

Une structure indispensable pour l'étude des insectes exotiques envahissants ou potentiellement envahissants : le laboratoire de quarantaine

Olivier Denux¹, Alain Roques¹

Résumé. Le nombre d'espèces exotiques d'insectes est en constante augmentation en France, tout comme dans le reste de l'Europe, et plus particulièrement durant les dernières décennies. Si la plupart des espèces exotiques qui s'établissent ne causent apparemment que peu de dégâts notables à l'heure actuelle, certaines ont un impact important notamment sur le secteur agronomique et forestier. Consciente de ce problème, l'Union européenne a mis en place des mesures de contrôle, d'éradication et d'interdiction du territoire de ces organismes, dit de quarantaine. Compte-tenu de l'importance à accorder à la connaissance scientifique de ces organismes, un régime dérogatoire a été institué pour la détention, la manipulation et la mise en circulation des organismes de quarantaine à des fins scientifiques. Ce régime dérogatoire passe notamment par la nécessité d'avoir un laboratoire de quarantaine pour étudier ces espèces. Nous présentons ici les bases de la législation et des prérogatives, avec l'exemple du fonctionnement concret de notre laboratoire de quarantaine attaché à l'Unité de recherche de Zoologie forestière de l'INRA Val-de-Loire.

Mots clés : confinement, réglementation, organisme de quarantaine, xylophage, phytophage

Introduction

Avec l'intensification des échanges de toutes sortes, en particulier commerciaux, correspondant au phénomène de mondialisation, on assiste depuis la deuxième moitié du 20^e siècle à une augmentation exponentielle de l'arrivée d'espèces exotiques d'insectes introduites d'un continent à l'autre (Roques et al., 2016). Alors qu'un certain nombre d'espèces était précédemment introduit de façon intentionnelle, en particulier pour la lutte biologique, la grande majorité arrive désormais de manière accidentelle en accompagnant les marchandises transportées, notamment les plantes (Roques, 2010). Parmi ces espèces, certaines sont capables de se reproduire et forment des populations pérennes leur permettant de s'établir dans l'écosystème d'accueil (Kolar et Lodge, 2001). Les espèces ainsi établies restent pour la plupart discrètes et indétectables. Mais quelques-unes sont rapidement décelées par les différents impacts qu'elles peuvent engendrer sur l'environnement, la santé ou encore l'économie. L'Union européenne s'est dotée de moyens pour tenter de réduire l'arrivée et l'impact de ces organismes nuisibles. Elle a dressé un inventaire des organismes nuisibles considérés comme les plus dangereux et non encore présents dans l'Union européenne ou avec une distribution restreinte sur le continent européen. Ces organismes, que l'on qualifie comme "organismes de quarantaine", sont listés dans les annexes de la Directive 2000/29/CE du Parlement européen. Pour l'ensemble des espèces de ces listes, leur introduction directe ou par l'intermédiaire de certains végétaux, produits végétaux ou autres objets est interdite dans l'espace de l'Union européenne. Les travaux scientifiques n'échappent pas à cette réglementation. Mais compte-tenu de l'importance à accorder à la connaissance scientifique de ces organismes, un régime dérogatoire a été institué pour la détention, la manipulation et la mise en circulation des organismes de quarantaine. Néanmoins, on doit aussi considérer que la majorité des espèces exotiques d'insectes ayant réussi à s'établir en Europe durant les 25 dernières années ne correspond pas à celles qui sont retenues sur les listes de quarantaine, et est rarement interceptée par les services phytosanitaires. Eschen et al. (2015) ont ainsi établi que seulement six espèces ont été interceptées en Europe durant la période 1995-2010.

1 Zoologie forestière, INRA, 45075 Orléans, France
olivier.denux@inra.fr

Laboratoire de quarantaine : aspects législatifs et pratiques

Les modalités de circulation et de détention d'organismes de quarantaine² pour des buts scientifiques sont définies dans la directive européenne 95/44/CE du 26 juillet 1995, abrogée et remplacée par la directive 2008/61/CE du 17 juin 2008. Cette directive européenne impose, aux laboratoires qui souhaitent mener des activités de recherche sur des organismes de quarantaine, l'obtention d'un agrément (**Figure 1**). Celui-ci définit si les conditions matérielles et de manipulations prévues dans le laboratoire, dit «de quarantaine», sont en adéquation avec les conditions de sécurité nécessaires pour les organismes de quarantaine qui seront étudiés, et pour le personnel.

