[Décrivez comment les documents/procédures sont émis sur le support souhaité, où les copies papier contrôlées sont conservées, etc.]

3.7 Révision des procédures

[Décrivez la politique de revue des procédures, les critères et la fréquence de mise à jour des procédures.]

3.8 Conservation des procédures

[Décrivez la politique sur la façon dont les versions antérieures des procédures sont conservées et qui est responsable de leur conservation.]

4. Liste des documents de références / des instructions de travail

Méthode d'essai

Titre de la méthode d'essai

Enregistrement des informations de contrôle des documents

Version N°	Date de mise en service	Description	Rédacteur	Réviseur	Editeur	Approbateur

Table des matières

[selon les sections suivantes]

Titre de la méthode d'essai

1 Objet

[Les méthodes d'essai se rapportent à des procédures de laboratoire et sont des documents internes qui fournissent des directives au personnel :

- Sur comment identifier la présence d'analyses spécifiques ou de quantifier la quantité présente
- Pour décrire le processus d'identification des échantillons.

Décrire la raison pour laquelle cette procédure d'essai a été rédigée].

2 Principe

[Décrivez comment la procédure fonctionne.]

3 Portée

[Décrivez à quel domaine d'essai ou à qui s'applique la procédure.]

4 Limites de la méthode

[Décrivez les facteurs qui influencent le niveau d'identification pouvant être atteint par cette méthode d'essai, tels que la qualité de l'échantillon, le stade de vie, la contamination en cas de PCR/RT-PCR, la sensibilité du diagnostic et la spécificité, et dans quelle mesure la RT-PCR a été validée (confusion taxonomique, contraintes de temps, etc.).

5 Exigences relatives aux échantillons

[Décrivez quel type d'échantillon et comment cet échantillon doit être monté/extrait pour l'identification à l'aide de caractères morphologiques ou de méthodes moléculaires. Par exemple, ADN, ARN ou ADNc dérivés d'échantillons d'essai, témoins positifs et négatifs pour les méthodes moléculaires].

Méthode d'essai (suite)

6 Matériel pour le contrôle de la qualité

[Décrivez les spécimens qui seront utilisés (comme matériel de référence) pour le contrôle de la qualité, p. ex. les collections de référence et les autres collections nationales. Pour les méthodes moléculaires, définissez ce qui suit :

- **Témoin négatif** : Dans certains cas, un échantillon de la même espèce hôte ou d'espèces hôtes similaires que l'échantillon d'essai exempt d'agent pathogène doit être inclus.
- **Témoin positif** : ADN dérivé de pathogènes, ADN dérivé d'invertébrés ou ARN qui couvre la région à amplifier par PCR ou RT-PCR, respectivement. Les extraits peuvent provenir d'une culture de plantes, de plasmides, de bactéries, de champignons ou d'invertébrés. Le témoin positif sera utilisé à une concentration environ 1.000 fois supérieure à la limite de détection de la PCR.
- **Témoin interne** : Pour chaque échantillon, un témoin interne peut être analysé simultanément ou alternativement lorsqu'une réaction négative a été obtenue avec le pathogène ciblé. Les témoins internes permettent la détection de l'ARN ou de l'ADN végétal, ou de l'ADN bactérien, fongique, d'invertébré ou de nématode.
- **Témoin sans matrice (témoin eau)** : Aucun acide nucléique n'est ajouté au mélange de réactifs.]

7 Procédure de contrôle de la qualité

[Décrivez l'étalonnage de l'équipement, la vérification des paramètres critiques, la participation régulière aux essais d'aptitude et l'estimation de l'incertitude de mesure (MU).]

8 Équipement

[Énumérez tout l'équipement nécessaire pour l'essai.]

9 Réactifs et solutions

[Énumérez tous les réactifs et les solutions qui en sont dérivées.]

10 Procédure

[Décrivez la méthode en détail, jusqu'au stade de la détection.]

11 Interprétation et enregistrement des résultats

12 Calculs

[Calcul détaillé, si nécessaire.]

14 Documents de référence

15 Pièces jointes

Modèle pour le traitement des échantillons

Titre de la procédure de traitement des échantillons

Enregistrement des informations de contrôle des documents

Version N°	Date de mise en service	Description	Rédacteur	Réviser	Editeur	Approbateur

Table des matières

[selon les sections suivantes]

1 Objet

[Décrivez la gestion des échantillons entrant dans le Laboratoire qui comprend :

- Comment les échantillons sont enregistrés
- Comment les échantillons sont préparés pour le traitement
- Comment s'effectue l'identification
- Comment les identifications sont rapportées
- Comment les échantillons sont expédiés pour des tests externes /une validation.]

2 Portée

[Décrivez à quel domaine d'essai ou à quoi s'applique la procédure.]

3 Actions

[Décrivez comment manipuler l'échantillon qui comprend :

- Comment les échantillons sont livrés au laboratoire
- Quelles sont les consignes de santé et de sécurité à suivre avant de manipuler les échantillons
- Les rôles et responsabilités de la réceptionniste
- Comment stocker les échantillons
- Comment identifier de façon unique les échantillons à des fins de traçabilité
- Les rôles et responsabilités du personnel de diagnostic en matière de gestion des échantillons
- Que faire en cas de réception d'échantillons inutilisables
- Procédés et essais sur les échantillons
- Communication des résultats au client par la personne autorisée
- Comment conserver ou éliminer les échantillons
- Comment envoyer des échantillons pour des tests externes /une validation.]

4 Pièces jointes

3.7 Système de gestion de l'information des laboratoires

3.7.1 Introduction

Un système de gestion de l'information de laboratoire (SGL) est une méthode permettant au laboratoire d'acquérir, d'analyser, de stocker et de communiquer des données de laboratoire. Il aide le laboratoire à gérer et à rationaliser ses données et ses opérations. Il aide le laboratoire à faire le suivi de ses échantillons, améliore l'exactitude de l'information saisie, augmente le débit et, enfin, améliore l'efficacité opérationnelle.

3.7.2 Nécessité d'un système de gestion de l'information de laboratoire

La collecte, la gestion et la diffusion de l'information sur les organismes nuisibles sont essentielles à la surveillance, aux enquêtes sur les incursions, aux interventions et au soutien des négociations sur l'accès aux marchés, etc. Il est important de disposer de l'information diagnostique pour prendre des décisions opportunes et éclairées. En l'absence d'un système de gestion de l'information approprié, l'extraction de l'information sur les échantillons ainsi que l'analyse et la production de rapports connexes seront un processus manuel qui prendra beaucoup de temps. Les laboratoires doivent s'assurer que leurs résultats sont propres, sans erreur et conformes aux normes d'assurance et de contrôle de la qualité établies par les organismes de réglementation (ISO 9001 / ISO 17025). La sécurité et l'intégrité des données doivent être assurées lorsque le laboratoire génère un volume élevé d'informations, effectue des tests de routine et est tenu de respecter des délais de traitement rapides des échantillons.

Un système de gestion de l'information spécialisé aidera le laboratoire à produire des résultats précis et reproductibles plus rapidement et de façon plus fiable. L'information sur les échantillons provenant des analyses de laboratoire sera plus facile à stocker et à suivre à partir du moment où les échantillons entrent dans le laboratoire jusqu'au moment où les résultats sont communiqués. De plus, le laboratoire peut évaluer les détectations de ravageurs et de maladies sur des produits spécifiques (association de ravageurs à

hôtes), leur statut d'éradication, l'historique des observations, etc. à des fins de surveillance et de recherche.

3.7.3 Gestion de l'information du laboratoire

Le laboratoire devra déterminer le type de système qu'il doit mettre en place pour gérer l'information sur les échantillons. Cette décision devrait être fondée sur une analyse des besoins et des pratiques du laboratoire.

Les facteurs suivants pourraient être pris en considération pour la prise de décision :

- la taille de l'organisation ou du laboratoire
- le nombre de tests de routine effectués par semaine ou par mois
- le nombre total d'échantillons reçus
- les exigences réglementaires
- les exigences du client
- la nécessité d'accélérer les délais de traitement des échantillons et des résultats
- comment s'adapter ou faire face aux défis de l'avenir, telle qu'une augmentation significative du volume de données.

3.7.4 Outils pour la gestion de l'information au laboratoire

3.7.4.1 Dossiers sur papier

Il est encore possible d'utiliser un système simple de tenue de dossiers sur papier. L'utilisation de l'archivage manuel présente certains avantages : il est moins coûteux à mettre en place, il n'est pas nécessaire de disposer d'un programme de formation complet ou coûteux pour l'utilisation de logiciels spécialisés, le risque de corruption des données est bien moindre, etc. Mais les principaux inconvénients sont qu'il faut beaucoup de temps pour récupérer les données, surtout lorsqu'elles sont abondantes, et le partage de l'information n'est pas facile.

3.7.4.2 Feuilles de calcul

Une feuille de calcul (p. ex. MS Excel) est l'équivalent numérique d'une feuille de travail papier. Elle peut être utilisée pour stocker et manipuler des données. Les feuilles de calcul sont faciles à utiliser, mais difficiles à gérer lorsqu'une trop grande quantité d'information est saisie dans une seule feuille de calcul. Il devient alors plus difficile d'éditer ou de

retrouver une information. Il n'y a pas de contrôle de version ce qui peut provoquer de la confusion et des erreurs lorsque les feuilles de calcul sont transmises à plusieurs membres du personnel. Il n'y a pas de contrôle ou de règle absolue sur le type d'information que les feuilles de calcul pourraient permettre au personnel d'inscrire dans une colonne particulière. Par conséquent, les données peuvent devenir inexactes et compromettre l'intégrité des résultats.

3.7.4.3 Bases de données

Une base de données (par ex. MS Access, Oracle) est généralement utilisée pour stocker de grandes quantités d'informations. L'organisation peut stocker tout type de fichier dans une base de données, y compris des fichiers Word, des images et des PDF. Les données peuvent être envoyées à d'autres personnes sous forme de fichiers PDF ou Excel. Une base de données permet d'établir des relations entre les types de données pour un accès rapide à l'information et une mise à jour simultanée. Les modifications peuvent être effectuées facilement et il est possible pour plusieurs personnes d'accéder au même ensemble de données à l'aide de systèmes de gestion de base de données tout en préservant l'intégrité des données. Les bases de données offrent une plus grande complexité en termes de manipulation des données, mais elles nécessitent une expertise technique par programmation ou code SQL.

3.7.4.4. Logiciels standard (p. ex. SGL, Q-pulse)

Des logiciels spécialisés sont conçus pour optimiser et vulgariser les opérations du laboratoire grâce au flux de données dans le laboratoire. Ce type de logiciel peut être utilisé pour :

- recevoir, intégrer et étiqueter les échantillons
- assigner le travail (p. ex. tests à réaliser pour chaque échantillon)
- vérifier l'état d'avancement des travaux
- tracer les données et les échantillons
- produire des rapports d'essai après passage par le contrôle de la qualité.

Ces systèmes doivent être adaptés aux besoins des utilisateurs. Grâce aux outils client/serveur, le système permet de traiter les données n'importe où sur le réseau. De plus, avec des

modules Web dans le système, les utilisateurs peuvent étendre leurs activités jusqu'à l'extérieur du laboratoire.

3.7.5 Ce qu'il faut conserver

Un SGL permet à l'organisation de stocker divers éléments d'information nécessaires aux fonctions de laboratoire. Il peut s'agir de protocoles de laboratoire, d'une liste de réactifs, d'images, d'informations sur les échantillons et l'équipement, avec au minimum les éléments qui suivent ci-dessous.

3.7.5.1 Enregistrement des échantillons et accès à l'information

Le SGL est utilisé pour stocker les informations d'enregistrement des échantillons et pour l'accès à l'information :

- date de réception de l'échantillon
- numéro d'identification unique (pour la traçabilité de l'échantillon)
- les essais à effectuer
- la discipline (entomologie, mycologie, virologie, nématologie)
- les coordonnées de l'auteur de la demande
- le numéro de référence du demandeur
- le nombre de fioles reçues
- des exemples de symptômes, s'il y a lieu
- les essais urgents ou de routine
- des détails pour un échantillon trouvé sur un hôte (type de sol, de variété, de contenant, toute plante ou partie de plante, etc.)
- des détails sur le pays d'origine et le lieu.

3.7.5.2 Détails de l'identification

- ordre
- famille
- genre
- espèce
- stade du cycle
- état de vie (mort ou vif)
- détails identificateurs
- date d'identification
- date de la réponse finale
- les frais, le cas échéant
- nouveau signalement (nouvel hôte ou nouvelle association).

3.8 Références

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2008. *ISO 9001:2008 : Systèmes de management de la qualité - Exigences*. Disponible à l'adresse <https://www.iso.org/fr/standards-catalogue/browse-by-ics.html> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2005. *ISO/IEC 17025:2005 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.iso.org/fr/standards-catalogue/browse-by-ics.html> (dernier accès le 17 septembre 2015).

International Accreditation New Zealand - Specific criteria for accreditation - Biological Testing, Fourth Edition May 2011. <http://www.ianz.govt.nz/services/accreditation-2/accreditation/laboratories/biological/> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Krogh, P. 2012. File lifecycle: understanding workflow. Philadelphia, PA, American Society of Media Photographers. Available at <http://dpbestflow.org/file-lifecycle/file-lifecycle-overview> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Lo, P.L. & Blank, R.H. 1989. A survey of armoured scale species (Hemiptera: Diaspididae) in kiwifruit orchards. *NZ Entomologist*, 12: 1-4.

Standard Operating Procedures (2014). Non publié. New Zealand, Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries.

Thompson, M., Lyons, A., Kumarasinghe, L., Peck, D. R., Kong, G., Shattuck, S. & La Salle, J. 2011. Remote microscopy: a success story in Australian and New Zealand plant biosecurity. *Australian Journal of Entomology*, 50: 1-6. DOI: 10.1111/j.1440-6055.2010.00803.x.

Walker, K. 2012. Guide de l'utilisateur PaDIL. Guide d'utilisation non publié. Musée Victoria, Australie.

Section 2 – Déroulement du travail de laboratoire

Aperçu

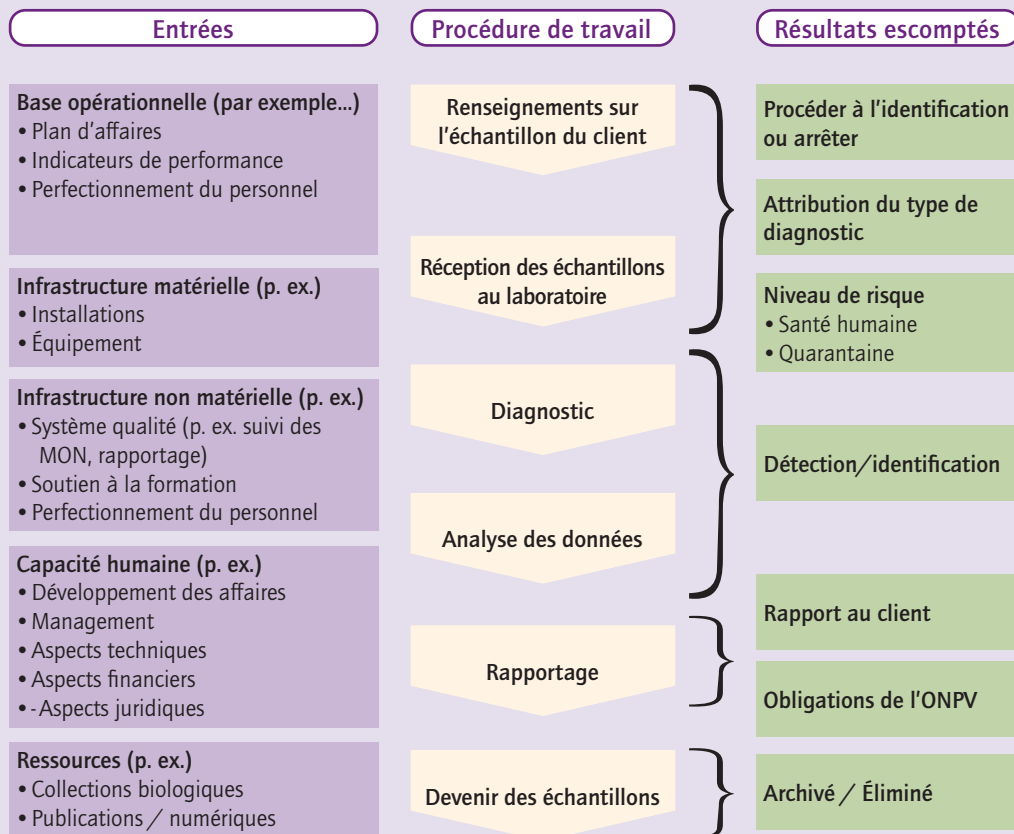
Cette section donne un aperçu des principales méthodes utilisées pour détecter et identifier les organismes nuisibles. Le diagnosticien dispose d'un large éventail de méthodes, de la microscopie visuelle au séquençage de l'ADN. Des directives générales seront données sur le processus d'examen et d'échantillonnage d'un échantillon et sur les étapes à suivre pour poser un diagnostic. Des détails sur les méthodes couramment utilisées sont décrits, ainsi que quelques exemples pour différents groupes d'organismes nuisibles.

La figure 14 présente un schéma de base pour le fonctionnement d'un service d'identification des organismes nuisibles, avec le déroulement du travail

(au centre), les intrants (à gauche) et les résultats (à droite). L'objectif est de donner une vue d'ensemble des activités, des étapes et des points de décision qui caractérisent un service d'identification des organismes nuisibles. Il ne s'agit pas d'une « prescription de pratique » qui doit être suivie et ne constitue pas une liste exhaustive du contenu, mais plutôt d'un guide de réflexion indépendante sur la façon dont le travail peut être réalisé dans le contexte de votre situation particulière.

Le schéma reflète la structure des sections et chapitres suivants et montre comment ces zones fonctionnent ensemble pour donner un service fonctionnel d'identification des organismes nuisibles.

Figure 14 : Procédure de base pour le fonctionnement d'un service d'identification des organismes nuisibles



4. Gestion des échantillons

Introduction

Les échantillons peuvent être reçus au laboratoire à partir d'une multitude de sources et avec de nombreuses demandes différentes. Il est important que les échantillons et les demandes qui les accompagnent soient correctement consignés et qu'ils soient ensuite acheminés au laboratoire et suivis jusqu'à ce qu'une décision finale puisse être prise.

4.1 Réception de l'échantillon

La plupart du temps, on peut s'attendre à ce que les échantillons soient reçus par l'intermédiaire des inspecteurs; toutefois, et selon le fonctionnement du laboratoire, des échantillons peuvent également être reçus des agriculteurs, de l'industrie et du public. La facilité d'obtenir de l'information sur l'échantillon sera donc variable. Cela dit, plus on peut obtenir d'informations sur l'échantillon, meilleures sont les chances d'obtenir un diagnostic rapide et précis. Il est donc conseillé aux laboratoires de diagnostic en santé des plantes de fournir aux clients des fiches d'information sur la soumission d'échantillons afin de documenter l'information pertinente. Ces feuilles devraient contenir des détails tels que :

- les coordonnées de la personne ou de l'organisation qui soumet l'échantillon
- les détails de l'échantillon, p. ex. le type de plante, l'âge des plantes
- le problème, p. ex. symptômes, pourcentage de plantes touchées
- l'historique de la croissance des plantes.

Le processus de réception de l'échantillon devrait également préciser les attentes du client, c.-à-d. s'il y a un test spécifique, le coût et le délai pour le rapport.

Le formulaire de soumission peut apporter des annotations et des descriptions des principaux symptômes des organismes nuisibles; un niveau minimal de description devrait être visé, par exemple si le problème affecte les feuilles, les

pousses, les fruits ou les racines, et s'il engendre une nécrose, un jaunissement, un dépérissement ou un flétrissement.

4.2 Enregistrement de l'échantillon

Lorsqu'un échantillon arrive au laboratoire pour analyse, il doit être accompagné des documents de présentation de l'échantillon (voir exemple en figure 15). Les détails de l'échantillon doivent ensuite être saisis dans un système d'enregistrement et l'échantillon doit recevoir un code ou un numéro d'identification unique. Cela permettra la traçabilité de l'échantillon et permettra de relier facilement les résultats des tests aux détails du client afin de produire des rapports rapides et précis.

Les échantillons doivent être livrés à un point central où ils peuvent être ouverts et enregistrés. Évaluer la documentation de l'échantillon pour connaître les détails des tests requis ou les principaux symptômes déclarés par le client afin de déterminer à quelle équipe diagnostique l'échantillon doit être envoyé. Vérifiez que vous disposez de tous les détails essentiels, tels que :

- nom de l'expéditeur - société et contact
- adresse et numéros de téléphone/adresse e-mail
- numéro(s) de référence du client
- identification de la (des) plante(s) hôte(s)/des échantillon(s)
- quels tests sont demandés.

S'il n'y a pas d'exemple de formulaire de soumission ou si les renseignements sont insuffisants, communiquez avec le client pour obtenir les renseignements requis.

Lors de l'enregistrement de l'échantillon, les détails suivants doivent être saisis :

- coordonnées du client
- savoir si l'échantillon fait partie d'une enquête spécifique
- identification de la (des) plante(s) hôte(s)/des échantillon(s)
- variété végétale

- type d'échantillon
- pays d'origine
- date de réception
- équipe (service) de diagnostic qui doit traiter l'échantillon
- code ou numéro d'identification unique de l'échantillon.

4.3 Examen de l'échantillon

Une fois qu'un échantillon a été reçu et que les détails ont été saisis, il est prêt à être examiné. Les vérifications initiales peuvent inclure:

- des détails sur l'hôte et sur le décompte du nombre d'échantillons
- l'aptitude de l'échantillon à l'examen, p.ex. il n'est manifestement pas excessivement pourri
- la présence d'insectes volants ou mobiles qui pourraient avoir besoin d'être confinés
- que l'échantillon envoyé est pertinent eut égard au problème signalé.

Après avoir satisfait à une première vérification, l'échantillon passe à la phase de diagnostic. Pour les échantillons pour lesquels un test spécifique est indiqué (p. ex. test de dépistage des virus sur pomme de terre), la transmission de l'échantillon au diagnosticien approprié est simple. Toutefois, dans le cas d'échantillons dont la demande vise à déterminer l'étiologie d'un trouble inconnu, une enquête préliminaire est nécessaire. Les sections suivantes présentent quelques observations de base qui peuvent conduire à une meilleure approximation des taxons de ravageurs causaux et de l'évolution du diagnostic.

4.3.1 Racines, tubercules, bulbes et bulbes

Symptômes - vérifier s'il y a malformation, dommages physiques, galles ou kystes, congestion des racines, pourriture, etc. En cas de pourriture, vérifier si elle est sèche ou humide, profonde ou superficielle, majeure ou mineure, s'étendant dans la couronne.

Examen - examiner d'abord l'échantillon sans perturber le sol qui y est attaché. Ensuite, enlever doucement la saleté à l'aide d'un instrument contondant ou en secouant et en réexaminant. Enfin, enlever toute saleté et vérifiez à nouveau. À chaque étape, examinez les surfaces sous une

loupe binoculaire et rechercher le mycélium, les fructifications, les sclérotés, les hyphes étendues, les lacets, etc. Faire des coupes transversales et longitudinales à travers les plus gros morceaux de matériel (p. ex. tubercules) et rechercher toute décoloration vasculaire ou pourriture générale.

Examen au microscope - faire une préparation sur lames et rechercher les structures fongiques ; examiner les écoulements bactériens.

Essais - isoler à partir du bord d'attaque, faire flotter, piéger, incuber, inoculer, vérifier le sol (pH et conductivité électrique).

Examiner la fiche d'information de l'échantillon - problèmes culturaux (p. ex. stagnation d'eau), problèmes d'entreposage (p. ex. gel, surchauffe, manque d'oxygène), compactage du sol ou croute dure, pollution des eaux souterraines (p. ex. fuite d'effluents), plantation ou empotage à la date prévue, apparition des symptômes, gamme d'hôtes affectée, distribution (inégaie ou étendue), antécédents des cultures, analyses nutritionnelles, applications de produits chimiques (p. ex. pesticides ou produits de croissance comme des agents anti-germinatifs), etc.

4.3.2 Base de la tige

Symptômes - vérifier s'il y a des lésions, des chancres, des galles, des racines adventives, une décoloration vasculaire, des preuves de dommages causés par des invertébrés nuisibles (p. ex. excréments, toile, traces de limaces ou limaces d'escargots).

Examen - rechercher le mycélium, les fructifications (sclérotés, pycnides, etc.), faire des coupes transversales et longitudinales, regarder la décoloration vasculaire, l'incompatibilité des greffons, etc.

Examen au microscope - préparer des lames et rechercher les structures fongiques, les décolorations vasculaires et les écoulements bactériens.

Essais - isoler à partir du bord d'attaque, incuber, inoculer, faire flotter.

Examiner la fiche d'information type - dommages causés par les vertébrés nuisibles (p. ex. lapins, cerfs, etc.), dommages physiques (p. ex. tonte de l'herbe), dommages causés par les intempéries (p. ex. vent érosif, gel, sécheresse, application de sels minéraux en hiver), amendements et paillis pour sols, etc.

Figure 15A : Page 1/2 du formulaire standard de soumission d'échantillons utilisé par Fera



Formulaire de soumission d'échantillon Clinique des plantes 2015

Fera Reference :
 (Pour usage interne seulement)

Vos coordonnées

Nom :	Votre Réf :	
Compagnie :	N° de commande	
Adresse :	Nom et adresse de facturation (si différent)	
Code postal :	N° TVA	
Tél :	Fax :	
Mobile :	Courriel :	

Souhaitez-vous vous inscrire à SamTrack ? (Notre système de suivi d'échantillons en ligne gratuit et sécurisé, permettant un accès rapide et facile à vos informations d'échantillons)*

L'échantillon - Pour nous aider à établir notre diagnostic, veuillez essayer de fournir autant d'informations que possible.

Genre, espèce et variété végétale : (ou semence/plante/type de sol)			
Propagation / méthode de plantation (p. ex. semences, bouturage, etc.) :		Âge des plantes ou date de semis :	
Les plantes sont-elles cultivées à l'extérieur, sous abri, ou s'agit-il d'un produit stocké ?			
Quels pesticides / herbicides ont été utilisés et quand ?			

Le problème

Quels symptômes avez-vous observés ? p. ex. tache foliaire, dépérissement, flétrissement			
Quelle en est la cause, d'après vous ?		Bactérie Champignon Ravageur Virus Nématode	
Répartition des symptômes et partie de la plante atteinte (racines, tiges, etc.) ?		% de plantes affectées	
Quand le problème a-t-il été décelé pour la première fois ?			
Si vous souhaitez un test spécifique de notre liste de prix, veuillez indiquer le test ici :			

Autres informations : par exemple : historique des cultures et types de plantes voisines, pente, température, humidité, irrigation, rapports.

J'autorise par la présente Fera Plant Clinic à effectuer des tests sur cet échantillon et j'accepte les conditions générales de vente de Fera.

Signé :	Date :	
---------	--------	--

VEUILLEZ NOTER : Les formulaires non signés ne seront pas traités.

Nous pouvons utiliser vos coordonnées pour vous envoyer des informations sur nos services/offres/événements ; cependant, vos coordonnées ne seront pas transmises à d'autres parties en dehors de Fera.
Veuillez cocher cette case si vous ne souhaitez pas recevoir ce type d'informations et ne recevoir que des informations relatives à votre (vos) échantillon(s).

Fera exclut par les présentes toute responsabilité pour toute réclamation, perte, demande ou dommage de quelque nature que ce soit (que ces réclamations, perte, demande ou dommage soient prévisibles, connus ou non) découlant des services et de la préparation de tout rapport technique ou scientifique, y compris, sans limitation, les pertes ou dommages indirects ou consécutifs ; perte de profits réels ou anticipés (y compris la perte de profits sur les contrats) ; perte de revenus ; perte d'affaires ; perte d'opportunités ; perte d'économies anticipées ; perte de clientèle ; perte de réputation ; perte de dommages ou de corruption de données ; perte d'utilisation d'argent ou autre, et que cette perte ou ce dommage ait été ou non signalé comme une réclamation, une demande en dommages et intérêts, que la responsabilité civile (négligence comprise), contractuelle ou autre. Cette déclaration n'affecte pas vos droits statutaires.

Figure 15B: Page 2 du formulaire standard de soumission d'échantillons de deux pages utilisé par Fera

Envoi de votre échantillon pour diagnostic

Comment choisir votre échantillon - L'échantillon que vous envoyez fournit la clé pour le diagnostic, alors veuillez tenir compte de ce qui suit:

- Essayez d'envoyer un échantillon représentatif du problème - nous devons voir toute la gamme des symptômes.
- Pour les maladies, essayez d'inclure la frontière entre les tissus sains et les tissus malades et, dans la mesure du possible, incluez du matériel sain pour la comparaison et le marquage comme tel.
- Si les symptômes sur les feuilles ou les pousses montrent une décoloration ou un dépérissement général, suggérant des dommages possibles aux racines, veuillez nous envoyer une plante entière (si possible) et inclure les racines et le sol environnant.
- Si vous soupçonnez que le problème est dû aux nématodes, veuillez inclure des échantillons de sol distincts provenant de la zone affectée et de la bordure de la zone affectée.

Comment emballer votre échantillon

Plantes entières	Enfermer la motte humide dans un sac de plastique scellé autour de la tige de la plante. Placez l'ensemble de la plante dans un deuxième sac en plastique, gonflez légèrement et fermez hermétiquement.
Feuilles et pousses Diagnostic de virus : Autre/diagnostic inconnu :	Placer dans un sac en plastique, gonfler légèrement et sceller. Envelopper l'échantillon dans du papier absorbant légèrement humide, placer dans un sac en plastique, gonfler légèrement et sceller.
Articles charnus	Par exemple : fruits, légumes, tubercules (sauf pommes de terre), bulbes, cormes, etc. Envelopper dans du papier sec et absorbant. En cas de pourriture ou de décomposition, les envelopper individuellement. Placer dans un sac en plastique, gonfler légèrement et sceller.
Invertébrés nuisibles	Les échantillons d'invertébrés nuisibles (insectes, araignées, acariens, etc.) doivent être placés dans un contenant en plastique scellé.
Tubercules de pomme de terre Diagnostic d'invertébrés : Autre/diagnostic inconnu :	Envelopper dans du papier sec et absorbant. Placer dans un sac en plastique, gonfler légèrement et sceller. Envelopper dans du papier sec et absorbant. Ne pas mettre dans un sac en plastique.
Échantillons de sol	Pour l'analyse des nématodes. Placez 500 g de terre dans un sac en plastique solide et scellez-le.
Échantillons de semences	S'assurer que les graines sont bien emballées.

Tous les échantillons doivent être placés dans une boîte en carton solide et emballés solidement avec du papier vissé. Inclure votre échantillon

Formulaire de soumission dans un sac séparé et scellez la boîte.

Envoyez votre échantillon à : Clinique des plantes
Fera
Sand Hutton York
YO41 1LZ
Royaume-Uni

Idéalement, les échantillons doivent être expédiés par service de messagerie express ou par courrier de première classe pour arriver à Fera le jour suivant. Si possible éviter d'envoyer des échantillons pendant le week-end ou un jour férié, mais si cela est inévitable marquer l'emballage extérieur avec la mention " Veuillez réfrigérer à l'arrivée " si nécessaire.

Si vous avez des questions, contactez-nous : Ligne d'assistance téléphonique de la Clinique des plantes Fera
Tél : 01904 462324
Fax : 01904 462147
Courriel : plantclinic@fera.gsi.gov.uk

* **SamTrack** est notre système de suivi d'échantillons en ligne gratuit et sécurisé, permettant un accès rapide et facile à vos informations d'échantillons. Vous pouvez vous inscrire à SamTrack sur <http://samtrack.fera.defra.gov.uk/>. Une fois inscrit, vous recevrez un nom d'utilisateur et un mot de passe uniques ainsi que des instructions sur la façon d'utiliser le système.

L'utilisation de **SamTrack** donne des informations actuelles, 24 heures sur 24. Vous pouvez....

- Vérifiez quand nous avons reçu votre (vos) échantillon(s) et qui s'occupe de votre (vos) échantillon(s).
- Vérifiez quels ravageurs et quelles maladies ont été identifiés, vérifiez votre rapport et voyez un résumé de tous les échantillons que vous nous avez envoyés.
- Accédez à l'information en dehors des heures normales de travail.

4.3.3 Tiges et troncs

Symptômes - vérifier s'il y a des dommages physiques et des blessures, des lésions, des chancres, des galles, une décoloration vasculaire, des dommages causés par les invertébrés nuisibles (p. ex. trous de forage pour insectes, toiles, déjections), etc.

Examen - rechercher le mycélium, les fructifications (sclérotés, pycnides, etc.), faire des coupes transversales et longitudinales, regarder la décoloration vasculaire, l'incompatibilité des greffons, etc.

Examen au microscope - préparer des lames et rechercher les structures fongiques, les décolorations vasculaires et les écoulements bactériens.

Essais - isoler à partir du bord d'attaque, incuber, inoculer, faire flotter.

Examiner la fiche d'information type - dommages causés par des parasites vertébrés (p. ex. écureuils, cerfs, etc.), dommages causés par des invertébrés (p. ex. insectes foreurs du bois), et aucun champignon n'a été observé, les dommages physiques (p. ex. dommages dus à la foudre).

4.3.4 Feuilles, fleurs et fruits

Symptômes - examiner les surfaces supérieure et inférieure et, dans le cas d'échantillons plus gros, réaliser des coupes transversales et longitudinales pour déterminer l'étendue de la lésion. Vérifiez s'il y a une décoloration ou des taches et vérifiez la répartition (par ex. croissance ancienne ou nouvelle, inter- ou intranervaire, marginale, apicale ou distale, unique, multiple, fusionnée), malformations et déformations (formes et couleurs atypiques, production prolifique de cheveux, épinastie, etc. Noter si les taches sont nécrotiques, chlorotiques ou imbibées d'eau. Vérifier l'absence de dommages physiques et de blessures, de lésions, de chancres, de galles, d'invertébrés nuisibles (p. ex. trous de forage pour insectes, toiles, excréments).

Examen - rechercher le mycélium, les fructifications, les mildious, les rouilles, les moisissures, les moisissures visqueuses, etc. et vérifiez s'il y a écoulement bactérien.

Examen au microscope - préparer les lames et rechercher les structures fongiques.

Essais - isoler du bord d'attaque, incuber, inoculer, faire flotter.

Examiner la fiche d'information type - applications de pesticides, dommages causés par les intempéries (p. ex. grêle, gel, soleil ou brûlure due au vent, sol soufflé par le vent ou sable).



5. Diagnostic

Introduction

Cette section donne un aperçu des principales méthodes utilisées pour détecter et identifier les organismes nuisibles et les maladies des végétaux. Le diagnosticien dispose d'un large éventail de méthodes, de la microscopie visuelle au séquençage de l'ADN. Des conseils généraux sont donnés sur le processus d'examen et d'échantillonnage d'un échantillon et sur les étapes à suivre pour poser un diagnostic. Des détails sur les méthodes couramment utilisées sont donnés avec quelques exemples pour différents groupes de ravageurs et de maladies.

5.1 Méthodes de diagnostic

Cette section décrit certaines des méthodes de diagnostic qui peuvent être utilisées pour identifier les ravageurs et en donne quelques exemples. Une gamme de méthodes de diagnostic est généralement disponible pour n'importe quel ravageur donné, c'est pourquoi des lignes directrices sur l'identification de la méthode la plus appropriée en tenant compte de l'infrastructure et de la capacité des ressources humaines sont présentées. Il est essentiel d'avoir une idée claire de la question à laquelle il faut répondre, du niveau de confiance dans l'identification requise, du délai dans lequel vous opérez, des coûts et autres exigences de la technique et du nombre d'échantillons qui nécessitent le test (diagnostic). Le choix de la méthode est souvent un compromis entre différents facteurs, notamment le coût, la spécificité, la sensibilité et le nombre d'échantillons.

5.1.1 Essai biologique conventionnel

Ces tests prennent généralement plus de temps et exigent plus de travail que les autres analyses de laboratoire décrites ci-dessous. Néanmoins, ils peuvent encore être très importants dans le diagnostic; par exemple, l'indexation des virus et des viroïdes par l'hôte est encore souvent nécessaire pour vérifier le résultat d'un test de laboratoire. Les

essais biologiques sont généralement effectués dans des serres compartimentées exemptes d'insectes et, sous certains climats, des serres-écrans sont nécessaires pour la culture et le maintien des plantes. Des armoires de culture, capables de fournir une température, une lumière et une longueur de journée contrôlées, peuvent être nécessaires pour pouvoir travailler toute l'année. Le choix des plantes d'essai pour le diagnostic de routine dépend du type de plantes et d'organismes nuisibles recherchés. La mise à jour continue du matériel de référence est un facteur à prendre en considération.

