

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA049 - version 4

Février 2021

Semences de tomate : Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* par isolement sur milieux et identification de la souche

Laboratoire de de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence : Mandat « Autres bactéries »



Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V1*	Sans objet	Septembre 2019	Version initiale
V2	Mineures	Février 2020	Précisions; ajout d'annexes
V3	Mineures	Mai 2020	Précisions concernant la préparation des milieux semi-sélectifs (annexe 1)
V4	Mineures	Février 2021	Possibilité de ne pas sous-échantillonner les petits échantillons ; température de centrifugation

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 4 avril au 4 Mai 2017 sur le site internet de l'Agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

Dans le cadre du contrat de branche Clavitom (2008-2011), la présente méthode a été validée par le GEVES et l'ANSES – LSV (rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA049 version 1) :

- **GEVES**

Adresse : Rue Georges Morel

49071 BEAUCOUZE cedex

Contact : contact@geves.fr

- **ANSES - Laboratoire de la santé des végétaux– Unité bactériologie, virologie et OGM**

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers CEDEX 01

Contact : angers.lsv@anses.fr

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	7
Avertissements et précautions de sécurité	8
1. Objet et domaine d'application	9
2. Documents de référence	9
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode	10
5. Réactifs	11
5.1 Eau.....	11
5.2 Solutions salines et milieux.....	11
5.3 Réactifs pour biologie moléculaire (PCR en temps réel Taqman™)	12
5.3.1 Oligonucléotides : Oosterhof & Berendsen, 2011	12
5.3.2 Kit de mélange réactionnel prêt à l'emploi PCR	12
5.4 Réactifs sérologiques pour immunofluorescence (test facultatif).....	12
5.5 Autres réactifs ou consommables à usage unique.....	12
5.6 Contrôles et témoins.....	13
5.6.1 Isolement par dilution/étalement.....	13
5.6.2 Identification des isolats	16
5.6.3 Règles de décision liées aux témoins pour isolement	17
6. Appareillage et matériels	18
7. Échantillons	20
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	20
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	20
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	20
8. Mode opératoire	21
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	21
8.2 Extraction de la bactérie-cible des semences	21
8.3 Étape d'isolement par dilutions/étalements.....	22
8.4 Repiquages des isolats suspects.....	23



8.5 Identification biochimique ou sérologique des isolats suspects (étapes facultatives ; OEPP 2016)	24
8.6 Identification des isolats par PCR en temps réel Taqman™ (Oosterhof & Berendsen, 2011)	25
8.7 Test de pouvoir pathogène	26
9. Résultats	27
9.1 Contrôle de la validité des résultats	27
9.1.1 Isolement sur milieux	27
9.1.2 Lectures et interprétation de la PCR en temps réel	27
9.1.3 Lectures et interprétation du test de pouvoir pathogène	28
9.2 Calculs et expression des résultats	30
10. Caractéristiques de performance de la méthode	31
10.1 Performances des milieux d'isolement sur une collection de souches pures (cibles et non-cibles) (travaux GEVES / contrat de branche Clavitom)	32
10.2 Performances des tests d'identification sur une collection de souches pures (cibles et non-cibles) (travaux GEVES / contrat de branche Clavitom)	32
10.3 Performances globales de la méthode MA 049	33
Annexe 1 : milieux et solutions	34
Annexe 2 : Etapes de centrifugation et constitution des fractions pour l'étape d'isolement par dilutions/étalements	38
Annexe 3 : témoin interne d'amplification (facultatif)	40
Bibliographie	42

Table des figures

FIGURE 1 : GAMME DE DILUTION EN VUE DU DEPOT DU TEMOIN POSITIF D'ISOLEMENT	14
FIGURE 2 : CROISSANCE DES COLONIES DES SOUCHES CFBP2492 ET CFBP2496 (OBSERVATION DE DIFFERENCES DE CROISSANCE NON SYSTEMATIQUE)	14
FIGURE 3 : EXEMPLE DE SCHEMA DE DILUTION POUR OBTENTION DU TI+	15
FIGURE 4 : EXEMPLE DE SCHEMA DE DILUTION POUR OBTENTION DU TEMOIN NEGATIF D'ISOLEMENT DOPE	16
FIGURE 5 : MACERAT OBTENU APRES PASSAGE AU BROYEUR A PALETTES	22
FIGURE 6 : SUR CMM1T: COLONIES JAUNES, RONDES, BOMBES, MUQUEUSES	23
FIGURE 7 : SUR SCMF: COLONIES GRIS SOURIS AVEC DES PONCTUATIONS NOIRES, MUQUEUSES, SANS FORME PRECISE	23
FIGURE 8 : EXEMPLES DE REPIQUAGES DE COLONIES : (DE GAUCHE A DROITE) CULTURE NON SUSPECTE (CAR ORANGE); CULTURE SUSPECTE; CULTURE ISSUE DU T+ SUR SCMF; CULTURE ISSUE DU T+ SUR CMM1T	24
FIGURE 9 : CHANCRE OBTENU AU POINT D'INOCULATION PAR LA METHODE PAR INJECTION A L'AIGUILLE	29
FIGURE 10 : FLETRISSEMENT OBSERVE SUR FEUILLES	29

**Table des tableaux**

TABLEAU 1 : OLIGONUCLEOTIDES	12
TABLEAU 2 : REGLES DE DECISION LIEES AUX TEMOINS POUR ISOLEMENT	17
TABLEAU 3 : ERREURS MAXIMALES TOLEREES	18
TABLEAU 4 : PRE-TESTS FACULTATIFS	24
TABLEAU 5 : MELANGE REACTIONNEL POUR LA PCR EN TEMPS REEL OOSTERHOF & BERENDSEN, 2011	25
TABLEAU 6 : PARAMETRES D'AMPLIFICATION	26
TABLEAU 7 : REGLES D'INTERPRETATION DES RESULTATS	28
TABLEAU 8 : INTERPRETATION DES RESULTATS	28
TABLEAU 9 : PRINCIPES DE DECISION	30
TABLEAU 10 : CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE L'ISOLEMENT	32
TABLEAU 11 : CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA PCR ET DU POUVOIR PATHOGENE	32
TABLEAU 12 : CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA METHODE	33



Introduction

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, est l'agent causal de la maladie du chancre bactérien de la tomate. Cette bactérie fut décrite pour la première fois en Amérique du Nord en 1909. Elle est à l'origine d'une bactériose vasculaire particulièrement redoutée des producteurs de nombreuses zones de productions de tous les continents. La tomate est le principal hôte de cette bactérie même si celle-ci a pu être retrouvée sur d'autres solanacées telles que *Capsicum* sp., *Solanum dulcamara*, *nigrum*, *douglasii* et *trifolium*. Cette bactérie étant transmissible par les semences, celles-ci constituent l'une des principales voies de dissémination sur longues distances. Des photographies de symptômes (flétrissement du feuillage, taches sur fruits) et des informations complémentaires sont disponibles sur les sites suivants :

<http://ephytia.inra.fr/fr/D/365>

<https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI>

La présente méthode est basée sur une détection par isolement sur milieux de culture semi-sélectifs, suivie d'une identification des isolats potentiels et une vérification de leur pouvoir pathogène. Elle s'applique sur semences non traitées ou sur semences désinfectées. La présence de traitement phytosanitaire de surface ou de traces de désinfectant peut impacter la qualité de la méthode.



Avertissements et précautions de sécurité

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

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

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement : l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

La bactérie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* n'est pas connue pour être pathogène pour l'homme. Sa manipulation ne requiert donc pas de précautions particulières en termes d'hygiène et de sécurité des opérateurs. Le laboratoire doit mettre en œuvre les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de cet organisme dans l'environnement. Tout fragment de matériel végétal infecté et isolat bactérien en résultant doivent être détruits par autoclavage ou tout autre moyen inactivant les bactéries, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact. De même, tout matériel/équipement utilisé lors du processus doit être désinfecté.