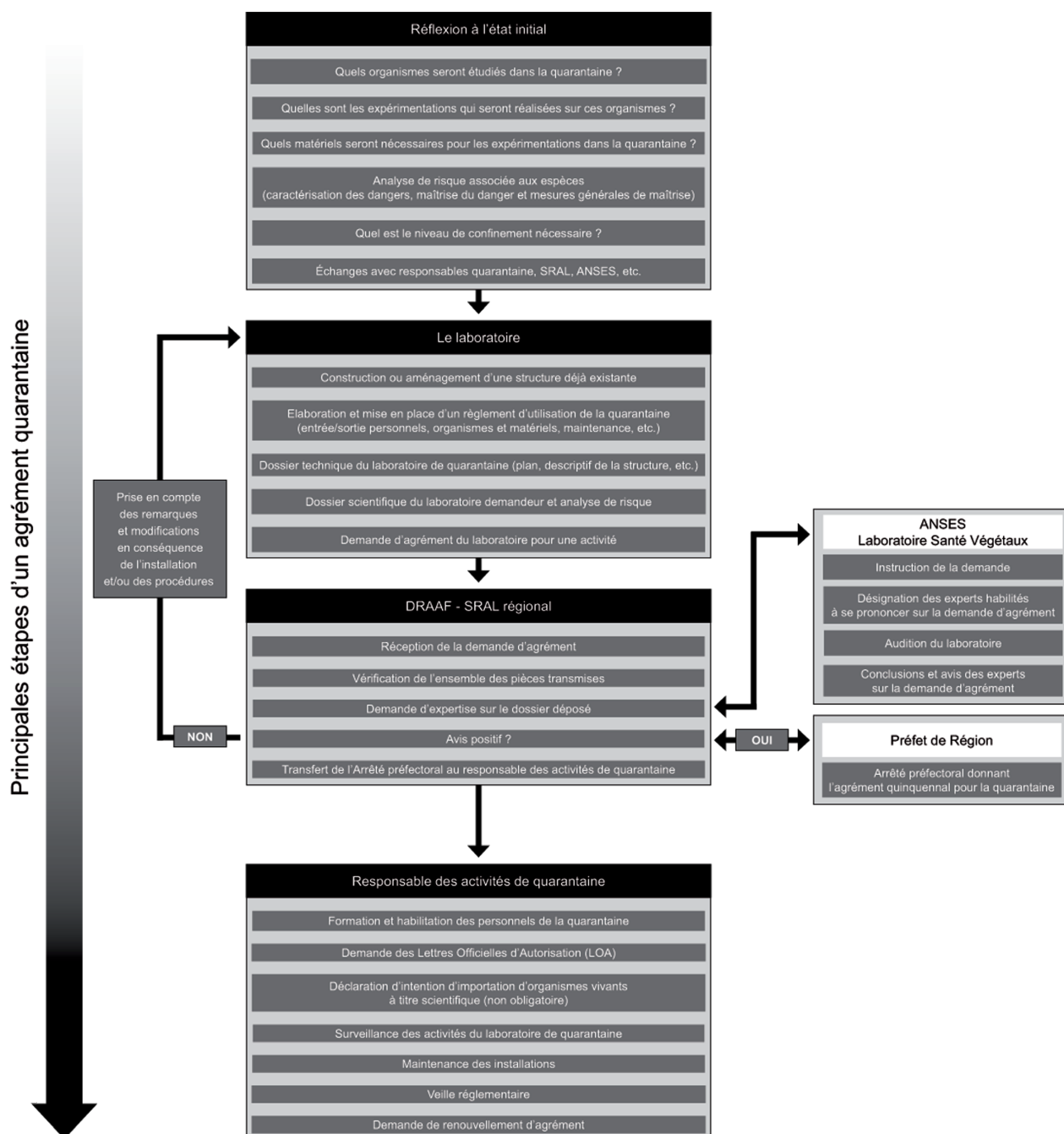


Figure 1. Etapes-clés d'un agrément de quarantaine (d'après D. Coutinot³).