5.1.2 Identification morphologique

La détermination morphologique d'un organisme nuisible est un élément fondamental du diagnostic de tous les organismes nuisibles des végétaux. Être capable de caractériser les ravageurs avec précision et rapidité est important pour comprendre l'importance du ravageur détecté. Caractériser la morphologie d'un organisme consiste à comparer l'organisme nuisible avec des références connues, ce qui permet l'interprétation des symptômes ou des caractéristiques observées pour arriver à l'identification. Souvent, cette identification est suivie de tests de confirmation qui appuient l'identification ou fournissent des détails supplémentaires, tels que le nom de l'espèce. L'importance des techniques morphologiques en diagnostic dépend de la discipline. La morphologie peut aller de l'examen des organes sexuels reproducteurs des insectes, à l'examen des structures fongiques par microscopie, en passant par l'examen de la taille et de la couleur des colonies bactériennes.

5.1.3 Analyse des métabolites (principalement identification bactérienne)

La majorité des agents pathogènes bactériens peuvent être isolés et cultivés sur des milieux, puis soumis à une analyse de la composition et des propriétés des métabolites qui fournit des

informations taxonomiques. Traditionnellement, ces méthodes comportaient une séquence d'essais, principalement des essais d'utilisation du substrat, qui suivaient une clé dichotomique et, par conséquent, l'identification prendrait des semaines plutôt que des jours à réaliser. Les méthodes exigeaient également un haut niveau de compétence technique pour que des données reproductibles puissent être générées. D'autres formats d'évaluation de l'utilisation des substrats ont ensuite été mis au point sur le marché, comme le système Biolog (<http://www.biolog.com>), qui permet une identification plus rapide et plus fiable.

Un autre système disponible sur le marché pour l'identification des bactéries est le système MIDI (<http://www.midi-inc.com>), qui s'appuie sur la technologie d'identification et de quantification des acides gras de la paroi cellulaire. Comme pour Biolog, une identification peut être réalisée dans les 48 heures suivant l'obtention d'une culture pure. Biolog et le système MIDI sont tous deux des produits commerciaux et sont livrés avec de vastes bibliothèques d'espèces bactériennes. Le niveau d'identification taxonomique atteint par ces systèmes est similaire. En règle générale, Biolog et le système MIDI permettent une identification fiable des pathogènes bactériens végétaux au niveau de l'espèce. Une identification taxonomique plus fiable et plus fine (par exemple jusqu'au pathovar) est possible chez certaines espèces en ajoutant les profils métaboliques spécifiques d'échantillons aux bases de données internes de ces systèmes.

5.1.4 Méthodes sérologiques

Les méthodes sérologiques sont basées sur une propriété des systèmes immunitaires des mammifères et des oiseaux. Lorsque des matières étrangères (appelées antigènes) comme un micro-organisme, une protéine ou un glucide complexe sont injectées dans un animal, le système immunitaire de l'animal répond en produisant des anticorps dans son sérum sanguin. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'antigène qui a déclenché leur production.

De nombreux agents pathogènes des plantes peuvent être détectés par des méthodes sérologiques ou immunologiques. Cette technologie est particulièrement importante pour le diagnostic

et l'identification des virus des plantes ; la simplicité moléculaire des virus permet une réponse très spécifique. Cependant, de telles méthodes ont également été développées pour les bactéries et les organismes plus complexes tels que les champignons.

Les anticorps peuvent être polyclonaux ou monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont ainsi appelés parce qu'ils se composent de nombreux anticorps ayant chacun une spécificité différente, qui se lient à plusieurs épitopes différents (sites de liaison) de l'antigène. Les anticorps monoclonaux contiennent plusieurs copies identiques d'un seul anticorps qui se lie à un épitope spécifique. En raison de ces propriétés, une vue généralisée des anticorps mono- et polyclonaux est que les anticorps monoclonaux fournissent une plus grande spécificité que les anticorps polyclonaux. Le bien-fondé de cette différence dépend alors de l'usage prévu et de l'organisme nuisible cible et de la nécessité ou non d'une spécificité élevée. Les immunoessais permettent de visualiser directement ou indirectement la liaison anticorps-antigène.

La quantification d'anticorps ou d'antigènes peut être réalisée par diverses méthodes. L'une des plus courantes est l'étiquetage de l'antigène ou de l'anticorps. Le marqueur peut être constitué d'une enzyme, d'or colloïdal (essais d'écoulement latéral), de radio-isotope, de marqueur magnétique ou de fluorescence. D'autres techniques comprennent l'agglutination, la néphélométrie, la turbidimétrie et le Western blot.

Dans le cas des immunoessais en laboratoire, la plupart de ces techniques ont été remplacées par les tests ELISA (dosage immuno-enzymatique). Dans un test ELISA, une quantité inconnue d'antigène est fixée à une surface, comme une plaque de 96 puits. Cette étape est suivie d'une étape de blocage pour empêcher la liaison d'anticorps non spécifiques. Un anticorps spécifique est alors fixé à la surface pour se lier à l'antigène. L'anticorps est lié à une enzyme et, à l'étape finale, un substrat que l'enzyme peut convertir en un signal détectable est ajouté. Par exemple, dans le test ELISA de fluorescence, lorsque l'échantillon est exposé à une lumière d'une longueur d'onde appropriée, tout complexe antigène-anticorps est fluorescent. L'intensité de fluorescence peut être utilisée pour déterminer la quantité d'antigène

présente dans un échantillon. Le test ELISA demeure l'une des méthodes les plus largement utilisées pour la détection systématique des virus des plantes, bien que les technologies d'amplification des acides nucléiques puissent à présent être utilisées en routine. Les tests ELISA sont très sensibles, faciles à reproduire, permettent de quantifier les niveaux de l'agent pathogène et peuvent être automatisés. Le test ELISA est robuste et peut être effectué dans presque n'importe quel laboratoire, puisqu'il nécessite un minimum de formation.

Bien qu'il présente de nombreux avantages, le test ELISA présente de nombreux inconvénients, dont le fait qu'il peut ne pas capturer toutes les souches d'un agent pathogène et que pour certaines cibles, aucun kit ELISA n'a été conçu. La production d'anticorps peut également nécessiter beaucoup de ressources, comme par exemple l'utilisation d'animaux vivants, contrairement aux techniques de PCR où l'on dispose d'une grande quantité de données séquentielles et où les tests peuvent être conçus à l'aide d'un ordinateur personnel avec accès Internet. Un test ELISA est également moins sensible que la PCR.

5.1.5 Méthodes de détection basées sur les acides nucléiques

La science de la détection des organismes nuisibles aux végétaux basée sur les acides nucléiques a progressé rapidement au cours des 20 à 30 dernières années et de nombreuses méthodes différentes sont listées dans la littérature. En termes très simples, la grande majorité de ces méthodes reposent sur la connaissance de la séquence d'acides nucléiques d'un organisme et la déduction de la spécificité taxonomique (p. ex. famille, genre, espèce, variété). Le choix de la méthode est fortement influencé par le résultat requis, en particulier le niveau de spécificité requis et le volume de matériel à tester.

La séquence d'acides nucléiques de tout organisme comprend des régions conservées à différents niveaux au cours de l'évolution : conservation des séquences haute, modérée et basse. Généralement, les gènes qui codent pour des processus essentiels (tels que les gènes d'ARNr) sont bien conservés, alors que les gènes moins essentiels peuvent présenter une conservation moyenne et les

régions non codantes une mauvaise conservation. Ces différences dans la séquence ont à la fois fourni des preuves à l'appui des taxonomies actuelles des organismes et mené à des révisions taxonomiques. Ces mêmes séquences fournissent également la base de connaissances pour la conception de courtes séquences d'acides nucléiques spécifiques d'un taxon (genre, espèce, etc.) et qui peuvent être utilisées soit comme sonde dans l'hybridation, soit comme amorce dans les méthodes basées sur la PCR (comme indiqué ci-après). Avec la révolution actuelle du séquençage du génome entier, le niveau de données séquentielles disponibles dans des bases de données telles que GenBank ne cesse d'augmenter, ce qui permet de développer des diagnostics très affinés.

Voici une introduction à certaines des principales et plus récentes méthodes d'analyse des acides nucléiques appliquées au diagnostic des organismes nuisibles.

5.1.5.1 Détection basée sur l'hybridation

L'hybridation est basée sur le principe de réunir les séquences d'acides nucléiques de l'organisme cible (inconnu) et de l'organisme d'essai (connu) pour permettre l'appariement (hybridation) des séquences homologues (si elles sont présentes) et la production d'un signal détectable. La procédure exige généralement que la cible ou l'acide nucléique à tester soit fixé à une matrice physique, telle qu'une membrane de nitrocellulose. Le signal de détection peut être un rayonnement ou, plus récemment, une forme quelconque de réaction chimique à base de colorant. Les progrès récents ont vu des changements majeurs dans la nature de la matrice physique et la miniaturisation de l'unité de détection. Les biopuces illustrent la conception actuelle des plates-formes d'hybridation où plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation peuvent être contenues à la surface d'un Eppendorf. Dans ces systèmes de biopuces, la séquence de chaque unité de détection peut être préparée et ainsi ces biopuces peuvent être adaptées selon les besoins à une détection particulière. Le projet Defra BioChip (<http://biochip.rvc.ac.uk/>) et, sur une base commerciale, ClonDiag (<http://www.clondiag.com>) sont des exemples de ce type de

technologie pour les virus végétaux. Dans ces deux exemples de systèmes, les biopuces recherchent des identifications à partir d'un seul échantillon.

Dans de nombreux cas, la question à laquelle il faut répondre nécessite l'examen de nombreux échantillons pour un organisme nuisible précis qui fait l'objet d'une mesure de quarantaine. Dans ces circonstances, une biopuce ne convient pas. Une méthode plus appropriée pour l'analyse à haut débit de nombreux échantillons est l'hybridation localisée d'acides nucléiques (nucleic acid spot hybridization - NASH). Avec cette méthode, de nombreux échantillons (souvent une empreinte souche) sont localisés sur une matrice (membrane nitrocellulosique) puis une sonde de test spécifique de l'organisme nuisible concerné est appliquée dans des conditions propices à l'hybridation et au développement d'un signal. La méthode et l'application sont très similaires au test ELISA et aux microplaques. Un certain niveau d'expérience est nécessaire avec la méthode NASH pour interpréter le signal et distinguer la différence entre un signal positif très faible et une marque due à la décoloration causée par l'échantillon.

5.1.5.2 Méthodes de détection conventionnelles et en temps réel basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

L'application de la PCR conventionnelle et en temps réel au diagnostic et à la caractérisation des organismes nuisibles a été considérable dans le contexte de la pathologie végétale.

L'amplification en chaîne par polymérase réalise une multiplication exponentielle de la séquence d'acide nucléique modèle grâce à des enzymes thermostables comme la *Taq* DNA polymerase et grâce à des cycles de chauffage et refroidissement qui entraînent respectivement la dénaturation des brins d'ADN et leur appariement. Cette réaction est principalement déterminée par la séquence d'acides nucléiques des oligonucléotides courts, appelés amorces, qui agissent par paires pour "amorcer" la réaction PCR, ainsi que par la température d'appariement. La séquence d'amorce dicte la région de l'ADN modèle qui sera amplifiée. Lorsque l'information sur les séquences est connue, les amorces peuvent être conçues pour amplifier

des régions cibles ; sinon, elles peuvent être conçues pour une amplification au hasard. La PCR de cibles ARN, comme chez les virus, nécessite une étape de transcription inverse pour générer de l'ADN complémentaire à partir du modèle d'ARN avant amplification de l'ADN. Un aperçu de la PCR est fourni par le NCBI. Amplification en chaîne par polymérase (PCR). Disponible à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Le principal résultat de la PCR est la production de nombreuses copies d'ADN de séquence identique à celle du modèle. Selon la conception des amorces, un seul produit ou plusieurs produits d'amplification de différentes tailles peuvent résulter de la PCR. L'ADN amplifié peut ensuite faire l'objet d'un traitement ultérieur (analyse de restriction, séquençage, marquage) ou être visualisé. Traditionnellement, les produits PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose. Cependant, une évolution de la PCR conventionnelle est la PCR en temps réel qui permet l'analyse en temps réel du produit par la surveillance d'une réaction chimique qui se déroule parallèlement à l'amplification. En PCR en temps réel, une sonde marquée avec un colorant se fixe entre les amorces. Lorsque l'amplification se produit, le colorant est activé, ce qui produit un signal. Le signal est mesuré sans qu'il soit nécessaire d'ouvrir le tube PCR, ce qui réduit considérablement les risques de contamination croisée.

Dans la plupart des cas, un diagnostic basé sur la PCR est basé sur la production d'un seul produit d'amplification, observé sur un gel d'agarose ou par une lecture de fluorescence et enregistré comme un résultat positif ou négatif. De plus, un diagnostic PCR plus approfondi comprendra un contrôle interne pour vérifier que la réaction s'est déroulée comme prévu, en plus des contrôles standard que l'on utiliserait pour détecter les résultats de type faux positifs et faux négatifs. Avec la PCR conventionnelle, le contrôle interne doit produire un fragment d'une taille différente de celle du fragment de l'organisme nuisible, et avec la PCR en temps réel, faire usage de colorants différents. Certaines méthodes de PCR comprennent également la quantification du

pathogène en fonction de l'intensité du signal par comparaison avec un étalon interne.

D'autres méthodes de diagnostic basées sur la « Polymerase Chain Reaction » ou encore PCR ont utilisé l'amplification de fragments génétiques qui sont caractérisés et connus pour être spécifique à un organisme. Une application majeure et subséquente à la technique de la PCR et de son diagnostic consiste à séquencer le fragment amplifié, puis à comparer cette séquence à celle des séquences connues sur GenBank ou une bibliothèque interne de séquences d'ADN à l'aide d'un outil tel que BLAST (« Basic Local Alignment Search Tool »).

De nombreuses études ont cherché à comparer la PCR et l'ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »). L'expérience de la plupart des laboratoires a montré que la PCR en temps réel est dix fois plus sensible que la PCR classique et cent fois plus sensible que l'ELISA. Cependant, la PCR et la PCR en temps réel nécessitent toutes deux du matériel et des consommables spécialisés ; et bien que ces coûts diminuent, ils dépassent ceux d'ELISA et peuvent constituer une contrainte en termes de mise de fonds initiale et de coûts de fonctionnement.

5.1.5.3 Amplification isotherme en boucle (LAMP)

Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'un des inconvénients de la PCR est le coût de l'équipement spécialisé nécessaire pour effectuer avec précision le profil PCR adéquat pour l'amplification contrôlée et, dans le cas de la PCR en temps réel, la surveillance simultanée de la fluorescence. L'amplification isotherme en boucle (LAMP) est une méthode de détection de séquences spécifiques d'acides nucléiques et a le potentiel de surmonter plusieurs des limites des méthodes basées sur la PCR. La capacité de LAMP à amplifier une séquence cible d'acide nucléique dans des conditions isothermes élimine le besoin d'équipement de cycle thermique, ce qui permet d'effectuer les essais avec un équipement minimal (bain-marie ou bloc chauffé). En outre, des méthodes simplifiées de détection des produits d'amplification facilitent l'utilisation des méthodes LAMP sur le terrain ou dans des environnements moins bien pourvus en ressources.

LAMP est une méthode d'amplification qui utilise deux paires d'amorces (amorces internes et externes) et une ADN polymérase à forte activité de déplacement de brin pour produire des produits d'amplification qui contiennent des régions de boucle auxquelles d'autres amorces peuvent se lier, ce qui permet à l'amplification de continuer sans cycle thermique. L'amplification est accélérée par l'utilisation d'un ensemble supplémentaire d'amorces (amorces de boucle) qui se lient aux boucles qui sont mal orientées pour que les amorces internes se lient. Un haut niveau de spécificité résulte de l'exigence que les amorces se lient à un maximum de huit régions de la séquence cible. LAMP a été utilisé pour la détection d'une gamme d'agents pathogènes des plantes.

Les réactions LAMP génèrent une grande quantité de produit d'amplification qui peut être détectée par électrophorèse conventionnelle sur gel d'agarose, au moyen de la turbidité mesurée par un spectrophotomètre, soit en temps réel en utilisant des colorants fluorescents intercalés, soit par inspection visuelle de la turbidité ou encore des changements de couleur. Bien que les méthodes de détection fondées sur l'inspection visuelle aient l'avantage de ne nécessiter aucun équipement, l'évaluation de la couleur ou de la turbidité à l'œil nu est potentiellement subjective. Des méthodes sans équipement pour la détection sans ambiguïté des produits LAMP permettraient d'accroître la faisabilité de l'utilisation de LAMP pour la détection des phytopathogènes en dehors du laboratoire. L'une de ces méthodes est l'utilisation de dispositifs à flux latéral (LFD ; Lateral Flow Devices) pour la détection des organismes cibles incorporées dans les produits d'amplification.

Comme la PCR, LAMP peut être utilisé pour détecter les séquences d'ARN en incorporant une étape de transcription inverse pour générer de l'ADNc à partir la séquence d'ARN avant amplification ; la transcription inverse et LAMP peuvent être effectuées dans un tube, à une seule température. Les avantages significatifs de LAMP sont donc : (i) la capacité d'effectuer des réactions d'amplification dans des conditions isothermes, évitant ainsi le besoin d'équipement de thermocycleurs; (ii) la spécificité élevée inhérente

à un mécanisme qui exige la reconnaissance de six régions (ou de huit régions si des amorces à boucle sont utilisées) de la séquence cible pour que l'amplification ait lieu ; et (iii) une efficacité d'amplification qui génère une très grande quantité de produit en moins de 1 h, permettant l'utilisation de stratégies de détection novatrices.

5.1.5.4 Pyroséquençage et séquençage de nouvelle génération

Les approches utilisant la PCR et le LAMP s'appuient sur des séquences connues de l'organisme à identifier pour concevoir des amorces appropriées. L'une des limites de la confiance accordée à la connaissance de la séquence est le fait d'essayer d'identifier un nouvel organisme nuisible ou de vérifier que le matériel est exempt d'organismes nuisibles. Dans ces situations, il faudrait utiliser un ou plusieurs ensembles d'amorces de spécificité taxonomique générale dans l'espoir de détecter un ravageur s'il est présent. Cependant, avec cette approche, un résultat négatif n'élimine pas toute incertitude car un ravageur inconnu peut être génétiquement très distinct et les sites cibles des amorces peuvent manquer d'homologie suffisante pour que la PCR s'initie. Une nouvelle approche pour le diagnostic qui a le mérite particulier d'identifier les organismes nuisibles inconnus et de vérifier que le matériel n'en est pas infecté est le séquençage de nouvelle génération, qui utilise des amorces universelles et aléatoires pour amplifier massivement tous les acides nucléiques d'un échantillon. Les produits d'amplification courts sont ensuite séquencés et un logiciel informatique sophistiqué est utilisé pour analyser ces séquences et les assembler afin que ces séquences aient une longueur suffisante pour l'identification taxonomique potentielle. L'identité des séquences construites peut ensuite être examinée en consultant les bases de données de séquences connues. Cette technologie est hautement spécialisée, serait limitée à quelques laboratoires et ne se justifierait que dans des cas exceptionnels.

5.1.6 Choix d'une méthode de diagnostic appropriée

Quand un agent pathogène doit être identifié, il faut choisir une méthode de diagnostic appropriée. Il faudrait également tenir compte des ressources

dont le laboratoire dispose à ce moment, ou pourrait disposer, pour ces essais. La possession d'équipements spécifiques, par exemple une machine de PCR en temps réel, peut être l'une des considérations initiales, mais il faudrait réfléchir davantage à d'autres facteurs plus larges liés aux ressources, notamment la disponibilité du personnel et ses compétences, l'espace de laboratoire et la maintenance en continu des équipements. Ensuite, il faut tenir compte des exigences spécifiques du test, telles que la sensibilité, la spécificité et la robustesse du test par rapport aux données de sortie du test (données de séquence, données de viabilité, résultats qualitatifs et quantitatifs). Enfin, il convient également de prendre en compte des considérations pratiques, telles que le temps nécessaire pour obtenir un résultat et le coût des tests individuels. En gardant ces facteurs à l'esprit, la recherche documentaire peut alors commencer pour trouver l'éventail des tests diagnostiques disponibles. Un bon point de départ est une recherche sur Internet, puis une recherche dans une base de données bibliographiques, généralement avec le type de méthode requise et l'agent pathogène cible.

5.2 Vérification des nouvelles méthodes

Une fois qu'une méthode de diagnostic appropriée aura été choisie, le laboratoire devra vérifier qu'il peut effectuer le test avec compétence. Dans le cadre de l'ISO 17025:2005 « le laboratoire confirmera qu'il peut appliquer correctement les méthodes normalisées avant d'initier les essais ou les étalonnages ». C'est différent de la validation, qui est la « confirmation par l'examen et la fourniture de preuves objectives que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont remplies » (Weigers 2003, 303). La vérification de la méthode comprend un certain nombre d'expériences utilisant du matériel de contrôle positif et négatif dans le but de s'assurer que le laboratoire peut obtenir une limite appropriée de détection et de réplification d'un test.

5.3 Formation du personnel de laboratoire

Pour un diagnostic réussi et fiable, il est essentiel que le personnel (i) ait une formation adéquate ; (ii) ait la possibilité d'acquérir de l'expérience ; et (iii) puisse exprimer ses compétences. Un certain nombre de séances de formation peuvent être nécessaires jusqu'à ce que le formateur et le stagiaire conviennent que ce dernier est compétent pour effectuer la tâche sans supervision ; toutes les séances de formation doivent être documentées. En règle générale, on devrait s'attendre à ce que les diagnosticiens aient au moins deux ans d'expérience dans un laboratoire de diagnostic avant de tenter d'établir un diagnostic complet (en raison de la grande variété de plantes, d'organismes nuisibles et de symptômes ; l'expérience est la clé de la réalisation de diagnostics de qualité).

Toutes les étapes de la formation doivent être enregistrées et couvrir :

- Étape 1 - Lire les instructions pertinentes (p. ex. les MON)
- Étape 2 - Observation de la tâche effectuée par un membre qualifié du personnel
- Étape 3 - Exécution de la tâche sous supervision
- Étape 4 - Évaluation de la compétence à exécuter la tâche sans supervision.

Dans la mesure du possible, les preuves ou l'expérience utilisées dans le cadre de l'évaluation des compétences devraient être consignées. La compétence est évaluée à l'aide, dans la mesure du possible, d'au moins un des éléments suivants :

- expériences menées à l'aide d'échantillons manuellement enrichis ;
- répétition d'analyse d'échantillons préalablement analysés ;
- l'analyse de matériaux de référence ou d'essais d'aptitude ;
- comparaison des résultats du formateur et du stagiaire.

Les critères d'acceptation sont décrits et sont normalement établis en fonction des limites d'acceptation établies pour la méthode lors du contrôle de la qualité. La date pour l'autorisation d'exécuter une tâche sans supervision est inscrite sur le formulaire d'évaluation, avec confirmation par le

supérieur hiérarchique. Les gestionnaires hiérarchiques devraient s'assurer que les éléments probants présentés et documentés sont exacts et appropriés.

Les laboratoires tenteront souvent de participer à des programmes d'essais d'aptitude. Les essais d'aptitude déterminent le rendement de chaque laboratoire pour des essais ou des mesures spécifiques et servent à surveiller le rendement continu des laboratoires. Cela fournira également la preuve permanente de la compétence d'une personne.

5.4 Méthodes de diagnostic

Le but de cette section est de fournir une introduction aux méthodologies requises pour isoler et identifier un organisme nuisible suspecté. Il ne s'agit nullement d'un guide exhaustif pour l'identification des organismes nuisibles aux plantes.

5.4.1 Bactériologie

Une introduction aux bactéries pathogènes des plantes est proposée par Vidaver, A.K. & Lambrecht, P.A. 2004. *Les bactéries en tant qu'agents pathogènes des plantes*.

The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01. Disponible sur : <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/bacteria.aspx> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Les travaux doivent être entrepris dans un laboratoire disposant d'un confinement approprié pour travailler avec des organismes de quarantaine.

L'équipement nécessaire est le suivant :

- plateaux de dissection
- scalpels, couteaux et ciseaux
- éthanol à 70%
- rouleau/tissu bleu
- petit bec Bunsen
- boîtes de Petri jetables et stériles de 90 mm
- solutions stériles à 0,1 % de peptone ou 0,85 % de NaCl
- boucles d'inoculation stériles à usage unique 1 µl et 10 µl
- eau distillée stérile
- milieux de croissance
- incubateurs (28 °C & 25 °C ±1 °C et 21 °C ± 2 °C)
- sacs autoclaves

5.4.1.1 Diagnostic

Le diagnostic des agents pathogènes bactériens des plantes dans les échantillons symptomatiques comprend l'examen, l'isolement, l'identification et la confirmation des organismes responsables. Le niveau d'identification pour un diagnostic approprié peut se situer au niveau du genre, de l'espèce ou de la sous-espèce.

Les infections bactériennes des plantes sont souvent saisonnières. Les infections sont également influencées par les conditions climatiques et les pratiques agricoles. Une bonne connaissance de base de ces facteurs doit être acquise sur plusieurs saisons de croissance.

La description des symptômes et des méthodes d'isolement et de confirmation des maladies bactériennes les plus courantes se trouve dans *Méthodes de diagnostic des maladies bactériennes des plantes* (Lelliot et Stead, 1991), qui est une référence essentielle. D'autres références utiles et essentielles sont énumérées à la section 5.5.1.3.

Tous les échantillons symptomatiques inconnus doivent être traités comme du matériel de quarantaine et l'élimination des déchets doit respecter les procédures locales.

Le diagnosticien doit consigner une description détaillée des symptômes sur la feuille de laboratoire, y compris des diagrammes s'il y a lieu. Des images peuvent être prises avant le traitement destructif des échantillons.

Isolement

- En se référant à la littérature, une décision clinique est prise quant aux genres de bactéries connus pour causer ce type de symptôme chez cet hôte.
- À l'aide de scalpels stériles, prélever une petite quantité de tissu à la limite du dommage observé (là où le tissu végétal sain rencontre le tissu malade). S'il n'y a pas de bordure d'attaque, on peut essayer de réaliser un isolement à partir d'une autre partie de la plante où les bactéries sont susceptibles de s'être répandues.
- Faire macérer la partie excisée dans quelques gouttes de peptone stérile (0,1 %) ou de solution saline (0,85 % de NaCl) en utilisant une boîte de Petri stérile comme surface propre et laisser reposer pendant quelques minutes avant l'étalement sur le milieu.
- L'isolement initial est de préférence entrepris sur un milieu pauvre en nutriments pour empêcher la croissance rapide des saprophytes. La majorité des bactéries peuvent être isolées sans difficulté sur un milieu gélosé d'agar ; cependant, des milieux de croissance sélectifs et plus riches peuvent être recommandés lorsque l'on soupçonne l'existence de genres spécifiques.
- Étiqueter le fond de la boîte de gélose (et non le couvercle) avec le numéro de référence du diagnostic et la date.
- Inoculer le milieu de croissance avec le macérât en l'étalant. Incuber les plaques inoculées. La plupart des genres de bactéries phytopathogènes sont incubés à 25 °C ± 1 °C pendant 48 h. Toutefois, si l'on recherche certaines bactéries spécifiques, d'autres températures peuvent être nécessaires (par exemple 28 °C ± 1 °C ou 21 °C ± 2 °C). D'autres bactéries à croissance lente nécessiteront également des temps d'incubation plus longs.

Identification

- Examiner les boîtes contenant les milieux de croissance après une incubation appropriée (48-72 h), à la recherche de colonies bactériennes typiques d'agents pathogènes présumés des plantes.
- À titre indicatif, les colonies candidates les plus probables seront probablement les plus nombreuses et pas nécessairement les premières colonies visibles qui apparaîtront après 24 heures.
- Si aucun pathogène bactérien présumé n'est isolé, réévaluer la description du symptôme et prendre une décision clinique quant à savoir si le symptôme est dû à une infection par des organismes autres que des bactéries ou s'il a une cause physiologique.
- Lorsque l'infection bactérienne n'est pas révélée, un rapport final "Aucun agent pathogène bactérien primaire isolé à partir de l'échantillon fourni" est enregistré.

- Purifier les pathogènes présumés au sein de populations mixtes par remettant en culture dans un milieu frais approprié et les réincuber à une température appropriée.
- Si les colonies sont encore mélangées, à l'aide d'une boucle d'inoculation de 1 µl, prendre une petite quantité d'une colonie mélangée et la remettre en suspension dans 5 ml d'eau distillée et, à l'aide d'une boucle de 10 µl, étaler sur un milieu frais.
- Dans le cas d'une culture pure, transférer sur un support plus riche, comme le milieu KB, car cela favorisera une croissance plus importante et cela permettra de maintenir plus aisément la viabilité de la culture.
- En général, pour un stockage à court terme (1 à 3 semaines), les cultures obtenues sont conservées à 5 °C ou à la température ambiante sur gélose. Pour un stockage à long terme, les échantillons seront conservés à -20 °C avec du glycérol ou à -80 °C sur billes de céramique.
- Lorsque des colonies bien isolées d'agents pathogènes présumés ont été obtenues, il convient de passer au stade de l'identification.
- Avant de procéder à des tests spécialisés (comme le profilage des acides gras ou la PCR), il peut être utile d'effectuer des tests de Gram (p. ex. le test KOH), d'évaluer la morphologie et la pigmentation des colonies, des tests de croissance en anaérobiose, de rechercher des spores et de réaliser le test oxydase, afin de pouvoir différencier certains des genres les plus courants.
- Réisoler à partir des symptômes nouvellement développés.
- La confirmation est complète lorsque la bactérie identifiée est récupérée de l'hôte et identifiée.
- Une identification complète est nécessaire avec un organisme qu'on soupçonne d'être en quarantaine ou pour une découverte nouvelle ou inhabituelle qui mérite une publication scientifique évaluée par des pairs.

5.4.2 Mycologie

Une introduction aux champignons pathogènes des plantes est fournie dans le *Manuel de diagnostic des maladies des plantes au Vietnam*. Section 7. *Taxonomie fongique et pathogènes des plantes*. Disponible à l'adresse : <http://aciarc.gov.au/files/node/8613/MN129part4.pdf> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Le travail doit être effectué dans un laboratoire qui dispose d'un confinement approprié pour travailler avec des agents pathogènes de quarantaine.

L'équipement nécessaire est le suivant :

- plateau de dissection
- scalpels et lames de rasoir
- aiguilles montées ou aiguilles hypodermiques jetables
- pinces
- lames de microscope en verre
- couvre-objets en verre N°2 (18 x 18, 22 x 22 et 18 x 50 mm ou autres selon le cas)
- ruban auto-adhésif transparent (Sellotape)
- milieu de montage : lactoglycérol
- colorants : trypane/bleu coton dans le lactoglycérol
- boîtes de Petri contenant un milieu gélosé de dextrose de pomme de terre (PDA - potato dextrose agar) ou tout autre milieu approprié
- tubes pour ébullition
- petit bec bunsen
- produits chimiques pour porter à ébullition les racines : hydroxyde de sodium ou hydroxyde de potassium (KOH)
- granulés antichocs, si disponibles.

5.4.2.1 Diagnostic

Il est important de décrire avec précision les symptômes avant l'examen (qui est souvent invasif

Confirmation (postulats de Koch)

- La confirmation complète consiste en la démonstration de la pathogénicité de la bactérie sur l'hôte concerné, causant des symptômes comparables avec ceux décrits initialement, suivie d'un réisolement et d'une identification répétée à partir de ce même hôte.
- Pour réaliser cette confirmation : inoculer une culture fraîche purifiée de la culture bactérienne identifiée sur des plantes saines en croissance de l'espèce hôte appropriée, et à faire pousser en même temps que des témoins non inoculés.
- Cultiver les plantes inoculées et observer le développement des symptômes.

et destructif), puis de préparer le matériel pour l'examen au microscope composé afin d'identifier toute structure fongique. Des cultures pures peuvent également être préparées pour faciliter l'identification.

Examen initial

Consultez la fiche d'information du client pour obtenir des détails sur l'hôte, le pays d'origine, le pourcentage d'infection et les commentaires.

Examiner l'échantillon à l'œil nu et noter tout dommage à l'échantillon, tel que :

- tissus apparemment secs et morts
- décoloration du feuillage
- jaunissement (chlorose)
- brunissement (nécrose)
- dépôts colorés
- taches ou trous sur les feuilles :
 - symétriques
 - de formes irrégulières
 - associés à des halos chlorotiques ou décolorés
- malformation ou rabougrissement des feuilles ou des pousses
- brunissement des tiges ou formation de chancre
- système racinaire rabougri, déformé, noirci ou pourri
- fermeté des tubercules, bulbes ou fruits
- exsudats collants, gomme à mâcher.

Consigner l'étendue et la position de tout dommage du genre décrit ci-dessus, puis placer l'échantillon sous la loupe binoculaire et sélectionner le plus faible grossissement. Examinez lentement les tissus sains afin de pouvoir reconnaître l'apparence des tissus non infectés (surtout les feuilles). Ensuite, examinez le matériel malade à la recherche de toute structure fongique, en notant sa position, sa présence, sa forme et sa relation avec les zones malades. Déterminez si les structures fongiques sont constamment associées aux symptômes.

Après avoir détecté une structure fongique, augmenter le grossissement (jusqu'à environ 50 fois) pour déterminer sa morphologie (mycélium, conidiophore, sporodochium, pycnidium, acervulus, apothécium, cléistothécium, périthécium, etc.), sa pigmentation (hyaline - incolore, de couleur vive

ou dématiagée - couleur foncée) et sa position sur hôte (superficielle, éruptives, partiellement éruptives, en relief, en plongée, émergente des stomates, des lenticelles, etc.). Après avoir examiné les surfaces de l'hôte, il peut être nécessaire de couper l'échantillon (en particulier les tubercules, les bulbes, les racines, les tiges et les fruits) pour déterminer l'étendue de la pénétration ou des dommages.

Si une zone d'intérêt est localisée, procéder à l'examen du matériau à l'aide d'un microscope à lumière composée.

Corps fructifère présent

Déposer une petite goutte de lactoglycérol (avec ou sans colorant) sur la surface d'une lame de microscope en verre propre. En gardant le matériau de l'échantillon sous la loupe binoculaire, prélever soigneusement un échantillon de plusieurs fructifications fongiques suspectes avec la pointe d'une fine lame de scalpel passée à flamme et lavée à l'alcool ou avec une aiguille montée ou une aiguille hypodermique stérile neuve. Examiner la lame sous la loupe binoculaire pour confirmer que les structures ont été retirées avec succès et qu'elles sont correctement orientées pour l'examen (des quantités excessives de matériel hôte peuvent également être enlevées et jetées à ce stade). Abaissez doucement un couvre-objet en verre de taille appropriée et glissez-le sur la lame, puis appuyez légèrement vers le bas pour expulser toute bulle d'air. Si nécessaire, en tenant la lame par le bout, réchauffez-la doucement sur la flamme d'un brûleur à alcool jusqu'à ce que les poches d'air commencent à se dilater, retirez-la de la flamme et placez-la sur la paillasse pour la laisser refroidir. Cela permet d'éliminer toutes les poches d'air supplémentaires et cela aide aussi à clarifier les tissus dans le milieu de préparation. Transférer la lame sous un microscope à lumière composée.

Mycélium aérien, dépôts chimiques ou structures inconnues

Couper un petit morceau de ruban adhésif transparent tel que le Sellotape (jusqu'à 30 mm de longueur) et placer le côté adhésif vers le bas sur l'échantillon, puis appuyer doucement sur le ruban. L'échantillon doit avoir adhéré au ruban adhésif.

Soulevez le ruban et placez la portion désirée (côté adhésif vers le bas) sur une petite goutte de lactoglycérol déposée sur une lame de microscope en verre. Presser doucement pour éliminer les bulles d'air, puis réchauffer avec beaucoup de précaution pour éviter l'ébullition, qui pourrait dissoudre l'adhésif. Laisser refroidir la lame et la transférer au microscope composé.

Aucune structure observée mais suspicion de mycélium

Enlever une mince section transversale ou longitudinale de l'hôte (feuilles, tiges, racines, tubercules et bulbes) à l'aide d'un scalpel ou d'une lame de rasoir et placer dans une goutte de trypane/ bleu coton dans du lactoglycérol sur une lame de microscope en verre (Le trypane/ bleu coton est utilisé parce qu'il aide à différencier l'hôte de la matière fongique ; ce dernier se colore habituellement dans un bleu plus foncé). Abaissez doucement un couvre-objet et réchauffez la lame comme ci-dessus. Transférez la lame sous le microscope composé.

Les fines jeunes racines peuvent être examinées entières ; cependant, toutes les racines plus vieilles et plus dures devront être bouillies pour les ramollir afin de permettre la pénétration du colorant et ainsi colorer toutes les spores fongiques qu'elles contiennent. Préparer ces racines en les faisant bouillir comme ci-dessous.