1. Objet et domaine d'application

La méthode décrite ci-après s'applique uniquement aux semences de tomate. Elle permet de déterminer le statut phytosanitaire des lots de semences de tomate. Même si la méthode par isolement peut permettre de disposer de données d'ordre quantitatif en termes de contamination, la présente méthode est considérée comme qualitative, permettant uniquement de déterminer la présence ou l'absence de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* dans un échantillon donné.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme potentiellement contaminés et peuvent être soumis à des analyses complémentaires sur demande. Un résultat indéterminé correspond à une suspicion non confirmée.

2. Documents de référence

- [1] Méthodes générales d'analyse MOA 010 « Immunofluorescence » et MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes » : la présente méthode ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de ces méthodes si utilisation de ces techniques.
- [2] Protocole de diagnostic PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de l'Organisation Européenne et méditerranéenne de Protection des Plantes publié en 2016. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 202–225
- [3] Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed ISHI - Veg version 4.3.1 juillet 2017:
https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2017/07/Tomato_Cmm_July2017.pdf

3. Termes, sigles et définitions

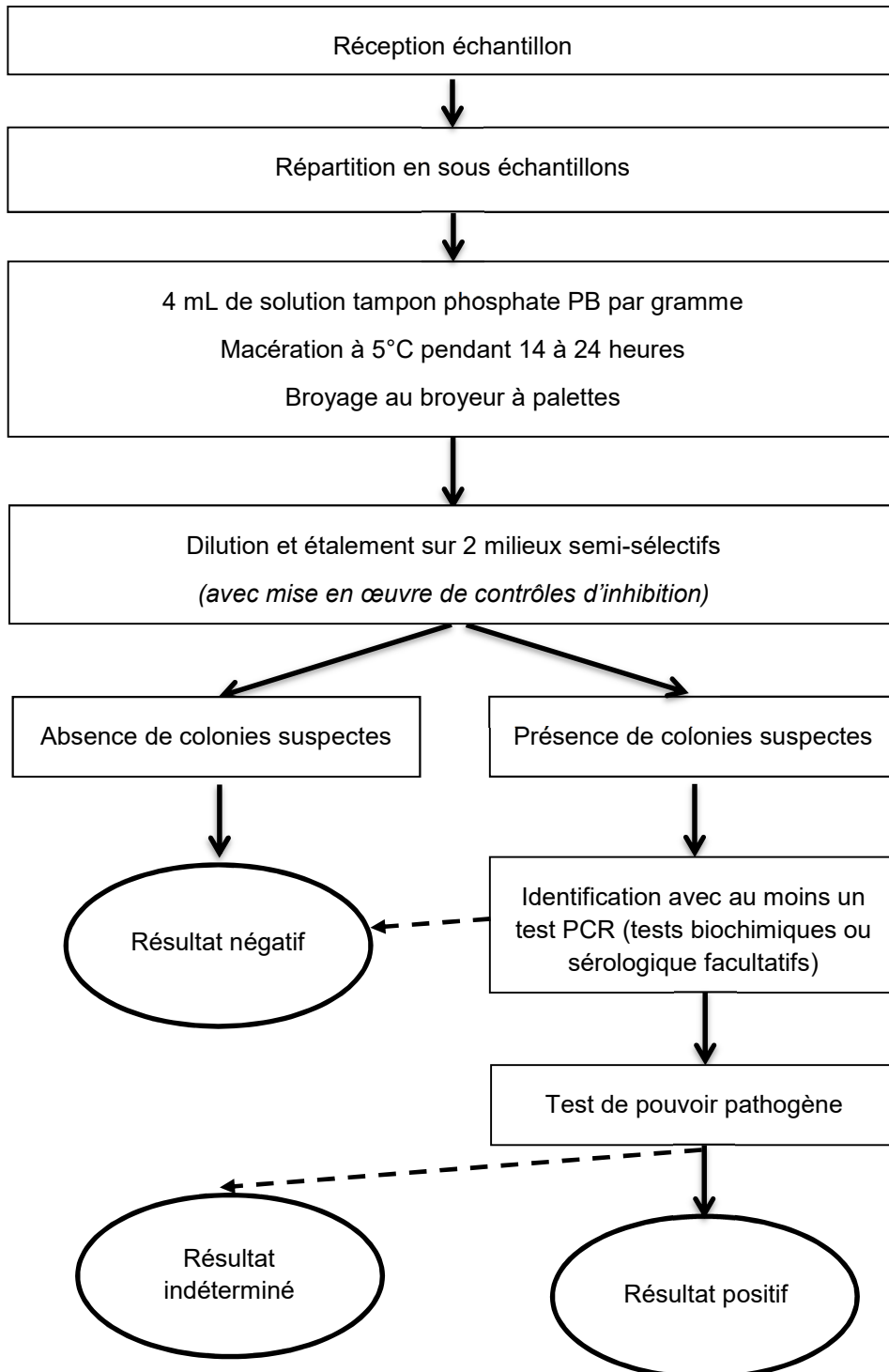
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.



4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :



- - -> Conclusion en cas de test(s) négatif(s)



5. Réactifs

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

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminant (ADN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

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

Les réactifs doivent être de qualité analytique

5.1 Eau

Préparation d'échantillons

Les solutions de macération et autres tampons ou milieux doivent être réalisés avec de l'eau de qualité analytique stérile de type déminéralisée ou osmosée.

Analyse de PCR en temps réel

L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

5.2 Solutions salines et milieux

La composition et la préparation de l'ensemble des milieux ou solutions sont décrits en annexe 1.

Il est recommandé d'ajouter du thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dans le tampon de macération pour les échantillons connus pour être désinfectés.



5.3 Réactifs pour biologie moléculaire (PCR en temps réel Taqman™)

5.3.1 Oligonucléotides : Oosterhof & Berendsen, 2011

Tableau 1 : Oligonucléotides

Amorces / sonde	Séquences nucléotidiques
Sens RZ_ptssk 10	5'-GGGGCCGAAGGTGCTGGTG-3'
Antisens RZ_ptssk 11	5'-CGTCGCCCGCCCGCTG-3'
Sonde RZ_ptssk 12	5'-FAM-TGGTCGTCCTCGGCG-MGB-NFQ-3'

Un contrôle interne d'amplification peut être ajouté au mélange réactionnel (annexe 3). La cible des amorces et sondes est le système de capteur sensoriel de la kinase à deux composants (PTSSK).

Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance.

5.3.2 Kit de mélange réactionnel prêt à l'emploi PCR

Le kit utilisé dans le cadre de la validation de cette méthode est le TaqMan™ Master mix (Applied Biosystem).

5.4 Réactifs sérologiques pour immunofluorescence (test facultatif)

Se référer à la MOA10 en cas d'utilisation de l'IF pour l'identification de souches.

- Antisérums polyclonaux dirigés contre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* généralement obtenu à partir de sang de lapin ou de chèvre.
- Conjugué : immunoglobulines dirigées contre les anticorps anti-Cmm (anti-lapin; anti-chèvre), conjuguées avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

5.5 Autres réactifs ou consommables à usage unique

- Produits courants d'un laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire tels que : désinfectant à action bactéricide ; solution d'hypochlorite de sodium utilisée à une concentration d'environ 1,3 % de chlore actif (ou autres produits de nettoyage équivalents permettant la destruction des traces d'ADN) ; cônes pour pipettes de volumes adaptés, à filtre pour la biologie moléculaire, ou système de distribution volumétrique pour les volumes > 1 mL.
- Pour la préparation d'échantillons et macérats : coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté ; sacs plastiques pour macération ou pots plastiques stériles de volume suffisant.



- Pour centrifugations et isolements sur milieux: tubes pour centrifugation à fond conique; microtubes de 1,5 ou 2 mL en fonction des étapes des protocoles ; boîtes de Petri ; tubes pour dilutions en série.
- Pour biologie moléculaire : microtubes ou capillaires pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé
- Pour le test de pouvoir pathogène : seringues de 1 mL et aiguilles à insuline ou piques en bois de type cure dents stériles ; plants de tomate de variété sensible type Moneymaker en pots (1 pied par pot).