² L'Union européenne vient d'adopter un nouveau règlement pour la gestion du risque phytosanitaire (2016/2031/UE) Mesures de protection contre les organismes nuisibles aux végétaux, modifiant les règlements du Parlement européen et du Conseil (UE) no 228/2013, (UE) no 652/2014 et (UE) no 1143/2014 et abrogeant les directives du Conseil 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE et 2007/33/CE.

³ DC Conseil & Formation – «Importation, Exportation, Détention d'Organismes Vivants à titre scientifique et Confinement». 4-6 avril 2017, SupAgro Montpellier.

Avant de faire une demande d'agrément de quarantaine et de concevoir le laboratoire adéquat, il est important de définir les organismes qui seront étudiés. En effet, c'est le type d'organisme qui va conditionner les modalités de confinement. Il existe plusieurs niveaux de confinement qui sont liés à la dangerosité de l'organisme étudié (insecte, nématode, acarien, pathogène) et à son mode de propagation. Schématiquement il existe trois niveaux d'exigence et de contrainte de confinement : du NS1 (niveau de sécurité 1, le moins contraignant) au NS3 (niveau de sécurité 3, le plus contraignant), avec des ajustements possibles entre niveaux en fonction des organismes étudiés. Pour les laboratoires NS1, seuls les organismes qui sont exclusivement véhiculés par des matériaux solides (et non par l'eau ou l'air) peuvent être étudiés. Les solides sont alors traités par autoclave (ou autre moyen) avant leur sortie de la quarantaine. Pour les laboratoires NS2 (**Figure 2**), la dispersion des organismes dans des éléments liquides est également traitée, par exemple la dispersion par les eaux usées, qui nécessite une cuve de traitement par chloration ou haute température. Enfin, les organismes pouvant être véhiculés par les solides, les liquides et également l'air doivent être étudiés dans un laboratoire NS3. Il nécessite, au-delà des contraintes NS1 et NS2, une désinfection systématique de ce qui sort, un traitement de l'air par filtration et une douche à l'entrée et à la sortie des agents.