Porter à ébullition des racines pour observation

- Sélectionner la zone suspecte des racines, en évitant si possible les brins excessivement pourris ou les brins en décomposition. Couper des morceaux de 3 à 6 cm de racines en quantité appropriée en fonction de la taille de l'échantillon.
- Mettre les racines dans un grand tube à ébullition, remplir le tube avec un maximum d'un pouce d'eau (environ 2,5 cm) et ajouter 4-6 granules antichocs (si disponibles). Les granules ne sont pas essentiels, mais ils aident à minimiser le risque que le contenu bouillant jaillisse hors du tube.
- Ajouter 2-3 pastilles d'hydroxyde de sodium ou de KOH (Éviter de manipuler les granules avec les doigts nus.)

- Utilisez un porte-tubes à essai pour maintenir le tube d'ébullition au-dessus d'une flamme moyenne sur un brûleur Bunsen ou une flamme de gaz (la flamme d'un brûleur à alcool ne sera pas assez chaude, donc ne pas l'utiliser) et faire bouillir les racines pendant plusieurs minutes pour les ramollir et les clarifier, puis les retirer du feu.
- Placer le tube chaud dans un support pour tubes jusqu'à ce qu'il soit suffisamment refroidi pour prélever l'échantillon à observer.
- Une fois refroidi, placer l'échantillon dans une boîte de Petri vide pour faciliter la sélection des racines.
- A l'aide d'une pince, placer une partie de l'échantillon de racine bouillie sur une lame et ajouter 1-2 gouttes de trypane/ bleu coton dans le lactoglycérol.
- Placez un grand couvre-objet (22 x 64 mm) au-dessus des racines.
- Tapotez doucement le couvre-objet pour écraser les racines en vue de l'examen.

Examen du matériel monté à l'aide d'un microscope composé

- Si nécessaire, installez le microscope composé pour une résolution et une clarté optimales.
- Sélectionner un objectif de faible grossissement (par ex. 10) et localiser le spécimen.
- Balayer l'échantillon à faible grossissement et vérifier si les structures sont fongiques.
- Déterminez si des spores sont présentes et déterminez comment elles se forment, par exemple à partir du mycélium ou dans un corps fructifère.
- Si un corps fructifère est localisé, notez sa morphologie et ses dimensions externes, puis essayez d'expulser son contenu en appuyant doucement sur le couvre-objet avec une aiguille montée émoussée. Ceci doit être fait avec beaucoup de soin sur le plateau du microscope, en observant au grossissement x10, ou en retirant la lame du microscope, en la plaçant sur la paille et en tapotant très doucement avec un crayon.
- Réexaminer à l'aide d'un fort grossissement et décrire la morphologie des spores et des structures productrices de spores.

- Il peut être nécessaire de couper une section mince d'un corps fructifère si les détails de la fixation des spores ne sont pas clairs. Cela peut se faire soit avec une lame de rasoir tranchante, soit avec un scalpel.
- Comparer la morphologie et un premier diagnostic provisoire de l'échantillon à une information de référence.
- Un diagnostic final peut être possible à ce stade ; utilisez également les sources de référence sélectionnées et suggérées pour faciliter le diagnostic.
- Si l'échantillon fongique ne peut être identifié avec confiance (pour quelque raison que ce soit), procéder alors à la culture du champignon suspect pour faciliter l'identification.

Isoler les champignons de la matière végétale

L'isolement initial peut être effectué sur une gélose réalisée avec l'eau du robinet. De plus, la grande majorité des agents pathogènes des plantes et des champignons sarophages courants se développent très bien sur PDA. Ce milieu peut être préparé à partir d'une formulation commerciale. Pour le premier isolement, le milieu peut être complété par des antibiotiques tels que la pénicilline et la streptomycine pour contrer toute bactérie. La température d'incubation peut être choisie en fonction de ce que l'on sait sur le champignon ; la plupart des pathogènes végétaux courants se développent assez bien entre 17 et 22 °C.

- Stériliser un scalpel à la flamme, ou utiliser une lame de rasoir neuve pour couper un petit morceau (2-3 mm max.) de tissu en bordure d'une lésion sur la tige, sur une nécrose interne ou sur une tache foliaire.
- Si vous ne recherchez pas le *Phytophthora*, placez une partie de l'échantillon dans 10 % d'eau de Javel pendant 2 à 5 minutes. Sinon, tremper le produit dans de l'éthanol à 50 % pendant 10 s. (Cette méthode peut être utilisée même si on soupçonne la présence de *Phytophthora*). Rincer à l'eau distillée stérile et sécher entre des serviettes en papier.
- Marquer la base de la boîte de gélose avec le numéro de référence de l'échantillon et la date. Si vous prélevez des tissus de plusieurs sortes de

lésions, étiqueter les plaques en conséquence. Placer le tissu prélevé sur la gélose dans chaque boîte, en vous assurant que les morceaux soient répartis uniformément.

- Incuber pendant 5-7 jours, en observant tous les deux jours pour suivre le progrès de la culture et voir si la culture est pure. Au tout début de l'incubation, la culture peut être repiquée sur un milieu frais s'il y a aussi des organismes indésirables qui poussent en même temps.
- Si nécessaire, consulter les sources de référence suggérées pour obtenir de l'aide sur les autres techniques de culture spécialisées qui pourraient s'avérer nécessaires et pour une identification ultérieure.

Dépôt de spores fongiques ou de corps fructifères

Prélever un échantillon d'inoculum de taille appropriée. Il est prudent de laisser un peu de matériel fongique original sur l'échantillon au cas où la première culture n'aurait pas réussi. Placer l'inoculum du champignon au centre d'une boîte de Petri avec un milieu PDA. Incuber et vérifier la croissance fongique tous les deux jours jusqu'à ce que la colonie produise des spores. Pour éviter le dessèchement de la gélose, les boîtes de Petri peuvent être scellées avec du Parafilm ou conservées dans un sac peu étanche.

5.4.3 Virologie

Gergerich, R.C. & Dolja, V.V. 2006, fournit une introduction aux virus pathogènes des plantes. *Introduction aux virus des plantes, l'ennemi invisible. L'instructeur en santé des plantes*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01. Disponible à l'adresse : <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/PlantVirus.aspx> (dernier accès le 21 septembre 2015).

Les travaux doivent être entrepris dans un laboratoire disposant d'un confinement approprié pour travailler avec des organismes de quarantaine.

5.4.3.1 Diagnostic

Examiner l'échantillon à l'œil nu et noter tout symptôme, tel que :

- couleur anormale
- nanisme ou rabougrissement

- décoloration des feuilles, par exemple chlorose, mosaïque, marbrure, taches annulaires, jaunissement des nervures ou nécrose des nervures
- malformation des feuilles, par exemple déformation, rétrécissement ou épinastie
- décoloration des tiges, des fruits et des racines
- d'autres symptômes comme le flétrissement ou la défoliation.

Les symptômes et les renseignements de base, comme l'espèce hôte, ainsi que l'expérience du diagnosticien, fourniront une indication de l'agent causal potentiel. Toutefois, d'autres tests de diagnostic seront nécessaires pour confirmer la présence d'un virus spécifique. En raison de leur nature, les virus sont généralement diagnostiqués par inoculation sur des plantes indicatrices et par des tests sérologiques ou des tests basés sur les acides nucléiques. La microscopie électronique peut également être utilisée, mais cela nécessite l'accès à du matériel spécialisé coûteux et à du personnel qualifié.

Inoculation sur un hôte indicateur

Les virus ne peuvent se propager que par une blessure. L'inoculation mécanique est une méthode courante pour réaliser la détection et le diagnostic des phytovirus. Cependant, il est important de noter que tous les virus ne sont pas transmissibles par la sève.

Des plantes indicatrices herbacées saines sont inoculées avec un échantillon d'inoculum suspect et tous les symptômes qui peuvent être produits par ces plantes indicatrices sont enregistrés après un certain temps, qui peut prendre des jours ou des semaines. Selon les réactions produites sur différentes plantes indicatrices, un diagnosticien peut être en mesure d'établir un diagnostic spécifique. Cette technique d'inoculation mécanique présente des variantes, qui sont fonction du virus particulier suspecté ou de l'hôte sur lequel il apparaît. En conséquence, une variété de plantes indicatrices et de tampons d'extraction sont utilisés.

Équipement requis :

- pilon et le mortier propres
- tampons de broyage, par ex. tampon phosphate pH 7,0⁴
- étiquettes pour les pots
- crayon
- plateau
- espèces indicatrices de la santé des plantes
- échantillon de matériau
- Céélite (terre à diatomées)
- microspatule
- flacon laveur remplie d'eau du robinet
- récipient rempli d'une solution d'eau de Javel
- feuille de test de laboratoire
- coton-tige
- Pipette de 1-5 ml à volume variable
- pointes de pipette
- sacs de broyage.

Les plantes indicatrices comprennent normalement *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana occidentalis* P1, *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana clevelandii*. D'autres plantes peuvent être ajoutées en fonction de l'hôte testé et du virus suspecté. Choisissez des plantes qui ont au moins six vraies feuilles (sauf le concombre qui devrait avoir une vraie feuille et le haricot vert qui devrait avoir des cotylédons seulement). Placer les plantes indicatrices dans l'obscurité pendant 12 à 24 heures avant l'inoculation pour augmenter leur sensibilité. Choisissez de deux à quatre feuilles de bonne taille sur la plante indicatrice. Marquer les feuilles à inoculer en faisant un trou dans la pointe de chacune des feuilles choisies à l'aide d'une pipette propre.

L'inoculum est préparé en broyant le matériel végétal dans un tampon (et une poudre abrasive telle que la Céélite). L'inoculum est ensuite frotté délicatement sur les feuilles marquées des plantes indicatrices et rincé à l'eau 3-5 min plus tard. Un témoin négatif (tampon d'inoculation seulement) et un témoin positif (virus modérément transmissible et produisant des symptômes clairs sur les plantes

⁴ Note : des additifs au tampon tels que la polyvinylpyrrolidone (PVP) et le sulfite de sodium sont importants pour aider à surmonter les inhibiteurs présents dans la matière végétale devant être utilisée comme inoculum.

indicatrices) doivent être inclus dans chaque lot d'inoculations. Notez qu'après chaque inoculation, la paillasse et l'équipement doivent être désinfectés à l'eau de Javel. Les plantes inoculées doivent ensuite être placées dans une serre à une température de 15-18 °C et incubées pendant 4 à 28 jours. Les plantes doivent être examinées deux fois par semaine pour déceler les symptômes et un registre des résultats doit être tenu à jour.

Les symptômes doivent être évalués à l'aide des critères suivants :

- plante hôte
- plantes indicatrices utilisées
- réactions de ces plantes indicatrices, tant les lésions locales que systémiques
- temps nécessaire pour produire des réactions.

Recherche de virus à l'aide du test ELISA

L'ELISA est une technique immunologique pour le diagnostic des phytovirus et développée par Clark et Adams (1977). Elle est devenue l'une des principales méthodes de diagnostic des virus des plantes car elle permet de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois, elle est très spécifique et quantitative.

Avec le test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA), les particules virales sont piégées et prises en sandwich entre la fraction d'immunoglobuline G (IgG) de l'antisérum spécifique et les IgG qui ont été marquées (conjuguées) par une enzyme avec la phosphatase alcaline. La présence du virus est confirmée par l'ajout d'un substrat à la phosphatase alcaline et le développement d'une couleur jaune due aux produits de dégradation du substrat. L'absorbance de la lumière est mesurée à 405 nm sur un colorimètre.

Équipement nécessaire :

- plaque ELISA
- pipettes à volume variable pour couvrir les gammes :
 - 1-5 µl
 - 5-50 µl
 - 50-200 µl
 - 200-1000 µl
 - 1-5 ml

- multipipette à huit canaux à volume variable : 50-250 µl
- embouts de pipette jetables de tailles appropriées
- extracteur de sève ou appareil de broyage
- lecteur de plaques par colorimétrie, par ex. lecteur de plaques Thermo Scientific Multiskan FC
- sérum-albumine de bovin
- poudre de lait écrémé en poudre
- sel hexahydraté de 4-nitrophényldisodisodium
- solution saline tamponnée au phosphate avec Tween (PBST)
- Tween-20
- anticorps et conjugués
- tampons
- plans de plaques
- stylo marqueur imperméable
- film alimentaire
- essuie-tout
- flacon laveur
- sacs de broyage.

Un plan de la plaque ELISA doit être produit pour cartographier l'emplacement des échantillons et des contrôles sur la plaque de 96 puits. Ceci devrait être basé sur les critères d'essai suivants :

- Chaque échantillon doit être analysé en double. C'est pourquoi les colonnes de la plaque doivent toujours être affectées à chaque virus par paires (par ex. colonnes 1+2 ArMV, colonnes 3+4+5+6 CMV, colonnes 7+8 TBRV).
- Pour chaque test de dépistage d'un virus, il doit y avoir au moins un témoin sain et un témoin infecté (également effectué en double).

Sur la feuille de plan de la plaque, assigner des échantillons et des contrôles aux puits de la plaque, en travaillant verticalement. Inscrivez-en haut de la page la ou les colonne(s) qui seront utilisées pour chaque test de virus. Dans la mesure du possible, utilisez un plan de plaque standard (où la place des témoins sains est déjà assignée).

Note : Les tests ELISA indirects en Triple-Sandwich (TAS-ELISA) doivent être réalisés sur une plaque séparée, car des étapes d'incubation supplémentaires sont nécessaires (à moins qu'il ne s'agisse d'un cocktail, au cours duquel l'anticorps monoclonal et le conjugué anti-espèces sont combinés ensemble et ajoutés à la plaque en même temps).

Procédure du test DAS-ELISA (Sandwich Double Anticorps) :

- Préparation de la plaque (dite coating) :
 - Étiqueter la plaque ELISA avec un autocollant portant le numéro de plaque ELISA et l'écrire sur le papier du plan de la plaque. Écrivez sur la plaque elle-même quel test de dépistage du virus se trouve dans chaque colonne selon le plan de la plaque.
 - Mélanger l'anticorps IgG spécifique du virus testé avec un tampon de coating dans un récipient de pesée en plastique. Ajouter 100 µl par puits. Recouvrir d'un film plastique. Remplir les formulaires en indiquant la date, et indiquez de quelle société provenait l'antisérum.
 - Incuber à 37 °C pendant 2 à 4 h ou toute la nuit.
- Préparation des échantillons
 - Placer les échantillons dans des sacs de broyage et les broyer. Ajouter 5 ml de tampon d'extraction (2 % p/v PVP dans PBST) avant le broyage ou immédiatement après. Ce volume peut être ajusté entre 2 et 10 ml pour les petites et grandes semences. Note : Pour les témoins sains, utiliser si possible la même hôte que pour les échantillons testés.
 - Laver la plaque ELISA avec du PBST ; soit trois fois à la main, soit à l'aide d'un laveur de plaque. Absorbent à sec avec plusieurs couches d'essuie-tout.
 - Suivant le plan de la plaque, remplir la plaque avec les échantillons, les témoins sains et les témoins infectés. Ajouter 100 µl d'extrait par puits. Recouvrir d'un film plastique étirable.
 - Incuber toute la nuit au réfrigérateur à 4 °C.
- Ajout d'un conjugué enzymatique :
 - Laver une fois à la main la plaque ELISA avec du PBST pour enlever les résidus de plantes ou de semences. Ensuite, utilisez un lave-vaisselle ou lavez encore trois fois à la main avec du PBST. Veillez à ce qu'il ne reste aucun résidu coloré. Si nécessaire, laver à nouveau. Éponger à sec.
 - Mélanger l'anticorps conjugué à l'antiphosphatase alcaline spécifique du virus testé avec un tampon conjugué (0,2 % p/v BSA dans le PBST) dans une nacelle de pesée en plastique. Ajouter 100 µl par puits. Recouvrir d'un film étirable. S'assurer de l'utilisation d'anticorps conjugués provenant de la même firme, tel qu'indiqué dans la section sur le coating de la documentation. Commencer la partie « conjugué » du protocole une fois que l'anticorps conjugué est ajouté.
- Incuber pendant 2-4 h à 37 °C.
- Ajout du substrat :
 - Laver la plaque ELISA avec du PBST et l'essuyer comme auparavant.
 - Préparer une solution de 0,1 % p/v d'hexahydrate de sel de 4-nitro-phénylphosphate disodique (substrat en poudre) dans un tampon de substrat, dans un bateau peseur en plastique. Faire 1 ml par colonne de la plaque (*note* : 10 ml suffisent pour une plaque pleine). Ajouter 100 µl par puits. Garder la solution dans l'obscurité lorsqu'elle n'est pas utilisée car elle est sensible à la lumière. Débuter le protocole et préciser l'heure à laquelle la solution de substrat a été ajoutée.
 - Garder la plaque dans l'obscurité à température ambiante et vérifier périodiquement le développement de la couleur. Généralement, cette durée est d'une heure au maximum et probablement moins dans les climats plus chauds (par exemple, les laboratoires non climatisés dans les pays tropicaux). Il est important de surveiller le témoin négatif car il doit rester sans couleur, mais il se décolore avec le temps. Pour certaines réactions ELISA, on obtient une incubation optimale qui différencie les tests positifs.
- Analyse des résultats : Il existe un certain nombre de scanners de plaques avec le logiciel d'analyse associé. Voici un exemple d'un système.
 - Lire l'absorbance conformément aux instructions du scanner de plaques.
 - Vérifier que les témoins infectés sont au-dessus du seuil positif et idéalement au-dessus de la valeur d'absorbance de 0,5 ; si la lecture est trop basse, laisser se développer plus longtemps. Prenez une copie papier et joignez-la au plan de la plaque. En cas d'impression, mettez en surbrillance sur le rapport les valeurs supérieures au seuil positif.

Détection de virus par PCR

La PCR est décrite à la section 5.1.5.2. Avant de pouvoir utiliser la PCR pour détecter un organisme nuisible aux plantes, l'acide nucléique doit être extrait du matériel d'essai. Plusieurs méthodes sont disponibles pour extraire les acides nucléiques à des fins d'analyse. Le choix des méthodes dans tout laboratoire dépend de la source principale de l'échantillon et de la nature du test que vous effectuez. Quelle que soit la méthode, le processus d'extraction comportera trois étapes principales : la lyse, l'élimination des inhibiteurs et la récupération de l'acide nucléique.

La lyse brute peut impliquer des méthodes physiques telles que le broyage, la congélation-décongélation ou la sonication, ou des méthodes chimiques utilisant des détergents, des enzymes, des agents chaotropes ou simplement la cuisson des cellules dans un tampon. Les méthodes d'extraction des acides nucléiques peuvent reposer sur la solubilité différente des acides nucléiques et des protéines dans le phénol et l'eau, comme dans les méthodes d'extraction phénol/chloroforme, ou sur la capacité des acides nucléiques à se lier à la silice, comme dans les méthodes d'extraction isothiocyanate de silice/guanidinium. L'acide nucléique extrait peut être concentré par précipitation avec de l'éthanol ou des billes de silice.

Des kits commerciaux contenant tous les réactifs nécessaires sont disponibles, basés sur des colonnes de torsion ou des billes magnétiques. En l'absence de kit commercial, le protocole suivant, communément appelé CTAB en raison de l'utilisation du bromure de cétyle triméthylammonium, est adapté de Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. 1993. *Une méthode simple et efficace pour isoler l'ARN des épiceas*. Plant Molecular Biology Reporter, 11 : 113-116. Elle peut être utilisée pour extraire l'ARN de la plupart des types de matériel végétal.

Protocole d'extraction de l'ARN – cas d'une feuille de plante

Pour chaque échantillon, effectuer une extraction de la ou des plantes à tester ainsi que d'une plante saine connue (si possible de la même espèce) comme témoin négatif. Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à 13 000 g dans une microcentrifugeuse, sauf indication contraire.

Équipement requis :

- outil de broyage et sacs de broyage
- microtubes à centrifuger de 2 ml (4 par échantillon)
- pipettes (P1000 et P200)
- pointes de pipette
- bain-marie ou autre incubateur préchauffé à 65 °C
- centrifugeuse (avec rotor approprié pour le filage de microtubes à centrifuger jusqu'à 13 000 g)
- frigo
- hotte
- réactifs :
 - tampon de broyage CTAB (au moins 1 ml par échantillon)
 - chloroforme : alcool isoamylique (IAA) 24:1
 - solution 4 M de chlorure de lithium (LiCl)
 - isopropanol
 - d'éthanol à 70 % v/v
 - tampon Tris-EDTA contenant 1 % de SDS
 - eau stérile sans nucléase.

Procédure :

- Placer 100-200 mg de tissu végétal dans un sac de broyage de 10x15 cm (ou similaire) et congeler dans de l'azote liquide avant de le broyer en poudre fine à l'aide d'un petit rouleau manuel. Remarque : vérifiez que vous n'avez pas fait de trou dans votre sac de broyage, si c'est le cas, couvrez-le avec du ruban adhésif.
- Broyer jusqu'à ce que la décongélation commence et que le tissu forme une "pâte lisse". Ajouter 1 à 2 ml (soit 10 volumes) de tampon de broyage et bien mélanger au rouleau.
- Décanter 0,7 ml de la sève broyée dans un microtube de 1,5 ml et incubé la sève à 65 °C pendant 10-15 minutes.
- Après incubation, ajouter 700 µl de chloroforme:IAA (24:1) et mélanger à l'émulsion en inversant le tube.
- Centrifuger à vitesse maximale dans une micro centrifugeuse pendant 10 minutes à température ambiante.
- Procédure facultative pour "tissu difficile" : Retirer soigneusement la couche supérieure (aqueuse) et la transférer dans un tube propre.

- Ajouter un volume égal de chloroforme:IAA, mélanger et centrifuger comme auparavant.
- Enlever la couche aqueuse en faisant très attention à ne pas perturber l'interphase. Ajouter un volume égal de la solution 4 M de LiCl, bien mélanger et incubé à 4 °C pendant la nuit ou 1 h à température ambiante.
 - Centrifuger pendant 20 à 30 minutes à vitesse maximale à 4 °C pour agglomérer l'ARN.
 - Remettre en suspension le culot dans 200 µl du tampon TE contenant 1 % de SDS. Ajouter 100 µl de NaCl 5 M et 300 µl d'isopropanol refroidi avec de la glace. Bien mélanger et incubé à -20 °C pendant 20 à 30 minutes
 - Centrifuger pendant 10 minutes à vitesse maximale à 4 °C pour obtenir un granulé d'acide nucléique. Décanter le sel et l'éthanol surnageant.
 - Laver les agglomérats en ajoutant 500 µl d'éthanol à 70 % et centrifuger pendant 3-4 minutes à 4 °C.
 - Décanter l'éthanol et sécher l'agglomérat pour éliminer l'éthanol résiduel. Remarque : Ne pas sécher complètement, car le culot deviendra difficile à remettre en suspension.
 - Remettre en suspension le culot dans 50 µl d'eau stérile sans nucléase.

Méthodologie PCR et contrôles:

Idéalement, différentes zones du laboratoire (ou différents laboratoires) seront dédiées aux différentes parties du processus PCR, afin de garantir l'absence de contamination. Les zones à séparer sont celles consacrées (i) à l'extraction, (ii) à la réalisation de la PCR, (iii) au dopage ADN et (iv) à la post-PCR.

Des mesures de contrôle de la contamination devraient être incluses à chaque étape du processus. Ainsi, pour chaque série d'extractions, un témoin sain connu devrait être inclus (idéalement de la même espèce ou d'une espèce étroitement apparentée ; un témoin tampon à blanc peut également être utilisé). Ce contrôle sera testé en même temps que les échantillons de diagnostic et permettra d'identifier toute contamination pendant le processus d'extraction.

Plusieurs types de contrôles de l'eau devraient être inclus dans le processus, comme suit :

- Tubes bouchés après l'ajout du mélange maître (pré-capuchonnés) - ceci indique le degré de propreté des réactifs utilisés.
- Tubes laissés ouverts pendant l'enrichissement de l'ADN mais fermés par la suite (post-capuchonnés) - ceci met en évidence toute contamination croisée pendant la mise en place (en particulier lors de l'utilisation de plaques).
- Enfin, les tubes dans lesquels de l'eau est ajoutée à la fin du processus pour indiquer la contamination croisée d'un échantillon à l'autre, ou associée à la pipette pendant le montage.

Protocole RT-PCR conventionnel :

Les réactions PCR doivent être réalisées sur de la glace ou avec les réactifs de base conservés préalablement sur de la glace. Les conditions de réaction typiques sont soit 25 ou 50 µl ; pour un usage diagnostique, 25 µl sont suffisants pour permettre la répétition de l'électrophorèse sur gel, tandis que pour le travail de développement et le séquençage, 50 µl pourraient être plus appropriés. La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) peut être effectuée soit dans un seul tube (avec une seule réaction), soit dans deux tubes (étape RT séparée). Dans un format à deux tubes, l'ADNc est ajouté à partir de la réaction de transcription inverse dans la réaction PCR, tandis que dans le format à un tube, une étape RT est effectuée immédiatement avant le cycle PCR. Ce format est préférable pour l'utilisation en diagnostic car il est plus simple et la contamination est moins probable puisque le tube n'est ouvert qu'après la PCR, l'optimisation de la RT-PCR en une étape implique généralement de réduire la quantité de M-MLV transcriptase inverse incluse dans le mélange réactionnel.

Mise en place de vos réactions PCR :

Équipement requis :

- pipettes (P10 et P200)
- pointes de pipette
- plaques PCR à 96 puits
- scellements de plaque ou bouchons
- salle PCR
- réactifs :
 - Mastermix
 - échantillons.

Tableau 1. Exemple de calcul d'un Mastermix RT-PCR en une étape

Réactif	Volume pour une réaction	Volume requis
Nombre total de réactions		1 l
Eau stérile, exempte de nucléase	34,75 µl	382,25
10 x tampon de réaction	5 µl	55
MgCl ₂ 25 mM	3 µl	33
Primer 1 10 µM	2 µl	22
Primer 2 10 µM	2 µl	22
mélange dNTP (10 mM chacun)	1 µl	11
MMLV (dilué 1/50 dans SDW)	1 µl	11
Taq polymérase (5 u/µl)	0,25 µl	2,75
ARN	1 µl	

Planifiez le nombre de réactions dont vous aurez besoin et les puits que vous utiliserez pour chaque échantillon à l'aide d'un plan de plaque. Calculez les volumes que vous devrez ajouter pour composer votre Mastermix RT-PCR (voir Tableau 1). Rappelez-vous qu'idéalement, vous devriez tester vos échantillons en double.

Prélevez 24 µl de Mastermix par puits et ajouter ensuite 1 µl d'échantillon ou du témoin à chacun des puits pertinents. Placer la plaque dans la machine PCR et mettre en route le programme RT-PCR.

5.4.4 Nématologie

5.4.4.1 Introduction à la nématologie végétale

Il existe de nombreux ouvrages de référence qui détaillent la biologie et la pathogénicité des nématodes phytoparasites et des nématodes libres. Les introductions fournies par Decraemer et Hunt (2006) et Hockland *et al* (2006) sont résumées, en partie, ci-dessous.

Les nématodes sont des animaux pseudocoelomates, non segmentés en forme de vers, communément décrits comme filiformes ou en forme de filaments. Les nématodes sont les Métazoaires les plus nombreux sur terre. Ils sont soit libres, soit parasites des plantes ou des animaux. Bien qu'ils soient présents dans presque tous les habitats (Cobb, 1915), ce sont essentiellement des animaux aquatiques. Les nématodes dépendent de

l'humidité pour leur locomotion et leur vie active. Par conséquent, l'humidité du sol, l'humidité relative et d'autres facteurs environnementaux affectent directement la survie des nématodes. Cependant, de nombreux nématodes peuvent survivre à l'état anhydrobiotique.

On estime qu'un seul acre (environ 4/10ème d'ha) de sol provenant de terres arables peut contenir jusqu'à 3 000 000 000 000 de nématodes. Afin de juguler ce facteur limitant de la production agricole, il est essentiel d'identifier avec précision les nématodes nuisibles et d'en comprendre la biologie. De nombreux nématodes phytoparasites causent des dommages économiques à un large éventail de cultures. Cependant, leur présence n'est pas toujours évidente pour les producteurs et les symptômes sont souvent attribués à des troubles nutritionnels ou à d'autres causes. Dans le passé, la difficulté de détecter les nématodes et le manque d'information sur leur biologie et les dommages qu'ils causent ont contribué à accroître le risque qu'ils se déplacent par inadvertance via les échanges commerciaux sans être remarqués, avec leurs hôtes associés ou dans les résidus de sol.

De nombreux nématodes susceptibles d'avoir une importance phytosanitaire sont interceptés dans le commerce international par les inspecteurs phytosanitaires aux points d'entrée. Il s'agit souvent d'espèces inconnues qui peuvent devenir des organismes nuisibles importants si on les

laisse entrer et s'établir. Des nématodes nuisibles, qui étaient auparavant inconnus ou peu connus, peuvent faire l'objet de mesures de quarantaine d'urgence afin d'éviter leur possibles introduction et propagation avant que les risques ne soient mieux compris. Le cas échéant, les mesures devraient être modifiées en fonction de l'expérience acquise et de l'acquisition de nouvelles informations. Cannon et ses collaborateurs (1999) décrivent comment le Royaume-Uni a adopté un protocole systématique pour déterminer les mesures appropriées et donnent des exemples de nématodes nuisibles interceptés au Royaume-Uni sur des penjing chinois (arbres nains) ; d'autres exemples comprennent certaines espèces de nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.) interceptés par des États membres de l'Union européenne sur des boutures de racinées importées.

Les nématodes présentent un large éventail d'habitudes alimentaires ou de trophismes. Certaines espèces de nématodes sont microphages ou microbotrophes, se nourrissant de petits micro-organismes, tandis que d'autres sont saprophages, se nourrissant de matière organique en décomposition. De nombreuses espèces de nématodes sont phytophages et se nourrissent directement sur les plantes, tandis que d'autres sont omnivores ou prédatrices. Le parasitisme d'espèce d'invertébrés ou de vertébrés est également fréquent. Il existe trois principaux types de parasitisme végétal : ectoparasite, endoparasite et semi-endoparasite.

Ectoparasite : Le nématode reste dans le sol et ne pénètre pas dans les tissus végétaux. Il se nourrit en utilisant son stylet pour perforer les cellules végétales - plus le stylet est long, plus il peut se nourrir en profondeur dans les tissus végétaux. La majorité des espèces ectoparasites restent mobiles tandis que d'autres, par exemple *Cacopaurus*, se fixent de manière permanente à la racine via leur stylet profondément enfoncé.

Endoparasite : Dans ce type de parasitisme, le nématode entier pénètre dans le tissu racinaire. Les endoparasites migrants, comme *Pratylenchus* et *Radopholus*, conservent leur mobilité et n'ont pas de site d'alimentation fixe dans le tissu végétal, tandis que les endoparasites plus sédentaires ont un site d'alimentation fixe et induisent un système

trophique sophistiqué de cellules nourrices ou syncytium. L'établissement d'un site d'alimentation spécialisé facilite le flux des nutriments de l'hôte, permettant ainsi aux femelles de devenir sédentaires, de formes obèses et hautement fécondes. Les endoparasites sédentaires ont également une phase migratoire avant que le site d'alimentation ne soit établi. Chez les nématodes à galles et à kystes, seuls les mâles J2 et adultes sont migrants, mais chez *Nacobbus*, par exemple, tous les stades juvéniles, ainsi que le mâle et la femelle immatures vermiformes, sont migrants, seule la femelle mature étant sédentaire.

Semi-endoparasites : Seule la partie antérieure du nématode pénètre dans la racine, la partie postérieure restant dans le sol.

5.4.4.2 Exigences du laboratoire

Les installations de laboratoire pour le diagnostic des nématodes nuisibles nécessitent de mettre en place un confinement approprié pour travailler avec des organismes de quarantaine. Des descriptions détaillées de l'équipement d'extraction peuvent être trouvées dans la Norme OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des végétaux) sur l'extraction des nématodes (OEPP, 2013a).

5.4.4.3 Diagnostic

L'identification des nématodes sous-tend tous les aspects de la recherche, des activités de conseil, de la mise en œuvre de la législation sur la quarantaine et du choix des stratégies de lutte. La taxonomie classique est maintenant complétée par le diagnostic moléculaire.

Des protocoles normalisés pour l'extraction des espèces de nématodes réglementées sont fournis par la CIPV et par chaque organisation régionale de protection des végétaux (ORPV). Les protocoles de diagnostic pour toutes les espèces de quarantaine et réglementées de la région européenne sont fournis par l'OEPP (<http://archives.eppo.int/EPPOStandards/diagnostics.htm>). Ces documents décrivent les symptômes typiques causés par l'alimentation et le parasitisme du nématode chez l'hôte.

Extraction des nématodes

Il existe de nombreuses méthodes pour extraire les nématodes du substrat, y compris les techniques passives, de dissection et de flottation. Les nématodes vermiformes peuvent être extraits des tissus végétaux, des semences, du sol ou du milieu de croissance à l'aide de techniques telles que l'entonnoir de Baermann (figure 16), la méthode modifiée du plateau de Baermann (Hooper et Evans, 1993 ; figure 17), une méthode adaptée de flottation avec du sucre (Coolen et D'Herde, 1972) ou la technique du brouillard (Hooper et al., 2005). Il existe également diverses méthodes décrites pour isoler les nématodes à kystes du substrat, par exemple, la boîte de Fenwick (Fenwick, 1940) ou le laveur de Wye (Winfield et al., 1987). Des descriptions détaillées des procédures d'extraction peuvent être trouvées dans la Norme OEPP sur l'extraction des nématodes (OEPP, 2013a).

Le matériel végétal soupçonné d'être infesté par des nématodes phytoparasites doit être traité dès que possible afin d'éviter toute nouvelle détérioration et infection par des agents pathogènes secondaires. Le sol et le milieu de

culture doivent être conservés à environ 5 °C à l'abri de la lumière directe du soleil, jusqu'à ce qu'ils soient traités. Pour assurer une bonne récupération, il est recommandé de manipuler le sol avec précaution afin d'éviter d'endommager les spécimens de nématodes.

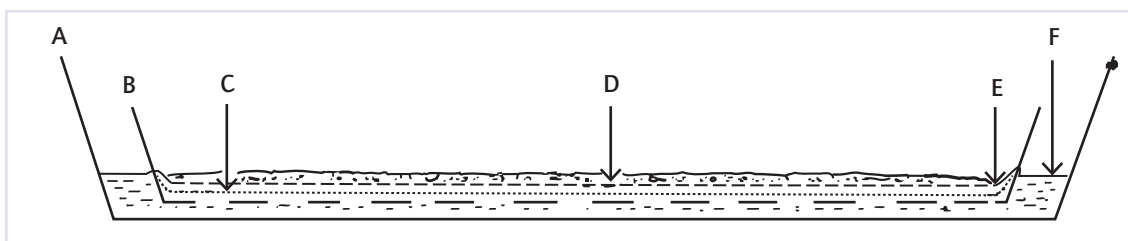
La méthode de l'entonnoir de Baermann est une technique simple d'extraction des nématodes actifs du sol, des semences et du matériel végétal.

Il se compose d'un entonnoir avec un morceau de tube en caoutchouc fixé à sa base et fermé par un ressort ou une pince (l'inclinaison recommandée de l'entonnoir est d'environ 30°). L'entonnoir est placé dans un support et presque totalement rempli d'eau du robinet. Un tamis en plastique ou un panier en fil métallique dont l'ouverture est suffisamment grande pour permettre le passage actif des nématodes est placé juste à l'intérieur du bord de l'entonnoir. Le sol ou les tissus végétaux sont coupés en petits morceaux et placés soit directement sur le treillis, soit sur une couche de tissu supportée par le treillis; le niveau d'eau est alors ajusté de telle sorte que le substrat est à peine submergé. Les nématodes actifs passent alors à travers les mailles et s'enfoncent jusqu'au fond de la base de l'entonnoir. Il est également possible d'utiliser des entonnoirs en plastique ou en acier inoxydable, ou encore des tuyaux en silicone. Cependant, en ce qui concerne ces derniers, la diffusion de l'oxygène dans l'eau est inférieure à celle du polyéthylène (Stoller, 1957), ce qui pourrait lentement conduire à l'asphyxie des nématodes. Selon le substrat, la plupart (50 à 80 %) des nématodes mobiles présents seront récupérés dans les 24 heures ; toutefois, les échantillons peuvent être laissés dans l'entonnoir jusqu'à 72 heures pour augmenter le taux de récupération. Pour des périodes d'extraction plus longues, des prélèvements réguliers et l'ajout d'eau fraîche augmentent la motilité des nématodes et donc leur taux de récupération. L'efficacité de l'extraction peut également être améliorée en ajoutant de 1 à 3 % d'H₂O₂ pour l'approvisionnement en oxygène (Tarjan, 1967, 1972). Après la période d'extraction, une petite quantité d'eau contenant les nématodes est prélevée et observée au stéréomicroscope (Flegg et Hooper, 1970).

