
**Demande d'appui scientifique et technique relatif à
l'officialisation d'une nouvelle méthode officielle pour la
détection du *Clavibacter michiganensis*
subsp. *michiganensis***

Demande « 2017-SA-0197 AST Méthodes de détection de Cmm »

**RAPPORT
d'appui scientifique et technique**

Janvier 2018

Mots clés

Tomate, semences, méthode officielle, détection, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*,

Rapport : 22/01/2018 • version : 01

Modèle ANSES/PR1/9/04-04 [version a]

Présentation des intervenants

PREAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme. Françoise POLIAKOFF –Chef d'unité BVO-LSV - Anses

Mme.Valérie OLIVIER –Responsable d'équipe Bactériologie – UBVO – LSV - Anses

Mme Géraldine ANTHOINE – Chef d'unité UCR - LSV- Anses

M.Mathieu ROLLAND – Chef d'unité UCR - LSV- Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	5
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande	6
Contexte	6
Objet de la demande	6
Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	6
2 Organisation des travaux	7
Méthodes à comparer	7
Principe des méthodes	7
Critères de performance	7
Taille de l'échantillon à analyser	9
Temps de réalisation	9
Applications	9
Délégabilité	10
3 Conclusions et recommandations	12
4 Bibliographie	13
Publications	13
Normes	13
ANNEXES	14
Annexe 1 : Lettre de la demande	15
Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport	16

Sigles et abréviations

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

BSV : Bureau de la Santé des Végétaux

ISHI : International Seed Health Initiative

OEPP : Organisation Européenne de Protection des Plantes

GEVES-SNES : Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences-Station Nationale d'Essais de Semences
PCR : Polymerase chain reaction

IF : Immunofluorescence

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande

Contexte

- La méthode ANSES/LSV/MA048 : Semences de tomate. Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* par immunofluorescence et PCR correspond à la révision de la méthode officielle française actuelle basée uniquement sur l'immunofluorescence. La méthode ANSES/LSV/MA049 : Semences de tomate. Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* par isolement sur milieux et identification de la souche est une nouvelle méthode basée sur le protocole ISHI. Ces deux méthodes ont été évaluées en intralaboratoires ainsi que lors d'un test interlaboratoires dans le cadre de l'OEPP.

La DGAL officialisera une des méthodes sur la base de l'étude des caractéristiques de chacune.

Objet de la demande

Dans le courrier BSV/2017- 09/005 du 14/09/2017, Patrick DEHAUMONT, Directeur Général de l'Alimentation, la DGAL sollicite l'avis de l'Anses pour réaliser une étude comparative des deux méthodes de détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mises au point par le LNR dans la perspective d'officialiser une de ces deux méthodes: la MA048 basée sur la PCR et la MA049 qui repose sur l'isolement des bactéries et sur leur identification (par PCR et par un test de pouvoir pathogène).

Dans le contexte décrit ci-dessus, il est demandé à l'Anses son avis scientifique et technique sur les méthodes évaluées.

Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

Ce rapport a pour objectif de présenter les caractéristiques de performance des méthodes évaluées par le LNR (LSV-UBVO).

2 Organisation des travaux

Méthodes à comparer

- ANSES/LSV/MA048 : Semences de tomate. Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* par immunofluorescence et PCR
- ANSES/LSV/MA049 : Semences de tomate. Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* par isolement sur milieux et identification de la souche

Principe des méthodes

Le principe technique de chaque méthode est différent. La méthode MA048 est basée sur l'enrichissement en bactéries de l'échantillon en favorisant leur multiplication par une macération à température élevée suivi d'un double test de screening, immunofluorescence (IF) et biologie moléculaire (PCR). La méthode MA049 est basée sur l'isolement de la bactérie sur milieu de culture et l'identification de la souche par PCR et test de pouvoir pathogène. La MO049 est la méthode opposable en cas de litige, sous réserve de réussite de l'isolement de colonies dument identifiées.