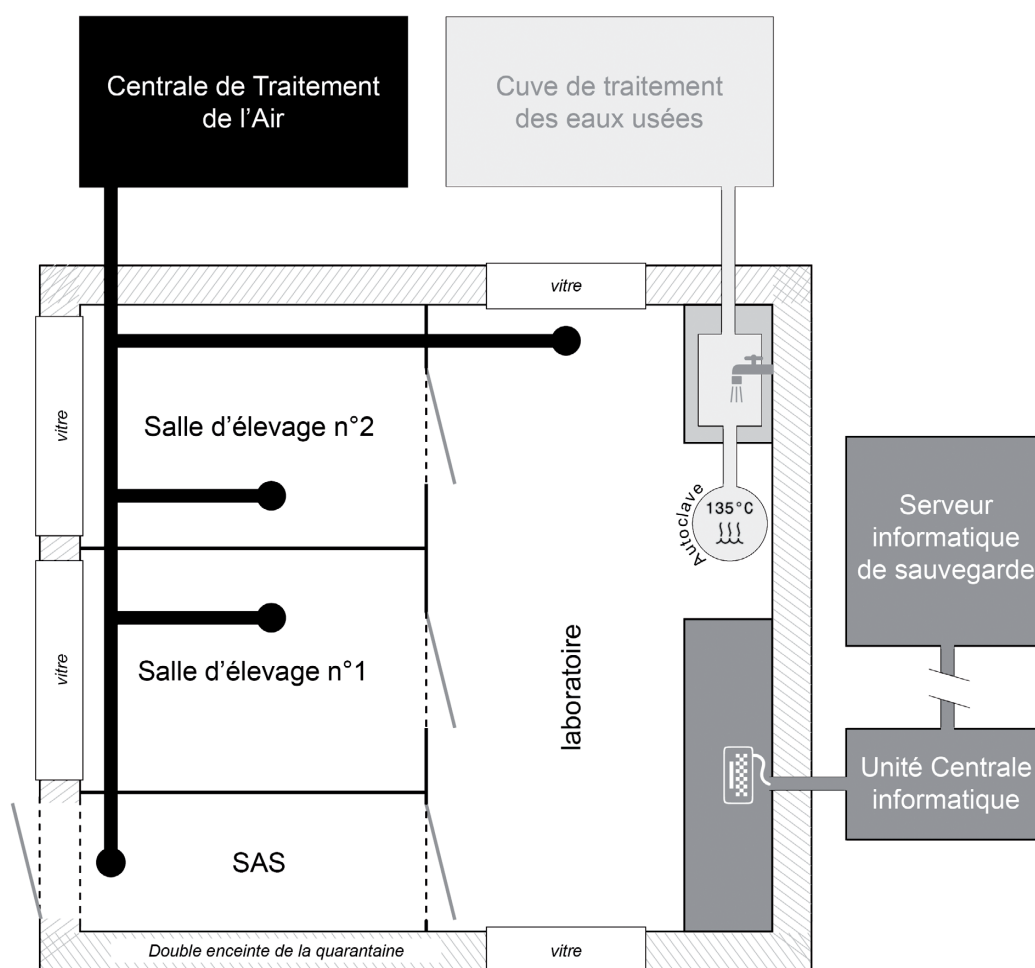


Figure 2. Schéma d'une quarantaine de niveau NS2.

La directive 2008/61/CE impose un certain nombre de mesures à mettre en place au niveau des locaux, des installations et des procédures de travail pour garantir le confinement de ces organismes de quarantaine. Pour chaque organisme ou groupes d'organismes de quarantaine qu'un laboratoire souhaite étudier, une demande d'agrément de ces installations doit être faite auprès de la DRAAF (Direction régionale de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt), au SRAL (Service régional de l'alimentation) en charge de la mise en place et du suivi de ces installations. Elle consiste, entre-autres, en un dossier avec un descriptif des espèces de quarantaine envisagées à l'importation dans

le laboratoire, une présentation du laboratoire de confinement avec la fourniture de l'ensemble des informations techniques de la structure de quarantaine (plan détaillé de l'installation, descriptif précis des parois, des vitrages, du système de dépression, du traitement des eaux usées, des registres informatiques et des sauvegardes, etc.), le détail des activités visées dans le laboratoire (zone d'origine des organismes, objectifs, etc.), la liste du personnel qui sera habilité, une analyse de risque pour les organismes de quarantaine concernés (caractérisation des dangers et mesures générales de maîtrise), l'ensemble des procédures de fonctionnement et notamment celles ayant trait à la maintenance, etc. En région, il est vérifié à réception que le dossier du pétitionnaire est complet, auquel cas il est transféré à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Après examen du dossier, une visite de la structure à agréer est diligentée dans le cas d'une première demande. Cette visite est effectuée par des experts nationaux habilités qui émettent un avis après examen. Si l'ensemble des conditions requises est validé, l'agrément est délivré pour une période de cinq ans.

Dès lors, des organismes de quarantaine en adéquation avec l'agrément obtenu peuvent être importés dans le laboratoire de quarantaine. Pour cela, une demande de LOA (lettre officielle d'autorisation) doit être faite auprès de la DRAAF au SRAL. La demande de LOA précise certains points tels que le nom de l'organisme de quarantaine, la quantité, la forme de vie (adulte, larve, œuf, chrysalide, puppe, etc.), le lieu d'origine de l'organisme, le but des activités de recherche envisagées et les méthodes de destruction envisagées à la fin de l'étude. Si l'ensemble des points sont en adéquation avec le type de structure et les procédures de quarantaine mises en place, la SRAL fournit une LOA. Celle-ci est endossée par les services phytosanitaires du pays d'origine et doit accompagner les organismes de quarantaine tout au long de leur transport. Les organismes de quarantaine doivent être placés dans un double contenant en mesure d'empêcher toute évasion dans l'environnement. La LOA est un document unique, valable pour un envoi ou pour plusieurs envois similaires prévus sur une courte période.