Figure 16: Entonnoir de Baermann modifié pour l'extraction des nématodes du matériel végétal ou du sol



Figure 17 : Méthode modifiée d'extraction des nématodes en barquette



A, plateau de photographie ; B, panier en fil métallique plastifié ; C, support en plastique à mailles grossières pour supporter la gaze ; D, filtre (tissu monocouche, filtre à lait ou morceau de vêtement en coton/nylon) ; E, fine couche de terre ; F, suffisamment d'eau pour mouiller le sous-échantillon sans toutefois l'inonder.

La technique de brumisation de Seinhorst diffère de celle de l'entonnoir de Baermann par le fait que la sève végétale et les produits de décomposition toxiques sont éliminés par lavage. Dans cette méthode, un entonnoir de Baermann ou une coupelle d'Oostenbrink est placé dans une brume ou un brouillard d'eau pour éviter le manque d'oxygène. Le brouillard est produit par des buses qui pulvérisent de l'eau à une certaine pression sur le matériel végétal ou par des buses qui pulvérisent de l'eau vers le haut afin que les gouttelettes tombent doucement sur le matériel végétal. Les nématodes actifs quittent les tissus végétaux et sont lessivés dans l'entonnoir ou la cupule où ils se déposent. Les nématodes sont recueillis toutes les 24-48 h dans un bocal en verre en déserrant la pince à la base de l'entonnoir ou en recueillant les spécimens sur un tamis 20-25 μm . L'extraction peut être poursuivie jusqu'à quatre semaines. Cette technique est décrite par Hooper (1986).

Les nématodes mobiles et immobiles peuvent être extraits du matériel végétal par la méthode de Coolen et D'Herde (1972). Le matériel végétal est lavé, coupé en morceaux d'environ 0,5 cm, et des portions de 5 g sont macérées dans 50 ml d'eau du robinet dans un mixeur domestique à la vitesse de mélange la plus basse, pendant 2 min. La suspension de nématodes et de fragments de tissus est lavée à travers un tamis de 750 μm placé sur un tamis de 45 μm . Le résidu sur le tamis de 45 μm est recueilli et versé dans deux tubes à centrifuger de 50 ml. Environ 1 ml de kaolin est ajouté à chaque tube, le mélange est bien agité, puis centrifugé à 3 000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant est décanté et une solution de saccharose (1,13 g/cm³) est ajoutée aux tubes. Le mélange est bien

agité et centrifugé à 1 750 tr/min pendant 4 minutes. Le surnageant est passé à travers un tamis de 45 μm , le résidu est recueilli et les nématodes sont étudiés sous un stéréomicroscope. Comme alternative au saccharose, du ZnSO₄, MgSO₄ ou de la silice colloïdale peuvent être utilisés.

Identification préliminaire :

Les définitions de la terminologie utilisée dans les sections suivantes se trouvent dans OEPP (2013b).

La différenciation des nématodes phytoparasites par rapport aux autres groupes trophiques nécessite une formation complète par un spécialiste. Un stéréomicroscope à dissection avec un grossissement d'au moins x40 est nécessaire pour observer les caractères morphologiques et préparer les spécimens à étudier. Les trois principaux types d'organes d'alimentation et les régions pharyngées correspondantes des nématodes phytoparasites sont présentés aux figures 18 et 19, respectivement.

Préparation des nématodes :

L'observation morphologique doit être effectuée sur autant de spécimens adultes que possible. Il existe de nombreuses méthodes publiées pour la fixation et le traitement des spécimens aux fins d'étude, dont les plus récentes sont résumées dans Manzanilla-López et Marbán-Mendoza (2012). Pour l'examen, il est recommandé d'observer les nématodes à l'état anhydre et montés dans du glycérol car des caractéristiques taxonomiques importantes peuvent être obscurcies si les spécimens ne sont pas suffisamment éclaircis.

Les préparations temporaires de lames de microscope peuvent être faites rapidement pour un examen instantané, mais ces lames ne peuvent

rester utilisables que pendant quelques semaines seulement.

Si possible, des lames permanentes devraient être préparées pour servir de futures références et déposées dans des collections de référence des nématodes. Les méthodes de préparation de montages permanents de nématodes sur lames ont été décrites en détail ailleurs (Seinhorst, 1962 ; Hooper, 1986). La méthode d'évaporation lente décrite par Hooper (1986) est décrite ci-dessous.

Préparations temporaires :

Une petite goutte d'eau est placée sur une lame de verre creuse. Elle doit être suffisante pour remplir complètement la cavité. Les échantillons de nématodes sont transférés dans l'eau et sont chauffés à 65 °C. Il est essentiel que le chauffage soit juste suffisant pour tuer les nématodes, car un chauffage prolongé entraînera la déformation et la détérioration des spécimens. En pratique, 10 à 15 secondes sur une plaque chauffante suffiront pour la plupart des espèces, mais il est recommandé de vérifier la lame à intervalles réguliers pour évaluer l'état d'avancement du processus, et ne l'enlever de la chaleur que lorsque les mouvements des nématodes ont cessé.

Une lame de verre, exempte de poussière, est sélectionnée et placée sur le côté de la platine du microscope. Une petite goutte de fixateur TAF non concentré (7 ml de formol (40 % de formaldéhyde), 2 ml de triéthanolamine, 91 ml d'eau distillée) ou un autre fixateur approprié est placé au centre de la lame et une quantité appropriée de copeaux de cire de paraffine est placée autour de la goutte (la cire aidera à supporter le couvre-objet et le scellera à la lame. Les nématodes sont transférés de la lame creuse au TAF de sorte qu'ils sont placés sous le ménisque au centre de la goutte et ne se chevauchent pas. Le nombre d'échantillons pouvant tenir sur une lame varie en fonction de la taille des nématodes. Un couvre-objet de taille appropriée est soigneusement nettoyé avec du papier absorbant pour lentilles. Il est doucement abaissé sur les copeaux de cire afin que le contact se fasse avec la goutte de TAF. La lame est placée sur une plaque chauffante et observée jusqu'à ce que la cire ait fondu, l'air qui peut être logé sous le

couvre-objet est enlevé en tapotant doucement sur la lame. La lame est ensuite retirée de la chaleur et examinée. Il devrait y avoir une zone dégagée de TAF contenant les nématodes au centre et un anneau complet de cire pour sceller la lame.

Si le sceau est brisé ou si les nématodes s'incrument dans la cire, la lame doit être à nouveau chauffée, le couvercle soigneusement retiré, les nématodes doivent être récupérés et remontés sur une nouvelle lame. Si de la cire s'est répandue au-delà du couvre-objet, elle est éliminée à l'aide d'une fine lame. Le couvre-objet est scellé avec un anneau de vernis à ongles transparent. Lorsque le vernis est sec, les échantillons sont prêts à être étudiés.

Préparations permanentes :

Une petite goutte d'eau est placée sur une lame de verre creuse, en quantité suffisante pour remplir complètement la cavité. Les échantillons de nématodes sont transférés dans l'eau et chauffés à 65 °C. Il est vital que le chauffage soit juste suffisant pour tuer les nématodes, car un chauffage prolongé entraînera une distorsion et une détérioration des spécimens. En pratique, 10-15 s sur une plaque chauffante suffiront pour la plupart des espèces, mais il est recommandé de vérifier la lame à intervalles réguliers pour surveiller les progrès et de ne l'enlever de la chaleur que lorsque les mouvements des nématodes ont cessé..

Les nématodes sont transférés dans une coupelle à embryon ou un verre de montre approprié à moitié plein de fixateur TAF non concentré (7 ml de formaldéhyde (40 % de formaldéhyde), 2 ml de triéthanolamine, 91 ml d'eau distillée). Elle est couverte et laissée en place pendant au moins une semaine. Les échantillons sont transférés dans un verre de montre contenant une solution de glycérol à 3 % avec une très petite quantité de TAF. Les nématodes doivent être immergés. Un couvre-objet est placé sur le verre de montre et laissé toute la nuit. Le couvre-objet est légèrement déplacé de façon à créer un petit espace pour permettre l'évaporation, et le verre de montre est laissé dans un incubateur (à environ 40 °C) jusqu'à ce que toute l'eau se soit évaporée (cela peut prendre au moins une semaine). En même temps, un petit béccher de glycérol est placé dans l'incubateur pour s'assurer qu'il devienne anhydre.

A l'aide d'une seringue ou d'un compte-gouttes, une petite goutte de glycérol anhydre est déposée au centre d'une lame de verre et les nématodes y sont transférés, en les disposant de manière centrale. Trois supports de couvre-objet sont soigneusement sélectionnés, tels que des billes de verre, de diamètre similaire à celle des nématodes, et placées à intervalles réguliers en marge de la goutte de glycérol, de façon à former un support homogène. De petites quantités de copeaux de cire de paraffine sont placées à intervalles réguliers autour de la circonférence de la goutte de glycérol. Un couvre-objet est chauffé sur un bloc chauffant pendant quelques secondes. La lamelle de protection est nettoyée à l'aide d'un chiffon pour lentilles et délicatement abaissée sur la cire, de sorte que le contact se fasse juste entre la lamelle de protection et le glycérol. La lame est placée sur le bloc chauffant et, dès que la cire a fondu et que les bulles d'air ont été expulsées par le couvre-objet déposé, la lame est retirée de la chaleur et la cire peut durcir. Lorsque la cire est complètement dure, l'excès de cire est enlevé du contour de la barbotine à l'aide d'un scalpel. La lamelle de recouvrement est scellée avec un anneau de produit scellant tel que le

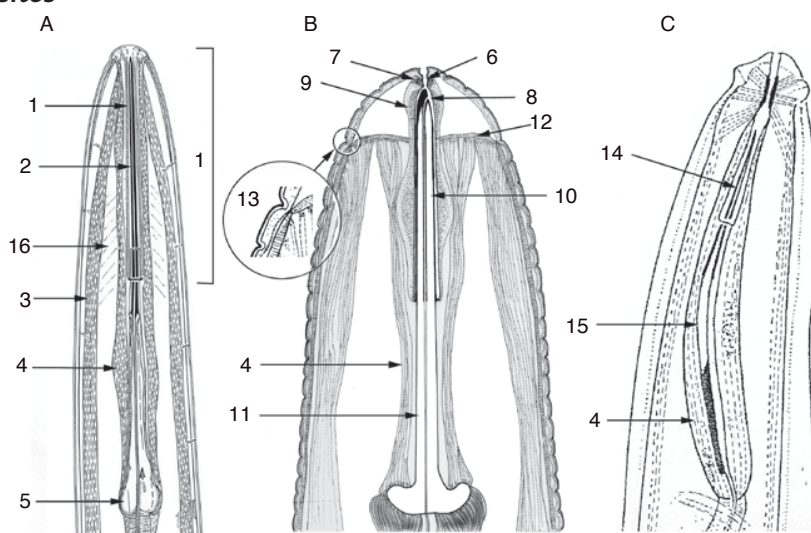
Glyceel ou du vernis à ongles transparent. La lame est identifiée à l'aide d'un marqueur indélébile ou d'une étiquette fixée sur celle-ci. On indiquera la classification, la date de préparation de la lame, la plante hôte, la localisation, le numéro de l'échantillon (le cas échéant) et la méthode de conservation utilisée.

Identification des espèces :

La classification d'une population de nématodes est difficile et nécessite une compréhension de la morphologie, de la phylogénie et de la taxonomie des nématodes. Si l'on soupçonne la présence d'un organisme classé en quarantaine ou si l'on soupçonne un nouveau signalement, la confirmation doit être effectuée par un spécialiste.

Pour l'identification par microscopie optique, un microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC) muni d'un grossissement x400 à x1000 (lentille à immersion dans l'huile) est recommandé. Des protocoles standards pour l'identification morphologique et la confirmation moléculaire des espèces de nématodes réglementés sont fournis par la CIPV et chaque ORPV.

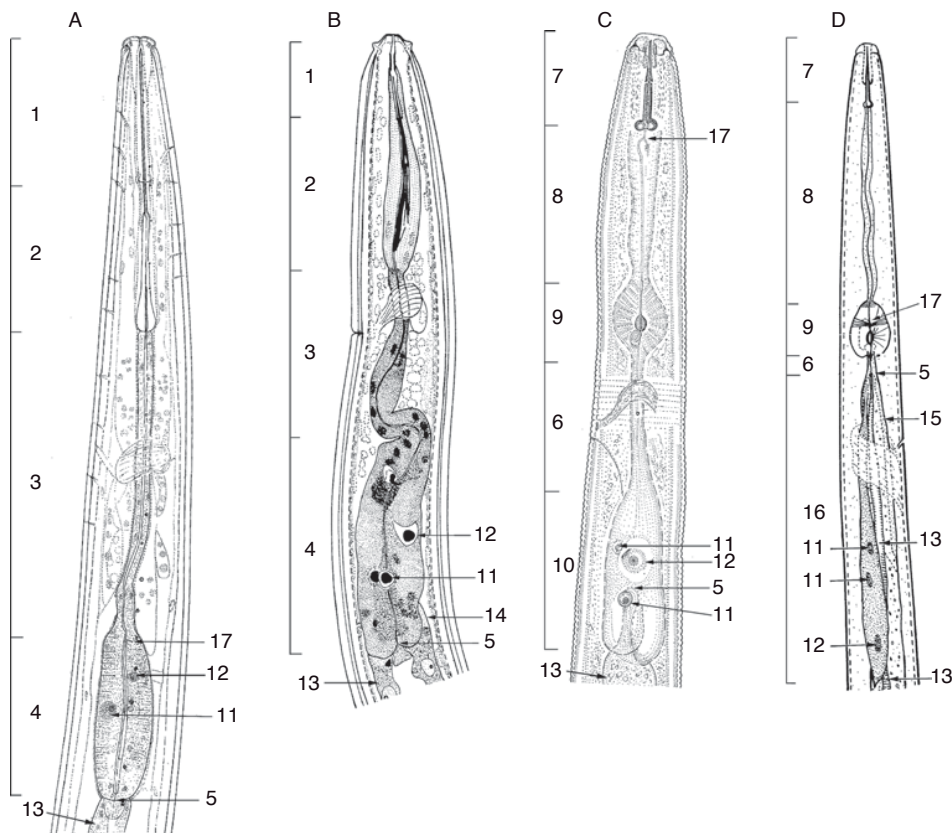
Figure 18 : Région stomatique et types d'appareils d'alimentation chez les nématodes phytoparasites



A, Odontostyle et odontophore (Longidoridae). B, Stomatostylet avec détail de la cuticule du corps (en médaillon) à la base du cadre céphalique (Tylenchomorpha). C, Onchiostyle (Trichodoridae).

1, cheilostome ; 2, odontostyle ; 3, muscles somatiques ; 3, muscles somatiques ; 4, muscles stylet protracteur ; 5, odontophore avec brides ; 6, prestome ; 7, épaissement de la cuticule autour du prestome ; 8, ouverture stylet ; 9, stoma ; 10, conus stylet ; 11, corps du stylet et boutons ; 12, armature céphalique basale ; 13, cuticule du corps en détail, montrant la disparition de la zone basale médiane et striée dans la région de la tête ; 14 et 15, onchiostyle avec onchium (14) et onchiophore (15) ; 16, dilateurs buccaux. Reproduction autorisée de Decraemer et Hunt (2006).

Figure 19 : Système digestif de divers taxons de nématodes phytoparasites



A, Paraxiphidorus (Longidoridae). B, Paratrichodorus (Trichodoridae). C, Pratylenchoides (Pratylenchidae). D, Aphelenchoides (Aphelenchoidae).

1, cheilostome ; 2, pharyngostome ; 3, région antérieure étroite du pharynx ; 4, bulbe pharyngé ; 5, jonction pharyngienne-intestinale ; 6, isthme ; 7, stomatostyle ; 8, procorpus ; 9, métacorpus ; 10, post-corpus ; 11, noyaux des glandes pharyngiennes ventrosublatales ; 12, noyau des glandes pharyngées dorsales ; 13, intestin ; 14, intestin chevauchant dorsalement le pharynx ; 15, cellule valvulaire de la jonction pharyngienne-intestinale ; 16, lobe des glandes pharyngiennes ; 17, orifice dorsal des glandes pharyngées. Reproduction autorisée de Decraemer et Hunt (2006).

5.4.5 Entomologie

Une introduction à l'identification des insectes est fournie par la Royal Entomological Society : http://www.Royensoc.co.uk/insect_info/introduction.htm

Les travaux devraient être entrepris dans un laboratoire sûr qui a mis en place des mesures de confinement qui empêcheront les organismes nuisibles de s'échapper. L'équipement de base requis est le suivant.

Grand équipement :

- microscope binoculaire de dissection (jusqu'à un grossissement x160) pour l'examen général à faible puissance des échantillons et le tri des échantillons

- source de lumière froide avec guides de lumière à fibres optiques
- microscope de recherche (grossissement jusqu'à x1000 avec source de lumière intégrée) pour l'examen d'échantillons montés sur lames
- bloc chauffant ou plaque chauffante (jusqu'à 120 °C)
- four à lamelles pour la préparation des lamelles
- incubateur de laboratoire pour l'élevage d'échantillons
- réfrigérateur domestique pour le stockage des échantillons
- congélateur domestique pour l'élimination des échantillons.

Petit matériel :

- creusets d'échantillons en émail blancs
- boîtes de Petri jetables en plastique de différentes tailles
- cupules à embryons et verres de montre
- lames de microscope (standard et creusées)
- lamelles de recouvrement (13 mm et 18 mm)
- règle en acier (de 20 cm avec divisions de 1/10^{ème} de mm)
- épingles entomologiques
- matériel de dissection comprenant : aiguilles à dissection, scalpels et lames, pinces (diverses, y compris pinces entomologiques), pinceaux fins, brosses à peinture, épingles et pipettes Pasteur
- brûleur à alcool.

Réactifs de base :

- eau déminéralisée
- éthanol (dilué avec de l'eau déminéralisée dans des solutions à 60 et 70 %)
- méthanol
- solution de KOH à 10 %
- white spirit (essence minérale)
- acide acétique glacial
- huile de clou de girofle
- supports de montage de diapositives Heinz
- Baume du Canada et solvant
- Colorant de tissu (fuchsine acide)

Équipement divers :

- ampoules et fusibles de rechange pour le microscope
- huile d'immersion pour microscope
- tissus pour lentilles
- air comprimé en bombe aérosol
- changeur de lame de scalpel
- poubelle pour objets pointus et tranchants
- flacons et supports de réactifs
- flacon pour réactifs usagés
- tubes à ébullition en pyrex, support de tube et grille
- carreau en liège
- tissu de laboratoire (rouleau)
- gants jetables
- marqueurs indélébiles (grossier et fin)
- tubes échantillons en plastique transparent avec bouchon à vis
- tubes Eppendorf (0,5 ml et 1,0 ml)

- bacs d'élevage
- sacs en polyéthylène transparent
- sacs autoclaves

5.4.5.1 Diagnostic

L'identification traditionnelle des insectes repose principalement sur l'examen microscopique des caractères morphologiques qui peuvent nécessiter une préparation spéciale des spécimens, l'utilisation de clés (généralement dichotomiques) et la comparaison avec un seul spécimen ou, de préférence, à une série de spécimens vérifiés. Cette approche demeure le moyen le plus rentable et le plus accessible d'effectuer le diagnostic des insectes. La plupart des clés, mais pas toutes, sont basées sur les caractéristiques du stade de vie adulte, mais dans les diagnostics phytosanitaires, ce sont les stades immatures que l'on rencontre le plus souvent durant les échanges commerciaux (œufs, larves ou pupes) ; dans de tels cas, il est souvent nécessaire de les élever à un stade identifiable. En outre, d'autres éléments de preuve peuvent également faciliter ou accélérer l'identification, par exemple, les données sur l'association hôte, l'origine géographique et la répartition des organismes nuisibles.

Environ un million d'espèces d'insectes ont été décrites jusqu'à présent, ce qui représente 80 à 90 pour cent de toutes les formes de vie animale connues, mais il en reste encore beaucoup d'autres qui n'ont pas encore été officiellement décrites et on estime que le total final se situe entre 6 et 10 millions d'espèces. Parmi les espèces d'insectes existantes connues, les taxonomistes les ont jusqu'à présent divisés en environ 23 ordres différents. Avec un tel éventail de taxons, il n'est pas dans la capacité ou l'expérience d'une seule personne d'offrir des services diagnostic exhaustifs. La majorité des espèces d'organismes nuisibles appartiennent cependant à seulement cinq de ces ordres, à savoir les Coléoptères (scarabés), les Diptères (mouches), les Hémiptères (punaises), les Lépidoptères (mites et papillons) et les Thysanptères (thrips). Un bon entomologiste phytosanitaire généraliste devrait être en mesure de reconnaître ces ordres et les principales espèces de ravageurs qui s'y trouvent, mais aller au-delà de ce diagnostic peut exiger les compétences d'identification d'un spécialiste.

Une méthode éprouvée de prestation de services de diagnostic en entomologie fonctionne selon un système de "triage", selon lequel les entomologistes généralistes donnent la priorité aux échantillons nouvellement arrivés et identifient la majorité des échantillons de routine. Il s'agit d'analyser des échantillons tels que du matériel végétal ou des pièges collants à la recherche d'invertébrés préoccupants et, si nécessaire, de préparer les invertébrés pour l'examen par eux-mêmes ou par les diagnosticiens principaux (par exemple, nettoyer les spécimens et les monter ensuite sur les lames de microscope). Lorsqu'ils ont poussé le diagnostic aussi loin qu'ils le peuvent, on fait appel à des diagnosticiens plus expérimentés ou spécialisés, au besoin. Une fois le diagnostic posé, il ne devrait être signé que par un entomologiste désigné. Par exemple, dans le cadre de l'accréditation ISO 17025, seuls les entomologistes qui ont été formellement formés et testés pour faire les identifications (et que cela soit clairement indiqué dans leurs dossiers de formation) peuvent signer pour une identification.

Pour les entomologistes généralistes et les spécialistes, l'expertise et l'expérience sont primordiales afin de fournir un service efficace et précis. La séparation entre les espèces peut être subtile et la confirmation du diagnostic ne peut être faite de façon fiable que par un diagnosticien expérimenté. De telles compétences ne peuvent être développées qu'au fil du temps grâce à la formation, au mentorat et à la collaboration et au réseautage avec d'autres experts et spécialistes.

5.5 Informations complémentaires

L'Internet donne accès à une vaste gamme d'informations pour étayer le diagnostic et le développement de l'expertise. Cette section fournit des informations sur des documents de référence clés pour les organismes nuisibles ainsi que des centres d'excellence et des bases de données d'experts.

5.5.1 Manuels et sites Web

Les principales sources d'information comprennent l'American Phytopathological Society (APS), les résumés de CAB, l'OEPP, ainsi que des recherches plus générales sur Internet (par ex. Google). Les

revues bibliographiques récentes ou les livres traitant des organismes nuisibles de cultures particulières sont particulièrement utiles et peuvent être localisés relativement facilement à l'aide de recherches sur Internet par mots clés (p. ex. virus, manioc).

Les points de départ utiles sont le CABI Crop Protection Compendium et le CABI Forestry Compendium. La recherche par hôte dans ces recueils peut générer une liste brute d'organismes nuisibles associés à l'hôte, qui peut ensuite être complétée par des recherches dans le système PQR de l'OEPP (base de données des organismes de quarantaine). Il est utile d'inclure tous les synonymes connus du ravageur même s'ils n'ont pas été utilisés depuis un certain temps.

Dans certains cas, il peut être nécessaire de tenir compte de tous les organismes associés à un hôte particulier et, par conséquent, il faut déterminer s'il s'agit d'un organisme nuisible authentique, d'un pathogène secondaire ou simplement d'un signalement accessoire.

Les noms des organismes changent au fur et à mesure que l'information taxonomique devient disponible et il est donc important de vérifier les noms actuellement approuvés des organismes ainsi que tous les synonymes et noms obsolètes.

Une ressource générale utile est le site Web du Catalogue de la vie (<http://catalogueoflife.org> et <http://www.species2000.org/>), qui fournissent les noms actuellement acceptés pour un large éventail d'organismes. Les noms fongiques et synonymes approuvés sont disponibles sur le site Web de l'Indexfungorum (<http://www.indexfungorum.org>), tandis que les noms de bactéries et de phytoplasmes approuvés sont disponibles sur le site Web de l'ISPP (<http://www.isppweb.org>) et dans Firrao et al. (2004) <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1007020>, respectivement.

Les sources principales pour chaque groupe d'organismes nuisibles sont énumérées ci-dessous.

5.5.1.1 Pathogènes - généralités

Notes dans la revue Plant Disease : <http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/Pages/default.aspx>

Plantwise Knowledge Bank: <http://www.plantwise.org>

[org/KnowledgeBank/home.aspx](http://www.knowledgebank.org/KnowledgeBank/home.aspx)

International Society for Infectious Diseases, Program for Monitoring Emerging Diseases (ProMED), About ProMED-mail. Available at <http://www.promedmail.org> (last accessed on 16 September 2015).

BSPP *New Disease Reports*: <http://www.ndrs.org.uk/>
CABI Crop Protection Compendium. Available at <http://www.cabi.org/cpc/> (last accessed on 16 September 2015).

Molecular Plant Pathology: <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291364-3703>

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), EPPO activities on plant quarantine. Available at <http://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm> (last accessed on 16 September 2015).

5.5.1.2 Virus et viroïdes

National Center for Biotechnology Information (NCBI) ICTVdB:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Genomes-Group.cgi?taxid=10239&opt=Virus>

Descriptions of plant viruses (DPV): <http://www.dpvweb.net/>

Viroïdes: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Genomes-Group.cgi?taxid=12884&opt=Viroid>

5.5.1.3 Bactéries

Lelliot, R.A. & Stead, D.E. 1991. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford, Wiley. 224 pp.

CABI & EPPO. 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International and Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1425 pp.

Weller, S.A., Aspin, A. & Stead, D.E. 2008. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *EPPO Bulletin*, 06/2008; 30(3-4): 375-380. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00914.x.

Snowdon, A.L. 2010a. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1. General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.

Snowdon, A.L. 2010b. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 2. Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.

Janse, J.D. 2010. *Phytopathology: principles and practice*. Wallingford, UK, CAB International. 368 pp.

Bradbury, J.F. 1985. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Wallingford, UK, CAB International. 332 pp.

The International Society of Plant Pathology (ISPP): <http://www.isppweb.org/>

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W., eds. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 2nd edn. St Paul, MN, USA, APS Press, American Phytopathological Society. 164 pp..

5.5.1.4 Phytoplasmes

Anciens noms ainsi que les noms selon la nomenclature révisée sans menclature : Firrao *et al* (2004) <http://taxonomi-con.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1007020>

5.5.1.5 Champignons

Index fungorum: <http://www.indexfungorum.org/>

Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A., eds. 2008. *Dictionary of the fungi*, 10th edn. Clayton, Victoria, Australia, CSIRO Publishing. 640 pp.

Barnet, H.L. & Hunter, B.B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 3rd edn. Minneapolis, MN, Burgess. *IMI descriptions of fungi and bacteria*. Wallingford, UK, CAB International. <http://www.cabi.org/dfb/> (last accessed on 16 September 2015).

Ellis, M.B. & Ellis, J.P. 1997. *Microfungi on land plants: an identification handbook*. Slough, UK, Richmond Publishing. 868 pp.

Snowdon, A.L. 2010a. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1. General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.

Snowdon, A.L. 2010b. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 2. Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Oxford, Blackwell. 388 pp.

Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society. 592 pp.

Lane, C.R., Beales, P. & Hughes, K.J.D., eds. 2012. *Fungal plant pathogens*. Wallingford, UK, CAB International. 328 pp.

5.5.1.6 Arthropodes

CABI Arthropod Name Index (1996) on CD-ROM. Gives information on synonyms and links to old *Review of Applied Entomology* volumes (including pre-1973).

Hill, D.S. 1987. *Agricultural insect pests of temperate regions*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 672 pp.

Hill, D.S. & Waller, J.M. 1982. *Pests and diseases of tropical pests: principles and methods of control*. London, Longman. 175 pp.

5.5.1.7 Insectes

Carroll, L.E., White, I.M., Freidberg, A., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. & Thompson, F.C. Pest fruit flies of the world. Available at http://delta-intkey.com/ffl/www/_wintro.htm (last accessed on 16 September 2015).

Carroll, L.E., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. & Thompson, F.C. Pest fruit flies of the world – larvae. Available at http://delta-intkey.com/ffl/www/_wintro.htm (last accessed on 16 September 2015).

Natural History Museum. Lepindex – the global Lepidoptera names index: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/lepindex/>

ScaleNet: <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/query.htm>

5.5.1.8 Nematodes

Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J., eds. 2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 896 pp.

Perry, R.N. & Moens, M., eds. 2013. *Plant nematology*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 568 pp.

Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 864 pp.

5.5.2 Bases de données des laboratoires accrédités et expertise

http://www.eppo.int/DATABASES/diagnostics/diag_quest.htm

5.6 Bibliographie

Barnet, H.L. & Hunter, B.B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 3rd edn. Minneapolis, MN, Burgess. Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J. & Mumford, R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 355–363. DOI: 10.1007/978-1-4020-8780-6_15.

Boonham, N., Tomlinson, J. & Mumford, R. 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 307–328. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349.

Bradbury, J.F. 1985. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Wallingford, UK, CAB International. 332 pp.

CABI & EPPO. 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International and Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1425 pp.

Cannon, R.J.C., Pemberton, A.W. & Bartlett, P.W. 1999. Appropriate measures for the eradication of unlisted pests. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*, 29: 29–36.

Coolen, W.A. & D'Herde, C.J. 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Ghent, Belgium, Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.

Decraemer, W. & Hunt, D.J. 2006. Structure & classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 3–32. Wallingford, UK, CAB International.

Ellis, M.B. & Ellis, J.P. 1997. *Microfungi on land plants: an identification handbook*. Slough, UK, Richmond Publishing. 868 pp.

EPPO. 2013a. Diagnostic: PM 7/119 (1) Nematode extraction. *EPPO Bulletin*, 43: 471–495.

EPPO. 2013b. *Diagnostic protocols for regulated pests: pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (rev. 4). Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. Available at http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf (last accessed 16 September 2015).

Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society. 592 pp.

- Fenwick, D.W.1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18: 155–172.
- Flegg, J.J.M.& Hooper, D.J.1970. Extraction of free-living stages from soil. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, pp. 5–22. Technical Bulletin 2. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Hockland, S., Inserra, R.N., Millar, L.& Lehman, P.S.2006. International plant health – putting legislation into practice. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 327–345. Wallingford, UK, CAB International.
- Hooper, D.J.1986. Extraction of nematodes from plant tissue. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Reference Book 402, 6th edn, pp. 51–58. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Hooper, D.J.& Evans, K.1993. Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes. In K. Evans, D.M. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 1–60. Wallingford, UK, CAB International.
- Hooper, D.J., Hallmann, J.& Subbotin, S.A.2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 53–86. Wallingford, UK, CAB International.
- IMI descriptions of fungi and bacteria*. Wallingford, UK, CAB International. <http://www.cabi.org/dfb/> (last accessed on 16 September 2015).
- Janse, J.D.2010. *Phytobacteriology: principles and practice*. Wallingford, UK, CAB International. 368 pp.
- Lelliot, R.A.& Stead, D.E.1991. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford, Wiley. 224 pp.
- Leslie, J.F.& Summerell, B.A.2006. *The Fusarium laboratory manual*. Oxford, Blackwell. 388 pp.
- Luc, M., Sikora, R.A.& Bridge, J., eds.2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 896 pp.
- Manzanilla-López, R.H.& Marbán-Mendoza, N., eds.2012. *Practical plant nematology*. Mexico City, Biblioteca Básica de Agricultura, Grupo Mundi- Prensa. 883 pp.
- Monger, W.A., Alicai, T., Ndunguru, J., Kinyua, Z.M., Potts, M., Reeder, R.H., Miano, D.W., Adams, I.P., Boonham, N., Glover, R.H.& Smith, J.2010. The complete genome sequence of the Tanzanian strain of *Cassava brown streak virus* and comparison with the Ugandan strain sequence. *Archives of Virology*, 155: 429–433. DOI:10.1007/s00705-009-0581-8.
- Seinhorst, J.W.1962. On the killing, fixing and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica*, 8: 29–32.
- Siddiqi, M.R.2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 864 pp.
- Smith, J.J., Waage, J., Woodhall, J.W., Bishop, S.J.& Spence, N.J.2008. The challenge of providing plant pest diagnostic services for Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 365–375.
- Snowdon, A.L.2010a. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1. General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.
- Snowdon, A.L.2010b. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 2. Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.
- Tarjan, A.C.1967. Influence of temperature and hydrogen peroxide on the extraction of burrowing nematodes from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 51: 1024–1028.
- Tarjan, A.C.1972. Observations on extracting citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 56: 186–188.
- Tomlinson, J.& Boonham, N.2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 1–7.
- Weller, S.A., Aspin, A.& Stead, D.E.2008. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *EPPO Bulletin*, 06/2008; 30(3–4): 375–380. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00914.x.
- Weigers, A.L.2003. Valid methods: the quality assurance of test method development, validation, approval, and transfer for veterinary testing laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15(4): 303–310.
- Winfield, A.L., Enfield, M.A.& Foremann, J.H.1987. A column elutriator for extracting cyst nematodes and other small invertebrates from soil samples. *Annals of Applied Biology*, 111: 223–231. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1987.tb01449.x.

6. Prise d'images de spécimens

Introduction

L'imagerie scientifique, ou photographie scientifique, est une méthode largement utilisée dans les travaux de surveillance à des fins d'identification et de documentation. Il s'agit de faire des photographies ou des dessins de spécimens représentatifs, de la manière la plus précise et la plus impartiale possible. Ce chapitre fournit une introduction à certaines des raisons de créer des images des spécimens et à certains des processus et techniques impliqués. Pour un développement plus détaillé, le lecteur est invité à consulter le [site Web des Ressources phytosinaitaire](#).

6.1 Pourquoi prendre des images pour le diagnostic ?

6.1.1 Documentation

L'une des raisons les plus courantes de prendre des photographies des spécimens est de les documenter, soit comme référence pour le futur, soit comme archive pour une collection physique. Une représentation précise et impartiale d'un spécimen peut être une assurance très utile contre la décoloration, les dommages, la dégradation ou la perte de couleurs.

6.1.2 Matériel de référence

Les images électroniques peuvent être partagées en ligne dans une bibliothèque d'images ou par courriel, et peuvent être utilisées comme matériel de référence de la même manière que le spécimen original. Les images des spécimens qui ont été identifiés avec certitude peuvent être utilisées à des fins de comparaison pour identifier les échantillons futurs. Le partage d'images en ligne permet à un public plus large qu'auparavant d'avoir accès aux spécimens. Cela expose également l'information à un examen minutieux par un plus grand nombre de relecteurs éclairés, ce qui se traduit souvent par une amélioration de l'exactitude.

6.1.3 Identification

Dans les cas où le spécimen n'a pas été identifié avec certitude, des images prises lors d'un diagnostic approprié peuvent être envoyées pour identification à un expert au lieu de l'échantillon original. La rapidité et la facilité avec lesquelles les images peuvent être envoyées aux experts, ainsi que le risque réduit de perte ou d'endommagement de l'échantillon pendant son transport, font de l'imagerie une arme importante dans l'arsenal d'un laboratoire de surveillance.

6.2 Qu'est-ce qu'une image scientifique ?

L'objectif principal de la prise de photographies et d'illustrations scientifiques est de représenter l'échantillon avec autant de détails que possible. Pour une photographie utilisable en diagnostic, le but est d'avoir :

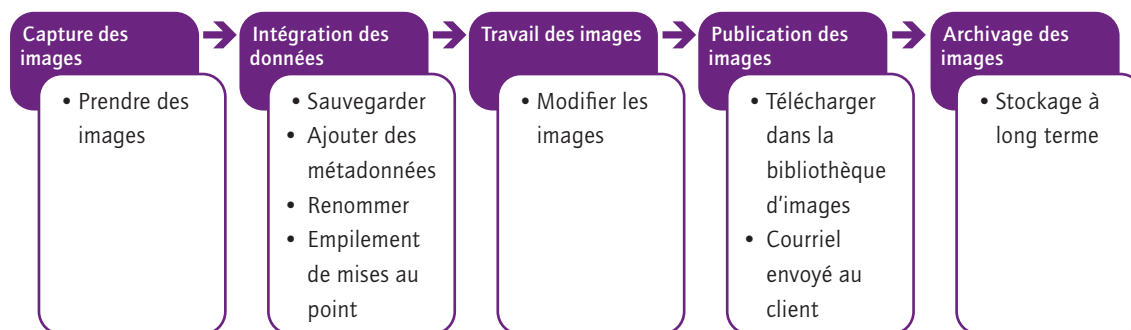
- une mise au point pour l'ensemble du sujet (en utilisant la technique des objectifs multiples)
- un niveau élevé de détail du sujet (images à haute résolution)
- une grande précision des couleurs (par l'utilisation d'échelles de gris et de couleurs)
- une grande précision de mesure (par l'intégration d'une barre d'échelle)
- des vues standardisées (dorsale, ventrale, latérale)
- un éclairage homogène
- une bonne exposition
- un fond monotone homogène, de préférence incolore.