5.6 Contrôles et témoins

Les techniques de détection d'un organisme par microbiologie ou d'identification par biologie moléculaire et par test de pouvoir pathogène requièrent l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de chaque manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- L'opérateur a correctement suivi le protocole,
- Les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- Les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- L'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- Il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Dans la présente méthode, **la souche utilisée comme témoin positif doit être une souche de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*** provenant de préférence d'une collection internationale (par exemple CIRM-CFBP) **mais répondant pleinement aux critères de représentativité d'une souche de Cmm et dûment purifiée, caractérisée et identifiée**. Cette souche doit être fraîchement repiquée au moment de son usage: la veille pour la partie microbiologique; depuis moins de 5 jours pour la partie moléculaire et pouvoir pathogène.

La manipulation de ces souches doit s'effectuer de manière à éviter toute contamination croisée avec les isolats de l'analyse en cours (séparation dans l'espace et/ou le temps).

5.6.1 Isolement par dilution/étalement

- Témoin négatif d'isolement (T-)

Pour s'assurer de la stérilité du tampon de macération, 100 µL de chacune de trois concentrations (1-1/10-1/100) de tampon phosphate PB sont étalés sur une boîte de chacun des milieux d'isolement et traités dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Un seul témoin est nécessaire par série d'analyse. Ce témoin doit être déclaré négatif à l'issue de la manipulation.

- Témoin positif d'isolement (T+)

Pour s'assurer que Cmm est capable de se développer sur les milieux utilisés d'une série d'analyse et de former des colonies de morphologie caractéristique, 100 µL des deux concentrations 10^2 et 10^3 d'une suspension de souche-cible (suspension issue de dilutions décimales dans le tampon de macération



(Figure 1)), sont étalés sur au moins une boîte de chacun des 2 milieux semi-sélectifs CMM1T et SCMF (recettes en annexe 1), afin d'obtenir une gamme de colonies entre 30 et 300 sur une des 2 concentrations de chaque milieu. Les colonies typiques (Figure 2) se formant dans les 10 jours serviront de référence lors des lectures de boîtes des échantillons, en absence de compétition avec la flore des semences. Un seul témoin est nécessaire par série d'analyse quel que soit le nombre d'échantillons. Ce témoin doit être déclaré positif à l'issue de la manipulation.

NB : l'expérience du laboratoire peut intervenir dans la capacité à estimer une concentration bactérienne : en cas de doute, ne pas hésiter à augmenter les concentrations étalées et donc le nombre de boîtes.

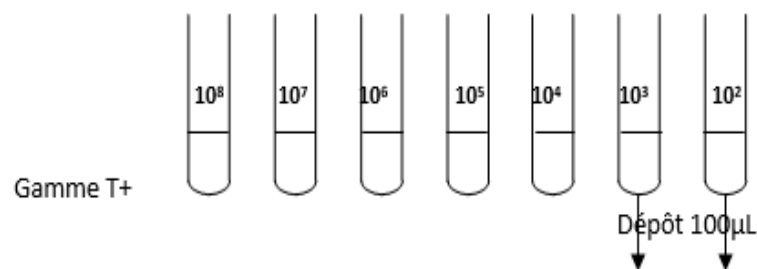


Figure 1 : Gamme de dilution en vue du dépôt du témoin positif d'isolement

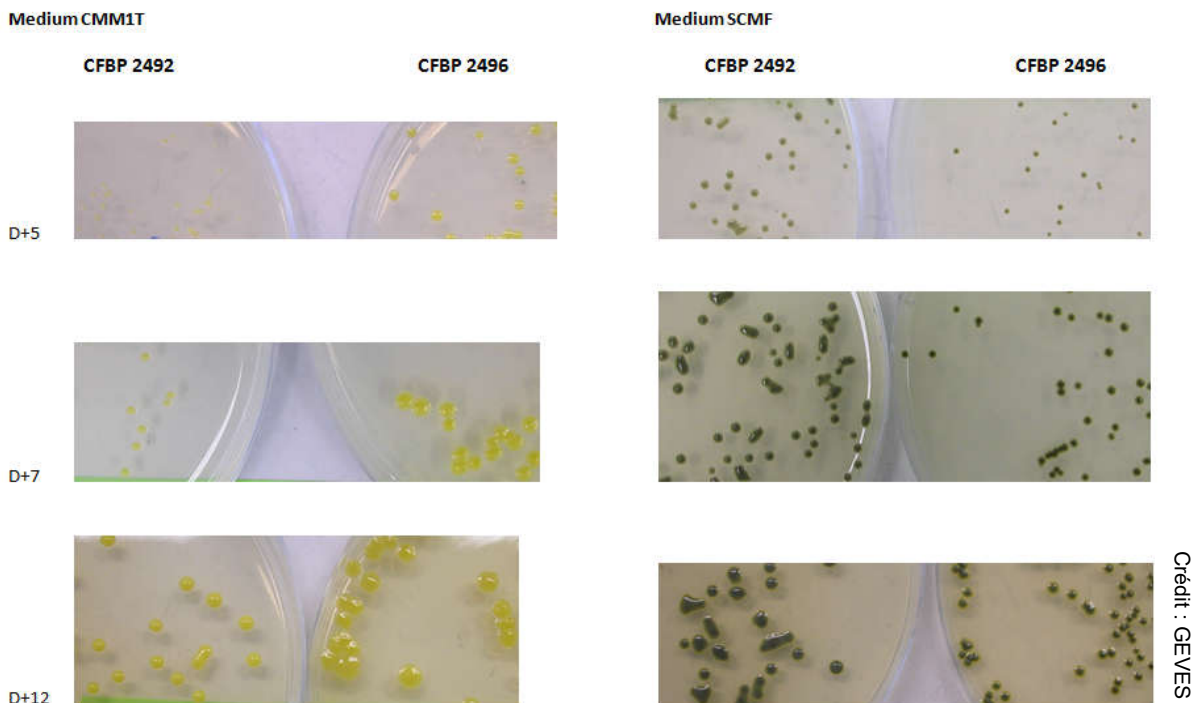


Figure 2 : Croissance des colonies des souches CFBP2492 et CFBP2496 (observation de différences de croissance non systématique)



- Témoin d'inhibition de croissance (TI+)

La capacité de croissance de Cmm sur des milieux semi-sélectifs peut être fortement influencée par la présence d'autres microorganismes ou de composés inhibiteurs présents dans les macérats de semences. Afin de permettre de valider l'absence d'inhibition de la bactérie-cible et de vérifier la croissance des colonies-cibles sur les milieux, un témoin d'inhibition (TI +) est **systematiquement préparé pour chaque sous échantillon** de semences testé.

Pour cela, une suspension bactérienne d'une souche Cmm est additionnée aux aliquots de(s) macérat(s) des sous échantillons de semences concentré(s) « x10 » (*ie.* post centrifugation) de sorte à obtenir un niveau recommandé de 20 à 100 ufc / 0,1 mL. Ces extraits dopés sont ensuite étalés (100 μ L par boîte) sur chaque milieu semi-sélectif (CMM1T et SCMF) et incubés pendant 10 jours à 28 °C. Le résultat attendu est la présence d'au moins 5 colonies de Cmm sur un des deux milieux.

En d'autres termes, ajouter par exemple 50 μ L de la gamme de dilution préparée pour le Témoin positif d'isolement (T+) de l'ordre de 10^4 et 10^3 cfu/mL de Cmm dans 450 μ L de macérât « x10 » de chaque sous échantillon (Figure 3).

NB : Pour des volumes plus faibles de macérats, il convient d'ajuster les volumes proportionnellement afin d'obtenir des concentrations finales de l'ordre de 10^3 et 10^2 cfu/mL.