Tableau 1 : Principe des méthodes

MA048	Macération des semences « à chaud » (18°C - 28°C) pour favoriser la multiplication bactérienne et améliorer la détectabilité des méthodes de dépistage (sérologie, biologie moléculaire) en présence de faibles taux de contamination Dépistage par 2 méthodes complémentaires: - Immunofluorescence sur macérats - PCR sur ADN extraits des macérats
MA049	Macération des semences "à froid" (4°C) pour limiter la multiplication bactérienne (limiter la prolifération des saprophytes) et faciliter l'isolement des colonies bactériennes sur milieux de culture, Centrifugation pour concentrer les macérats et les bactéries cibles et augmenter les chances de détection en présence de faibles taux de contamination, Dilution-étalements sur 2 milieux complémentaires pour isolement de colonies suspectes, Tests d'identification des colonies (PCR et test de pouvoir pathogène)

Critères de performance

Les valeurs des critères de performance des méthodes sont synthétisées dans le tableau 2. L'inclusivité et l'exclusivité des tests ont été établies sur une collection des souches cibles et non-cibles au cours de comparaisons intra-laboratoires réparties entre les laboratoires GEVES (milieux de culture, PCR, pouvoir pathogène) et LNPV (immunofluorescence). La mise au point de la PCR directe sur macérats a été développée par le GEVES. Ces études ont été menées dans le cadre du projet collaboratif français « ClaviTom »: Gestion de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, un enjeu sanitaire majeur pour la

production de tomate en France (Contrat de Branche 2008-2011 ; VEGEPOLYS-GEVES-LNPV-INRA-UFS-DGAL-CTIFL-ARELPAL-Briand-AOPTomate-SF3P).

Les autres critères de performance ont été obtenus lors d'un EILV (Essai inter-laboratoires de comparaison de méthodes), organisé par le LNPV et le GEVES, au niveau européen dans le cadre de l'OEPP (2014-2016).

Les résultats obtenus à partir de panels homogènes de semences de tomate permettent de considérer que les deux méthodes sont équivalentes pour définir le statut d'un échantillon.

Tableau 2 : Valeurs obtenues par critère de performance pour chacune des méthodes

Critères	Définition	MA048	MA049
Sensibilité analytique (inclusivité)	Pourcentage de souches cibles détectées	100%	100%
Spécificité analytique (exclusivité)	Pourcentage de souches non-cibles non détectées	94% L'exclusivité de 94% obtenue avec la méthode MA048 est due à des faux positifs obtenus avec quelques saprophytes "look alike" c'est-à-dire très proches de Cmm, observés pour la PCR R/8 et pour l'IF.	100%
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas de la cible	10^1 à 10^2 b/mL	25 b/mL (donnée Naktuinbouw)
Seuil de détection EILV	Niveau de concentration le plus bas de la cible (proportion de réussite à l'isolement sur les lots de semences)	Identique	identique
Sensibilité diagnostique EILV	Pourcentage d'échantillons contaminés détectés positifs	100%	100%
Spécificité diagnostique EILV	Pourcentage d'échantillons non contaminés non détectés	100%	100%
Exactitude diagnostique EILV	Pourcentage de vrais échantillons positifs et négatifs détectés avec le bon statut parmi des échantillons cibles et non-cibles	100%	100%
Répétabilité EILV	Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons	98%	95%

Reproductibilité EILV	Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons testés dans des conditions différentes	90%	91%
--------------------------	--	-----	-----

Taille de l'échantillon à analyser

Dans les deux cas, l'échantillon soumis à analyse est de 10.000 semences. En revanche, la MA048 requière 2.000 semences supplémentaires afin de réaliser un témoin d'inhibition, indispensable à la fiabilité du résultat de l'analyse. Dans le cas de la MA049 ce témoin est préparé à l'aide d'excédents de macérât issus des 10.000 semences non disponibles dans le cas de la MA048.

Les effectifs des nouvelles méthodes ont été augmentés par rapport à la méthode actuelle (5000 semences) afin de limiter les risques de résultats faussement négatifs. Ces effectifs sont en conformité avec ceux décrits dans le protocole PM7/42 de l'OEPP.

A titre indicatif, les semences de tomates hybrides sont vendues par 1000 semences (soit 1 à 3 g) à un prix compris entre 100€ et 1000€.

Tableau 3 : Taille des échantillons soumis à essai

MA048	12000 semences
MA049	10000 semences

Temps de réalisation

La durée nécessaire à la mise en œuvre de l'analyse entre la date de réception et celle de la fin d'analyse diffère de façon importante en fonction de la méthode. La MA048 permet d'obtenir un résultat en 5 jours. La MA049 permet de délivrer un résultat au mieux à 12 jours s'il est négatif. En cas de résultat positif, le résultat ne pourra être délivré qu'au bout de 22 à 33 jours.