6.3 Procédure de travail

La prise d'images de spécimens peut être complexe et prendre beaucoup de temps. Si vous avez l'intention d'entreprendre un travail d'illustration de nombreux spécimens, établissez une procédure de travail qui soit fonctionnelle et efficace. Un exemple de procédure de travail qu'il peut être utile d'adopter

est illustré à la Figure 20. Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe des renseignements plus détaillés sur la prise d'images de spécimens épinglés, humides et montés sur lames, en particulier pour les échantillons d'arthropodes, disponibles en ligne.

Figure 20 : Exemple d'une procédure de travail pour la prise d'images



7. Diagnostic à distance des organismes nuisibles aux végétaux

Introduction

A mesure que le commerce mondial et la circulation des personnes augmentent, les pays sont confrontés à des risques accrus d'incursions d'organismes nuisibles qui peuvent réduire la qualité et le rendement des productions agricoles et entraîner des restrictions à l'accès aux marchés. En même temps, il y a eu un déclin de l'expertise taxonomique et une concentration de spécialistes dans les centres-villes, loin des endroits où l'on trouve des organismes nuisibles et où l'on a le plus besoin des services d'experts taxonomistes. Comme ces facteurs contribuent à accroître le risque potentiel d'incursions des organismes nuisibles, nous devons trouver le moyen d'offrir des procédés d'identification des organismes nuisibles plus rapides, moins coûteux et de meilleure qualité. Les technologies mobiles et Internet apportent de nouvelles solutions à des problèmes similaires

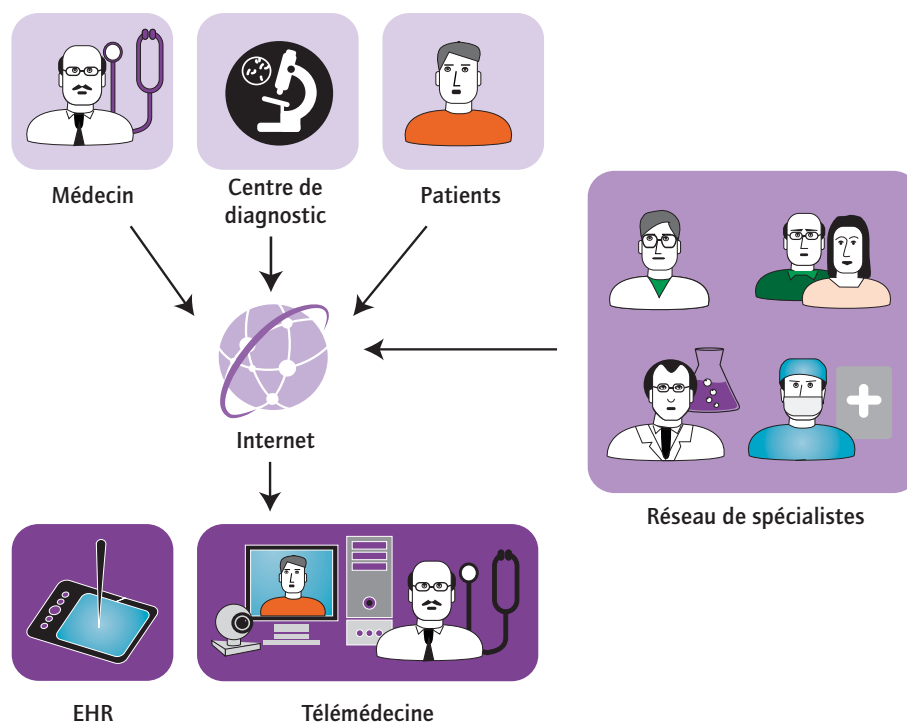
dans le monde entier et pourraient bien s'appliquer également aux problèmes des organismes nuisibles, mais elles nécessiteront une adaptation, un passage à de nouveaux procédés et une nouvelle manière de faire des diagnostics.

7.1 Qu'est-ce que le télédiagnostic et pourquoi en avons-nous besoin ?

Depuis quelques années maintenant, les médecins ont fait appel aux technologies de communication pour créer le concept de télémédecine (Figure 21), où les consultations des patients se font à distance. La télémédecine s'est avérée particulièrement utile pour les personnes vivant dans des communautés isolées ou des régions éloignées, où l'accès à des spécialistes ou aux conseils de ces spécialistes est limité.

Les contraintes de distance et d'expertise sont les mêmes pour le diagnostic des organismes nuisibles aux plantes, alors que nous sommes

Figure 21 : La télémédecine utilise Internet pour partager en temps réel l'information sur les patients.



confrontés à un déclin mondial à la fois de l'expertise taxonomique et du nombre de diagnosticiens des organismes nuisibles en général. De plus, nos spécialistes ont tendance à se concentrer dans les grands centres urbains, alors que la plupart des espèces nuisibles sont interceptées dans les zones rurales et éloignées, ou à une certaine distance du spécialiste le plus proche. Dans le même temps, la mondialisation a conduit à une augmentation du commerce international et de la circulation des personnes. L'augmentation de la circulation des biens et des personnes s'accompagne d'une augmentation de la probabilité de déplacement des organismes nuisibles. La demande de services de diagnostic augmente à mesure que les ressources humaines spécialisées diminuent et nous sommes donc contraints de trouver des solutions rapides, peu coûteuses et efficaces à ce problème.

Le télédiagnostic des organismes nuisibles aux végétaux s'apparente à la télémédecine en ce sens qu'il utilise Internet et d'autres technologies de communication pour partager des images d'un organisme nuisible ou des symptômes causés par des organismes nuisibles avec des spécialistes dans différents endroits. Une gamme d'outils et de dispositifs de communication numériques peuvent être utilisés pour partager des images et de l'information sur les organismes nuisibles. Le processus peut se dérouler en temps réel ou non et utiliser un logiciel pour capturer et stocker les informations qui sont partagées pendant

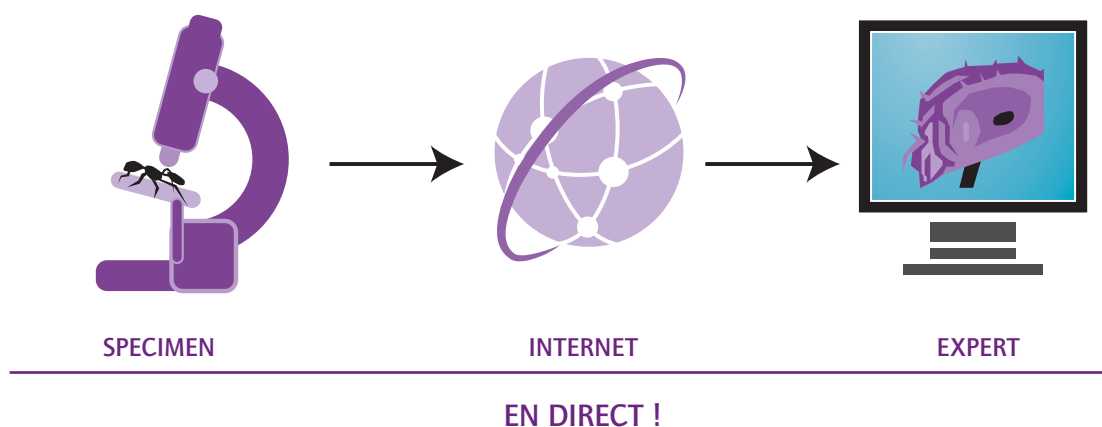
le processus, créant ainsi un enregistrement numérique permanent de l'organisme nuisible et de son identification. Les sections suivantes décrivent certains des systèmes utilisés pour l'identification à distance des organismes nuisibles.

7.1.1 Principes de base

Un laboratoire de diagnostic à distance typique comprend un microscope (à dissection ou composé), une caméra vidéo fixée au microscope et un ordinateur ou un serveur Internet avec une interface graphique. Les images capturées par la caméra vidéo peuvent être partagées en connectant l'ordinateur ou le serveur à Internet et en attribuant une adresse IP statique à cet emplacement. La connexion directe de la caméra à Internet permet à des personnes situées à d'autres endroits de visualiser les images de la caméra en temps réel sur leur ordinateur en utilisant leur navigateur Web pour localiser l'adresse IP de la caméra du microscope (Figure 22). La personne (située à l'emplacement de la caméra) qui partage l'image peut communiquer avec la personne qui regarde l'image (le spécialiste) en utilisant divers outils de communication.

La microscopie à distance s'est avérée efficace dans le monde réel. Des essais menés par l'Australian Quarantine and Inspection Service (AQIS) et le Ministry of Agriculture and Forestry Biosecurity de Nouvelle Zélande, qui ont testé l'efficacité de la microscopie à distance dans le cadre de la quarantaine végétale, et ont montré qu'en

Figure 22 : Un spécialiste peut accéder à l'image d'un organisme nuisible sur Internet à partir du matériel Nikon DS-L2 connecté à une caméra montée sur microscope.



Australie un diagnostic permettant de prendre des décisions réalistes en matière de biosécurité a été posé dans 77 % des cas (Thompson et al., 2011).

Plusieurs types de systèmes différents sont disponibles pour faciliter le partage d'images en direct sur Internet. Pour capturer les images du microscope vers un ordinateur, il faut un logiciel spécial de capture et partage d'image sur Internet. Ce logiciel comprend habituellement l'édition et l'archivage d'images et nécessite l'attribution d'une adresse IP statique à l'ordinateur utilisé. Le logiciel Olympus NetCam et le module Leica Network LAS sont des exemples de ce système.

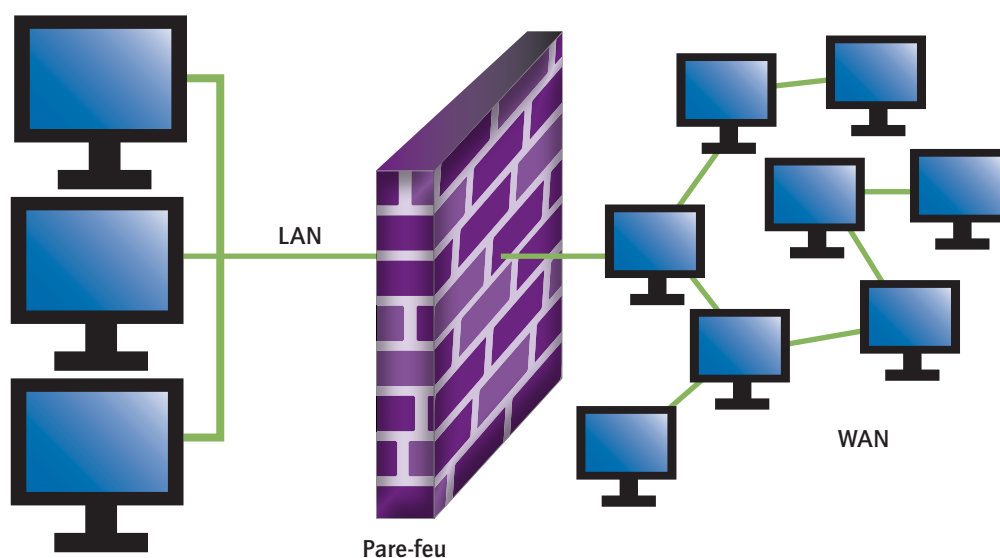
De son côté, Nikon propose les unités de contrôle des caméras de la série DS-L avec une interface graphique qui capture l'image du microscope et l'offre directement sur Internet sans aucun ordinateur, ni logiciel supplémentaire. L'unité DS-L possède son propre système d'exploitation unique grâce auquel l'utilisateur peut sélectionner ses propres paramètres IP. Il dispose également de sa propre suite d'édition d'images, d'outils d'annotation et de mise en valeur de l'image en direct, et les modèles actuels disposent d'un écran tactile pour une utilisation facile.

Dans les deux types de systèmes, le partage d'images peut être limité à un réseau local (LAN) ou être mis à la disposition d'un réseau étendu (WAN), comme Internet. Chaque type de réseau

nécessitera certains protocoles de sécurité qui seront déterminés par l'organisation, et le partage au sein de ces réseaux et entre eux exigera le respect des protocoles de sécurité pertinents. Par exemple, les entreprises créent souvent des couches de pare-feu pour limiter le flux de données au sein de leur réseau, par mesure de précaution contre la propagation de logiciels malveillants (ou « virus ») qui pourraient infecter le réseau. Ils créent également des pare-feu conçus pour protéger le réseau contre les attaques externes et donc limiter le flux de certains types d'accès et de données entrant sur leur réseau. Les réseaux peuvent occasionnellement limiter les données qui peuvent quitter le réseau local.

Pour partager des images d'un microscope situé dans un réseau local, les images doivent être capturées par un appareil dont l'adresse IP est accessible sur Internet. Pour contacter directement l'adresse IP de l'appareil, les personnes extérieures au réseau local doivent passer à travers le pare-feu de l'organisation. Sans protocole de sécurité, les utilisateurs externes auraient un accès direct au réseau interne. Les organisations qui souhaitent participer à un réseau externe de microscopes à distance doivent établir certains protocoles de sécurité par des pare-feu pour protéger leurs systèmes (Figure 23). Le type de sécurité requis dépendra du type de système matériel utilisé pour

Figure 23 : Protection par pare-feu pour les réseaux locaux (LAN)

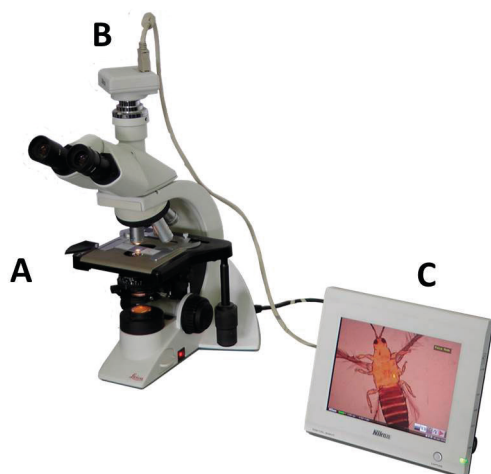


capturer les images de la caméra du microscope. Les systèmes informatisés comme Olympus Netcam et Leica Network LAS, qui utilisent des ordinateurs pour la capture d'images, sont plus sensibles aux failles de sécurité car les ordinateurs ont des systèmes d'exploitation communs (Windows, Linux, Apple/Mac OS) et un stockage sur disque dur qui est souvent connecté au LAN. Le système Nikon est moins sensible parce qu'il n'a pas de capacité de stockage de données et utilise un système d'exploitation Nikon très confidentiel ; par conséquent, il n'est pas sensible aux attaques et ne peut pas stocker les virus.

7.1.2 Matériel de visée numérique Nikon

Le système d'imagerie numérique Nikon se compose d'une caméra numérique sur microscope liée à une unité de commande autonome dédiée à la caméra (Figure 24).

Figure 24 : Appareil photo Fi-1 et console DS-L2 connectés.

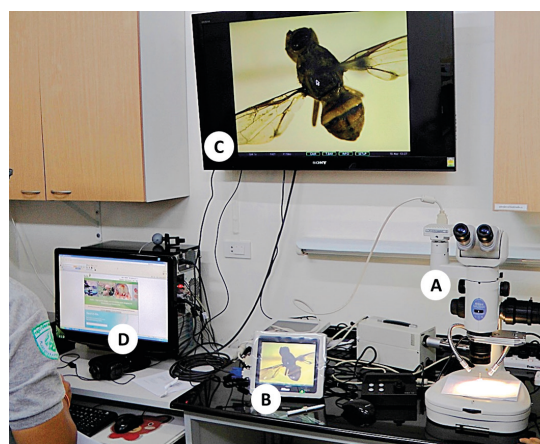


A, microscope ; B, appareil photo numérique Nikon (Fi-1) ; C, Unité de commande de l'appareil photo Nikon (DS-L2) qui se connecte à Internet.

L'unité de commande de la caméra possède son propre écran et son propre système d'exploitation, de sorte qu'aucun ordinateur supplémentaire n'est nécessaire. Il dispose d'une capacité réseau complète et peut être connecté à un réseau local ou à Internet. Le navigateur Web est disponible pour la visualisation d'images en direct et la connexion via les protocoles standards de communication Internet

et de transfert de fichiers (HTTP, telnet, FTP) et est DHCP compatible pour l'attribution des adresses IP. L'appareil peut également être connecté à un ordinateur ou à grand écran externe et peut capturer des images sur une clé USB. Un ensemble complet de menus est disponible pour la prise d'images, la mesure et l'annotation d'images. Un exemple d'installation en Thaïlande d'une telle unité est illustré à la Figure 25.

Figure 25 : Installation du matériel Nikon pour la microscopie à distance au Laboratoire de quarantaine des plantes à Bangkok, Thaïlande

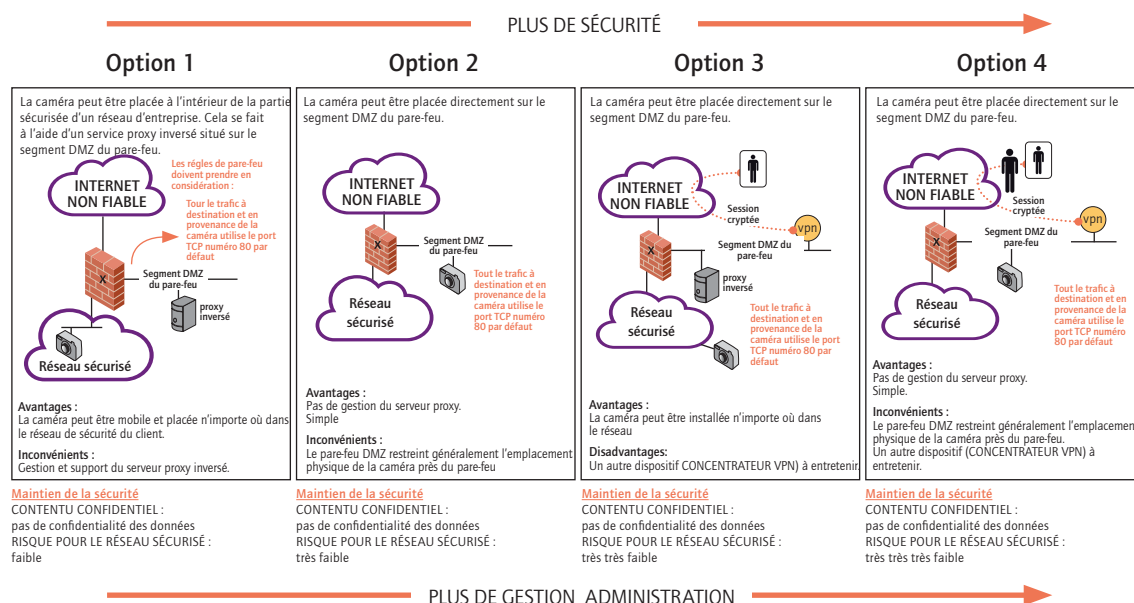


A, appareil photo numérique Nikon ; B, DS-L2 Unité de commande de l'appareil photo ; C, Moniteur étendu pour l'unité de commande de l'appareil photo et D, PC utilisé pour accéder aux informations taxonomiques sur Internet, communiquer avec les utilisateurs distants et accéder à l'image partagée par Internet ou sur le LAN.

7.1.2.1 Accès Internet et configuration avec Nikon DS-L

Les consoles de la série Nikon DS-L contiennent un serveur Web qui prend en charge un site Web permettant d'accéder à l'appareil photo. Une adresse IP fixe est nécessaire pour connecter la caméra à Internet. Le serveur DS-L est généralement situé à l'intérieur du pare-feu d'un réseau, de sorte que toute personne souhaitant accéder aux images de la caméra doit passer par tous les pare-feu de l'organisation pour accéder au serveur. Au premier abord, cela peut sembler un risque de sécurité car il faut ouvrir un port dans le pare-feu pour permettre l'accès à la console DS-L, mais, comme mentionné ci-dessus, il y a une capacité limitée pour les personnes extérieures

Figure 26 : Options de sécurité informatique pour l'installation d'une caméra microscopique dans un réseau local afin de fournir un accès Internet externe.



d'accéder au LAN via la console. Si une personne non autorisée se connectait à la console DS-L, elle ne pourrait voir que l'image de la caméra du microscope (puisque cet équipement n'est connecté que lorsqu'il est nécessaire d'identifier un ravageur à distance, il y a peu de possibilités de pirater le système). Bien que la console ne pose pas de risque élevé pour la sécurité du réseau local, des mesures supplémentaires peuvent être mises en place pour isoler la console du réseau de l'organisation. Certaines stratégies qui peuvent être utilisées pour éliminer complètement la menace comprennent l'utilisation d'un proxy inverse ou d'une DMZ pour isoler la console DS-L du réseau (Figure 26).

7.2 Méthodes de communication pour la microscopie à distance en temps réel

7.2.1 Téléphone vocal standard

Lors du partage de l'image d'un échantillon avec un spécialiste, les parties concernées doivent communiquer entre elles pour discuter de l'échantillon et transmettre les instructions. Par exemple, le spécialiste peut avoir besoin de voir les caractéristiques clés de l'échantillon afin de finaliser une identification et doit donc enseigner au non-spécialiste comment manipuler l'échantillon sous le microscope durant ce processus. Comme le

spécialiste peut voir l'échantillon en temps réel, la communication doit être relativement fluide.

Un simple appel téléphonique suffit souvent pour la plupart des identifications à distance et, qu'il soit fixe ou mobile, le téléphone est peut-être l'outil de communication disponible le plus courant. Quoi qu'il en soit, les outils de communication peuvent être limités dans de nombreux endroits et d'autres options peuvent ne pas être disponibles.

7.2.2 Système de visioconférence

La vidéoconférence peut accroître les interactions entre ceux qui cherchent à réaliser des identifications et ceux qui les fournissent. Par exemple, dans le cas des visioconférences, plusieurs spécialistes situés à différents endroits pourraient participer simultanément à une identification à distance. Les services Internet tels que Skype, Google Hangouts, Apple FaceTime et d'autres sont facilement disponibles et accessibles à un public mondial (figures 27 et 28). Ces applications, qui disposent d'installations d'enregistrement et de chat, peuvent conserver un enregistrement de la discussion qui accompagne chaque identification à distance.

7.2.3 Le logiciel de "tableau blanc" en ligne

Les "tableaux blancs électroniques" peuvent être utilisés pour augmenter le partage d'informations et dans l'enseignement. Ils permettent l'annotation

Figure 27 : Un non-spécialiste thaïlandais utilise un appel vidéo Skype pour discuter d'un spécimen avec des spécialistes au Vietnam.



L'image de l'échantillon est partagée avec le Vietnam sur Internet via le Nikon DS-L2.

en temps réel d'une image avec la possibilité pour toutes les parties de contribuer à la discussion, indépendamment de leur emplacement. A tout moment de la discussion, l'image et les commentaires peuvent être sauvegardés pour consultation ultérieure. Les systèmes de tableaux blancs peuvent être simples ou élaborés. Le programme de tableau blanc de Microsoft Messenger, fourni gratuitement avec Windows, est simple, peut être appris rapidement et répond aux besoins élémentaires.

7.2.4 Autres méthodes de capture et de partage d'images en direct

Les systèmes de prise d'images connectés sur le Web, comme ceux dont il a été question plus haut, sont relativement coûteux et, bien qu'ils produisent des images de la meilleure qualité et offrent une série de fonctions supplémentaires pour la manipulation des images, il existe des moyens plus simples et moins coûteux de partager des images en direct. A condition que les images en direct (flux vidéo) puissent être capturées sur un PC, n'importe quel programme qui permet le partage de bureau peut être utilisé pour partager les images avec d'autres PC dans différents endroits via Internet. Ces programmes comprennent Windows Remote Desktop, Skype, Ustream, Google Hangouts, Web-conférence et d'autres programmes qui sont disponibles gratuitement. L'un des inconvénients de cette méthode est que la qualité de l'image peut être compromise au point que les

Figure 28 : Les échantillons sous microscope USB peuvent être partagés avec un expert via un logiciel vidéo. Dans ce cas, la conversation entre le laboratoire et l'expert se fait par téléphone.



Skype peut également être utilisé pour la vidéo et la voix.

détails essentiels à l'identification sont perdus. Cela s'explique par le fait que beaucoup de ces types de programmes appliquent leurs propres conditions de traitement d'image, ce qui peut considérablement réduire la qualité. En revanche, les systèmes qui permettent un accès direct à l'image de l'échantillon ne perdent que peu ou pas de qualité.

Dans de nombreux cas, la perte de qualité ne constitue pas un obstacle trop important à l'identification. Tout dépend de la nature du spécimen et du niveau de détail requis. Lorsque les ressources sont limitées, cette approche peut être considérée comme une option. Un équipement de capture d'images peu coûteux, comme les microscopes USB, peut être facilement utilisé dans cette situation (Figure 29).

Notez, cependant, que les organisations peuvent imposer des restrictions de sécurité sur l'utilisation d'outils de partage Web similaires à ceux décrits ci-dessus.

7.3 Processus de diagnostic à distance pour l'éducation et la formation

La possibilité de partager des images microscopiques en direct avec des utilisateurs d'Internet présents sur plusieurs sites offre une opportunité idéale pour former des personnes à distance. En partageant des images microscopiques sur Internet, les spécialistes et les taxonomistes peuvent démontrer

comment identifier les espèces de ravageurs ou distinguer les symptômes ou les caractéristiques d'un organisme nuisible particulier. D'autres dispositifs de communication peuvent être utilisés pour fournir un environnement de vidéoconférence où il peut y avoir des discussions, des tableaux blancs, du chat, de la documentation, des images, des vidéos et du son. Ces documents constituent un dossier durable de la formation, auquel le participant peut avoir accès pour consultation ultérieure. Le résultat est un apprentissage interactif bon marché et efficace, où les participants peuvent prouver leurs compétences en accédant à un spécialiste dans le confort de leur propre bureau.

7.3.1 Diagnostic à distance sur le terrain

Dans de nombreux cas, les images permettent d'identifier les organismes nuisibles ou les problèmes posés par ces organismes. Le développement d'ordinateurs de poche, de microscopes USB, de caméras sur téléphones, d'un vaste réseau mobile sans fil et à haut débit rend désormais possible la capture d'images à fort grossissement et à haute résolution à partir de presque n'importe quel endroit, et leur partage sur Internet ou via les réseaux téléphoniques. Ces technologies permettent de rationaliser le processus de diagnostic des organismes nuisibles afin que les images d'un organisme ou de ses symptômes puissent être partagées avec des spécialistes directement sur le terrain à l'aide de dispositifs mobiles. L'identification

au niveau de l'espèce n'est pas toujours nécessaire pour prendre une décision de gestion. Au lieu de cela, une application plus rapide des stratégies de lutte antiparasitaire peut s'avérer plus importante que de retarder l'identification à partir d'un spécimen. Tous les diagnostics ne peuvent pas être effectués de cette façon, mais une proportion importante des problèmes d'organismes nuisibles pourrait être résolus rapidement et efficacement si le personnel de terrain pouvait partager et communiquer avec les spécialistes via des appareils mobiles.

7.3.1.1 Matériel pour appareils mobiles

Une gamme d'objectifs macro et de microscopes sans fil est désormais disponible pour les appareils mobiles offrant un grossissement de x4 à x200 sur le terrain (voir, par exemple, <http://www.photojojo.com> et <http://www.chinavasion.com>). Ces dispositifs sont bon marché et peuvent être mobilisés auprès d'un large groupe d'utilisateurs sur le terrain, où des images de haute qualité des organismes nuisibles peuvent être capturées et partagées avec des réseaux de personnes qui peuvent collectivement commenter ou offrir une identification. Ces dispositifs, ainsi que le phénomène du crowdsourcing de l'information et du réseautage social, peuvent considérablement renforcer la capacité individuelle et collective d'identifier les organismes nuisibles d'une manière rapide et efficace (figure 30). Sur le terrain, cela signifie que les décisions en matière de lutte

Figure 29 : Gauche : Un microscope USB capture des images sur un PC à un point d'inspection frontalier qui peuvent être partagées avec des spécialistes distants via des outils de collaboration Web tels que Skype. Centre : Un microscope USB à grossissement x 20 - x 200. Droite : Un agent de l'inspection frontalière examine les organismes nuisibles et capture des images à l'aide d'un microscope USB.



antiparasitaire peuvent être prises plus rapidement et, lorsque de grands réseaux sont impliqués dans le processus, les renseignements sur les organismes nuisibles sont largement diffusés. De plus, cette approche collective de résolution de problèmes signifie que les membres les plus expérimentés d'un réseau partagent leurs connaissances avec des membres moins expérimentés, ce qui améliore le niveau de compétences de tous les membres du groupe.

7.3.2 Réseaux virtuels pour le diagnostic à distance

Le crowdsourcing est devenu un phénomène puissant pour le partage et le développement des connaissances dans l'espace numérique. De nombreux sites Web sont conçus pour cibler et connecter les gens de nombreuses façons différentes et peuvent fournir un large éventail de choix pour les utilisateurs engagés dans des activités de crowdsourcing. Les réseaux sociaux et les sites Web de partage peuvent permettre aux gens de partager de l'information à l'échelle mondiale avec des personnes connues et inconnues ou permettre aux utilisateurs de communiquer avec des individus ou des groupes privés spécifiques.

Sermo est une communauté en ligne de médecins comptant plus de 200.000 membres

qui peuvent choisir de partager des informations cliniques afin d'aider au diagnostic et d'enrichir les connaissances médicales. Des réseaux en ligne similaires pourraient être utilisés pour partager l'information sur les organismes nuisibles afin de les identifier et de recommander les stratégies de gestion (figure 31). Les sites Web et les logiciels existants peuvent servir de base à de tels réseaux où les agriculteurs, les consultants, les agronomes et les spécialistes de la vulgarisation peuvent partager des informations de diagnostic et rendre collectives les décisions relatives à la lutte antiparasitaire. Les réseaux virtuels peuvent être locaux, en commençant par les relations existantes entre pairs et en s'étendant à des réseaux régionaux, nationaux et même internationaux et en puisant dans un pool croissant d'expertise.

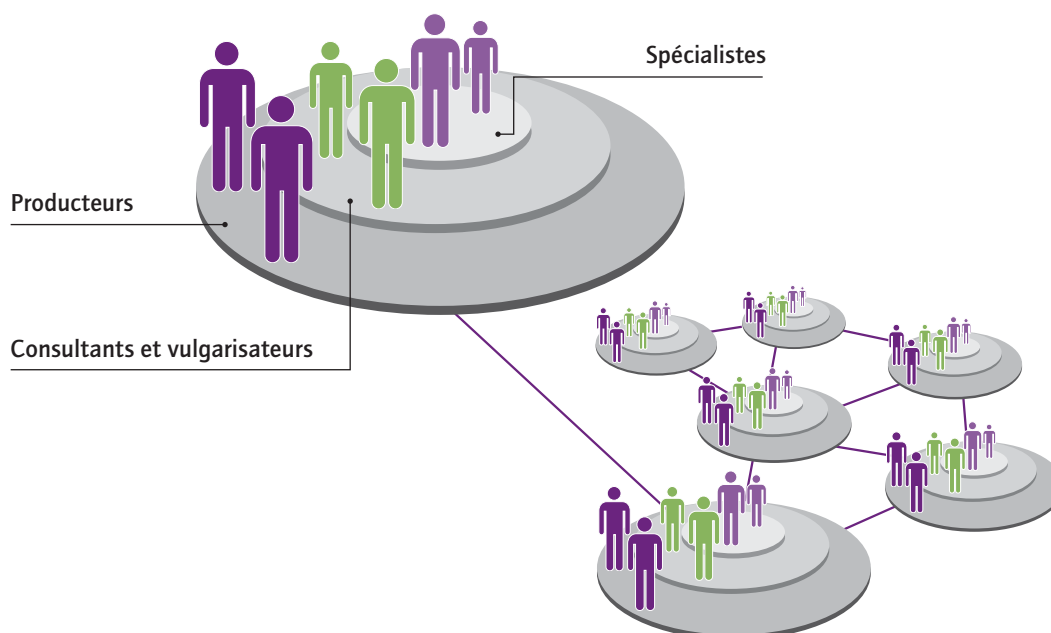
7.3.2.1 Logiciel pour appareils mobiles

L'explosion du nombre de propriétaires de téléphones mobiles et l'élargissement de la couverture des services ont ouvert la voie à la communication de masse et au partage de l'information. L'efficacité des téléphones mobiles pour le diagnostic à distance peut être améliorée par l'utilisation d'un logiciel qui non seulement facilite le processus de communication, mais qui enregistre et stocke également les données. Le courrier électronique est souvent utilisé pour part-

Figure 30 : Centre : Diverses pièces jointes simples permettent aux téléphones mobiles de capturer des images fortement agrandies d'organismes nuisibles, qui peuvent être partagées et discutées avec les communautés via des réseaux dans le cloud. Ces communautés peuvent inclure des ONPV locales ou régionales. De chaque côté, des images prises avec le microscope sans fil Hot Electronics et le téléphone portable. Du côté gauche, des images de la maladie des Taches Brunes du papayer. Du côté droit, des images qui montrent la gamme d'agrandissements obtenus avec un microscope sans fil.



Figure 31 : Un exemple de réseau de producteurs, de consultants, d'agents de vulgarisation et de spécialistes



ager de l'information sur les organismes nuisibles ; cependant, le simple partage d'images d'organismes nuisibles via les services de courrier électronique limite l'interaction à un groupe particulier et ne permet pas de sauvegarder, stocker et partager l'information avec un groupe plus large. De plus, comme les interactions par courriel sont dispersées et qu'il n'y a pas de connexion, il n'est pas facile d'agrégier les données à des fins de consultation future. Il est donc souhaitable d'utiliser des sites Web ou des logiciels qui peuvent partager et stocker des informations sur les organismes nuisibles dans un environnement réseau (Figure 32). L'information sur l'incidence des ravageurs qui est stockée et regroupée peut fournir des renseignements précieux sur l'incidence et la distribution spatiale et temporelle des ravageurs. Cette information peut ensuite être utilisée pour les décisions de lutte antiparasitaire, les alertes, les déclarations de zones indemnes, l'élaboration de stratégies de recherche et de développement (R&D) et l'établissement de listes d'organismes nuisibles.

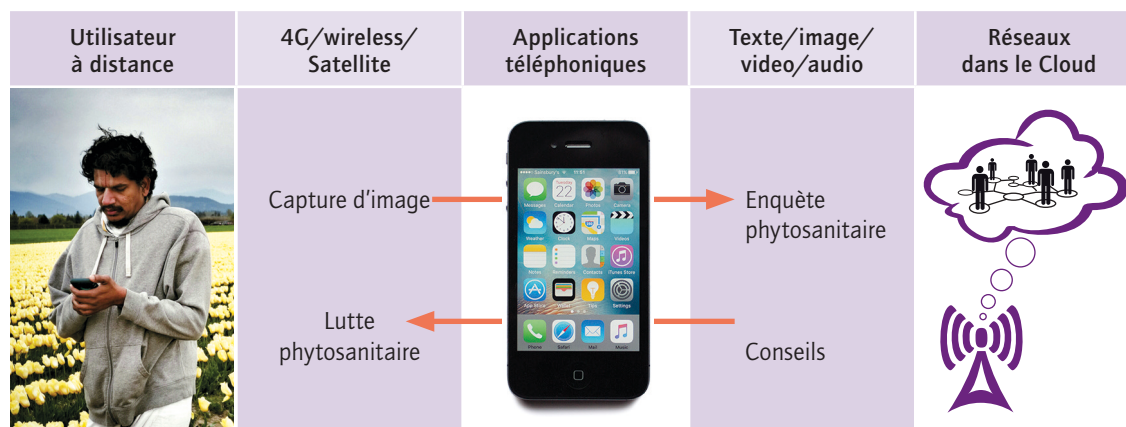
Bien qu'il existe de nombreuses applications mobiles pour s'engager dans les médias sociaux, il existe peu de sites conçus spécifiquement pour les

biologistes et qui peuvent sauvegarder et organiser les données. Les programmes ont tendance à s'orienter soit vers les médias sociaux, soit vers la gestion de données, mais pas les deux. Par conséquent, plusieurs applications devraient être utilisées pour réaliser à la fois le partage de groupe et le stockage des données. Cependant, Pestpoint (<http://www.Pestpoint.org.au>) est un logiciel qui permet aux utilisateurs de créer des réseaux virtuels privés à des fins de partage, et qui capture et stocke les informations sur les organismes nuisibles. Il fonctionne à la fois à partir de la plate-forme Web et de la plate-forme mobile.