Pour des effectifs de sous échantillons inférieurs à 2000 semences réaliser les dilutions dans le macérât non dilué (pas de macérât x10)

Le témoin d'inhibition doit être traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

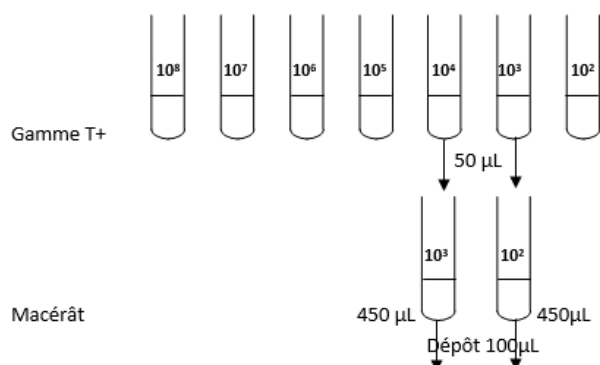


Figure 3 : Exemple de schéma de dilution pour obtention du TI+

- Témoin négatif d'isolement dopé (recommandé)

Pour s'assurer que le niveau de concentration demandé pour le témoin d'inhibition de croissance a été atteint, 50 μ L des concentrations 10^4 et 10^3 cfu/mL de la gamme de dilution préparée pour le Témoin positif d'isolement (T+) sont ajoutés dans 450 μ L de tampon de macération.

100 μ L de deux concentrations 10^2 et 10^3 obtenues sont étalés sur une boîte de chaque milieu semi-sélectif (CMM1T et SCMF) afin d'obtenir une concentration de 20 à 100 ufc / 0,1 mL (Figure 4).

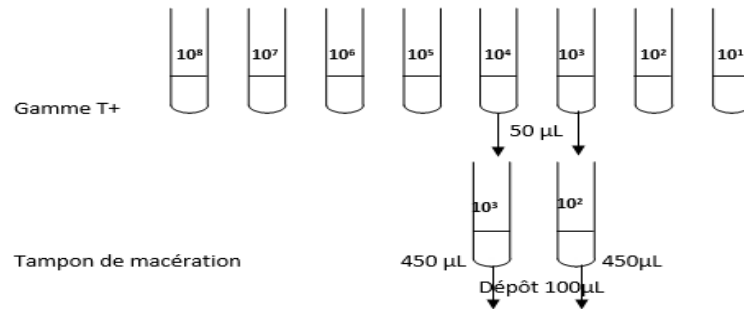


Figure 4 : Exemple de schéma de dilution pour obtention du témoin négatif d'isolement dopé

5.6.2 Identification des isolats

Pour l'identification des isolats par biologie moléculaire et facultativement en sérologie, les témoins de référence doivent être inclus au cours du processus de PCR et/ou d'IF pour valider respectivement les étapes d'amplification génique et/ou de coloration d'immunofluorescence. Ces témoins sont décrits dans les exigences des méthodes officielles d'analyse MOA022 et MOA010. De plus, en cas d'anomalies constatées sur un contrôle ou témoin, les dispositions de la MOA022 et MOA010 doivent être respectées.

Lors du test de pouvoir pathogène, les deux témoins sont constitués de plantes inoculées :

- témoin positif : inoculation de la plante avec une souche-cible de Cmm (5.6) afin de s'assurer de la qualité des symptômes attendus
- témoin négatif : inoculation de la plante avec de l'eau stérile pour vérifier l'absence de contamination croisée ou de réaction aspécifique.



5.6.3 Règles de décision liées aux témoins pour isolement

Tableau 2 : Règles de décision liées aux témoins pour isolement

T+			T-		T- dopé		TI+		Conformité témoins/contrôles
ufc/mL	Nb colonies	C	Nb colonies	C	Nb colonies	C	Nb colonies	C	
300-3000	30-300	Oui	0	Oui	20-100	Oui	≥ 5	Oui	Oui
300-3000	30-300	Oui	présence	Non	20-100	Oui	≥ 5	Oui	Non
300-3000	30-300	Oui	0	Oui	20-100	Oui	< 5	Non	Non Résultat indéterminé si négatif Résultat positif si colonies confirmées PCR et PP
300-3000	30-300	Oui	0	Oui	<20 ou >100	Non	≥ 5	Oui	Non (mauvaises dilution) Résultat indéterminé si négatif Résultat positif si colonies confirmées PCR et PP
300-3000	30-300	Oui	0	Oui	20-100	Oui	< ou ≥ 5	Non	Non Inhibition Résultat indéterminé si négatif Résultat positif si colonies confirmées PCR et PP
<300 ou >3000	<30 ou >300	Non	0	Oui	<20 ou >100	Non	< ou ≥ 5	Non	Non Refaire l'analyse à partir du macérât avec de nouveaux témoins



6. Appareillage et matériels

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

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse MOA 022 et éventuellement MOA 010. Différents systèmes peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 3 : Erreurs maximales tolérées

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022/MOA010 version en vigueur
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$ Bain thermostaté : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ Incubateur bactériologique : 28°C et EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$
Temps	EMT = 10%

Thermocycleur : le constat de qualification (aptitude à l'usage attendu) se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique ou d'une vérification métrologique.

Les manipulations décrites dans la présente méthode nécessitent un appareillage courant de laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire, mais notamment :

- Pour la préparation des solutions, milieux et échantillons : balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons (ex : balance de classe II), agitateur rotatif ou orbital pouvant assurer une agitation suffisante des semences sans débordement des contenants à 5°C, pipette automatique et/ou distributeur, centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative de 180 à au moins 9000 g et rotor(s) adapté(s).
- Pour le broyage: Système de broyeur à palettes.
- Pour l'incubation des boîtes de Petri : Incubateur bactériologique



- Pour les tests moléculaires : Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur. En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, la mise en œuvre de la méthode nécessite un thermocycleur pour PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et/ou d'autres reporteurs utilisés dans le mélange réactionnel.
- Pour le test de pouvoir pathogène : chambre climatique ou serre permettant une régulation entre 23 et 30°C, entre 70 et 80% d'humidité, avec un minimum de 8h de lumière/jour.
- Stockage des échantillons et des ADN : Congélateur (température $\leq -18^{\circ}\text{C}$) et réfrigérateur (température = 5°C)



7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif et non endommagé. Sa conformité est de la responsabilité du préleveur. Les échantillons de semences reçus doivent être en parfait état de conservation, sans humidité et dans un contenant suffisamment scellé pour éviter la perte des semences.

La taille minimale de l'échantillon pour cette méthode est de 10 000 semences.

Les masses des échantillons et sous-échantillons peuvent être déterminées sur la base de la Masse de Mille Semences fournie par le demandeur d'analyse. La représentativité de l'échantillon n'est pas du ressort du laboratoire d'analyse.

En cas de doute (état, taille, aspect), le laboratoire peut émettre des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant la raison. Le laboratoire peut également refuser l'analyse en indiquant la cause du refus (par exemple : échantillon de semences enrobées). Ce refus doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible et en adéquation avec le contexte de l'analyse (ex : blocage sous douane, ...). En attente de traitement, l'échantillon devra être conservé à une température positive permettant une conservation sans dégradation ($\leq 10^{\circ}\text{C}$). Tout risque éventuel de contamination croisée entre échantillons devra être évité.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Cas d'un échantillon négatif : sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif ou indéterminé : l'ensemble des reliquats pertinents (échantillon, macérat, extrait d'ADN) doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats.

Dans le cas d'un résultat positif, la souche isolée devra être conservée sans limite de durée.



8. Mode opératoire

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures,...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et tout risque de contamination d'un échantillon par un autre.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La taille minimum d'un échantillon est 10 000 semences.

Au minimum, par échantillon, 2 sous-échantillons de taille égale devraient être testés, sans dépasser la taille maximale de 10 000 semences par sous échantillon.

Si le nombre de semences est inférieur ou égal à 10000 semences, analyser la totalité de l'échantillon en 1 ou 2 sous échantillons équivalents.

La répartition en sous-échantillon est réalisée par pesée sur la base de la Masse de Mille Semences :

- soit fournie par le client (donnée la plus fiable)
- soit déterminée par un appareillage spécifique ou en comptant et pesant 3 x 100 semences (le laboratoire ne peut être tenu responsable des incertitudes liées à ce mode de calcul)

Remarques :

- Entre chaque échantillon, veiller à éviter les contaminations croisées (changement des coupelles de pesée, désinfection).
- Cas des échantillons de semences désinfectées (si information connue): pour les échantillons traités à l'hypochlorite de sodium, il est recommandé d'utiliser un tampon de macération PB additionné de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,5 g/L).