Tableau 4 : Durée de l'analyse

MA048	Négatif: 5 jours (3 jours de macération et 2 jours pour réaliser l'analyse par immunofluorescence ou PCR) Suspicion de positif: 6 jours (3 jours de macération, 1 jour pour l'immunofluorescence + 2 jours pour la PCR)
MA049	Négatif: 12 jours (macération 1 jour; isolement 11 jours) Suspicion de positif : ajouter 1 jour pour le(s) test(s) d'identité des colonies suspectes (PCR) et 10 à 21 jours pour le test de pouvoir pathogène.

Applications

L'intérêt de la MA048 est qu'elle convient parfaitement comme méthode de dépistage dans le cas de besoin d'un résultat rapide (par exemple, blocage de la marchandise en douane). L'intérêt majeur de la MA049 est que celle-ci est complète en cas de litige (conservation de la souche bactérienne vivante, identification, traçabilité,...) et polyvalente (possibilité de détecter d'autres bactéries en parallèle).

Tableau 5 : Contexte d'application des méthodes

MA048	Méthode adéquate en dépistage (détection/identification ciblées). Sa fiabilité est confortée par 2 techniques de principes biologiques différents (sérologique et moléculaire)
MA049	<p>Méthode microbiologique permettant l'isolement de cultures pures de Cmm, la vérification de l'identité moléculaire des colonies isolées et de leur pouvoir pathogène ainsi que la conservation de la souche isolée.</p> <p>Autre application : Possibilité de détection multi-organismes Par utilisation du même macérat et de milieux semi-sélectifs complémentaires, des isolements de bactéries du genre <i>Xanthomonas</i> (<i>eu</i>)<i>vesicatoria</i> et <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> peuvent être menés C'est l'une des raisons pour laquelle cette méthode est privilégiée par l'UFS. NB: le groupe des « <i>Xanthomonas vesicatoria</i> » (<i>X vesicatoria</i>, <i>X euvesicatoria</i>, <i>X gardneri</i>, <i>X performans</i>) est réglementé (2000/29 CE) mais ne fait pas l'objet d'un dépistage commun à l'import avec Cmm. <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> n'est pas de quarantaine. La problématique est différente pour l'export car ces 3 bactéries (Cmm, Xves et Ps <i>tomato</i>) sont présentes sur le territoire français.</p>

Déléabilité

Capacité du réseau existant

A ce jour, un seul laboratoire (GEVES-SNES) du réseau des laboratoires agréés détient la compétence pour l'isolement de bactéries issues de semences sur milieux de culture et donc à mettre en œuvre immédiatement la méthode MA049. En revanche, les laboratoires actuellement agréés pour la réalisation des analyses sur semences de tomate par Immunofluorescence ont également la capacité de mettre en œuvre la PCR proposée dans le MA048 (agrément pour des analyses par PCR).

Tableau 6 : Capacité des laboratoires agréés à mettre en œuvre les méthodes

MA048	Les 4 laboratoires actuellement agréés sur la ligne Cmm/IF sont déjà agréés en PCR sur une ligne d'analyse végétale telle que sur les bactérioses de la pomme de terre (LDA67, Labocea). Le GEVES a participé à la validation de la méthode et à l'EILV. Labocea a également participé à l'EILV de 2014.
MA049	Le laboratoire GEVES pratique cette méthode (aussi référencée comme ISHI4 par l'ISHI-VEG) depuis de nombreuses années en prestations privées pour la filière semences, prestation que ne réalise pas en routine le LNR. Labocea est agréé pour les analyses par isolement microbiologique d' <i>Erwinia amylovora</i> sur échantillon symptomatique de Maloidées, matrice très différente des semences et méthode moins complexe en mise en œuvre que pour Cmm. Les autres laboratoires ne sont pas connus pour disposer de solides compétences en microbiologie.

Opérationnalité du réseau

Le réseau des laboratoires agréés actuel peut être opérationnel rapidement pour mettre en œuvre la méthode MA048. En revanche la mise en œuvre de la MA049 ne pourra être effective avant un an minimum, une formation et un accompagnement sur plusieurs mois complétés par un essai d'aptitude (EILA) ou contrôle de capacité s'avèrent nécessaires.