7.4 Conclusions

Toutes les identifications d'organismes nuisibles ne peuvent pas être effectuées à distance. Certains sont tout simplement trop difficiles à déterminer à distance et nécessiteront l'examen d'un échantillon. L'identification des insectes à partir d'images sera certainement plus facile que l'identification des maladies des plantes. Néanmoins, nous devrions au moins essayer de résoudre chaque problème d'organisme nuisible de cette manière, si cela signifie

Figure 32 : Diagnostic à distance sur le terrain où des images ou des vidéos des organismes nuisibles sont capturées sur un appareil mobile et partagées sur Internet avec un réseau de personnes qui peuvent être en mesure d'offrir une identification, des conseils de gestion ou les deux.



que certains de ceux-ci peuvent être contrôlés plus rapidement. La création d'un système de diagnostic à distance qui comprend des réseaux et la saisie de données présente de multiples avantages pour l'ensemble du système phytosanitaire, notamment l'acquisition de connaissances par la saisie et le stockage de l'information sur les organismes nuisibles dans l'espace et le temps, l'amélioration des capacités à mesure que les gens moins expérimentés tirent profit des interactions avec des gens plus expérimentés grâce à leurs réseaux et une meilleure connaissance des ravageurs grâce aux tendances dans leur répartition et leur incidence.

8. Collections de référence

Introduction

Une collection de référence à des fins phytosanitaires peut contenir les types de spécimens suivants :

- champignons
- arthropodes
- gastéropodes
- nématodes
- plantes envahissantes
- plantes parasitaires
- parties des plantes infectées par des agents pathogènes et des ravageurs.

Une collection de référence est essentielle à des fins phytosanitaires car elle :

- appuie les décisions en matière de quarantaine et d'intervention
- permet de vérifier les registres d'agents pathogènes et des ravageurs d'un pays pour résoudre les différends commerciaux
- permet de revoir les registres des pathogènes et des ravageurs à mesure que les méthodes de diagnostic s'améliorent et en tenant compte de la révision continue de la taxonomie des organismes; pendant la révision taxonomique, une espèce peut être révisée et divisée en plusieurs espèces différentes ou combinée à d'autres espèces.

Une bonne collection de référence devrait avoir :

- des spécimens bien conservés, conservant des caractères clairs pour le diagnostic et permettant l'analyse (p. ex. via des tests moléculaires) à l'avenir
- des mesures efficaces pour prévenir l'infestation de ravageurs et les dommages causés par l'humidité sur les spécimens
- des étiquettes qui contiennent les détails de la collecte
- une base de données pour extraire efficacement les données.

8.1 Exigences générales

8.1.1 Bâtiment

Les exigences structurelles du bâtiment pour une collection de référence sont les suivantes :

- une salle spécialement dédiée, avec un minimum de vibrations : on peut envisager une structure parasismique, pas de voie de circulation et pas de visiteurs non-accompagnés
- la pièce doit avoir suffisamment d'espace pour ranger les spécimens de référence et un espace de travail pour le conservateur
- un sol et des murs massifs sans joints dans la menuiserie pour éviter l'infestation par des parasites
- de grandes paillasses de travail pour le traitement des échantillons, l'examen microscopique et la maintenance des cultures
- un système de rangement qui peut prendre la forme de boîtes, de tiroirs, d'armoires, d'étagères ou de placards (remarque : certains systèmes de classement mobiles sont plus coûteux, mais permettent de gagner beaucoup d'espace)
- des points de téléphonie et de réseau placés dans des positions pratiques
- pas de robinet d'eau dans la collection pour éviter les dommages causés par l'humidité.

Les spécimens vivants ne devraient pas être manipulés dans la même pièce que les collections de référence afin de minimiser les perturbations et d'éviter l'infestation par des parasites tels que les acariens, les cloportes et les coléoptères.

8.1.2 Environnement contrôlé

Les spécimens de référence sont fragiles et vulnérables aux ravageurs, aux moisissures et aux champignons. Les points suivants vous aideront à éviter d'endommager la collection :

- Les climatiseurs et les déshumidificateurs sont essentiels dans les régions au climat chaud et humide. Le coût de fonctionnement de

ces appareils peut être important ; il est donc conseillé d'intégrer ce coût dans le budget financier.

- Il est recommandé de maintenir la température à 18-19 °C et l'humidité relative à moins de 50 pour cent afin de prévenir les dommages causés par l'humidité, la croissance fongique et la reproduction des poux de bibliothèque et des coléoptères qui peuvent endommager les spécimens.
- Les spécimens se conservent plus longtemps dans l'obscurité. Il ne devrait pas y avoir de fenêtres ou de puits de lumière dans la pièce et les lumières devraient rester éteintes lorsque la pièce n'est pas utilisée.
- Pour lutter contre les ravageurs, il est recommandé d'utiliser des contenants étanches à l'air pour les spécimens, d'utiliser des produits antiparasitaires (p. ex. des blocs de camphre, des pièges collants à naphthalène, de la colle Tanglefoot), de procéder à la fumigation ou d'appliquer un insecticide si nécessaire, de boucher les trous dans la menuiserie ; de congeler régulièrement (tous les 1 à 2 ans) tous les spécimens des herbiers, entrant ou sortant, à -20 °C pendant 48 h.
- Séparer la collection de référence de l'espace de travail utilisé pour manipuler le matériel végétal vivant.

8.1.3 Sûreté et sécurité

Les collections de référence contiennent des ressources précieuses qui sont importantes pour les décisions de mise en quarantaine et d'intervention, et qui peuvent faciliter le commerce. Par conséquent, les collections devraient être conservées à un niveau de sécurité raisonnable. En outre, des mesures de sécurité devraient être mises en œuvre pour protéger le personnel travaillant dans les collections.

Certaines mesures de sécurité et de sûreté sont requises comme :

- une salle dédiée, séparant les collections de l'espace bureau et des autres espaces
- une pièce fermant à clé ou une pièce dans un bâtiment à accès restreint
- un système d'alarme pour la protection après les heures d'ouverture

- un téléphone pour permettre les appels d'urgence
- du point de vue de la protection contre le feu :
 - couverture anti-feu, extincteur, gaz inerte
 - ne pas utiliser de flammes nues
 - ne pas laissez les appareils électriques, en particulier les appareils de chauffage, allumés sans surveillance
 - entretenir le câblage électrique
- la prise en compte des catastrophes naturelles, par exemple les tremblements de terre, les tsunamis, les inondations, les tempêtes et les incendies de forêt
- ne pas manger dans la salle de collection de référence
- pas de visiteurs non accompagnés
- porter des chaussures couvertes
- attacher les cheveux longs
- un accès réservé au personnel formé
- les produits chimiques et l'équipement doivent être manipulés par un personnel qualifié.

Certains des produits chimiques et réactifs utilisés dans la préparation des échantillons de référence sont nocifs. Les mesures suivantes devraient être envisagées :

- Les fiches signalétiques (FS) et toute documentation fournie sur le produit doivent être vérifiées afin de bien comprendre les dangers associés au contenu du produit chimique, du réactif ou de la trousse (p. ex. les exigences d'entreposage et de manutention). Des copies papier des fiches signalétiques de chaque produit chimique conservé au laboratoire devraient être facilement accessibles.
- Les quantités de substances dangereuses dans le laboratoire doivent être réduites au minimum, en fonction des besoins et de la durée de conservation. Une signalisation appropriée devrait être installée lors de l'entreposage de ces substances.
- Le personnel doit s'assurer que l'aire de travail est sécurisée en localisant les extincteurs, la trousse de premiers soins la plus proche et tout équipement de sécurité requis.
- Des vêtements et de l'équipement de protection individuelle appropriés devraient être utilisés

conformément aux recommandations de la fiche signalétique, p. ex. blouse de laboratoire, gants, lunettes de sécurité, lunettes de protection, écrans faciaux, masques.

- Les exigences légales du pays pour la conservation des produits chimiques et des réactifs doivent être vérifiées.
- Les produits chimiques et les réactifs doivent être éliminés de manière appropriée ; consultez les autorités locales.

8.1.4 Exigence de confinement

Certains pays exigent que les spécimens des herbiers provenant des produits interceptés et présentant un risque important pour la biosécurité soient conservés à l'abri dans une installation de confinement. Consultez les autorités locales pour confirmer le niveau de confinement requis.

Le matériel végétal infecté par des ravageurs ou des maladies exotiques et tout consommable contaminé (p. ex. lingettes, sacs en plastique, gants) doivent être éliminés de façon appropriée. Consultez les autorités locales.

8.1.5 Système de rangement

Les échantillons doivent être conservés par ordre alphabétique de l'agent pathogène ou de l'hôte, ou par numéro d'inventaire.

Une base de données devrait être créée pour permettre la saisie efficace des nouveaux enregistrements et des nouvelles informations, ainsi que l'extraction des données à l'aide de fonctions de recherche et de filtrage des données. Une base de données peut aller d'une simple feuille de calcul Excel à des programmes spécialement conçus pour les herbiers. Il n'est pas recommandé de conserver les enregistrements uniquement dans un registre, car il est difficile de mettre à jour et d'extraire les données.

8.1.6 Système de rangement

Il est important d'avoir du personnel chargé de s'occuper et de superviser la garde et le contrôle des collections de référence.

La collection de référence doit être régulièrement entretenue en :

- surveillant la température, l'humidité, le seau d'eau du déshumidificateur, les alarmes

de sécurité et d'incendie, les mesures antiparasitaires qui peuvent être en place

- vérifiant que les préparations permanentes ne sèchent pas et que les étiquettes ne s'estompent pas
- procédant à la mise à jour de la base de données avec les changements de nom et l'ajout des nouvelles informations disponibles.

Si le récipient scellé d'un spécimen séché d'un herbier a été ouvert, il est nécessaire de reprendre le processus de séchage avant de le sceller et de remettre le spécimen dans la collection.

Si des tissus végétaux infectés préservés ont été donnés ou échangés, il est nécessaire de réinoculer les agents pathogènes sur des plantes herbacées (dans la mesure du possible) ou sur des spécimens greffés et de préserver certains tissus végétaux nouvellement infectés pour reconstituer le stock.

Certains agents pathogènes peuvent perdre leur potentiel infectieux avec le temps ; il peut être nécessaire de tester les plantes inoculées ou greffées par sérologie ou techniques moléculaires pour vérifier si la transmission a réussi (par exemple en cas de transmission latente).

8.1.7 Amélioration

Les collections de référence peuvent accroître leur valeur en :

- échangeant des spécimens avec d'autres collections de référence pour obtenir de nouveaux spécimens de référence
- invitant des experts à réexaminer les spécimens
- en générant un code-barres ADN à partir d'échantillons
- en conservant des extractions d'acides nucléiques dans des congélateurs (-80°C est recommandé)
- en mettant en place une collection de référence virtuelle.

Note : La numérisation des détails de la collecte, des données sur les séquences d'ADN et des images de spécimens dans un système de gestion des données permet une extraction, une analyse et un compte rendu efficaces des données, ce qui, à son tour, peut faciliter des décisions rapides en matière de biosécurité.

8.2 Collection entomologique de référence

8.2.1 Spécimens de référence (pièce justificative et physique)

Les collections entomologiques de référence comprennent tous les invertébrés terrestres, ainsi que les nématodes, les vers, les escargots et les limaces.

8.2.1.1 Critères de sélection des échantillons à conserver (ce qu'il faut conserver)

Les restrictions d'espace sont le facteur limitatif global qui détermine le nombre d'échantillons qu'il est possible d'entreposer ; tous les échantillons ne peuvent pas être conservés pour être inclus dans la collection. En guise de guide, laissez de la place pour environ dix spécimens de la même espèce, bien que cela puisse varier en fonction de la taille et de l'importance des spécimens.

Les critères pour la conservation des échantillons entomologiques sont les suivants :

- la faune locale, les espèces indigènes ou endémiques, les ravageurs communs des cultures locales, les ravageurs interceptés et les espèces nouvellement établies
- des spécimens mâles et femelles de chaque espèce, si possible
- la répartition : des spécimens de chaque espèce provenant de différents pays
- la localité : des spécimens de chaque espèce provenant de différentes localités ou régions du pays d'origine
- la variation : les variations intraspécifiques de couleur, de motif, de marquage, de taille, etc.
- de nouvelles espèces ajoutées à la collection
- des spécimens qui sont en meilleur état que ceux qui font déjà partie de la collection
- des spécimens prélevés sur un nouvel hôte (on parle de nouvel hôte quand l'insecte a été élevé sur ou à partir de cet hôte, et non pas seulement parce qu'il est présent sur celui-ci)
- des spécimens conservés pour des raisons d'enquête.

8.2.2 Équipement et fournitures

8.2.2.1 Équipement pour procéder

- un microscope
- une étuve de séchage
- une plaque de cuisson ou un four à micro-ondes
- une étiquette pour four de cuisson
- un congélateur
- un frigo
- une loupe ou lampe grossissante.

8.2.2.2 Consommables et autres éléments

- des pinces, fines et ultra-fines, inoxydables
- des épingles entomologiques (en acier inoxydable uniquement) provenant d'un fournisseur pour l'entomologie (tailles 0, 3, 5)
- des épingles fines pour montages doubles
- des blocs de préparation (Figure 33)
- des pièces de carton coupées et conçues pour étaler les acariens et les petits insectes (Figure 33)
- des couvre-objets (16 mm et 13 mm de diamètre circulaire)
- des lames de microscope (25 mm x 75 mm x 1 mm)
- des planches d'étalement (différentes tailles)
- des panneaux en mousse de polyéthylène à cellules fermées
- des flacons pour genitalia (microflacons)
- du papier pour étiquettes, des stylos ou crayons (pour une écriture à l'épreuve de l'éthanol)
- des étiquettes pour les échantillons
- de la colle de montage (cardage) pour insectes
- une paire de ciseaux
- des flacons de verre de différentes tailles (figure 33)
 - p.ex. 50 12 mm
 - p.ex. 75 25 mm
- des verres de montre pour réaliser les colorations, avec des couvercles en verre (Figure 33).

8.2.2.3 Produits chimiques et solutions

La liste des produits chimiques de laboratoire nécessaires à la fabrication des milieux et à la préparation des spécimens est la suivante :

- Baume du Canada (puisque ce baume est dilué avec du xylène, l'Euparal est préféré)
- camphre
- hydrate de chloral

- huile de clou de girofle
- eau distillée
- colle de cardage entomologique
- éthanol (96 %) dilué à 70 % (remarque : comme l'éthanol pur est souvent difficile à obtenir, certains conservateurs utilisent l'isopropanol (alcool isopropylique))
- acétate d'éthyle
- Euparal
- poudre de fuchsine acide
- acide acétique glacial
- glycérol, glycérine
- gomme arabique
- Histoclear (une essence d'orange utilisée comme agent éclaircissant pour l'Euparal)
- eau de Javel domestique (solution d'hypochlorite de sodium à 5 %)
- acide chlorhydrique (10 %)
- acide lactique (85 %)
- phénol
- KOH (10 %).

Certains produits chimiques utilisés dans la préparation des insectes en vue de leur identification sont extrêmement toxiques ou inflammables. Le plus grand soin doit être pris lors de leur utilisation, de préférence sous une hotte, sur une station de tirage vers le bas ou, au minimum, dans un endroit très bien ventilé. Il est également important de porter un équipement de protection individuelle, comme des gants et une blouse de laboratoire. Certains produits chimiques ne doivent pas être entreposés ensemble et nécessitent des armoires spéciales pour des raisons de sécurité (voir tableau 2).

Figure 33 : Petit équipement nécessaire en routine pour le montage.



8.2.2.4 Les milieux

Cette section donne une liste de milieux et leurs recettes pour différents ordres d'insectes.

Fluide d'Essig/Wilkey

Acide lactique (85%)	100 ml
Phénol (solution aqueuse saturée) ¹	10 ml
Acide acétique glacial	20 ml
Eau distillée	5 ml

¹ Avertissement de sécurité : les vapeurs émises par le phénol sont cancérigènes, il doit donc être utilisé sous hotte.

Support de montage Hoyer

Eau distillée	50 ml
Hydrate de chloral	200 g
Gomme arabique (cristaux clairs)	30 g
Glycérine	20 g

Dissoudre la gomme arabique dans de l'eau distillée à température ambiante.

Ajouter l'hydrate de chloral et laisser reposer un jour ou deux jusqu'à dissolution.

Ajouter la glycérine et filtrer à travers la laine de verre.

Solution de coloration

Fuchsine acide	0,5 g (10%)
Acide chlorhydrique	25 ml
Eau distillée	300 ml

8.2.3 Traitement des échantillons en vue de leur conservation

Cette section comprend un aperçu des meilleures méthodes de conservation pour chaque type d'organisme (p. ex. l'éthanol, la préparation de lames sèches ou une combinaison des deux). Pour des renseignements détaillés sur la préservation des insectes, voir CSIRO. *Simple methods of preserving insects and their allies*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Disponible à : <http://www.ento.csiro.au/education/preserving.html> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Tableau 2 : Produits chimiques et évaluation de leurs dangers

Chimique	Classe de danger
Baume du Canada	Inflammable, irritation grave des yeux, irritation de la peau, toxique pour les organismes aquatiques
Hydrate de chloral	Irritant pour la peau et les yeux
Huile de clou de girofle	Toxique, irritant pour la peau
Acétate d'éthyle	Facilement inflammable, irritation grave des yeux, lésions aux organes par contact avec la peau.
Euparal	Cause une irritation cutanée, peut causer des symptômes d'allergie ou d'asthme ou des difficultés respiratoires en cas d'inhalation, peut causer une réaction allergique cutanée, peut causer une irritation respiratoire, cause de graves lésions oculaires.
Fuchsine acide en poudre	On estime que le statut de danger est irritant pour la peau et les yeux. Ne pas inhaler ou ingérer
Acide acétique glacial	Liquide inflammable, toxique, toxicité systémique, corrosif pour les métaux, corrosif pour la peau, corrosif pour les yeux, écotoxine aquatique, écotoxine pour les vertébrés
Glycérol	Peut causer une irritation de la peau, des yeux et des voies respiratoires. Peut affecter les reins
Gomme arabique	Sensibilisateur respiratoire et de contact
Eau de Javel domestique (solution d'hypochlorite de sodium à 5 %)	Voir les instructions du fabricant
Acide chlorhydrique	Fatal en cas d'ingestion, corrosif pour les métaux, brûlures graves de la peau et des yeux, écotoxine aquatique et vertébrée.
Phénol	Toxique, métal, corrosif pour la peau et les yeux, écotoxine aquatique et pour les vertébrés
Acide lactique	Toxique, corrosif pour la peau et les yeux, écotoxine pour les vertébrés
Hydroxyde de potassium (KOH)	Toxique, métal, corrosif pour la peau et les yeux, écotoxine aquatique et pour les vertébrés

8.2.3.1 Mise à mort

Une fois l'échantillon capturé ou localisé, il peut être mis à mort en utilisant les méthodes suivantes.

Les spécimens à corps mou et immatures, qui perdent leur couleur, devraient être tués dans de l'eau portée juste à ébullition et laissés pendant 1 à 5 minutes avant d'être placés dans 70 à 80 % d'éthanol. Cela aide à les empêcher de devenir foncés ; les larves de Coléoptères, de Lépidoptères et d'Hyménoptères sont fixées de cette manière. Les insectes plus gros prennent plus de temps et peuvent nécessiter plusieurs remplacements de l'eau bouillante.

Les insectes à corps dur peuvent être tués directement dans 70 à 90 % d'éthanol. Les insectes recouverts d'écailles comme les Lépidoptères, les Trichoptères et les Culicidés ne devraient pas être tués à l'aide d'agents liquides, mais par congélation ou à l'aide d'un dessiccateur.

Les Hyménoptères parasites sont mieux tués et conservés dans de l'éthanol à 96 %. Cette concentration élevée empêche les ailes membraneuses de se tordre et de se replier, les poils de s'emmêler et les parties molles du corps de se dessécher.

La plupart des spécimens peuvent être tués en les plaçant au congélateur pendant au moins 30 minutes ; les insectes plus gros prendront plus de temps à tuer. Cette technique est aussi utilisée pour immobiliser les insectes actifs avant de les tuer avec d'autres méthodes.

Les petits insectes destinés au montage sur lame sont tués directement dans les liquides de clarification et de coloration.

Les spécimens d'insectes sont également tués par des vapeurs d'acétate d'éthyle (produit chimique inflammable et irritant) dans un bocal avec couvercle hermétique.

Les escargots et les limaces sont tués par noyade dans de l'eau bouillie (pauvre en oxygène) dans un bocal avec couvercle hermétique. Retirer le plus d'air possible et laisser reposer 24 h. Utiliser de l'eau narcotisée (imbibée de tabac) et ne pas faire bouillir le spécimen car cela le rend dur.

Les vers de terre (Annelida : Oligochaeta) peuvent être tués dans 70% d'éthanol.

8.2.3.2 Le montage à sec

Les références suivantes peuvent être utiles :

Walker, A.K. & Crosby, T.K. 1988. *The preparation and curation of insects*, new revised edn. New Zealand DSIR Information Series 163. Wellington, DSIR Science Information Publishing Centre. 92 pp. Disponible à : <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/nzac/specimen-preparation-and-curation> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Schauff, M.E., ed. 2001. *Collecting and preserving insects and mites: techniques and tools*. Washington, DC, Systematic Entomology Laboratory. Disponible à : <http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=10141> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Hunter, G. 2006. *Curation of insect specimens*. Conserve O Gram No. 11/8. Washington, DC, National Park Service. Disponible à : <http://www.nps.gov/museum/publications/conservoogram/11-08.pdf> (dernier accès le 17 septembre 2015).

8.2.3.3 Épinglage

- Les abeilles, les guêpes, les mouches, les termites ailées, les noctuelles et les papillons devraient tous être épinglés dans le thorax.

Les abeilles, les guêpes et les mouches doivent toutes être épinglées légèrement à droite du centre pour éviter d'endommager les caractères de diagnostic délicats.

- Les punaises (Hemiptera) doivent être épinglées à travers le scutellum.
- Les sauterelles (orthoptères) doivent être épinglées par le pronotum.
- Les coléoptères (coléoptères) doivent être épinglés dans l'élytre droit (figure 34).

Les épingles doivent être en acier inoxydable, sinon elles risquent de rouiller et de détruire l'échantillon. Les épingles doivent être insérées dans le corps à l'aide d'une épingle de taille appropriée. Dans la mesure du possible, il faut utiliser des épingles numéro 3 adaptées à l'épinglage direct des gros insectes. Les épingles numéro 5 sont utilisées pour les très gros insectes et les épingles numéro 0 pour les insectes à corps étroit. Tout ce qui est plus petit que cela doit être monté sur une micro-épingle (« minuten pin ») (voir section 8.2.3.4 Montage double).

Remarque : Les épingles 00 et 000 sont trop élastiques et risquent d'endommager l'échantillon lors de la manipulation.

Figure 34 : Vue dorsale et latérale du coléoptère épinglé



8.2.3.4 Montage double

Les petits insectes épinglés à l'aide de micro-épingles doivent être montés en double sur des bandes de 3 mm de côté par 10-12 mm de long de Nu Poly Strips ou de plastazote sur une épingle numéro 3 (Figure 35).

8.2.3.5 Épinglage sur carton

Tous les petits insectes durs (<5 mm) doivent être collés sur des cartons triangulaires (Figure 36).

Les scarabés (Coléoptères) doivent être montés de façon à ce que le côté ventral du corps soit visible.

Les mouches, guêpes et autres insectes dont les ailes sont déployées au-dessus du corps doivent être montés sur leur côté droit, de préférence avec les ailes orientées verticalement.

Les échantillons doivent être orientés avec la tête sur le côté droit de la pointe du carton. Seule une quantité minimale de colle doit être utilisée.

Les pointes du carton sont attachées à une épingle entomologique numéro 3.

8.2.3.6 Rectangles en carton

De très petits insectes, en particulier des scarabées à corps mou allongés, des hyménoptères minuscules et des coléoptères, peuvent être collés sur des cartes rectangulaires (Figure 37). Cette méthode est utilisée de préférence lorsqu'il y a plus d'un spécimen de la même série, car chaque spécimen peut être collé à un angle différent pour faciliter l'identification future.

Les nymphes provenant de l'élevage des spécimens sont également montées de cette façon. Les cartons sont attachés à une épingle entomologique numéro 3.

Remarque : Le montage de l'échantillon sur des rectangles en carton n'est pas une méthode à privilégier.

8.2.3.7 Étalement et mise en place

Les ailes des papillons diurnes et nocturnes sont déployées pour montrer le motif de couleur (Figure 38). Les bords postérieurs des ailes antérieures sont perpendiculaires au corps. Les ailes postérieures doivent alors être suffisamment en avant pour qu'il n'y ait pas d'écart important entre les ailes avant et

Figure 35: Vue latérale de l'insecte doublement monté

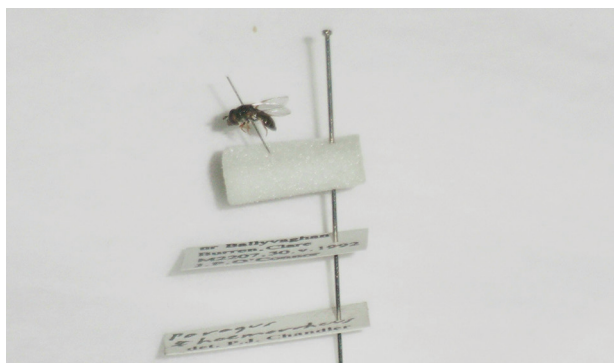


Figure 36: Vue dorsale et latérale de l'insecte monté sur carton

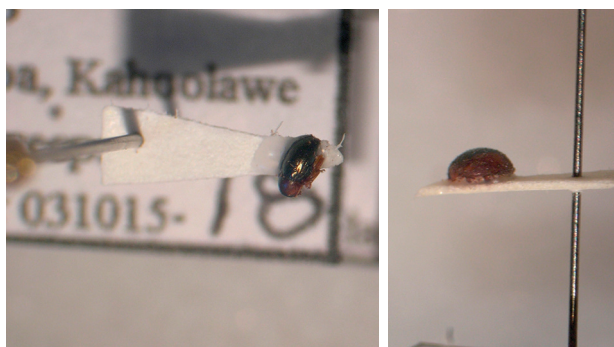
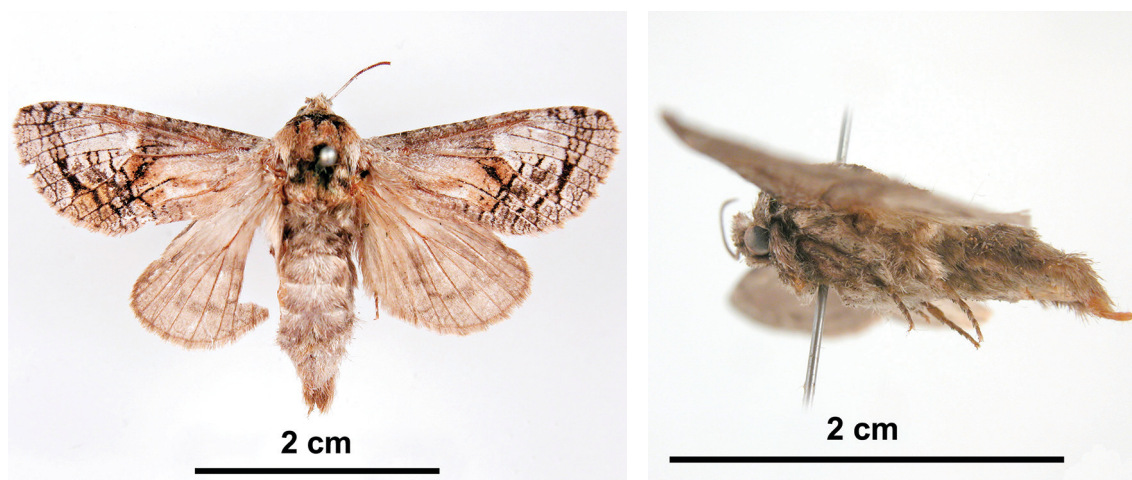


Figure 37: Insecte fixé sur un carton rectangulaire



Figure 38: Vue dorsale et latérale d'un papillon nocturne avec les ailes déployées



arrière. Il ne devrait pas y avoir de plis dans les ailes postérieures. Les ailes sont entièrement recouvertes de papier non ciré, de papier léger pour posture aérienne ou de papier calque.

Un tutoriel en ligne est disponible : Science Learning, 2009. *Mounting moths*. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/Hidden-Taonga/Sci-Media/Video/Mounting-moths> (dernier accès le 17 septembre 2015).

8.2.3.8 Conservation dans l'éthanol

Les invertébrés terrestres ou aquatiques à corps mou suivants, une fois tués ou fixés, devraient être stockés dans de l'éthanol à 70-75 %:

- Les formes larvaires de la plupart des ordres d'insectes
- Les termites (Isoptères) - tous les stades
- Le lépisme argenté (*Thysanura*)
- Les escargots et limaces (sauf les coquilles vides)
- Les vers, les centipèdes, mille-pattes, amphipodes.

Les échantillons destinés aux travaux moléculaires doivent être placés immédiatement dans de l'éthanol à 96 %, et l'éthanol doit être changé après plusieurs jours pour déshydrater les échantillons en vue de leur conservation.

8.2.3.9 Le montage sur lames

Le montage sur lame doit être utilisé pour les groupes d'insectes énumérés ci-dessous. Les méthodes de

préparation pour le montage des lames varient pour chaque groupe. Voir aussi les méthodes de fabrication de diapositives décrites dans Dooley, J. 2002. *Préparation des échantillons*. San Francisco, CA, PPQ. Disponible à l'adresse http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/Dones_Lourdes/other_files/slide_prep_training.pdf (dernier accès le 17 septembre 2015).

- Acariens (*Acari*) (peuvent être glissés directement dans le Hoyer's et dégagés sur une plaque chauffante)
- Nématodes
- Thrips (*Thysanoptères*)
- Cochenilles farineuses (*Pseudococcidae*)
- Insectes à écailles (*Coccoidea*)
- Pucerons (*Aphidoidea*)
- Autres ordres et exuvies
- Aleurode (*Homoptère : Aleyrodidae*)
- Parties disséquées des insectes - cette technique nécessite des micro-outils spécialisés (Figure 39) et une certaine habileté. Les outils sont relativement faciles à fabriquer avec des micro-pinces chauffées sur une flamme et délicatement pliées en position requise avec une pince très fine, puis insérées et collées dans de petites brochettes de bambou ou des cure-dents en bois.

Note : Le montage sur lames est un excellent moyen de préserver et d'étudier les petits insectes à corps mou et les organes génitaux.

Figure 39 : Micro-outils utilisés dans la préparation d'échantillons en entomologie



8.2.4 Étiquetage des échantillons

Il est très important que tous les échantillons préparés qui doivent être incorporés dans une collection permanente soient épinglés, conservés dans de l'éthanol ou montés sur des lames, et soient étiquetés correctement et de manière appropriée. Les étiquettes doivent être imprimées à l'encre permanente, qui n'est pas soluble dans l'eau et l'éthanol. Les formats des étiquettes d'échantillons entomologiques sont présentés dans ce guide.

N'écrivez jamais sur les deux côtés de l'étiquette et n'utilisez jamais de stylo à bille.

8.2.4.1 Étiquettes imprimées

Les modèles d'étiquettes sont générés électroniquement sur du papier « Goatskin Parchment-Blue White » (100 g/m²), ou sur tout autre papier d'archives de qualité appropriée, sans acide, au fini lisse, de sorte que le stylo d'étiquetage ne plie pas les fibres. Des modèles d'étiquettes de détermination pour les entomologistes individuels peuvent également être générés électroniquement.

L'information et les déterminations locales peuvent être générées électroniquement ou écrites à la main à l'aide de stylos d'archives ou de stylos à encre noire permanente, avec des pointes de petite taille, généralement 0,18 (stylos rotatifs) ou 1 (Artline et stylos similaires). Un crayon pointu peut être utilisé en l'absence d'un stylo approprié.

Qu'elles soient générées électroniquement ou écrites à la main, les étiquettes sont d'environ 8 mm x 15 mm pour les échantillons épinglés et 10 mm x 20 mm pour les échantillons dans l'éthanol, et les étiquettes autocollantes prédécoupées pour les échantillons montés sur lame. Toutes les étiquettes générées électroniquement doivent être chauffées dans un petit four de paille pour cuire l'encre de l'imprimante sur le papier et empêcher la formation de taches ou l'écoulement. Voir les instructions du fabricant pour l'utilisation du four de paille le plus approprié.

Instructions pour la cuisson des étiquettes entomologiques

- Le four de cuisson d'étiquettes ne doit être utilisé que pour le papier !
 - pas de graisse
 - pas de nourriture
 - pas d'autres produits chimiques.
- Couper les étiquettes en bandes ou placer toute la page sur une grille.
- Cuire les étiquettes pendant 1 min à 160 °C.
 - Chronométrer avec une montre ou un chronomètre pendant 1 minute.
 - Regarder durant l'opération ! Vérifier les étiquettes au microscope : l'impression doit être brillante et continue, et non granuleuse ou tachetée.

Indication de la localité

Pour tous les spécimens, l'étiquette de la localité doit contenir un numéro de référence ou d'accession unique aux fins de retraçage, la localité (ou le pays d'origine), l'hôte et la date de collecte :

- Le numéro de référence/numéro d'adhésion
- Le pays d'origine
- L'hôte ou l'endroit où il se trouve (sur la deuxième étiquette si nécessaire)
- Le collecteur
- La date.

Étiquettes d'identification (Det)

La deuxième étiquette, celle de la détermination ou de l'identification, porte sur le nom de l'espèce, l'identificateur (qui a réalisé l'identification) et l'année d'identification :

Figure 40A : Insecte directement épinglé montrant la position des étiquettes

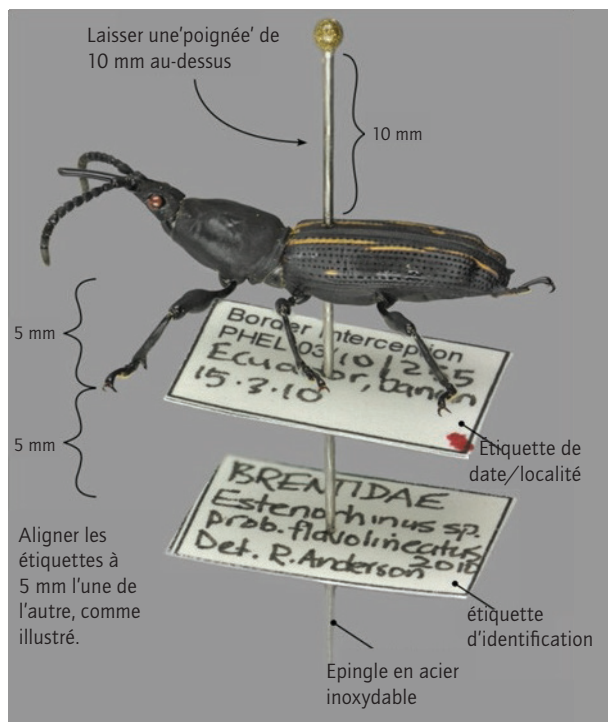
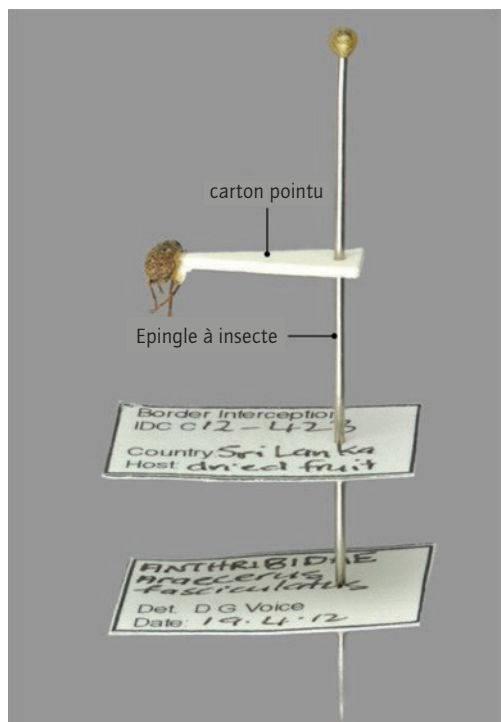


Figure 40B : Echantillon monté sur carte montrant la position des étiquettes et de l'épingle



- famille (ou utilisez plutôt la sous-famille si vous la connaissez), en majuscules
- genre espèce : en italique (si généré par ordinateur), le genre commence par une lettre majuscule, espèce en minuscules
- identifiant : initiales et nom du parrain, année.
Si le nom est long, l'année peut être abrégée aux deux derniers chiffres après une apostrophe (13') :
- Dét : M.J. Parker 2013
- Dét : M.J. Parker 01 janvier 2013
- Dét : S.P. Kortesecephsky'13.

Étiquettes de ré-identifications ultérieures

Celles-ci doivent être ajoutées au spécimen sans enlever la détermination initiale.

Note : Après la ré-identification, il se peut que l'on doive modifier tout le dossier archivé concernant le spécimen.

Positionnement d'étiquettes sur des échantillons épinglés

L'étiquette de localité doit être placée à environ 5 mm de l'échantillon épinglé. Des exemples d'étiquettes sont donnés ci-dessous.