Exemple de fonctionnement d'un laboratoire de quarantaine insectes : l'URZF

Impliquée depuis plusieurs années dans l'étude des insectes exotiques introduits en Europe, l'Unité de recherche de zoologie forestière (URZF) INRA d'Orléans (Centre Val de Loire) s'est équipée d'un laboratoire de quarantaine de niveau NS2, avec un agrément lui permettant d'étudier l'ensemble des insectes de quarantaine mais aussi les envahisseurs potentiels non inclus sur ces listes de quarantaine, à l'exclusion de certains hémiptères (*Stemorrhyncha*, *Cicadomorpha*, *Fulgoromorpha*), des diptères *Agromyzidae* et des thrips (*Thysanoptera*). L'objectif principal est de pouvoir étudier les caractéristiques biologiques de ces insectes exotiques envahissants ou potentiellement envahissants (ex : cycle de vie, régime alimentaire, capacité de reproduction et de dispersion). Le laboratoire de quarantaine de l'URZF a été construit en 2008 et a obtenu son premier agrément le 8 avril 2009. Seule une partie des agents de l'URZF est habilitée à rentrer et travailler dans le laboratoire de quarantaine, après avoir suivi une formation avec le responsable du laboratoire et en accord avec la direction de l'Unité. Les agents ainsi habilités ont pris connaissance du règlement de la quarantaine, de son fonctionnement, des contraintes de travail et des obligations qui en découlent (ex : traçabilité de toutes les activités exercées dans le laboratoire, dangers afférents aux risques de dissémination d'organismes nuisibles).

Compte-tenu des contraintes de fonctionnement d'un tel laboratoire, un maximum de dispositifs techniques a été placé à l'extérieur de la quarantaine afin de faciliter les travaux de maintenance (unité centrale informatique, climatisation et dépression, traitement des eaux usées). Le laboratoire de quarantaine est fait de parois étanches et ignifugées, constituées d'une âme isolante coincée entre deux parements en acier. Les vitrages sont assurés par des doubles-vitres feuilletées de sécurité. L'ensemble du laboratoire de quarantaine est mis en dépression (60 Pascals), en continu, par une CTA (centrale de traitement de l'air) qui permet également de gérer les conditions de température entre 15°C et 30°C. Ce dispositif de dépression permet de créer un contre-flux d'air au niveau des portes d'accès, l'air allant de l'extérieur vers l'intérieur de la quarantaine afin de refouler les organismes tentant de sortir lors de l'ouverture des portes ou par les bas des portes. Des dispositifs de mesure sont disposés à différents points stratégiques, permettant aux agents de contrôler le niveau de dépression avant l'entrée dans la quarantaine ou pendant leur travail au milieu confiné. L'air est filtré en entrée et en sortie avec des filtres HEPA F7. Ces filtres ont une efficacité supérieure à 98 % sur des particules de 3,0 µm évitant toute dispersion des organismes étudiés par la ventilation. L'entrée du laboratoire est sécurisée par un digicode, qui donne accès à un sas d'entrée de 5,5 m² (Figure 3).





Figure 3. SAS d'accès au laboratoire de quarantaine insectes de l'URZF (photo : O. Denux).

Dans le SAS, des dispositifs de piégeage (piège UV, piège appâté avec des composés volatils phéromones/ kairomones génériques, bande jaune engluée ou tout autre dispositif adapté aux espèces étudiées) sont mis en place au cas par cas, afin de capturer les éventuels individus tentant de s'échapper depuis la pièce principale. Un vestiaire permet aux agents de se changer (chaussures et blouse blanche obligatoires), avant de pénétrer dans le laboratoire *stricto sensu* (Figure 4).



Figure 4. Intérieur du laboratoire de quarantaine de l'URZF (photo : O. Denux).