8.2 Extraction de la bactérie-cible des semences

Chaque sous-échantillon est transféré dans un sachet solide en polyéthylène avec filtre, de type Bioreba (avec gaze pour la filtration des particules grossières).

Un volume de 4 mL de solution tampon phosphate PB 50 mM stérile (annexe 1) est ajouté par gramme de semences. Bien fermer les sachets pour éviter la fuite de liquide.

Les sous-échantillons sont ensuite laissés à macérer à 4°C pendant minimum 14 à 24 heures (si possible sous agitation à 120-150 rpm). Il est impératif de prévoir et vérifier la bonne imbibition des semences pendant la phase de macération. Puis, l'extraction des bactéries internes des semences est favorisée en utilisant un broyeur à palettes de type Bagmixer (Interscience) ou Stomacher (Seward) pendant une durée et à une intensité suffisante pour obtenir des particules blanches résultant de l'endosperme. Quatre minutes à la vitesse maximale sont ainsi recommandées pour le broyeur Interscience Bagmixer et huit minutes pour le Seward Stomacher. Refaire un passage au broyeur si nécessaire : le liquide de macération doit devenir laiteux après macération/extraction des graines sans écrasement complet des semences (figure 5).



Crédit : ISF

Figure 5 : Macérat obtenu après passage au broyeur à palettes

Après une phase de repos à température ambiante, 20 à 50 mL de chaque macérat de semences sont ensuite centrifugés à faible vitesse afin d'éliminer la plupart des débris (5 minutes à 180 g ou 1 minute à 1000 g).

Chaque surnageant (le culot est jeté) est subdivisé comme suit : :

- 2 mL sont utilisés pour l'analyse aux dilutions 1 et 1/10 dans du tampon PB (annexe 1)
- Le reliquat (minimum 25 mL) est transféré dans un tube stérile et est centrifugé à une vitesse d'au minimum 5000 g pendant 5 minutes de préférence à 4 °C. Le surnageant est jeté. Ce culot est remis en suspension par agitation avec un volume équivalent à 10% du volume prélevé initial (2 mL pour 20 mL par exemple) de tampon PB pour obtenir l'extrait concentré x10.

L'ensemble de ces étapes est repris en annexe 2.

Remarque : Le culot obtenu à 5000g peut être très fragile. Augmenter la vitesse/temps en cas de culot trop fragile.

La partie restante est conservée comme reliquat jusqu'à l'étape de lecture des boîtes.

8.3 Étape d'isolement par dilutions/étalements

Des aliquotes de 100 µL de macérat de semences avant centrifugation rapide « x1 » et « 1/10 » et après centrifugation rapide « concentrés x10 » sont étalés sur deux boîtes par concentration des 2 milieux semi-sélectifs CMM1T et SCMF. Les boîtes ensemencées sont mises à incuber à 28 °C.

En parallèle, le témoin d'inhibition dopé est préparé comme décrit en 5.6.1. Tous les témoins (Témoin négatif d'isolement, Témoin positif d'isolement, Témoin d'inhibition de croissance, Témoin



négatif d'isolement dopé) sont étalés à raison de 100 μ L par boîte, sur une seule boîte par dilution et par milieu (Annexe 2).

L'incubation est réalisée à 28°C jusqu'à 10 jours. Si des colonies typiques apparaissent avant, elles peuvent être repiquées et caractérisées.

A l'issue de la période d'incubation, les colonies en croissance sur les milieux sont observées. Les caractéristiques des colonies de Cmm sont présentées en figures 6 et 7.

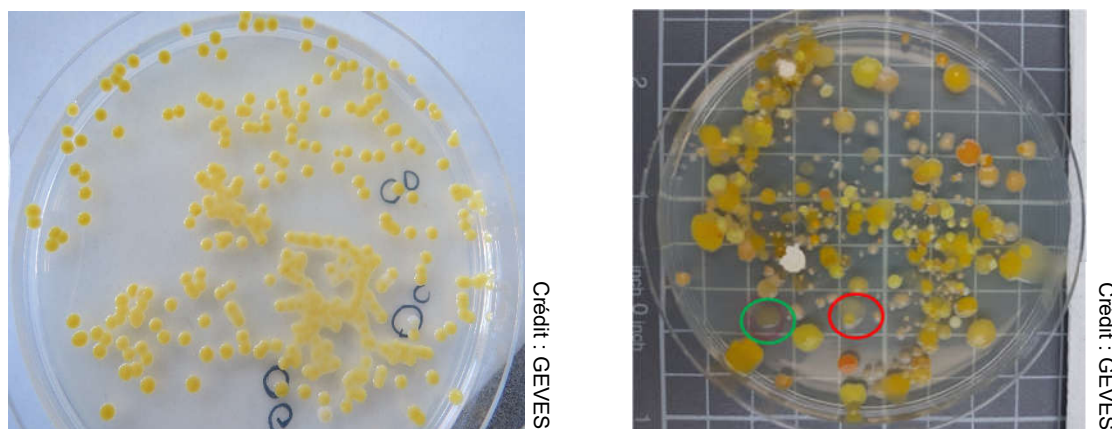


Figure 6 : Sur CMM1T: colonies jaunes, rondes, bombées, muqueuses

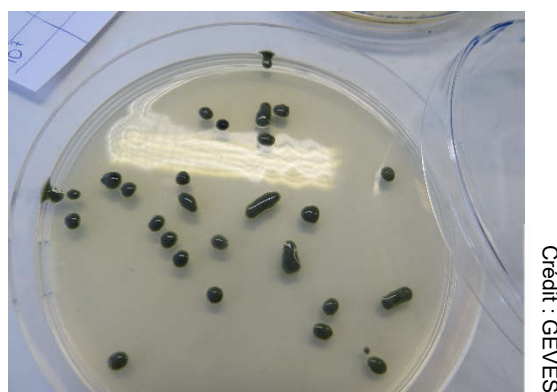


Figure 7 : Sur SCMF: colonies gris souris avec des ponctuations noires, muqueuses, sans forme précise

Comparer les colonies aux témoins positifs (5.6.1). L'attention des manipulateurs est attirée sur le fait que des différences de vitesse de croissance et de morphologie ont été décrites (figure 2).

En présence de colonies suspectes, celles-ci doivent subir **obligatoirement** un repiquage (8.4), un test d'identification par PCR (8.6) et, si positives en PCR, un test de vérification du pouvoir pathogène (8.7).

8.4 Repiquages des isolats suspects

Si présentes, les colonies suspectes (minimum 6 si présentes par sous-échantillon) doivent être repiquées sur un milieu non sélectif, de type LPGA ou GYCA/YDC (recettes en annexe 1) en vue d'une vérification de l'aspect cultural avant test(s) d'identification. Les cultures de Cmm doivent présenter un



aspect jaune (de jaune pâle à jaune vif), muqueux (de muqueux à très muqueux), brillant et fluide (Figure 8).



Crédit : GEVES

Figure 8 : Exemples de repiquages de colonies : (de gauche à droite) culture non suspecte (car orange); culture suspecte; culture issue du T+ sur SCMF; culture issue du T+ sur Cmm1T.

NB : Toujours repiquer le témoin positif sur une boîte séparée des souches à tester

8.5 Identification biochimique ou sérologique des isolats suspects (étapes facultatives ; OEPP 2016)

Afin de discriminer rapidement certaines souches non suspectes, il est possible de réaliser tout ou partie des tests rapides suivants:

Tableau 4 : Pré-tests facultatifs

Pré-tests*	Résultat attendu
Gram au KOH à 3% (sur culture fraîche de 24h et non dense) ou coloration de GRAM	Pas de filament Positif
Catalase	Positive
Oxydase	Négative
Immunofluorescence (cf. MOA010)	Positif

*Les tests de Gram, catalase et oxydase sont décrits par Leliott et Stead (1987). Le Gram au KOH est décrit par Suslow *et al.*, 1982.