Pour les échantillons épinglés (figure 40A), le trou d'épingle doit se trouver à peu près au milieu de l'étiquette, en évitant tout mot. Cette méthode offre une protection maximale aux appendices fragiles de l'échantillon.

Pour les échantillons directement épinglés, l'étiquette est centrée sous l'échantillon, l'axe long de l'étiquette coïncidant avec l'axe long de l'échantillon.

Pour les échantillons montés sur carton et les échantillons doubles sur épingles (figure 40B), insérer l'épingle par le centre du côté droit de l'étiquette, avec l'axe long de l'étiquette orienté dans le même sens que la pointe du carton. Le trou d'épingle va à droite des mots. Ceci est moins susceptible d'interférer avec l'écriture tout en offrant une certaine protection à l'échantillon.

Laissez suffisamment d'espace entre chaque étiquette pour que les données puissent être lues sans avoir à glisser ou incliner l'étiquette. Les étiquettes inclinables peuvent les desserrer, se balancer sur les épingles et risquer d'endommager les échantillons voisins.

Lorsque les étiquettes se détachent, enlever l'étiquette et fermer le trou d'épingle à l'aide d'un

ongle du pouce, puis la ré-épingler en faisant un nouveau trou d'épingle.

Positionnement des étiquettes pour les échantillons stockés dans des flacons

Cela comprend les étiquettes pour les échantillons stockés dans des flacons en verre ou en plastique, à secs ou dans de l'éthanol. Ces étiquettes sont plus grandes que les étiquettes d'échantillons épinglés (jusqu'à 15 mm x 40 mm), la localité et les parties d'identification se trouvent sur la même étiquette, positionnés sur la longueur du flacon. N'utilisez qu'une seule étiquette, qui doit être placée à l'intérieur de la fiole (Figure 41).

Les données locales vont à gauche, les données d'identification à droite.

Rouler l'étiquette autour d'un crayon, mots à l'extérieur, pour la recourber légèrement, avant de la placer dans la fiole. Ceci permet à l'étiquette de rester contre le verre pour que les mots ne soient pas obscurcis par des spécimens flottants.

S'il est nécessaire d'insérer une deuxième étiquette : pour s'assurer que les deux étiquettes peuvent être lues, insérer une feuille de papier ordinaire de la largeur de la fiole pour les séparer avec les mots des deux étiquettes vers l'extérieur.

Si les échantillons sont stockés dans de l'éthanol à 96 % pour des travaux moléculaires, cela doit être indiqué sur l'étiquette.

Positionnement des étiquettes pour les échantillons montés sur lames

L'étiquette de localité est placée sur le côté droit lorsque l'échantillon est tourné la tête vers le bas.

L'étiquette d'identification est placée sur le côté gauche de la lame (Figure 42).

8.2.5 Assouplir les échantillons séchés

Il n'est pas nécessaire d'assouplir les spécimens fraîchement tués. Certains spécimens, cependant, meurent en transit vers le laboratoire et deviennent secs et cassants ; ils ont besoin d'être assouplis pour empêcher les appendices de se briser pendant l'épingleage.

Procédure d'assouplissement simple

- Couvrir le fond de la cuve de réhydratation (récipient hermétique ou dessiccateur) avec de l'eau chaude jusqu'à environ 1 cm, placez une grille au-dessus de l'eau et couvrez avec du papier filtre ou du papier absorbant.
- Ajouter quelques gouttes d'huile de clou de girofle ou un désinfectant pour prévenir la formation de moisissures.
- Placer les échantillons sur du papier filtre dans une boîte peu profonde, telle qu'une boîte de Petri ou un couvercle en plastique.
- Fermer la cuve de réhydratation et laissez reposer toute la nuit. La durée nécessaire à

Figure 41 : Exemple d'étiquette pour les échantillons stockés dans un flacon

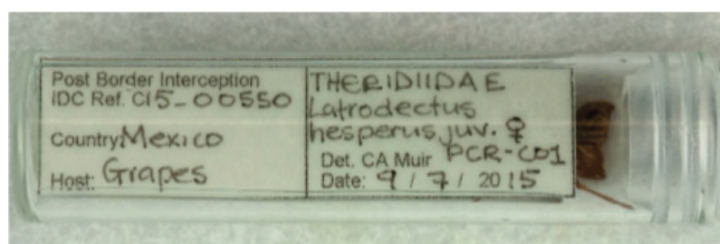


Figure 42 : Étiquetage d'un échantillon sur une lame montée



l'assouplissement dépend des insectes et de leurs tailles.

- Alternativement, pour des résultats rapides, placer la cuve dans le four à 40 °C, les échantillons doivent être suffisamment assouplis pour être manipulés en quelques heures.
- Veiller à ce que les étiquettes de la cuve ne soient pas écrites à l'encre soluble dans l'eau.

8.2.6 Séchage des spécimens

Les échantillons destinés au stockage à sec, y compris les coquilles d'escargots, doivent être séchés dans des récipients appropriés au four à 40 °C, ou séchés à l'air dans un récipient sûr à température ambiante, avant d'être stockés dans les collections. Aucun spécimen séché de la collection ne doit être laissé à l'extérieur du laboratoire toute la nuit, à moins qu'il ne s'agisse d'un contenant couvert.

Les fours de séchage des laboratoires d'entomologie sont maintenus à une température optimale de 40 °C pour le séchage des échantillons entomologiques. En général, les échantillons peuvent rester dans l'étuve jusqu'à ce qu'ils soient stockés de façon permanente.

Les échantillons épinglés peuvent être placés sur des plateaux unitaires dans le four ou dans des boîtes de stockage pour le séchage. Le temps de séchage dépend de la taille et de la couleur d'un spécimen, de quelques heures ou d'une nuit (p. ex. petits Diptères) à une semaine (p. ex. grands Coléoptères noirs).

Le matériel monté sur lame doit être séché dans le four d'entomologie pendant au moins 4 semaines. Différents supports et différentes quantités de supports peuvent prendre plus de temps à sécher complètement. Les échantillons montés sur lames sont placés dans des plateaux coulissants en aluminium dans le four pour le séchage.

8.2.7 Dissections

La dissection est une tâche habile et exige de la pratique. N'importe quelle partie du corps de l'insecte peut être disséquée et montée sur une lame pour être étudiée dans le Hoyer. Cependant, une fois qu'un appendice tridimensionnel est placé sous un couvre-objet, une déformation peut se produire, de sorte que le placement dans un puits de coloration

avec du sable et de l'éthanol à 95 % permet un examen à différents angles. Les appendices doivent être stockés dans de l'éthanol à 80 % et 5 % de glycérol ajouté. De très petits appendices peuvent être montés sur une lame à cavité.

8.2.7.1 Genitalia (organes génitaux)

- Enlever l'abdomen et les élytres dans de l'éthanol à 70%; si l'insecte est fraîchement tué, il n'est pas nécessaire de le mettre dans de l'éthanol, chauffer dans du KOH à 10% pendant 1 h maximum.
- Enlever soigneusement les organes génitaux avec le dernier segment abdominal modifié dans de l'eau distillée.
- Transférer dans de l'éthanol à 90 % ou, après avoir fait des observations, monter dans le milieu de Hoyer directement à partir d'eau distillée - soyez conscient qu'il peut y avoir déformation. Il est également possible d'effectuer un montage temporaire dans de la glycérine pour examen ou dans de l'eau, dans un verre de montre.
- Les organes génitaux et les parties macérées sont mieux conservées dans la glycérine dans un microtube épinglé avec l'échantillon (sur la même épingle).

Références de dissection et de préparation des organes génitaux des lépidoptères

Hayden, J. . E . Lee, Lee, S . Passoa, S . C . Young, J. Landry, J., J. -F . Nazari, V. Mally, Mally, R. Somma, L . A . & Ahlmark, K . M . 2013. Identification numérique de microlepidoptères sur Solanaceae. Fort Collins, CO, USDA-APHIS-PPQ Identification Technology Program (ITP). Disponible à l'adresse <http://idtools.org/id/leps/micro/> (dernier accès le 17 septembre 2015).

Hoare, R. J . B . 2000. Un nouveau genre de Nepticulidae primitifs (Lépidoptères) de l'est de l'Australie, avec un diagnostic révisé des sous-familles nepticides. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 128(3) : 289-317. (p. 292).

8.2.7.2 Larves de Diptères et autres parties d'insectes

- Placer la larve dans l'eau dans un plat à dissection et couper la cuticule avec des

ciseaux à dissection fins le long d'un côté, en commençant près de l'extrémité antérieure, en passant sous le spiracle latéral et en continuant presque à l'extrémité postérieure.

- Placer la larve dans la solution d'Essig/Wilkey et chauffer doucement pendant 1 h. Lorsque la larve est bien macérée, retirer le contenu du corps.
- Séparer la région spiraculaire postérieure du reste de la peau et tirez le squelette céphalopharyngien à une courte distance du corps. Placer la peau dans de l'éthanol à 95 %.
- Dans la solution de Hoyer, monter avec la peau ouverte vers l'extérieur de sorte que le squelette céphalopharyngé, avec les crochets buccaux, se trouve loin de la peau et que la zone spiraculaire postérieure se trouve avec les deux spiracles vers le haut.
- Pour certaines autres demandes, la tête de l'échantillon est soigneusement montée sur des lames afin que les pièces buccales puissent être examinées.
- D'autres parties du corps de l'insecte, comme les antennes, les pattes et les palpes, peuvent être montées directement dans la solution de Hoyer.

8.2.7.3 Rembourrage d'orthoptères, de cigales et de phasmatodes

Les grandes sauterelles, les grands hémiptères (p. ex. Cicadidae) et d'autres insectes orthoptères peuvent devoir être disséqués pour le stockage à sec permanent. À l'aide de ciseaux à disséquer, une coupe est pratiquée sous l'abdomen, le contenu de l'intestin est enlevé à l'aide d'une pince, la cavité est nettoyée avec un coton imbibé d'éthanol puis un coton-tige propre est inséré pour remplir l'espace libre. Les bords coupés peuvent être assemblés et collés en place avant que l'échantillon ne soit séché à l'étuve.

Il peut être nécessaire d'enlever le contenu de l'intestin des Phasmatodea et d'insérer une soie de nylon à l'extrémité de l'abdomen pour garder l'abdomen rigide avant de le sécher au four.

8.2.7.4 Procédure de préparation des ailes de Lépidoptères

- Couper soigneusement les ailes au niveau de l'attache basale de l'échantillon.

- Faire blanchir les ailes des lépidoptères en les immergeant dans de l'eau de Javel domestique ou de lessive (solution d'hypochlorite de sodium à 5 %) pendant 1 à 3 minutes. Les mouiller d'abord avec de l'éthanol activera l'eau de Javel. Remarque : le processus de blanchiment doit être surveillé attentivement sous le microscope car les ailes peuvent être endommagées si on les laisse trop longtemps dans le produit chimique.
- Dès que les veines deviennent visibles, retirez-les de l'eau de Javel et lavez-les à l'eau claire.
- Enlever les écailles de lépidoptères dans l'eau en brossant soigneusement les ailes avec une brosse fine.
- L'aile sans écailles peut ensuite être colorée avec une solution de fuchsine acide, si désiré.
- Laver dans de l'éthanol à 95 % et de la glycérine ou une solution de Hoyer sur une lame.
- Pour faire un montage permanent, placer les ailes dans de l'huile de clou de girofle pendant 5-10 min avant de les monter dans du Baume d'Euparal ou du Canada.
- Positionnez l'aile comme vous le souhaitez, retournez-la si nécessaire et assurez-vous que sa partie basale est bien tendue et que toutes les nervures sont visibles.

8.2.8 Procédure de montage sur lame pour les petits arthropodes

La préparation des lames de tous les échantillons pour la collection de référence doit suivre la procédure de montage permanent. Une procédure de montage temporaire est également fournie ci-dessous, qui peut être utilisée pour l'identification rapide et le stockage à court terme, et qui permet le retraitement pour la fabrication de lames permanentes.

8.2.8.1 Procédure pour les collemboles, les pucerons et les hémiptères immatures (punaises)

- Placer les échantillons dans la solution d'Essig/Wilkey dans un puit de coloration.
- Couvrir avec un couvercle en verre et étiqueter avec un numéro d'identification unique.
- Chauffer jusqu'à clarification (de 30 min à 1 h)

sur une plaque chauffante ou sous une ampoule dans la hotte.

- Si nécessaire, ajouter 3 ou 4 gouttes de solution de coloration à la fuchsine acide.
- Retirer le contenu du corps et répéter, si nécessaire, en utilisant une nouvelle solution d'Essig/Wilkey.

Pour les supports permanents

- Transférer dans l'éthanol à 25% pendant 5 à 10 minutes.
- Puis dans l'éthanol à 50% pendant 5-10 min.
- Puis dans l'éthanol à 75% pendant 5-10 min.
- Puis dans l'éthanol à 100% pendant 5-10 min.
- Puis dans l'huile de clou de girofle pendant 5-10 min.
- Enfin, monter directement dans le Baume du Canada.

Pour les montages temporaires

Montage direct dans le milieu de montage en solution de Hoyer (les Collemboles peuvent également être nettoyées à l'acide lactique dans un four à 40 °C).

8.2.8.2 Thrips (Thysanoptères)

Procédure de montage permanent

- Placer dans le KOH à 10% ou dans un milieu Essig/Wilkey pendant une période variable, selon la couleur de l'échantillon :
 - formes noire ou brun foncé - plusieurs heures
 - formes pâles - 2 h.
- Transférer dans l'eau (au moins 1h, peut être laissé pendant plusieurs jours).
- Transférer dans l'éthanol à 30% (1 h, peut être laissé pendant 2 à 3 jours).
- Transférer dans l'éthanol à 70% (1 h, peut être laissé pendant 2 à 3 jours).
- Transférer dans de l'éthanol à 95% (1 h, peut être laissé pendant 2 à 3 jours).
- Transférer dans l'éthanol absolu (1 h, peut être laissé pendant 2-3 jours)
- Transférer dans l'huile de clou de girofle (au moins 1 h, peut être laissé pendant 2-3 jours).
- Monter sur lame avec du Baume du Canada, habituellement un thrips par lame, avec la tête de l'échantillon dirigée vers le bas.

Procédure de montage temporaire

- Placer les Thrips dans un milieu Essig/Wilkey dans un puit en verre de montre pendant une période variable, selon la couleur de l'échantillon.
- Recouvrir d'un couvercle en verre, étiqueter et placer sous la lampe pour le ranger.
- Après le nettoyage (environ 1 h selon la couleur de l'échantillon), enlever les parties internes ; laver l'échantillon dans l'éthanol à 70-96 %.
- Monter les lames dans le milieu de montage de Hoyer, généralement un Thrips par lame, face dorsale vers le haut, la tête vers l'opérateur.
- Marquer la lame avec la tête de l'échantillon dirigée vers le bas.

Référence: Thrips Wiki. 2013. Collecting and preparing thrips for study. http://thrips.info/wiki/Collecting_and_preparing_thrips_for_study (dernier accès le 22 septembre 2015).

8.2.8.3 TProcédure de montage temporaire sur lame pour les Cochenilles à boucliers et à cires (Hemiptera : Diaspididae et Coccidae)

Le but de la préparation est d'éliminer à la fois la sécrétion externe recouvrant le corps et les organes internes, sans endommager les structures diagnostiques externes du corps.

- Retirer les échantillons des flacons et du substrat végétal sous microscope binoculaire et les placer dans un puits de coloration contenant la solution d'Essig/Wilkey.
- Enlever délicatement les cochenilles de leurs plaques protectrices (tests), percer le milieu du thorax et ajouter quelques gouttes de fuchsine acide pour colorer.
- Recouvrir d'un couvercle en verre, étiqueter et placer sous la lampe pour clarification. Les échantillons peuvent être pompés et agités légèrement pendant cette étape pour faciliter le processus de nettoyage. Les spécimens frais sont habituellement nettoyés adéquatement en 1 à 2 heures.
- Retirer la solution d'Essig/Wilkey fraîche, extraire les pièces internes et laver l'échantillon dans de l'éthanol à 75 %
- Monter face ventrale vers le haut, avec le pygidium vers le haut dans le milieu de montage de Hoyer.
- Étiqueter la lame.

8.2.8.4 Procédure de montage temporaire sur lame pour les cochenilles farineuses (*Hemiptera : Pseudococcidae*) et les Cochenilles géantes (*Hemiptera : Monophlebidae*)

Le but de cette préparation est d'éliminer à la fois la sécrétion externe recouvrant le corps et les organes internes, sans endommager les structures diagnostiques externes du corps.

- Retirer les échantillons du substrat végétal ou de la fiole sous microscope binoculaire et les placer dans un puits de coloration contenant la solution d'Essig/Wilkey.
- Faire une petite incision, à l'aide d'une fine aiguille, sur la face dorsale de la cochenille, entre les coxae postérieurs.
- Placer quelques gouttes de chloroforme pour éliminer les cires corporelles et quelques gouttes de fuchsine acide pour colorer.
- Couvrir le puit de coloration d'un couvercle en verre, d'une étiquette et placez-le sous la lampe pour le nettoyer. Les échantillons peuvent être mélangés légèrement pendant cette étape pour faciliter le processus de nettoyage. Les spécimens frais sont habituellement nettoyés adéquatement en 1 à 2 heures.
- Retirer la solution d'Essig/Wilkey fraîche, extraire les pièces internes et laver l'échantillon dans de l'éthanol à 75 %.
- Monter face ventrale vers le haut, avec la tête vers le bas dans le milieu de montage de Hoyer.
- Étiqueter la lame.

8.2.8.5 Procédure de montage permanent au micro-ondes pour les cochenilles farineuses et les cochenilles (*Hemiptera : Coccoidea*)

- Enlever les cochenilles du matériel végétal dans un puit de coloration sec. A ce stade, des observations peuvent être faites - parasitisme, vivant ou mort, dénombrement, identification provisoire, etc.
- Faire couler de l'éthanol à 95 % sur les cochenilles farineuses pour qu'il pénètrent dans la cire.
- Perforer au milieu du thorax - une microépingle dans un support est idéale pour cela.
- Transférer les insectes dans la solution d'Essig/Wilkey en y ajoutant une ou deux gouttes

de solution de fuchsine acide; utiliser 1 ml de liquide dans un flacon de 5 ml. Posez le couvercle sur sans serrer - ne le vissez pas. Le couvercle doit avoir 3-4 trous d'aération car le contenu du flacon va bouillir (un flacon fermé pourrait exploser).

- Mettre au four à micro-ondes pendant 1 min. *Remarque* : La durée et le niveau de puissance dépendent de la puissance (wattage) du four à micro-ondes utilisé. Les composés phénoliques vont bouillir, alors utilisez sous une hotte.
- Dès que la fiole est suffisamment froide pour être manipulée, verser le liquide dans un puit de coloration. L'insecte devrait s'être éclairci. Si ce n'est pas le cas, pompez doucement l'insecte pour l'aider à s'éclaircir, puis remettez-le dans le flacon et mettez-le au four à micro-ondes une minute de plus.
- Transférer les insectes dans de l'éthanol à 95 %. Utilisez une pince à extrémités plates pour les aplatir doucement sur le dos et le ventre tout en expulsant le reste du contenu. Les insectes peuvent maintenant être montés dans le milieu de montage de Hoyer.
- Transférer immédiatement dans l'huile de clou de girofle dans un puit de coloration. Couvrir le puit et cuire au four à micro-ondes pendant 1 min. *Remarque* : La durée et le niveau de puissance dépendent de la puissance (wattage) du four à micro-ondes utilisé. L'huile ne bout pas, donc on n'utilise pas de fiole. L'huile dissout les traces de graisse et de cire qui, autrement, obscurcissent les monticules de Baume du Canada. Chez certains insectes, p. ex. cochenilles farineuses très grasses ou monophlebidés, il peut être nécessaire de répéter cette étape dans de l'huile de clou de girofle fraîche si l'huile de clou de girofle a un aspect trouble épaissi après chauffage au four à micro-ondes.
- Transférer directement sur lames dans le Baume du Canada.

Référence : La procédure de montage sur lame est modifiée à partir de Lo, P. L. & Blanc R. H. 1989. A survey of armoured scale species (*Hemiptera : Diaspididae*) in kiwiwi vergers. *New Zealand Entomologist*,12: 1-4.

8.2.8.6 Acariens (*Acari*)

Les acariens bien sclérosés doivent être traités dans l'acide lactique avant le montage des lames. Éviter un nettoyage excessif dans l'acide lactique, car cela peut rendre les acariens trop clairs et difficiles à manipuler.

Pour collecter les acariens du substrat végétal, humidifier une aiguille avec de l'acide lactique, du milieu de montage de Hoyer ou utiliser un pinceau d'artiste fin.

- Placer les dans un bac de coloration ou une lame creusée avec de l'acide lactique et les chauffer sous la lampe, sur une plaque chauffante ou dans un four à 70 °C.
- Monter les lames des spécimens éclaircis dans le milieu de montage de Hoyer.

Les acariens légèrement sclérosés et non sclérosés peuvent être glissés directement dans le Hoyer. Placer la lame sur une plaque chauffante pour la nettoyer à 70 °C. Les spécimens sont habituellement nettoyés pour identification dans l'heure qui suit.

Référence: **Dooley, J. 2002.** Specimen preparation. San Francisco, CA : PPA. Disponible à l'adresse http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/whitefly/PDF_PwP%20ETC/Slide%20Prep%20Training.pdf (dernier accès le 22 septembre 2015).

8.2.8.7 Aleurodes et psylles immatures (*Hemiptera, Psylloidea : Aleyrodidae*) (*puparia*)

- Prélever les échantillons dans de l'éthanol à 75 %.
- Placer les échantillons dans du KOH à 10% et les rendre transparents pendant plusieurs heures à température ambiante. (*Note* : ne jamais chauffer les échantillons d'aleurodes en KOH car cela affecte la chitine et diminue sa capacité à retenir les taches). Ne placez pas d'échantillons noirs dans le KOH, car cela froisse leur peau.
- Tremper dans de l'éthanol à 75 % (pas d'incisions nécessaires), puis dans une solution de blanchiment de peroxyde d'hydrogène et d'hydroxyde d'ammonium à 50/50.
- S'assurer que les échantillons s'immergent dans la solution.
- Surveiller toutes les 15 minutes.
- Dès que les échantillons brunissent

uniformément, les transférer dans l'éthanol à 75% pour laver et neutraliser le KOH.

- Transférer dans la solution d'Essig/Wilkey avec de la fuchsine acide.
- Transférer dans l'huile de clou de girofle. N'essayez jamais de pomper ou d'extraire le contenu corporel des nymphes, car les soies sont très fines et facilement endommagées. Laisser agir de 5 à 10 minutes jusqu'à ce qu'elle soit clair.
- Placer une petite goutte sur la lame, étalez-la pour recouvrir la surface de protection.
- Aligner les spécimens ; laisser le Baume du Canada devenir un peu collant.
- Placer le couvre-objet doucement sur le Baume et les échantillons.
- Si le Baume ne couvre pas la zone du couvre-objet, vous pouvez en ajouter plus.

8.2.8.8 Aleurodes adultes

Procédure de montage temporaire

- Placer les échantillons dans de l'éthanol à 70 %.
- Placer l'échantillon sur la lame avec le milieu de montage de Hoyer. Les échantillons doivent être positionnés sur la lame face dorsale vers le haut ou sur le côté. Positionner sur la face latérale est plus difficile à faire mais les structures nécessaires sont plus faciles à discerner.
- Chauffer la lame à 40-60 °C pendant plusieurs heures.

Procédure de montage permanent

- Placer les échantillons dans de l'éthanol à 70 % (les incisions ne sont pas nécessaires et ne doivent pas être faites).
- Utiliser une spatule suffisamment large pour supporter la plupart des parties du corps et des ailes lors des transferts d'un réactif à l'autre.
- Placer les échantillons dans du KOH à 10 % et les rendre transparents pendant plusieurs heures à température ambiante. Il est préférable de le faire du jour au lendemain, à moins qu'une détermination rapide ne soit nécessaire. Remarque : Ne jamais chauffer les échantillons dans KOH !
- Transférer dans l'éthanol pour laver et neutraliser le KOH.

- Transférer dans la solution d'Essig/Wilkey avec colorant (pattes en bas, dos en haut ; il n'est pas nécessaire d'immerger l'échantillon entier, sinon les ailes s'emmêleront presque certainement avec le reste du corps) ; chauffer à 50 °C (ne pas essayer de retirer le contenu du corps car la mouche blanche devient très collante dans la solution chauffée de Essig/Wilkey).
- Transférer dans de l'huile de clou de girofle et extraire le contenu interne du corps à l'aide d'une très fine aiguille courbée (00 ou 0 pointe d'insecte) ; retourner à la solution d'Essig/Wilkey (avec ou sans colorant) si nécessaire et chauffer. Transférer à nouveau dans l'huile de clou de girofle si les échantillons ont été réchauffés dans la solution d'Essig/Wilkey.
- Monter les spécimens sur une lame à l'aide d'un couvre-objet étayé (les accessoires doivent être en vinyle ou en monofilament d'une longueur courte d'environ 0,25 mm de diamètre).

Note : Il est important que les spécimens soient placés dans du Baume du Canada très mince et coulant, dilué avec du xylène pour qu'il coule, sinon les antennes et souvent les pattes s'affaisseront et ne serviront plus à l'identification. Le Baume épais ne peut pas pénétrer assez rapidement dans les petites ouvertures de ces structures. Un Baume plus épais peut être ajouté avant l'application du couvre-objet et est probablement une nécessité dans les glissières étayées de toute façon car le xylène s'évapore, laissant une quantité insuffisante de Baume pour couvrir les échantillons. Les échantillons doivent être placés sur la lame face dorsale vers le haut ou sur le côté. Le positionnement sur le côté est plus difficile à obtenir mais les structures nécessaires sont plus faciles à discerner.

Référence : Cette procédure a été tirée d'une clé provisoire pour les aleurodes adultes de Californie par R.J. Gill (1989, non publiée).

8.2.9 Références pour les techniques de préparation et de montage

Les auteurs recommandent la documentation suivante concernant les techniques de préparation et de montage. Ces références précisent les modalités de préparation des différents groupes.

Général

- Naumann, D.I., ed.**1991. *The insects of Australia: a textbook for students and research workers* (Parts 1 & 2). Melbourne, Melbourne University Press. 1029 pp.
- Walker, A.K.& Crosby, T.K.**1988. *The preparation and curation of insects, new revised edn.* New Zealand DSIR Information Series 163. Wellington, DSIR Science Information Publishing Centre. 92 pp. Available at <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/nzac/specimen-preparation-and-curation> (last accessed on 17 September 2015).
- Stehr, F.W., ed.**1987. *Immature insects.* Dubuque, IA, Kendall/Hunt Publishing. 754 pp. (Vol. 1, pp. 9-17).

Acari

- Krantz, G.W.& Walter, D.E.**2009. *A manual of acarology*, 3rd edn. Lubbock, TX, Texas Tech University Press. 816 pp. (pp. 83-96).
- Jeppson, L.R., Keifer, H.H.& Baker, E.W.**1975. *Mites injurious to economic plants.* Berkeley, CA, University of California Press. 614 pp. (pp. 385-392).

Araneae

- Ubick, D., Paquin, P., Cushing, P.E. & Roth, V., eds.** 2005. *The spider genera of North America: an identification manual.* The American Arachnological Society. (pp. 8-9).

Coleoptera

- Booth, R.G., Cox, M.L. & Madge, R.B.**1990. *IIE guides to insects of importance to man.* Vol. 3. *Coleoptera.* Oxford, Oxford University Press. 392 pp. (Adults, pp. 10-12; larvae, pp. 205-208).

Diptera

- Ferrar, P.** 1987. *A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha.* Part 1. *Text*; Part 2. *Figures.* Leiden, E.J. Brill; Copenhagen, Scandinavian Science Press. 907 pp. (pp. 10-12).
- White, I. & Elson-Harris, M.M.** 1992. *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics.* Wallingford, UK, CAB International. 600 pp. (pp. 24-29).
- Drew, R.A.I., Hooper, G.H.S. & Bateman, M.A.** 1978. *Economic fruit flies of south Pacific region.* Queensland, Department of Primary Industries; Canberra, Department of Health. 137 pp. (pp. 2-4).

Foote, R.H., Blanc, F.L. & Norrbom, A.L. 1993. *Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America north of Mexico*. Ithaca, NY, Comstock. 576 pp. (pp. 37-41).

Heteroptera

Slater, J.A. & Baranowski, R.M. 1978. *How to know the true bugs (Hemiptera-Heteroptera)*. Dubuque, IA, W.C. Brown. (pp. 12-15).

Aleyrodidae:

Martin, J.H. 1999. *The whitefly fauna of Australia (Sternorrhyncha: Aleyrodidae): a taxonomic account and identification guide*. Canberra, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. (pp. 124-125).

Aphididae:

Blackman, R.L. & Eastop, V.F. 2000. *Aphids on the worlds crops: an identification and information guide*, 2nd edn. UK, Wiley. 250 pp. (pp. 363-365).

Coccidae:

Gill, R.J. 1988. *The scale insects of California*. Part 1. *The soft scales (Homoptera: Coccoidea: Coccidae)*. Technical Series in Agricultural Biosystematics and Plant Pathology No. 1. Sacramento, California Department of Food and Agriculture. 132 pp. (pp. 126-127).

Coccoidea:

Gill, R.J. 1993. *The scale insects of California*. Part 2. *The minor families (Homoptera: Coccoidea)*. Sacramento, California Department of Food and Agriculture. 241 pp.

Diaspididae:

Gill, R.J. 1997. *The scale insects of California*. Part 3. *The armored scales (Homoptera: Diaspididae)*. Technical Series in Agricultural Biosystematics and Plant Pathology No. 3. Sacramento, California Department of Food and Agriculture. 307 pp.

Williams, D.J. & Watson, G.W. 1988. *The scale insects of the tropical south Pacific region*. Part 1. *The armoured scales (Diaspididae)*. Wallingford, UK, CAB International Institute of Entomology. (p. 13).

Pseudococcidae:

Williams, D.J. & de Willink, M.C.G. 1992. *Mealybugs of Central and South America*. Wallingford, UK, CAB International. 635 pp. (p. 22).

Williams, D.J. & Watson, G.W. 1988. *The scale insects of tropical south Pacific region*. Part 2. *Mealybugs (Pseudococcidae)*. CAB International Institute of Entomology. 260 pp. (p. 11).

Lepidoptera

Holloway, J.D., Bradley, J.D. & Betts, C.R., eds. 1987. *CIE guides to insects of importance to man*. Vol. 1. *Lepidoptera*. Wallingford, UK, CAB International Institute of Entomology. (pp. 11-14).

Thysanoptera

Palmer, J.M., Mound, L.A. & du Heaume, G.J. 1989. *CIE guides to insects of importance to man*. Vol. 2. *Thysanoptera*. Wallingford, UK, CAB International Institute of Entomology; London, British Museum of Natural History. 73 pp. (pp. 3-5).

Thrips Wiki. 2013. Collecting and preparing thrips for study. Available at http://thrips.info/wiki/Collecting_and_preparing_thrips_for_study (last accessed on 22 September 2015).

8.3 Collection nématologique de référence

8.3.1 Équipements et réactifs

- desséchant (p. ex. gel de silice, chlorure de calcium, éthanol à 95 %)
- éthanol
- formol
- glycérol
- parafilm
- dessiccateur
- aiguille de dissection
- couvercle en verre pour couvrir le verre de la montre
- radiateur
- lame de microscope
- couvre-objet de microscope
- pipette
- petites perles de verre, fil de fer fin ou de cire pour supporter les couvre-joints

- fiole
- verre de montre.

8.3.2 Procédure de montage permanent du nématode

- Extraire les nématodes aux différents stades de développement comme décrit au chapitre 5.
- Transférer les spécimens vivants dans un verre de montre.
- Réduire l'eau dans le verre de montre à 1 ml.
- Ajouter 2 ml de formol chaud à 3 % dans le verre de montre et laissez durcir pendant au moins 2 semaines.

Remarque : N'utilisez pas de fixateurs contenant de l'éthanol, car cela provoque des déformations.

8.3.2.1 Montages permanents

- Après la mise à mort et la fixation, transférer les échantillons dans 1 ml de solution Seinhorst I (20 volumes d'éthanol à 95 % pour 1 volume de glycérol et 79 volumes d'eau) placée dans un verre de montre.
- Placer le verre de montre avec les échantillons dans un dessiccateur contenant un desséchant pendant 2-3 jours.
- Ajouter au moins deux fois le volume de la solution de Seinhorst II (5 volumes de glycérol et 95 volumes d'éthanol à 95 %) à la solution existante dans le verre de montre.
- Couvrir le verre de montre avec un couvercle en verre, en laissant un petit espace d'environ 1-2 mm de large.
- Conserver les échantillons à température ambiante pour permettre une lente évaporation de l'alcool pendant 2 semaines.
- Transférer les échantillons à l'aide d'une aiguille à dissection (comme alternative, monter des poils ou des plumes sur un porte-plume) sur une lame de verre avec une goutte de glycérol sur une lame de microscope.
- Disposer les nématodes si nécessaire.
- Ajouter de petites perles de verre, du fil de fer fin ou de la cire pour soutenir les couvre-objets dans le cas des nématodes de grande taille.
- Placer délicatement une lamelle de recouvrement et la sceller avec du vernis à ongles.

8.3.2.2 Échantillons non montés

- Après la mise à mort et la fixation, transférer les échantillons dans un flacon.
- Ajouter 3 % de formaline avec 2 % de glycérol pour prévenir la détérioration des échantillons si l'agent de conservation s'évapore.
- Fermer la fiole avec du parafilm et étiqueter.

8.4 Collection de phytopathogènes et herbier de référence

Une collection de référence de phytopathogènes et un herbier peuvent contenir l'un ou l'autre des types de spécimens suivants :

- des champignons
- des plantes envahissantes
- des plantes parasites
- des parties de plantes affectées par des agents pathogènes (bactéries, champignons, nématodes, virus, viroïdes, phytoplasmes, *Liberibacter*)
- des parties de plantes affectées par des facteurs abiotiques.

Pour une bonne collection de référence de phytopathogènes et un herbier (en plus de ceux énumérés dans l'introduction) devraient être composés :

- des spécimens en quantité suffisante
- des spécimens avec différentes parties de plantes avec différents stades de symptômes
- des spécimens présentant différents états morphologiques pour les champignons (p. ex. anamorphe et téléomorphe, ou état écidien, pycnidien, urédien et téléutosporien)
- des spécimens de différents pays
- des spécimens provenant de différentes régions administratives
- des spécimens multiples pour tenir compte des variations entre les populations
- des informations supplémentaires, par exemple des photos de symptômes sur le terrain et des photos d'échantillons avant le séchage.

Note : Les échantillons peuvent être montés sur des lames de microscope et conservés dans des herbiers.

8.4.1 Sélection de la méthode

La plupart des spécimens de plantes, y compris ceux infectés par des agents pathogènes, peuvent être conservés par séchage à l'air, séchage avec des desséchants, pressage, lyophilisation, congélation

et laminage. Des échantillons très charnus et délicats peuvent être conservés par décapage pour conserver la forme de l'échantillon. Les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes sont résumés au tableau 3.

Tableau 3 : Avantages, inconvénients et types d'échantillons adaptés à chaque méthode de conservation en herbier

Procédé de conservation	Types d'échantillons	Avantages	Inconvénients
Séchage à l'air	Échantillons secs et moins charnus	Faibles coûts d'installation et d'exploitation. Les symptômes sont bien préservés	Les acides nucléiques sont mal conservés
Séchage avec des desséchants	Échantillons secs et moins charnus	Faibles coûts d'installation et d'exploitation. Les acides nucléiques sont assez bien conservés	Il faudra peut-être remplacer les desséchants. Les symptômes ne sont pas bien préservés
Séchage par pressage	Spécimens secs, moins charnus et moins volumineux	Faibles coûts d'installation et d'exploitation. Les symptômes sont bien préservés	Les acides nucléiques sont mal conservés
Lyophilisation	La plupart des spécimens conviennent	Les acides nucléiques sont bien conservés	Les ampoules de lyophilisation limitent la taille des échantillons. L'installation et le fonctionnement sont plus coûteux. Les symptômes ne sont pas bien préservés
Congélation	Tous les types d'échantillons conviennent	Les acides nucléiques sont bien conservés	L'espace du congélateur peut être limité. L'installation et le fonctionnement sont plus coûteux. Les acides nucléiques peuvent se dégrader lors de multiples processus de congélation-décongélation. Les symptômes ne sont pas bien préservés
Plastification	Échantillons secs et relativement plats	Faibles coûts d'installation et d'exploitation. Rapide et facile à préparer. Les symptômes sont bien préservés	Difficile d'examiner les échantillons avec une loupe ou un microscope. Difficile d'extraire des échantillons pour des tests supplémentaires. Les acides nucléiques sont mal conservés
Macération	Échantillons très charnus ou délicats	Faibles coûts d'installation et d'exploitation. Les symptômes sont bien préservés	Les acides nucléiques sont mal conservés dans certains conservateurs.