Le laboratoire s'étend sur 40 m² et présente un éclairage en grande partie naturel pour favoriser l'élevage des insectes. Une porte intérieure donne accès à une cellule d'élevage de 5 m². La structure initiale du laboratoire autorise à y ajouter par la suite, si nécessaire, des cellules additionnelles. Le laboratoire possède un congélateur et un autoclave afin de permettre la destruction des différents types d'échantillons. Les eaux usées sont traitées dans une cuve extérieure de 1000 L, via un système de stérilisation (par hypochlorite de sodium) et de brassage des effluents, avant évacuation dans le circuit des eaux usées. Toutes les données concernant la quarantaine (registre entrée/sortie des personnels et matériels, expérimentations, problèmes techniques, etc.) sont saisies systématiquement sur l'ordinateur du laboratoire de quarantaine. Les données sont sauvegardées par l'opérateur à chaque fermeture de l'ordinateur sur un serveur informatique de l'INRA. En cas d'échappement d'insectes à la suite d'évènements difficilement prévisibles (ex : intrusion, bris de glace, incendie, etc.), des arbres sentinelles placés aux abords du laboratoire de quarantaine doivent permettre de contenir les propagations dans le proche environnement.

Le laboratoire de quarantaine de l'URZF possède un équipement standard permettant la réalisation d'élevages d'insectes et des mesures sur les espèces étudiées (ex : poids et taille des individus, diapause au froid). L'une des originalités de ce laboratoire est la présence de manèges de vol, qui permettent d'estimer les capacités de dispersion théorique des insectes étudiés (possibilité d'étudier 16 vols en parallèle). L'insecte est attaché à un support adapté, relié à l'extrémité d'une tige qui pivote librement autour d'un axe (**Figure 5**). Des capteurs/récepteurs permettent de comptabiliser le nombre de tours effectués par chaque insecte. Les informations sont transmises par voie filaire à des ordinateurs (situés à l'extérieur de la quarantaine) qui calculent les distances parcourues et le nombre d'arrêts effectués. Des commutateurs permettent de démarrer ou éteindre, depuis l'intérieur de la quarantaine, les différents ordinateurs présents à l'extérieur. Une application informatique permet de passer facilement d'un ordinateur à un autre à partir d'un seul écran et clavier. En cas de problème informatique, l'externalisation du matériel permet ainsi d'éviter l'entrée de personnels de maintenance dans le laboratoire de quarantaine.




Figure 5. Manège de vol à insectes (photo : O. Denux).

Thématiques de recherche de l'URZF en milieu confiné

Le nombre d'insectes exotiques établis au niveau européen a augmenté de manière exponentielle ces dernières années (Roques et al., 2010). Mais seule une partie de ces espèces est classée dans les organismes de quarantaine, et donc contrôlée au niveau des points d'entrée sur le territoire européen (ports, aéroports, etc.). Au-delà du contrôle et de l'étude des insectes de quarantaine, il est apparu essentiel d'identifier les futures espèces envahissantes. L'URZF mène ainsi deux approches scientifiques sur les invasions biologiques : (i) la détection





précoce des espèces envahissantes potentielles (installation d'arbres sentinelles, détection par piégeage dans les zones de fret) et (ii) l'étude des processus biologiques sur les insectes d'ores et déjà classés comme organismes de quarantaine.

Durant la période de l'agrément initial 2009-2014, plusieurs expérimentations ont ainsi été réalisées sur des organismes non classés de quarantaine mais jugés comme ayant potentiellement un risque phytosanitaire. Suite au premier inventaire des espèces exotiques établies, réalisé à l'échelle de l'Europe (DAISIE, 2009), nous avons développé de nouvelles méthodes pour la détection précoce des espèces d'insectes exotiques. En partenariat avec l'Institut de Zoologie de Beijing de l'Académie des Sciences de Chine et l'Université agronomique et forestière du Zhejiang (Lin'an), des arbres sentinelles natifs d'Europe ont été installés en Chine afin d'identifier les insectes potentiellement en mesure de pouvoir se développer sur ces essences et de s'acclimater en Europe. L'objectif est donc de détecter très tôt des potentiels insectes nuisibles à nos forêts pour mieux s'en prévenir (ex : contrôle des voies d'introduction liées au commerce ornemental). Parmi les dizaines d'espèces inventoriées, nos collègues chinois nous ont envoyé en 2011 quelques chrysalides d'un lépidoptère *Psychidae*, qui avait retenu leur attention à cause de sa forte polyphagie sur les arbres sentinelles. Ces individus ont été placés en quarantaine puis identifiés par barcoding comme appartenant au genre *Pteroma*. Les tests réalisés en quarantaine ont confirmé le fort niveau de polyphagie de cette espèce sur les essences caduques autochtones d'Europe (ex : chêne, charme, peuplier) et la possibilité de réaliser un cycle de vie complet sous conditions climatiques tempérées (Roques et al., 2015).