Tout isolat ne répondant pas aux critères ci-dessus n'est pas du Cmm. Ceux répondant à ces critères doivent être identifiés obligatoirement par les points 8.6. Les isolats positifs au point 8.6. sont identifiés obligatoirement par le point 8.7 (au moins un isolat par échantillon si présent).



8.6 Identification des isolats par PCR en temps réel Taqman™ (Oosterhof & Berendsen, 2011)

Les souches ayant une morphologie typique sur boîte (cf. 8.4) sont identifiées par au moins un test moléculaire.

Une suspension de chaque souche suspecte est préparée à environ 10^6 cfu/mL. Une lyse des cellules bactériennes est réalisée par chauffage de minimum 10 minutes à 95-98° C puis par refroidissement immédiat sur la glace ou à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ pendant 15 min.

Pour chaque solution mère d'ADN extrait, deux amplifications sont réalisées en absence de témoin interne. Si présence de témoin interne, réaliser au moins une amplification par ADN. Pour chaque série d'amplification, réaliser un témoin négatif d'amplification et un témoin positif d'amplification tel que décrit au point 5.6.2.

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le tableau ci-après (OEPP 2016):

Tableau 5 : Mélange réactionnel pour la PCR en temps réel Oosterhof & Berendsen, 2011

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	Qsp 23 μL
TaqMan™ master mix 2X (Applied Biosystems)	1X
Amorce RZ_ptssk 10	0,24 μM
Amorce RZ_ptssk 11	0,24 μM
Sonde RZ_ptssk 12	0,24 μM
Extrait d'ADN bactérien	2 μL
Total	25 μL

Remarque : Un contrôle interne d'amplification peut être ajouté au mélange réactionnel. Il convient alors d'ajuster les concentrations du mélange réactionnel en conséquence. NB : un exemple de mélange réactionnel avec le contrôle interne d'amplification est présenté en annexe 3 (ISHI - Veg version 4.3.1 de juillet 2017).

Les différents paramètres de l'amplification par PCR en temps réel sont présentés dans le tableau ci-après:



Tableau 6 : Paramètres d'amplification

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycle
Activation de l'ADN polymérase	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	15 s	40
Hybridation /Elongation	60°C	30 à 60 s	

8.7 Test de pouvoir pathogène

Pour chaque échantillon, toutes les souches suspectes dont la PCR est positive doivent être vérifiées par le test de pouvoir pathogène. NB : il est possible de tester simultanément le pouvoir pathogène de l'ensemble des isolats suspects (PCR positifs) d'un échantillon.

Pour ce faire, trois plants de tomate d'un cultivar sensible de type « Marmande » ou « Moneymaker », au stade 2-3 feuilles étalées (environ 3 à 4 semaines après semis), sont inoculés avec chaque isolat suspect.

En parallèle, les témoins positifs (2 plants) sont inoculés avec une souche de référence et les témoins négatifs (2 plants) avec de l'eau stérile (test par injection), soit cure-dents seul (test par piqûre). Les plantules ne doivent pas être arrosées un jour avant l'inoculation pour faciliter l'absorption de l'inoculum.

L'inoculation peut être réalisée au-dessus des cotylédons (entre cotylédons et 1^{ère} feuille) soit par injection, soit par piqure au cure-dents:

- par injection à l'aiguille dans la tige d'une suspension bactérienne (suspension de la culture à tester dans 100 µl d'eau stérile ou 0,01 M de tampon PBS (annexe 1)).
- par piqûre dans la tige à l'aide d'un cure-dents trempé directement dans la culture bactérienne de la souche à tester.

Les plantules sont cultivées à 23-32 °C et 70 à 80% d'humidité relative avec un minimum de 8h de lumière par jour. En cas d'humidité relative insuffisante, il est recommandé de recouvrir les plantules pendant 48 h après inoculation pour maintenir une humidité élevée.

NB : Réaliser toujours dans l'ordre suivant: témoin négatif, souches, témoin positif



9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

Comme déjà précisé, l'observation et la conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons/isolats soumis à analyse. L'analyse n'est validée que si les conditions de conformité des témoins sont remplies. Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.

9.1.1 Isolement sur milieux

La validation de la conformité des témoins est basée sur la vérification de l'aspect (morphologie, vitesse de croissance) et du nombre des colonies présentes sur les boîtes, critères qui doivent correspondre à ce qui est attendu, soit à minima :

- Témoin positif (T+) : présence de colonies isolées dans la gamme attendue sur au moins une boîte de chaque milieu.
- Témoins inhibition dopés (TI+) : présence d'au moins 5 colonies sur un des deux milieux. L'absence de colonies de Cmm est un marqueur de l'inhibition ou de la perte de viabilité des bactéries introduites dans le broyat. Ce défaut peut être dû à la présence de microflore antagoniste associée aux semences, à la toxicité de produits chimiques de désinfection des semences,...
- Témoin négatif (T-) : aucune colonie sur chacun des milieux

Si la présence d'inhibitions est mise en évidence dans l'échantillon lors de l'étape d'isolement, l'analyse par isolement sur milieux ne peut pas aboutir à une conclusion. Le résultat final est indéterminé.

9.1.2 Lectures et interprétation de la PCR en temps réel

Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel pour être prise en compte. La ligne de seuil (threshold) doit être fixée au-dessus du fond de fluorescence (background), la détermination de la ligne de seuil peut être réalisée automatiquement avec le logiciel du thermocycleur ou bien manuellement après chaque réaction.

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :

- Le témoin négatif d'amplification n'a pas généré de courbe de fluorescence caractéristique, ni de valeur de Ct. Il permet de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle.
- Le témoin positif d'amplification a généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct < à 40.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, le test PCR n'est pas validé. Sinon les résultats peuvent être considérés comme interprétables.



Les règles d'interprétation des résultats de chaque réplicat sont présentées dans le tableau ci-après :

Tableau 7 : règles d'interprétation des résultats

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct < 40	Positif
Pas de Ct	Négatif : refaire un prélèvement de colonies si présentes

Pour chaque échantillon analysé, les résultats des deux amplifiats, par exemple référencés 'A' et 'B', sont interprétés en parallèle. L'interprétation détaillée en fonction des résultats de chaque réplicat des extraits d'ADN est présentée dans le tableau ci-après :

Tableau 8 : interprétation des résultats

Type résultat	Résultat sur amplifiat A	Résultat sur amplifiat B	Résultat final	Marche à suivre	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
1	+	+	<i>Cmm</i> identifié	Sans objet	<i>Cmm</i> identifié
2	+	-	Non déterminé	PCR à refaire	Suite à la nouvelle PCR : si résultat 1: <i>Cmm</i> identifié; si résultat 2 : <i>Cmm</i> identifié résultat 3: <i>Cmm</i> non identifié.
3	-	-	<i>Cmm</i> non identifié	Sans objet	<i>Cmm</i> non identifié

Remarque : l'extraction d'ADN par lyse thermique et/ou l'ajout de dilution de l'extrait pourra également être renouvelée sur décision du laboratoire.

9.1.3 Lectures et interprétation du test de pouvoir pathogène

En moins d'une semaine après l'inoculation, les nécroses au point d'inoculation et un début de flétrissement peuvent être observés. Mais les flétrissements sont beaucoup plus nets à partir de 8 jours après l'inoculation.



Crédit : Anses

Figure 9 : Chancre obtenu au point d'inoculation par la méthode par injection à l'aiguille

Les observations doivent être poursuivies jusqu'à 21 jours après l'inoculation. En cas de symptômes rapidement marqués liés à l'agressivité de la souche, le test peut être interrompu plus tôt pour reisolement mais pas avant 15 jours post inoculation. Les symptômes attendus sont la formation de chancres (division de tige) aux points d'inoculation et/ou le flétrissement des folioles de type « stress hydrique ».



Crédit : GEVES

Figure 10 : Flétrissement observé sur feuilles

En présence de symptômes typiques, le test est positif pour l'isolat considéré.

En l'absence de symptômes, le test est indéterminé pour l'isolat considéré. En cas de présence d'autres isolats du même échantillon, le test de pouvoir pathogène devra être reproduit sur un autre isolat.