8.4.2 Exigences relatives à l'échantillon

Les échantillons doivent être traités le plus rapidement possible. Sinon, étiqueter les échantillons et les conserver dans des conditions appropriées, au réfrigérateur ou dans un endroit frais et ombragé.

Note : Certaines plantes tropicales deviennent brun-forcé lorsqu'elles sont conservées au réfrigérateur.

Les échantillons doivent contenir un matériel adéquat en bon état de conservation. Des images des échantillons doivent être prises avant le traitement, si nécessaire.

Note : Le séchage modifie la couleur des symptômes de la maladie et la forme des parties charnues des plantes.

Il est recommandé de sélectionner des parties de plantes présentant différents stades de symptômes ou différents états pathogènes. Les parties des plantes doivent être coupées pour s'adapter aux contenants. Les matériaux encombrants peuvent être coupés en deux ou en quatre, ou tranchés pour faciliter le séchage.

Porter des gants jetables et essuyer les surfaces des paillasses et les outils avec un désinfectant. Ceci est particulièrement important lors de la manipulation de matériel infecté par des maladies qui peuvent avoir des effets néfastes.

8.4.2.1 Conservation des échantillons infectés par des virus, des viroïdes et des bactéries non cultivables comme les phytoplasmes et *Liberibacter*.

- Dans la mesure du possible, les tissus végétaux d'origine doivent être conservés (p. ex. les tissus végétaux infectés par un virus).
- Pour les virus et viroïdes transmissibles mécaniquement, les plantes herbacées infectées ou les plantes greffées infectées pourraient être stockées à la place ou en plus du tissu végétal original.
- Pour tous les virus, viroïdes et micro-organismes non cultivables (phytoplasmes, *Liberibacter*, par exemple), les plantes greffées infectées pourraient également être stockées.
- La plupart des virus, viroïdes et micro-organismes non cultivables sont bien conservés.

Cependant, certains de ces organismes peuvent se dégrader au cours de ce processus en raison de leur nature instable - par exemple, les tissus végétaux stockés dans le congélateur se dégradent avec le temps, ce qui entraîne de multiples cycles de décongélation et de congélation.

- La meilleure méthode de conservation consiste à lyophiliser les tissus végétaux ; cependant, le séchage des tissus végétaux sur des desséchants (p. ex. chlorure de calcium) est également une bonne méthode. La congélation des tissus végétaux est également adéquate, à condition que le matériel ne soit pas soumis à des cycles de décongélation et de congélation trop fréquents.
- Les micro-organismes non cultivables (par ex. phytoplasmas, *Liberibacter*) ne peuvent être conservés dans leurs plantes vivantes que pour des travaux biologiques (par ex. greffe ou transmission par les insectes)..

8.4.3 Méthodes de conservation

Équipements généraux, consommables et réactifs :

- articles de papeterie
- papier pour étiquettes
- papier de soie
- kit de dissection (pinces, scalpels, ciseaux)
- planche à découper
- contenants d'échantillons (p. ex. grands sacs en plastique, enveloppes en papier, flacons)
- désinfectants : éthanol, alcool isopropylique ou désinfectant commercial (par ex. Trigene, Virkon)
- équipements de protection individuelle (p. ex. tabliers de laboratoire, gants jetables, masques, lunettes de protection)
- appareil photo, scène photographique et scanner
- ordinateur et imprimante
- réfrigérateur

8.4.3.1 Séchage à l'air

Les échantillons peuvent être séchés à l'aide d'un dessiccateur d'aliments, d'un four ventilé ou simplement d'une boîte ou d'une armoire avec un ventilateur à l'intérieur de la boîte pour maintenir la circulation d'air et faciliter le séchage.

Note : Certaines collections de référence de phytopathogènes et d'herbiers utilisent des fours à micro-ondes pour sécher les spécimens ; cependant, cela n'est pas recommandé car certaines parties de la plante peuvent exploser et le processus de chauffage endommage l'ADN du spécimen, qui pourrait être utilisé pour un travail moléculaire futur.

Les contenants d'échantillons peuvent être des enveloppes d'herbier, des enveloppes postales, des boîtes en plastique hermétiques ou des sacs en plastique refermables sur mesure.

Procédure de séchage à l'air des échantillons

- Étendre les échantillons sur des plateaux pour faciliter le séchage.
- Mettre les plateaux dans le séchoir et mettre le séchoir en marche.
- Prélever les échantillons lorsqu'ils sont bien séchés.
- Étiqueter les contenants pour chaque spécimen avec un numéro de spécimen unique.
- Placer les échantillons séchés dans des récipients étiquetés.
- Congeler les récipients contenant des échantillons à -18 °C pendant 2 jours pour tuer les parasites de l'herbier. *Note* : mettre les contenants en papier (p. ex. enveloppes d'herbier, enveloppes) dans des sacs de plastique refermables avant de les congeler pour éviter l'accumulation de condensation d'eau.
- Essuyer toute condensation d'eau sur la surface des contenants.
- Entreposer les contenants d'échantillons dans le système d'entreposage.
- Mettre à jour la base de données de l'herbier.

8.4.3.2 Pressage

Liste des équipements, consommables et réactifs :

- papier journal ou buvard
- planches de bois (des presses d'usine de fabrication commerciale sont disponibles)
- sangles
- pondération
- chemise en papier
- cordes (par ex. fil dentaire, fil de coton)

- utilisez des rubans de haute qualité pour éviter qu'ils ne se détachent de l'échantillon après quelques années)

Procédé pour presser des échantillons secs

- Poser et disposer les échantillons entre les feuilles de journaux (ou de papier buvard). *Note* : Plier les longues tiges en forme de V ou de W.
- Écrire le numéro de l'échantillon sur une feuille de papier et placez-le avec l'échantillon.
- Ajouter des journaux supplémentaires entre les échantillons pour absorber l'humidité.
- Ecraser la pile de journaux entre deux planches de bois.
- Attacher les sangles autour de la pile et serrer les sangles.
- Placer un poids lourd sur le dessus de la pile pour appliquer une pression supplémentaire.
- Garder la pile dans un endroit chaud et sec.
- Positionner correctement les échantillons après quelques heures ou une journée de pressage.
- Changer le journal tous les jours pendant les premiers jours, puis moins fréquemment, en fonction des conditions des échantillons et de l'humidité relative. *Note* : Certains spécimens de plantes deviennent brun- foncé si les journaux n'ont pas été changés fréquemment pour sécher les spécimens. Les journaux usagés doivent être jetés ou complètement séchés avant d'être réutilisés.
- Examiner les échantillons régulièrement pour prévenir la moisissure.
- Prélever des échantillons bien séchés.
- Étiqueter les chemises en papier avec le numéro de l'échantillon.
- Poser et fixer les échantillons sur des chemises en papier à l'aide de ficelles et de rubans adhésifs.
- Mettre à jour la collection de référence sur les agents pathogènes des plantes et la base de données de l'herbier.

8.4.3.3 Séchage avec des desséchants

Liste des équipements, consommables et réactifs :

- produits déshydratants, p. ex. chlorure de calcium ou billes de gel de silice hydroabsorbantes (remarque : se reporter

- aux directives nationales pour l'élimination appropriée de ces produits chimiques toxiques)
- récipients de stockage avec bouchons à vis (en plastique ou en verre)
- du coton ou du papier essuie-tout (pour éloigner le chlorure de calcium des tissus végétaux).

Préparation du récipient

- Ajouter du desséchant au fond du récipient en plastique. *Note* : porter des gants, un masque facial et des lunettes de protection lors de la manipulation de ce produit chimique.
- Insérer du coton ou du papier essuie-tout au fond du contenant pour créer une barrière entre le chlorure de calcium et les tissus végétaux.
- Insérer une étiquette contenant au moins un numéro d'identification unique.

Préparation de l'échantillon

- Sélectionner les tissus végétaux à conserver. Ceux-ci doivent être aussi frais que possible et contenir les symptômes. *Note* : Les tissus secs ou cariés doivent être évités. Porter des gants lors de la manipulation de matériel végétal infecté. Conserver les échantillons sur de la glace en tout temps.
- Enlever toute humidité en séchant doucement la surface avec un essuie-tout.
- Couper le tissu végétal en morceaux à l'aide d'une lame de scalpel ou de rasoir sur une planche à découper propre et désinfectée. *Note* : Entre deux manipulations de matériel végétal infecté par différents organismes, changez de gants, jetez la lame de rasoir jetable, désinfectez la planche à découper et la lame avec un désinfectant comme une solution d'éthanol à 70 %, de Virkon ou d'eau de Javel, ou des lingettes comme Isowipes, Mediowipes, Trigène ou V-wipes.

Séchage et stockage des échantillons

- Placer les morceaux de tissu végétal dans le contenant en plastique.
- Fermer hermétiquement le récipient en plastique.
- Étiqueter le contenant à l'aide d'un autocollant écrit à l'encre ou au crayon permanent ou

écrivez directement sur le contenant à l'encre permanente. *Note* : Les informations minimales à faire figurer sur l'étiquette sont le nom scientifique du matériel végétal et un numéro d'identification unique.

- Conserver à température ambiante dans un endroit sec et frais.
- Mettre à jour la base de données de l'herbier.

8.4.3.4 Lyophilisation

Liste des équipements, consommables et réactifs :

- réfrigérateur ou chambre froide à 4 °C
- lyophilisateur
- flacons, joints en caoutchouc et bouchons à vis pour lyophilisateur
- billes de gel de silice hydroabsorbantes, laine d'ouate ou essuie-tout
- lames de scalpel ou de rasoir
- gants jetables
- planche à découper
- désinfectant (p. ex. 70 p. 100 d'éthanol ; lingettes, p. ex. Trigène)
- étiquettes en papier (à insérer à l'intérieur des flacons)
- étiquettes collantes (à coller sur le bouchon des flacons)
- marqueurs, stylo
- une base de données informatique ou une feuille de papier d'enregistrement.

Préparation du flacon

- Verser quelques billes de gel de silice hydroabsorbantes dans chaque flacon (3-5 flacons par échantillon).
- Insérer fermement un coton ou un essuie-tout dans le fond du flacon pour créer une barrière entre les billes de gel de silice et l'échantillon.
- Insérer une étiquette contenant au moins un numéro d'identification unique.

Préparation de l'échantillon

- Sélectionner les tissus végétaux à conserver. Il doit être aussi frais que possible et symptomatique. *Note* : Les tissus secs ou cariés doivent être évités. Porter des gants lors de la manipulation de matériel végétal infecté. Conserver les échantillons sur de la glace en tout temps.

- Couper le tissu végétal en petits morceaux à l'aide d'une lame de scalpel ou de rasoir sur une planche à découper propre et désinfectée. *Note* : Entre le matériel végétal infecté par différents organismes, changer de gants, jeter la lame de rasoir jetable, désinfecter la planche à découper et la lame de scalpel avec un désinfectant tel qu'une solution d'éthanol à 70 %, de Virkon ou d'eau de Javel, ou des lingettes de Isowipes, Mediwipes, Trigene ou Vwipe.
- Transférer environ 0,5 g de tissu végétal haché dans un flacon en verre préparé avec étiquette.

Séchage et stockage des échantillons

- Placer toutes les fioles sur le support métallique du lyophilisateur.
- Poser le joint d'étanchéité en caoutchouc de façon lâche sur l'embouchure de la fiole.
- Placer la grille avec les échantillons préparés dans la chambre du lyophilisateur.
- Faire fonctionner le lyophilisateur toute la nuit. *Note* : La couleur du gel de silice doit être bleu foncé lorsque l'échantillon est complètement sec.
- Fermer les flacons en abaissant le mécanisme d'obturation.
- Visser le capuchon en plastique.
- Mettre un numéro de référence sur le dessus du capuchon.
- Placer les flacons dans un réfrigérateur à 4 °C pour une conservation à long terme. *Remarque* : Si le gel de silice passe du bleu au rose, cela indique que le sceau du flacon fuit probablement de l'humidité et que les tissus végétaux à l'intérieur doivent être séchés de nouveau immédiatement ou jetés.
- Mettre à jour la collection de référence sur les agents pathogènes des plantes et la base de données de l'herbier.

8.4.3.5 Congélation

Liste des équipements, consommables et réactifs :

- contenants d'entreposage (en plastique ou en verre) avec bouchons à vis ou sacs de plastique pouvant être scellés
- coton ou papier essuie-tout pour retirer le chlorure de calcium des tissus végétaux
- étiquettes collantes pour la congélation

- marqueurs ou crayons
- lames de scalpel ou de rasoir
- gants jetables
- planche à découper
- désinfectant (p. ex. solution d'éthanol à 70 %, Virkon, eau de Javel ; lingettes, p. ex. Trigene).
- ordinateur/base de données ou feuille de papier d'enregistrement.

Préparation du récipient

- Préparer une étiquette collante contenant au moins un numéro d'identification unique ou écrire directement à l'encre permanente sur le récipient ou le sac plastique. *Note* : Le marqueur à l'extérieur peut se dégrader avec le temps.
- Facultatif : Une étiquette en papier peut également être insérée à l'intérieur du contenant ou du sac en plastique.

Préparation de l'échantillon

- Sélectionner les tissus végétaux à conserver : Le tissu végétal doit être aussi frais que possible et symptomatique. *Note* : Les tissus secs ou cariés doivent être évités. Porter des gants lors de la manipulation de matériel végétal infecté. Conserver les échantillons sur de la glace en tout temps.
- Enlever toute humidité en séchant doucement la surface avec un essuie-tout.
- Aplatir les tissus végétaux, si possible.
- Placer le tissu végétal dans le contenant étiqueté ou le sac en plastique et le fermer. *Note* : Entre deux manipulations de plantes contenant des tissus infectés par différents organismes, changer de gants, jeter la lame de rasoir jetable, désinfecter la planche à découper et la lame de scalpel avec un désinfectant tel qu'une solution d'éthanol à 70 %, Virkon ou un agent de blanchiment, ou des lingettes Isowipes, Mediwipes, Trigene ou Vwipes.

Stockage des échantillons

- Conserver l'échantillon dans un congélateur à -20 °C ou, de préférence, à -80 °C. *Note* : Éviter la décongélation et la congélation multiples car cela endommagerait les tissus de la plante.
- Mettre à jour la collection de référence sur les agents pathogènes des plantes et la base de données de l'herbier.

8.4.3.6 Plastification

Liste des équipements, consommables et réactifs :

- lplastifieuse
- feuilles de plastification

Procédé pour plastifier des échantillons secs

- Poser et disposer les échantillons entre les feuilles de plastification.
- Écrivez le numéro de l'échantillon sur une feuille de papier et placez-le avec l'échantillon. Vous pouvez aussi écrire sur la feuille de laminage après le laminage.
- Allumer la plastifieuse et attendre qu'elle soit chaude et prête pour la plastification.
- Faire passer les feuilles de pelliculage avec l'échantillon dans la pelliculeuse.
- Éteindre la plastifieuse.
- Mettre à jour la collection de référence sur les agents pathogènes des plantes et la base de données de l'herbier.

8.4.3.7 Macération

Liste des équipements, consommables et réactifs :

- récipients en verre étanches à l'air
- agents de conservation (p. ex., l'éthanol à 70 p. 100).

Procédures de préparation des échantillons marinés

- Égoutter l'excès de liquide s'il y a lieu.
- Mettre l'échantillon dans un récipient en verre rempli d'agent de conservation. *Note* : Assurez-vous que l'échantillon est immergé dans l'agent de conservation et que le couvercle du récipient en verre est bien scellé.
- Étiqueter le contenant en verre avec le numéro de l'échantillon et le type d'agent de conservation utilisé. Remplacez l'agent de conservation une ou plusieurs fois pour les échantillons ayant une forte teneur en eau.
- Mettre à jour la collection de référence sur les agents pathogènes des plantes et la base de données de l'herbier.

8.4.3.8 Cultures vivantes

Les cultures vivantes de champignons et de bactéries peuvent être maintenues par un transfert fréquent

des cultures sur un milieu de culture frais. Conserver les cultures au réfrigérateur (4 °C) ou immergées sous l'huile minérale peut prolonger le temps entre deux cultures. Les cultures fongiques qui forment des spores peuvent être conservées par lyophilisation dans des ampoules en verre scellées. La plupart des cultures peuvent être conservées pendant des années dans des congélateurs (à -20 °C ou -40 °C) et des surgélateurs (à -80 °C), et des décennies dans les congélateurs cryogéniques (en dessous de -135 °C) et dans la vapeur d'azote liquide, avec le taux de survie le plus élevé obtenu par ces deux dernières méthodes. Cependant, les oomycètes, comme le *Pythium* et le *Phytophthora*, se conservent mieux dans des fioles de verre avec de l'eau et dans un réfrigérateur (4 °C). Les détails de ces méthodes sont disponibles dans les références ci-dessous.

Kirsop, B.E. & Doyle, A. 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods*, 2nd edition. Academic Press. 288 pp.

Smith, D. & Onions, A.H.S. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*, 2nd edition. UK, International Mycological Institute. 132 pp.

Waller, J.M., Lenné, J.M. & Waller, S.J., eds. 2001. *Plant pathologist's pocketbook*, 3rd edn. Wallingford, UK, CAB International. 528 pp.

8.4.4 Étiquetage et enregistrement des données

Chaque agent pathogène des plantes de la collection de référence et chaque spécimen d'herbier doit être étiqueté avec un numéro de spécimen unique. Les informations supplémentaires ci-dessous peuvent être enregistrées sur l'étiquette ou dans une base de données séparée :

- nom scientifique de la plante
- nom scientifique des agents pathogènes
- partie ou substrat végétal
- adresse et coordonnées GPS du site de collecte
- nom du collecteur
- date de prélèvement
- nom de l'identificateur
- date d'identification
- technique utilisée pour l'identification
- date de conservation
- images

- symptômes observés sur les plantes
- notes de terrain
- les caractéristiques éphémères (couleur, odeur, forme) avant séchage.

Chaque lame de microscope doit porter le numéro unique de l'échantillon à partir duquel elle a été préparée. Il est également recommandé d'inscrire les renseignements supplémentaires ci-dessous sur l'étiquette :

- nom du pathogène
- nom de l'hôte de la plante
- nom de l'identificateur
- date d'identification.

8.5 Autres collections de référence

8.5.1 Matériau de référence divers

Les extraits d'acide nucléique obtenus à partir de ravageurs, de pathogènes et de matériel végétal infecté peuvent être conservés dans un congélateur à -80°C comme matériel génétique de référence. L'ADN peut être conservé beaucoup plus longtemps car il est plus stable que l'ARN. Dans tous les cas, évitez la décongélation et la congélation multiples car cela affectera la qualité des acides nucléiques.

Les grilles utilisées dans les microscopes électroniques à transmission pour visualiser les pathogènes peuvent être stockées comme matériel de référence. Ces grilles peuvent être conservées pendant de nombreuses années dans un environnement sec et frais.

8.5.2 Collections internationales de référence

Dans la mesure du possible, un échantillon des espèces conservées doit être envoyé aux collections internationales de référence. Certains pays peuvent également avoir leurs propres collections de référence dans des musées ou des universités. Les instituts désireux d'avoir une collection de référence devraient tenir à jour une base de données claire qui devrait être facilement accessible aux autres chercheurs à l'échelle nationale et internationale.

Exemples de collections internationales d'arthropodes et leurs abréviations :

BMNH Natural History Museum, London
 BPBM Bishop Museum, Honolulu, Hawaii
 NMNW Namibian National Insect Collection, Windhoek, Namibia (E. Marais)

NMSA Natal Museum, Pietermaritzburg, KwaZulu-Natal, South Africa (M. Mostovski)
 PCV P Cerretti collection, Verona, Italy
 SMNS Staatliches Museum für Naturkunde, Stuttgart, Germany (H.-P. Tschorsnig)
 TAU Department of Zoology, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel (A. Freidberg)
 TZC Theo Zeegers collection, Soest, The Netherlands
 ZMAN Zoologisch Museum, Amsterdam, The Netherlands (B. Brugge)
 NZAC New Zealand Arthropod Collection, Auckland.

Une liste complète des collections de référence sur les phytopathogènes et les herbiers est disponible sur le site Web de l'Index Herbariorum tenu à jour par le New York Botanical Garden.

Quelques autres exemples d'herbiers internationaux pour les micro-organismes sur les plantes sont :

- Purdue Agriculture, Purdue Herbaria - Arthur Fungarium (PUR): <https://ag.purdue.edu/btny/Herbaria/Pages/arthur.aspx>
- Cornell University Plant Pathology Herbarium (CUP): <http://www.plantpath.cornell.edu/CUPpages/index.html>
- New South Wales Department of Primary Industries Plant Pathology Herbarium (HERB-DAR): <http://www.dpi.nsw.gov.au/aboutus/services/collections/herbarium>
- The New York Botanical Garden (NYBG): <http://sciweb.nybg.org/science2/Mycology.asp>
- Landcare Research. New Zealand Fungal & Plant Disease Collection (PDD): <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/pdd>
- Natural Resources Canada. Pacific Forestry Centre's Forest Pathology Herbarium (DAVFP): <http://www.nrcan.gc.ca/forests/research-centres/pfc/13493>
- DAFF Plant Pathology Herbarium and Insect Collection, Australia (BRIP): <http://collections.daff.qld.gov.au/web/home.html>
- **Farr, D.F. & Rossman, A.Y.** *Fungal databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.* <http://nt.ars-grin.gov/fungalbases/>

Une liste complète des collections de culture est disponible sur le site Web de la Fédération mondiale des collections de cultures (WFCC). Le Catalogue mondial des micro-organismes fournit une base de données en ligne pour les souches microbiennes conservées dans de nombreuses collections internationales.

Voici d'autres exemples de collections internationales de cultures de micro-organismes sur les plantes:

- Agdia: <http://www.agdia.com/>
- American Type Culture Collection (ATCC): <http://www.atcc.org/>
- Centraalbureau voor Schimmelcultures - CBS-KNAW Collections: <http://www.cbs.knaw.nl/collections/>
- CABI Microbial services: <http://www.cabi.org/services/microbial-services/culture-collection/>
- Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures: <http://www.dsmz.de/>
- International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP): <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/icmp>
- Japan Collection of Microorganisms (JCM): <http://www.jcm.riken.jp/>
- LOEWE: http://www.loewe-info.com/index.php?cp_sid=142506643c4&cp_tpl=5501
- CAB International. The United Kingdom National Culture Collection (UKNCC): <http://www.ukncc.co.uk/>

8.5.3 Collections de référence virtuelle

Quelques exemples de collections virtuelles sont :

- CABI Crop Protection Compendium: <http://www.cabi.org/cpc>
- CABI Forestry Compendium: <http://www.cabi.org/fc/>
- PaDIL - High quality images and information tools designed for biosecurity and biodiversity: <http://www.padil.gov.au/>
- Plantwise Knowledge Bank: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/home.aspx>
- Forestry Images: <http://www.forestryimages.org/>
- University of Maine plant disease images: <http://extension.umaine.edu/ipm/ipddl/plant-disease-images/>
- AntWeb - the world's largest online database

of images, specimen records and natural history information on ants: http://www.antweb.org/user_guide.jsp

8.5.4 Prélèvement de référence de séquence d'ADN

Plusieurs bases de données de séquences sont disponibles.

Tous les organismes

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank sequence database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems): <http://www.boldsystems.org/>
- Q-Bank - Comprehensive databases on quarantine plant pests and diseases: <http://www.q-bank.eu/>

Champignons

- MycoBank: <http://www.mycobank.org/>
- Fusarium-ID: <http://isolate.fusariumdb.org/index.php>
- Phytophthora database: <http://www.phytophthoradb.org/>
- Phytophthora-ID: <http://phytophthora-id.org/seq-id.html>
- Pythium Genome Database: <http://pythium.plantbiology.msu.edu/>

Bactéries

- Plant Associated and Environmental Microbes Database (PAMDB.org): <http://genome.ppps.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>

Nématodes

- WormBase for the genetics of nematodes: <http://www.wormbase.org>

Insectes

- BeeBase for bee research: <http://hymenoptera.genome.org/beebase/>
- FlyBase: a database of *Drosophila* genes and genomes: <http://flybase.org>
- BeetleBase for *Tribolium castaneum* genetics, genomics and developmental biology: <http://beetlebase.org>

9. Rapportage

Introduction

Une fois le travail de diagnostic terminé, les détails d'identification doivent être communiqués à l'auteur de la demande dans les délais convenus. Il est important qu'un autre membre du personnel compétent vérifie le rapport final avant de l'envoyer à son auteur, afin d'éviter les erreurs.

La réponse-type devrait :

- être aussi brève que possible
- être formulée avec soin
- fournir, dans la mesure du possible, les informations demandées par l'auteur de la communication
- ne pas dépasser le niveau de compétence du membre du personnel
- ne pas dépasser le niveau d'autorité de l'identification.

Le rapport final devrait contenir :

- toutes les informations sur l'auteur de la demande
- toutes les informations sur l'échantillon
- tous les tests effectués
- le nom scientifique du ravageur et de la maladie en suivant le format accepté, p. ex. pour l'entomologie : *Genre espèce* [ORDRE : Famille].
- les signatures des identificateurs
- le détail des échantillons supplémentaires trouvés (le cas échéant)
- et, le cas échéant :
 - état de vie/mort
 - l'organisme nuisible/le statut réglementaire
 - le nombre d'organismes et leur stade de développement
 - la date et heure de la réponse
 - les noms des identificateurs en caractères d'imprimerie
 - les coûts.

Il est important de prouver qu'une réponse a été envoyée au demandeur, en particulier :

- ce qui a été envoyé
- comment il a été envoyé
- quand il a été envoyé
- qui l'a envoyé.

Rapport intermédiaire

Il est recommandé d'envoyer une réponse provisoire lorsque l'identification ne peut être achevée dans le délai convenu.

Amendement au rapport final

Lorsque le contenu d'un rapport est manquant ou incorrect (p. ex. l'identification d'organismes ou le résultat d'analyse est incorrect), un rapport modifié doit être envoyé au déclarant. Générez à nouveau le rapport final et assurez-vous que ce nouveau rapport contient un message supplémentaire indiquant que ce rapport remplace le numéro de rapport : XXXXXXXX ou qu'il remplace le rapport émis le jj/mm/aaaaa.

Nouveau signalement

Il incombe au personnel de diagnostic de veiller à ce que la direction du laboratoire soit informée dès que possible des catégories d'identification suivantes :

- toute identification susceptible d'être nouvelle dans le pays
- toute identification d'un organisme indésirable en attente de confirmation
- toute découverte significative d'un organisme de réponse.

Ces nouvelles identifications doivent être confirmées soit par un autre scientifique, soit par un expert reconnu au niveau national ou international.

10. Le devenir de l'échantillon

Introduction

Les laboratoires de diagnostic doivent envisager le meilleur moyen de traiter un échantillon une fois qu'il a été entièrement analysé et que le rapport de diagnostic final a été publié.

Les échantillons peuvent être éliminés d'une manière appropriée à leur risque pour la biosécurité ou conservés pour une utilisation ultérieure.

10.1 Mise au rebut

Avant de décider de se débarrasser d'un échantillon, le laboratoire devrait considérer la nécessité de le conserver comme preuve. Voir la section 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*) pour de plus amples renseignements dans ce domaine. L'échantillon doit également tenir compte de la valeur de l'échantillon en vue d'une utilisation future, tel que décrit ci-dessous.

Si un échantillon est considéré comme n'ayant plus aucune valeur, il doit être éliminé d'une manière qui le rend inerte face aux risques phytosanitaires. Des installations pour ce faire devraient exister dans le laboratoire, tel que décrit au chapitre 2.

10.2 Conservation de l'échantillon ou du spécimen

Un laboratoire peut choisir de conserver des échantillons et leurs spécimens associés pour de nombreuses raisons.

Dans le contexte phytosanitaire, la rétention d'échantillons peut être importante afin de fournir des preuves en cas de non-respect des exigences, d'actions en justice résultant de mesures phytosanitaires ou de différends commerciaux. Voir la section 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Les échantillons peuvent également être conservés en raison de leur valeur diagnostique comme échantillons de référence ou ils peuvent représenter le premier signalement d'un ravageur dans une région. Dans ce dernier cas, cette preuve pourrait être utilisée à titre officiel par une ONPV à des fins telles que la déclaration des organismes nuisibles (NIMP 17), la détermination du statut d'un organisme nuisible d'un pays (NIMP 8) et les zones indemnes (NIMP 4).

Si un échantillon ou un spécimen a une bonne valeur diagnostique de référence, il peut être conservé au laboratoire ou dans une autre collection pour faciliter les diagnostics futurs ou à des fins de formation. Les critères de sélection des spécimens de référence supplémentaires comprennent, sans s'y limiter, ce qui suit :

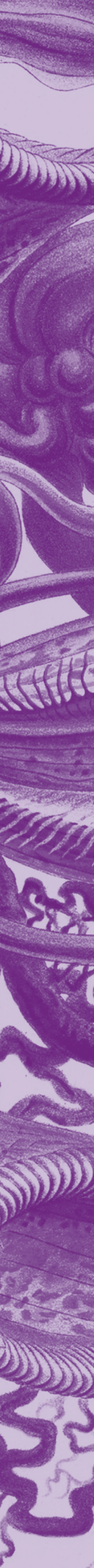
- des espèces nouvelles pour la collection
- des spécimens qui sont en meilleur état que ceux qui font déjà partie de la collection
- un nouveau signalement dans le pays d'origine
- pour le matériel de formation, p. ex. des projets
- pour la photothèque

Vous trouverez plus de détails sur la conservation des échantillons et des spécimens pour ces utilisations au chapitre 8.

Section 3 : Autres sources d'information

Introduction

Internet donne accès à une vaste gamme d'informations pour étayer le diagnostic et le développement de l'expertise. La section 5.5 fournit des informations sur les principaux matériaux de référence pour les organismes nuisibles ainsi que sur les centres d'excellence et les bases de données d'experts.



Bibliographie

- Barnet, H.L. & Hunter, B.B.** 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 3rd edn. Minneapolis, MN, Burgess.
- Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J. & Mumford, R.** 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 355–363. DOI: 10.1007/978-1-4020-8780-6_15.
- Boonham, N., Tomlinson, J. & Mumford, R.** 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 307–328. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349.
- Bradbury, J.F.** 1985. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Wallingford, UK, CAB International. 332 pp.
- CABI & EPPO.** 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International and Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1425 pp.
- Cannon, R.J.C., Pemberton, A.W. and Bartlett, P.W.** 1999. Appropriate measures for the eradication of unlisted pests. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*, 29: 29–36.
- Coolen, W.A. & D'Herde, C.J.** 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Ghent, Belgium, Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.
- Decraemer, W. & Hunt, D.J.** 2006. Structure & classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 3–32. Wallingford, UK, CAB International.
- Ellis, M.B. & Ellis, J.P.** 1997. *Microfungi on land plants: an identification handbook*. Slough, UK, Richmond Publishing. 868 pp.
- EPPO.** 2013a. Diagnostic: PM 7/119 (1) Nematode extraction. *EPPO Bulletin*, 43: 471–495.
- EPPO.** 2013b. *Diagnostic protocols for regulated pests: pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (rev. 4). Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. Available at http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf (last accessed on 16 September 2015).
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K.** 1996., *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society. 592 pp.
- Fenwick, D.W.** 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18: 155–172.
- Flegg, J.J.M. & Hooper, D.J.** 1970. Extraction of free-living stages from soil. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, pp. 5–22. Technical Bulletin 2. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Hockland, S., Inserra, R.N., Millar, L. & Lehman, P.S.** 2006. International plant health – putting legislation into practice. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 327–345. Wallingford, UK, CAB International.
- Hooper, D.J. & Evans, K.** 1993. Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes. In K. Evans, D.M. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 1–60. Wallingford, UK, CAB International.
- Hooper, D.J.** 1986. Extraction of nematodes from plant tissue. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Reference Book 402, 6th edn, pp. 51–58. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Hooper, D.J., Hallmann, J. & Subbotin, S.A.** 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 53–86. Wallingford, UK, CAB International.
- IMI descriptions of fungi and bacteria*. Wallingford, UK, CAB International. Available at <http://www.cabi.org/dfb/> (last accessed on 16 September 2015).
- Janse, J.D.** 2010. *Phylobacteriology: principles and practice*. Wallingford, UK, CAB International. 368 pp.
- Lelliott, R.A. & Stead, D.E.** 1991. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford, Wiley. 224 pp.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A.** 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Oxford, Blackwell. 388 pp.

- Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J., eds. 2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 896 pp.
- Manzanilla-López, R.H. & Marbán-Mendoza, N., eds. 2012. *Practical plant nematology*. Mexico City, Biblioteca Básica de Agricultura, Grupo Mundi-Prensa. 883 pp.
- Monger, W.A., Alicai, T., Ndunguru, J., Kinyua, Z.M., Potts, M., Reeder, R.H., Miano, D.W., Adams, I.P., Boonham, N., Glover, R.H. & Smith, J. 2010. The complete genome sequence of the Tanzanian strain of *Cassava brown streak virus* and comparison with the Ugandan strain sequence. *Archives of Virology*, 155: 429–433. DOI:10.1007/s00705-009-0581-8.
- Seinhorst, J.W. 1962. On the killing, fixing and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica*, 8: 29–32.
- Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 864 pp.
- Smith, J.J., Waage, J., Woodhall, J.W., Bishop, S.J. & Spence, N.J. 2008. The challenge of providing plant pest diagnostic services for Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 365–375.
- Snowdon, A.L. 2010a. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1. *General introduction and fruits*. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.
- Snowdon, A.L. 2010b. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 2. *Vegetables*. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.
- Tarjan, A.C. 1967. Influence of temperature and hydrogen peroxide on the extraction of burrowing nematodes from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 51: 1024–1028.
- Tarjan, A.C. 1972. Observations on extracting citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 56: 186–188.
- Tomlinson, J. & Boonham, N. 2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 1–7.
- Weller, S.A., Aspin, A. & Stead, D.E. 2008. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *EPPO Bulletin*, 06/2008; 30(3–4): 375–380. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00914.x.
- Weigers, A.L. 2003. Valid methods: the quality assurance of test method development, validation, approval, and transfer for veterinary testing laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15(4): 303–310.
- Winfield, A.L., Enfield, M.A. & Foremann, J.H. 1987. A column elutriator for extracting cyst nematodes and other small invertebrates from soil samples. *Annals of Applied Biology*, 111: 223–231. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1987.tb01449.x.

Crédits

Les figures, diagrammes et images utilisés dans ce manuel ont été développés ou fournis par le Plant Health and Environment Laboratory (PHEL) de Nouvelle-Zélande et Fera Science Ltd du Royaume-Uni, sauf indication contraire.

Crédits photographiques:

Page 8 : Oliver Jeffrey/IITA (Creative Commons Attribution-NonCommercial 2.0 Generic). Page 76 : JKI, Allemagne.

Page 96, figure 30 : Mark Stanaway

Page 97 : (à gauche) Skyid Wang ; (au centre) Green Ink.

Page 103, les deux images: Forest et Kim Starr, Starr Environmental, Bugwood.org (Licence Creative Commons Attribution 3.0). Page 104, figure 35 : Notafly, Wikimedia Commons (Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported).

Page 104, figure 36, les deux images : Forest et Kim Starr, Starr Environmental, Bugwood.org (Licence Creative Commons Attribution 3.0.).

Page 104, figure 37: Notafly, Wikimedia Commons (Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported).

Page 105, les deux images: Pest and Diseases Image Library, Bugwood.org (Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 United States License).

Illustrations :

Page 78: Reproduit de Decraemer, W. & Hunt, D.J. 2013. Taxonomy, systematics and principal genera: structure and classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. Plant nematology, 2nd edn, 3–39. Wallingford, UK: CAB International, with permission. [A. From Coomans (1985), B. Adapted from Endo (1980), C. From Maafi and Decraemer (2002).]

Page 79: Reproduit de Decraemer, W. & Hunt, D.J. 2013. Taxonomy, systematics and principal genera: structure and classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. Plant nematology, 2nd edn, 3–39. Wallingford, UK: CAB International, with permission. [A: From Decraemer et al. (1998). B: From Decraemer and De Waele (1981). C: From Siddiqi (1986). D: From Shepherd et al. (1980).]

CIPV

La convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV) est un accord phytosanitaire international qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination des organismes nuisibles. Les voyages et le commerce internationaux sont plus importants que jamais. Au fur et à mesure que les personnes et les marchandises se déplacent dans le monde, les organismes qui présentent des risques pour les plantes voyagent avec eux.

L'organisation

- ┆ Le nombre de parties contractantes signataires de la Convention dépasse 181.
- ┆ Chaque partie contractante a une organisation nationale de protection des végétaux (ONPV) et un point de contact officiel de la CIPV.
- ┆ 10 organisations régionales de protection des végétaux (ORPV) ont été créées pour coordonner les ONPV dans diverses régions du monde.
- ┆ La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider à renforcer les capacités régionales et nationales.
- ┆ Le Secrétariat est assuré par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO-ONU).