Tableau 7 : Conséquence en termes de transfert des méthodes pour la délégation des analyses

MA048	Possible à court terme : simple changement de méthode faisant appel à des compétences techniques déjà maîtrisées par le réseau de laboratoires agréés actuellement pour la détection de Cmm. Formation non indispensable, contrôle de capacité de mise en œuvre via un EILA (à organiser) pour tous les laboratoires déjà agréés en Immunofluorescence sur semences de tomate
MA049	Possible à moyen terme : Nécessité d'organiser un appel à candidature pour construire un nouveau réseau de laboratoires agréés pour cette ligne d'analyse car requière des compétences peu ou pas disponibles. Besoin d'une formation complète des candidats retenus et accompagnement de retour dans leurs laboratoires par tests en doublon (durée 3- 6 mois) puis contrôle de capacité (EILA) (délai de 3 mois pour réalisation). Soit un délai de l'ordre d'un an pour un réseau opérationnel.

3 Conclusions et recommandations

Les deux méthodes évaluées sont différentes en termes de mise en œuvre, elles sont reconnues équivalentes en termes de fiabilité de résultat au regard du protocole de diagnostic de l'OEPP (Organisation Européenne de Protection des Plantes). Les laboratoires agréés ont la compétence pour mettre en œuvre la méthode MA048 permettant une délégation rapide de l'analyse. La méthode MA049 est la méthode reconnue et pratiquée dans les échanges commerciaux au niveau international (ISHI-ISF, ISTA), sa complexité de mise en œuvre et l'absence de maîtrise de celle-ci par les laboratoires agréés à ce jour entraîneront un dispositif plus lourd et plus long de transfert pour un réseau opérationnel au niveau national.

Date de validation du rapport : 22/01/2018

4 Bibliographie

Publications

ISF (2016) Methods for the detection of *Clavibacter michiganensis* ssp michiganensis on tomato seeds. version. 4.3.1 August 2016 (http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html).

Méthode LNPV BH/06/01 version a: Semences de tomate détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (agent du chancre bactérien de la tomate) par immunofluorescence indirecte.

OEPP/EPPO Bulletin - PM 7/42 (3) : **Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*** (2016) 46 (2), 202–225 -

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de la demande



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation

Service des actions sanitaires en production primaire

Sous direction de la qualité, de la santé et de la protection des végétaux

Bureau de la santé des végétaux

251 rue de Vaugirard
75352 Paris cedex 15

Dossier suivi par : Raffaëlla GOGLIA
Courriel : bsvsdppov.dgpa@agriculture.gouv.fr
Tél : 01 49 55 81 48

Monsieur Roger GENET

Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
(ANSES)

14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort cedex

Paris, le 14 SEP. 2017

Réf. interne : BSV/2017- 09/005

Objet : Demande d'avis scientifique et technique en vue de l'officialisation d'une nouvelle méthode officielle pour la détection du *Clostridium michiganensis* subsp. *michiganensis*

Monsieur le Directeur général,

La méthode officielle actuellement en vigueur (BH/06/01a) pour la détection du *Clostridium michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) manque de fiabilité. Ce constat a rendu nécessaire la mise au point d'une autre méthode d'analyse, plus fiable, qui aura pour vocation à terme de remplacer la BH/06/01a. Dans ce cadre, le LNR a mis au point deux méthodes : la MA048, basée sur PCR et la MA049, qui repose sur l'isolement des bactéries et sur leur identification (par PCR et par un test de pouvoir pathogène).

Dans la perspective d'officialiser une de ces deux méthodes, je sollicite l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail. Il vous est demandé de réaliser une analyse scientifique et technique comparative des deux méthodes mises au point, notamment en ce qui concerne leurs critères de performance.

Sur la base de cet avis, la DGAL officialisera l'une ou l'autre des deux méthodes.

Mes services se tiennent à votre disposition pour vous apporter, le cas échéant, toute information complémentaire.

Copie : SDPAL/BERL

Le Directeur Général de l'Alimentation,
Patrick DEHAUMONT

Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport

[à utiliser si la première version est actualisée afin de tracer et de rendre clairement visibles les modifications.]

Date	Version	Page	Description de la modification
22/01/2018	01		Première version