En 2013 et 2014, une étude a été conduite, en partenariat avec le CIRAD de Montpellier, sur l'organisme de quarantaine *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880) (*Lepidoptera, Castniidae*), un papillon ravageur des palmiers originaire de l'Uruguay et de l'Argentine, introduit en Espagne depuis le milieu des années 1990 avant d'envahir une grande partie du bassin méditerranéen. Les expérimentations ont porté sur la mesure des capacités de dispersion naturelle de ce papillon, en utilisant les manèges de vol.

Depuis 2015, un élevage comparatif de capricornes asiatiques, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky, 1854), originaires de la zone native de l'espèce et d'individus issus de la zone envahie dans le Loiret (Gien) a été mis en place en conditions de confinement afin de comparer leurs caractéristiques comportementales et leurs performances avec celles des populations envahissantes présentes en France et en Europe. Ces travaux de recherche s'inscrivent dans le cadre d'une thèse financée par la DGAL qui vise (i) à comprendre les voies d'invasion d'*A. glabripennis* en Europe et (ii) à étudier certaines caractéristiques physiologiques potentiellement liées à la capacité d'invasion de cet insecte.

Conclusion

Les laboratoires de quarantaine constituent un élément indispensable pour tout scientifique qui souhaite importer et étudier des échantillons de sol, des végétaux ou tout organisme nuisible interdit à l'importation dans l'Union européenne. Ces structures de confinement et leur mode de fonctionnement répondent à un cahier des charges strict afin d'éviter tout risque d'échappement des organismes étudiés dans le milieu naturel. Parmi ces structures, le laboratoire de quarantaine insectes de l'URZF constitue une infrastructure clé dans l'étude des insectes forestiers exotiques envahissants ou potentiellement envahissants en Europe. Sa surface, sa modularité interne et les possibilités d'évolution future (ex : l'ajout de nouvelles pièces d'élevage) en font un outil à-même de répondre aux besoins d'aujourd'hui et de demain.

Remerciements

Nous remercions chaleureusement Dominique Coutinot (DC Conseil & Formation) pour la relecture de l'article et les informations communiquées.

Références bibliographiques

DAISIE (2009) *Handbook of alien species in Europe*. Invading nature : Springer Series in Invasion Ecology. Springer. 399 pp.

Eschen R, Roques A, Santini A (2015) Taxonomic dissimilarity in patterns of interception and establishment of alien arthropods, nematodes and pathogens affecting woody plants in Europe. *Divers Distrib* **21** : 36-45.

Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology : predicting invaders. *Trends Ecol Evol* **16** : 199-204.

Roques A, Auger-Rozenberg M-A, Blackburn TM, Garnas JR, Pyšek P, Rabitsch W, Richardson DM, Wingfield MJ, Liebhold AM, Duncan RP (2016) Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biol Invasions* **18** : 907-920.

Roques A, Kenis M, Lees D, Lopez-Vaamonde C, Rabitsch W, Rasplus JY, Roy DB (2010) Alien terrestrial arthropods of Europe. *Biorisk* **4** : 1023-1028.

Roques A, Fan JT, Courtial B, Zhang YZ, Yart A, Auger-Rozenberg MA, Denux O, Kenis M, Baker R, Sun JH (2015) Planting Sentinel European Trees in Eastern Asia as a Novel Method to Identify Potential Insect Pest Invaders. *PLoS ONE* 10(5): e0120864.doi:10.1371/journal.pone.0120864