Si besoin de compléter le principe de Koch et en présence de symptômes, la bactérie peut être ré-isolée, sur au moins une plante par échantillon, à partir des tissus vasculaires de plante(s) présentant des symptômes de flétrissement ou de chancre(s). Pour cela, une section de tige de 1 à 2 cm au-dessus du point d'inoculation est prélevée. Après dilacération de cette section dans un liquide stérile (PBS 0,01M, solution saline, eau) (annexe 1), l'isolement est réalisé par dilution/étalements ou épuration sur milieu générique (de type LPGA). Les isolats obtenus doivent présenter les critères du Cmm.



9.2 Calculs et expression des résultats

En absence de colonies suspectes sur les milieux Cmm1 et SCMF et si les contrôles sont conformes, l'échantillon est considéré comme **négatif**.

En présence d'isolat(s) ayant répondu(s) positivement au test d'identification PCR et test de vérification du pouvoir pathogène, l'échantillon concerné est considéré **positif pour la détection de Cmm**.

En présence d'isolat(s) ayant répondu(s) négativement au test d'identification PCR, l'échantillon concerné est considéré **négatif** pour la détection de Cmm.

En présence d'isolat(s) ayant répondu(s) positivement au test d'identification PCR mais indéterminé au test de vérification du pouvoir pathogène, l'échantillon concerné est considéré **indéterminé** pour la détection de Cmm. La souche doit être transmise au LNR pour confirmation. Si l'échantillon ne présente que des souches indéterminées, contacter le LNR

En cas de résultat non conforme sur les témoins inhibition d'isolement, le résultat des échantillons concernés ne peut pas être interprété. Le résultat du test par isolement est **indéterminé**.

Tableau 9 : principes de décision

Contrôles	Colonies suspectes	PCR	PP	Résultat
Conformes	Non			Négatif
Conformes	Oui	-		Négatif
Conformes	Oui	+	-	Indéterminé Souche transmise au LNR pour confirmation
Conformes	Oui	+	+	Positif
Non conformes	Non			Indéterminé Contacter le LNR
Non conformes	Oui	+	+	Positif



10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performances de la méthode présentée dans les tableaux ci-après est extraite de différents rapports de caractérisation et de validation de méthodes d'analyse établis par l'Anses d'Angers et le GEVES dans le cadre de travaux collaboratifs :

- CLAVITOM 2008-2011 : Gestion de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, un enjeu sanitaire majeur pour la production de tomate en France. Rapport final de Contrat de branche. VEGEPOLYS-GEVES-LNPV-INRA-UFS-DGAL-CTIFL-ARELPAL-Briand-AOPTomate-SF3P.
- Fiches de synthèse et données de validation pour OEPP disponibles sur www.eppo.org dont Validation report *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* / Cmm Media. C Tricot, V Grimault 2011.
- Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds: test performance study report. ANSES-GEVES. Janvier 2016.
- Protocole de diagnostic PM 7/42 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de l'Organisation Européenne et méditerranéenne de Protection des Plantes publié en 2016. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 202–225.
- Version 1 du rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse MA049 version 1 « Semences de tomate : Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* par isolement sur milieux et identification de la souche » établi par l'Anses en 2019



10.1 Performances des milieux d'isolement sur une collection de souches pures (cibles et non-cibles) (travaux GEVES / contrat de branche Clavitom)

Tableau 10 : Caractéristiques de performance de l'isolement

Caractéristique	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation	Résultats obtenus lors de la caractérisation des milieux	
		CMM1T	SCMF
Inclusivité	141 souches - cibles <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (collection Clavitom)	100% (Cas atypique d'une souche mutante blanche non « naturelle »)	100%
Exclusivité	72 souches non-cibles*	80,6% Croissance de 14 saprophytes	75% Croissance de 6 autres sous-espèces de <i>Cm</i> et de 12 saprophytes
Exactitude		93,4% (199/213)	91,5% (195/213)

Les croissances de colonies de saprophytes sont complémentaires sur les 2 milieux SCMF et CMM1T. Cependant, la croissance de ce type de colonies est inévitable sur des milieux semi-sélectifs et ne constitue un écueil à la lecture du moment que les colonies ne sont pas envahissantes (ce qui n'est jamais à exclure sur lots de semences) ou inhibitrices du Cmm.

10.2 Performances des tests d'identification sur une collection de souches pures (cibles et non-cibles) (travaux GEVES / contrat de branche Clavitom)

Tableau 11 : Caractéristiques de performance de la PCR et du pouvoir pathogène

Caractéristique	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation	PCR Oosterhof & Berendsen	Pouvoir pathogène
Inclusivité	141 souches - cibles <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (collection Clavitom)	100%	99,3% 1 faux négatif
Exclusivité	72 souches non-cibles*	100%	Obtention de symptômes avec 2 souches pathogènes de la tomate (<i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>). Non critique car ces souches seraient négatives aux tests d'identification
Exactitude		100%	98,6%



*La liste complète des souches de la collection ClaviTom et des résultats est disponible dans le rapport de validation de la méthode.

10.3 Performances globales de la méthode MA 049

Tableau 12 : Caractéristiques de performance de la méthode

Caractéristique	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation	Résultat MA049
Sensibilité diagnostique	Réalisé sur 7 lots de semences présentant une flore saprophytique plus ou moins riche et variée	100 %
Spécificité diagnostique	Réalisé sur 7 lots de semences présentant une flore saprophytique plus ou moins riche et variée	100 %
Exactitude	Réalisé sur 7 lots de semences présentant une flore saprophytique plus ou moins riche et variée	100 %
Répétabilité	Données d'EILV pour 7 laboratoires et 11 échantillons : pourcentage d'accords entre résultats des répliquats.	96 %
Reproductibilité	Données d'EILV pour 7 laboratoires et 11 échantillons : pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons entre les laboratoires	93 %
Limite de détection	Non évalué, donnée transmise par le Naktuinbouw (OEPP 2016)	25 cfu/mL



Annexe 1 : milieux et solutions

Contrôles et conservation des milieux

Les milieux de culture étant des réactifs critiques pour la réalisation des isolements, chaque lot de fabrication de milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire) doit donner lieu à un contrôle de conformité. Les milieux de culture doivent être utilisés dans un délai de deux mois après fabrication sauf contre-indication spécifiée. En cas de non utilisation dans les deux mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu doit être réalisé.

En cas de changement de couleur, de signe d'évaporation / déshydratation ou prolifération microbienne, il convient d'éliminer tout le lot de milieu.

Le stockage des milieux doit être réalisé à l'abri de la lumière, à une température positive $\leq 20^{\circ}\text{C}$.

Conservation : Il est préférable d'utiliser des tampons fraîchement préparés ou conservés au froid après stérilisation.

1. Tampons

Solution tampon phosphate (PB) 50 mM, pH 7.4 pour la macération des semences et les dilutions

Réactifs	g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$	19,57 g
KH_2PO_4	1,65 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3^*$	0,5 g
Eau déminéralisée	1000 mL
Autoclaver 15 min minimum à 121°C	
Tween 20 stérile (10% solution)	0,2 mL

* Recommandé en cas de semences désinfectées à l'hypochlorite de sodium



2. Milieux semi-sélectifs

CMM1T (CMM1tris100), pH 7,7

Réactifs	g/L
Saccharose	10,00
Trizma base (Tris base)	3,32
TrisHCl	11,44
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25
LiCl	5,00
Extrait de levure	2,00
NH ₄ Cl	1,00
Hydrolysate acide de caséine (Casamino acids)	4,00
Agar	15,00
Vérifier le pH à 7,7* et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes minimum.	
Ajouter après refroidissement autour de 60°C:	mg/L
Polymyxin B sulfate Sigma P4932 ou équivalent **	10,00
Acide nalidixique - sodium Sigma N4382 **	28,00
Nystatin ** ou cycloheximide **	100,00

*Le pH de ce milieu est critique pour sa performance ; les volumes doivent être strictement respectés. Le ratio Trizma base / TrisHCl doit être strictement suivi afin d'obtenir le pH attendu (Bert Woudt, Syngenta Seeds). NB: le pH doit être mesuré pour vérification.

** Des solutions mères peuvent être préparées comme suit ; dans ce cas, elles peuvent être conservées à 5°C pendant un mois.

Exemples (à ajuster selon les quantités) :

- 10 mg de polymyxin B sulfate dilué par ml d'eau déminéralisée, utilisation de 1mL par L de milieu
- 10 mg d'acide nalidixique par ml de 0,1M NaOH, utilisation de 2,8ml par L de milieu
- 100 mg de nystatin par ml de solution à 50% DMSO et 50% éthanol ou 100 mg de cycloheximide par ml d'éthanol, utilisation de 1mL par L de milieu

NB : L'utilisation des solutions-mères est recommandée par mesure de sécurité et en raison des performances des balances de précision car il est interdit de réaliser des pesées en dessous de la portée minimale de la balance utilisée.

**SCMF (SCM Fast) pH 7,3**

Réactifs	g/L
Agar	18,00
K ₂ HPO ₄	2,00
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ (anhydre)	0,122
H ₃ BO ₃	1,50
Extrait de levure	2,00
Saccharose	10,00
Vérifier le pH 7,3 et autoclaver 15 minutes minimum à 121°C	
Ajouter après refroidissement autour de 60°C:	mg ou mL/L
Acide nalidixique - sodium Sigma N4382**	20,00 mg
Trimethoprim Sigma T7883**	80,00 mg
acide nicotinique**	100 mg
Nystatin Sigma N6261** ou cycloheximide	100,00 mg
Tellurite de potassium Chapman*(1% solution) BD ou équivalent	1,0 ml

*La provenance du tellurite de potassium est critique

** Des solutions mères peuvent être préparées comme suit ; dans ce cas, elles peuvent être conservées à 5°C pendant un mois.

Exemples (à ajuster selon les quantités) :

- 10 mg d'acide nalidixique par ml de 0,1M NaOH, utilisation de 2mL par L de milieu
- 10 mg de trimethoprim par ml de méthanol à 100% ou DMSO, utilisation de 8mL par L de milieu
- 20 mg d'acide nicotinique par ml d'eau stérile, utilisation de 5mL par L de milieu
- 100 mg de nystatin par ml de solution à 50% DMSO et 50% éthanol ou 100 mg de cycloheximide par ml d'éthanol, utilisation de 1mL par L de milieu



3. Milieux non-sélectifs (MOA REP 001)

LPGA	g/ L
Extrait de levure	5 g
Peptone	5 g
D(+) glucose	10 g
BD bacto agar	15 g
Eau déminéralisée	1L
pH 7	
Autoclave pendant 15 min minimum	
Ajout de 50mg/L de cycloheximide (en solution dans l'éthanol à 95%) pour les isolements de tests de pouvoir pathogène	50 mg

YDC (<i>Yeast extract-Dextrose-Calcium Carbonate medium</i>)	g/ L
Extrait de levure	10 g
Glucose	20 g
CaCO ₃	20 g
Agar bactériologique de type A	15
Eau déminéralisée	1L
Vérifier le pH à 6.9 et autoclaver pendant 15 min minimum	

GYCA	g/ L
Extrait de levure	5 g
D(+) glucose	5 g
CaCO ₃	40 g
Agar bactériologique de type A	15
Eau déminéralisée	1L
Autoclaver pendant 15 min minimum	



Annexe 2 : Etapes de centrifugation et constitution des fractions pour l'étape d'isolement par dilutions/étalements



Crédit : ISF

Macération des semences
et broyage au broyeur à palettes (8.2)



centrifugation lente
(5 min à 180g ou 1 min à 1000g)

surageant (culot jeté) : prélever 2 mL = **concentration « 1 »** ;
+ dilution au 1/10 du surageant = **concentration « 1/10 »**



Centrifugation rapide du surageant :
minimum 5000g minimum 5 min

Culot resuspendu dans 10% du volume initial (surageant jeté) = **concentration « X10 »**

Nombre de boîtes par fraction d'échantillon

Fraction utilisée pour isolement	Echantillon (8.2 ; 8.3)	Témoin inhibition de croissance dopé (5.6.1)
concentration « 1 »	2 boîtes / milieu	/
concentration « 1/10 »	2 boîtes / milieu	/
concentration « X10 »	2 boîtes / milieu	1 boîte / milieu

**Autres boîtes pour témoins (5.6.1)**

	Témoin négatif d'isolement	Témoin positif d'isolement	Témoin négatif d'isolement dopé
Tampon de macération	1 boîte / milieu	-	Minimum 2 boîtes / milieu
Suspension de Cmm	-	Minimum 2 dilutions différentes / milieu	Minimum 2 dilutions différentes / milieu



Annexe 3 : témoin interne d'amplification (facultatif)

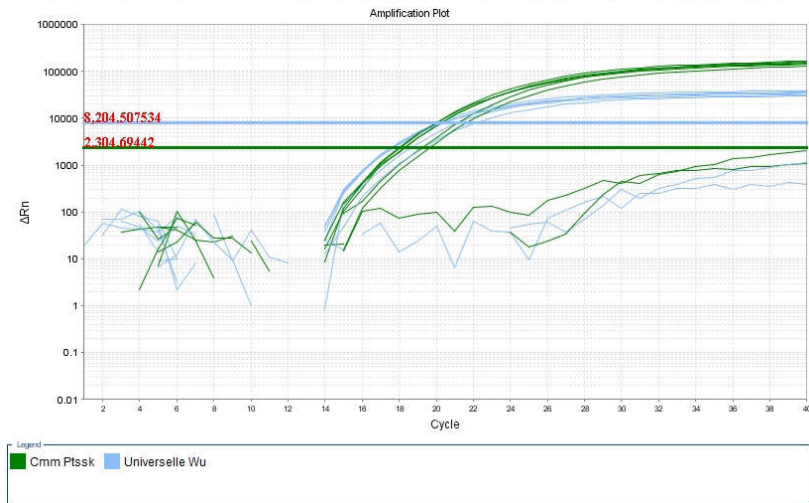
- Oligonucléotides : Oosterhof & Berendsen, 2011 et Wu *et al.* 2008

RZ_ptssk 10 : 5'-ggggCCgAAggTgCTggTg-3'
RZ_ptssk 11 : 5'-CgTCgCCCgCCCgCTg-3'
Sonde RZ_ptssk 12 : 5'-FAM-TggTCgTCCTCggCg-MGB-NFQ-3'
Wu-F : 5'-CAACgCgAAgAACCTTACC-3'
Wu-R : 5'-ACgTCATCCCCACCTTCC-3'
Wu-Probe1 : 5'-VIC-ACgAcAACATgCACCACctg-QSY-3'

- Exemple de mélange réactionnel et conditions de PCR

Mix PCR	Unité	[]	[] finale	Volume 1 tube
H2O				11.94
RZ-ptssk 10	µM	20	0.5	0.63
RZ-ptssk 11	µM	20	0.5	0.63
RZ-ptssk 12 (sonde)	µM	20	0.25	0.31
PerfeCTa mix	X	5	1	5
Wu-F	µM	10	0.2	0.5
Wu-R	µM	10	0.2	0.5
Wu-Probe1	µM	10	0.2	0.5
Volume mix	µL			20
Matrice	µl			5
Volume total	µL			25

Témoin interne d'amplification Ct WU	Ct Ptssk	Résultat
	<40	Résultat attendu pour Cmm
<35	négatif	Résultat attendu pour un non-Cmm
Autres résultats		PCR à refaire sur nouvelles suspensions



Crédit : GEVES



Bibliographie

Leliott R A and Stead D E (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Chapter 6. Media and methods p 169. Ed. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications.

Oosterhof J & Berendsen S (2011) The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Abstr.). *Phytopathology* 101, S133.

Suslow T.V. *et al.*, 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* **72** : 917-918

Wu Y.D., Chen L.H., Wu X.J., Shang S.Q., Lou J.T., Du L.Z. and Zhao Z.Y. (2008). Gram Stain-Specific-Probe-Based Real-Time PCR for Diagnosis and Discrimination of Bacterial Neonatal Sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (8): 2316-2319.