

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/ LSV / MA 049 version 1

Consultation

Semences de tomate

Détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

par isolement sur milieux et

identification de la souche

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence Bactéries phytopathogènes sur matrices autres que bananier, agrumes et plantes tropicales



Historique de la méthode

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

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
01		Consultation	Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du public du 04 avril au 04 Mai 2017 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par l'ANSES - LSV et le GEVES :

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

Laboratoire National de Référence : Bactéries phytopathogènes sur matrices autres que bananier, agrumes et plantes tropicales

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers CEDEX01

Contact : angers.lsv@anses.fr

GEVES Rue Georges Morel 49071 BEAUCOUZE cedex



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1 Objet et domaine d'application	8
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	9
5 Réactifs	10
5.1 Eau	10
5.1.1 Préparation des échantillons, des milieux et tampons	10
5.1.2 Analyse par PCR	10
5.2 Solutions salines et milieux (annexe).....	10
5.3 Réactifs pour biologie moléculaire (PCR en temps réel Taqman®).....	10
5.4 Réactifs sérologiques pour immunofluorescence	11
5.5 Autres réactifs ou consommables à usage unique	11
5.6 Contrôles et témoins	12
6 Appareillage et matériels	13
6.1 Pour la préparation des solutions, milieux et échantillons.....	14
6.2 Pour le broyage.....	14
6.3 Pour l'incubation des milieux.....	14
6.4 Pour les tests moléculaires	14
6.5 Pour le test de pouvoir pathogène	14
7 Échantillons.....	14
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	15
8 Mode opératoire	16
8.1 Matériaux de référence.....	16
8.1.1 Témoin positif de croissance sur milieux	17
8.1.2 Contrôles d'inhibition de croissance	17
8.1.3 Contrôle négatif de stérilité du tampon de macération	17
8.2 Préparation des échantillons pour analyse	17
8.3 Extraction de la bactérie-cible des semences	17
8.4 Etape d'isolement	18
8.4.1 Dilutions et étalements sur milieux	18
8.4.2 Incubation.....	19
8.4.3 Lectures et interprétation	19
8.5 Repiquages des isolats suspects	19
8.6 Identification rapide des isolats suspects (étapes facultatives)	19



8.7	Identification des isolats par test(s) moléculaire(s)	20
8.7.1	Extraction d'ADN par lyse thermique	20
8.7.2	PCR en temps réel Taqman® d'après Oosterhof & Berendsen, 2011	20
8.8	Test de pouvoir pathogène	21
9	Résultats	21
9.1	Contrôle de la validité des résultats	21
9.1.1	Isolement sur milieux	21
9.1.2	Lectures et interprétation de la PCR Taqman® sur isolats	22
9.1.3	Lectures et interprétation du test de pouvoir pathogène	23
9.2	Calculs et expression des résultats de l'isolement sur milieux	23
10	Caractéristiques de performance de la méthode	23
10.1	Performances des milieux d'isolement sur une collection de souches pures (cibles et non-cibles) (travaux GEVES / contrat de branche Clavitom)	24
10.2	Performances des tests d'identification sur une collection de souches pures (cibles et non-cibles) (travaux GEVES / contrat de branche Clavitom)	25
10.3	Critères de performance par essai inter-laboratoires de validation du protocole « isolement et identification de la souche » sur macérats de semences de tomate (issus d'une macération au froid):	26
	Annexe	28
	Bibliographie	33



Introduction

La bactérie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith, 1910; Davis *et al.*, 1984) (Cmm) est une bactérie listée dans l'annexe 2, partie A, chapitre 2b de la directive 2000/29/CE. C'est à ce titre un organisme réglementé dans l'Union Européenne, organisme nuisible présent et important dans l'Union Européenne, dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les états membres s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* est également classée en catégorie 2 dans l'arrêté du 15 décembre 2014 relatif à la liste des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces végétales.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, l'agent causal de la maladie du chancre bactérien de la tomate, 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. La présence de traitement phytosanitaire de surface ou de traces de désinfectants 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. La détention et/ou la manipulation de la bactérie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* est soumise à l'obtention d'un arrêté préfectoral d'agrément en accord avec la directive européenne 2008/61 CE. Il est ainsi nécessaire que les installations de laboratoire permettent le contrôle des déchets solides et liquides. 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.

2 Documents de référence

- Méthodes générales d'analyse MOA 010 « Immunofluorescence » et MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : la présente méthode ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de ces méthodes si utilisation de ces techniques.
- Protocole de diagnostic PM 7/042 *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.
- Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed ISHI-Veg version 4.3.1 août 2016 http://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2016/08/Tomato_Cmm_2016.pdf

3 Termes, sigles et définitions

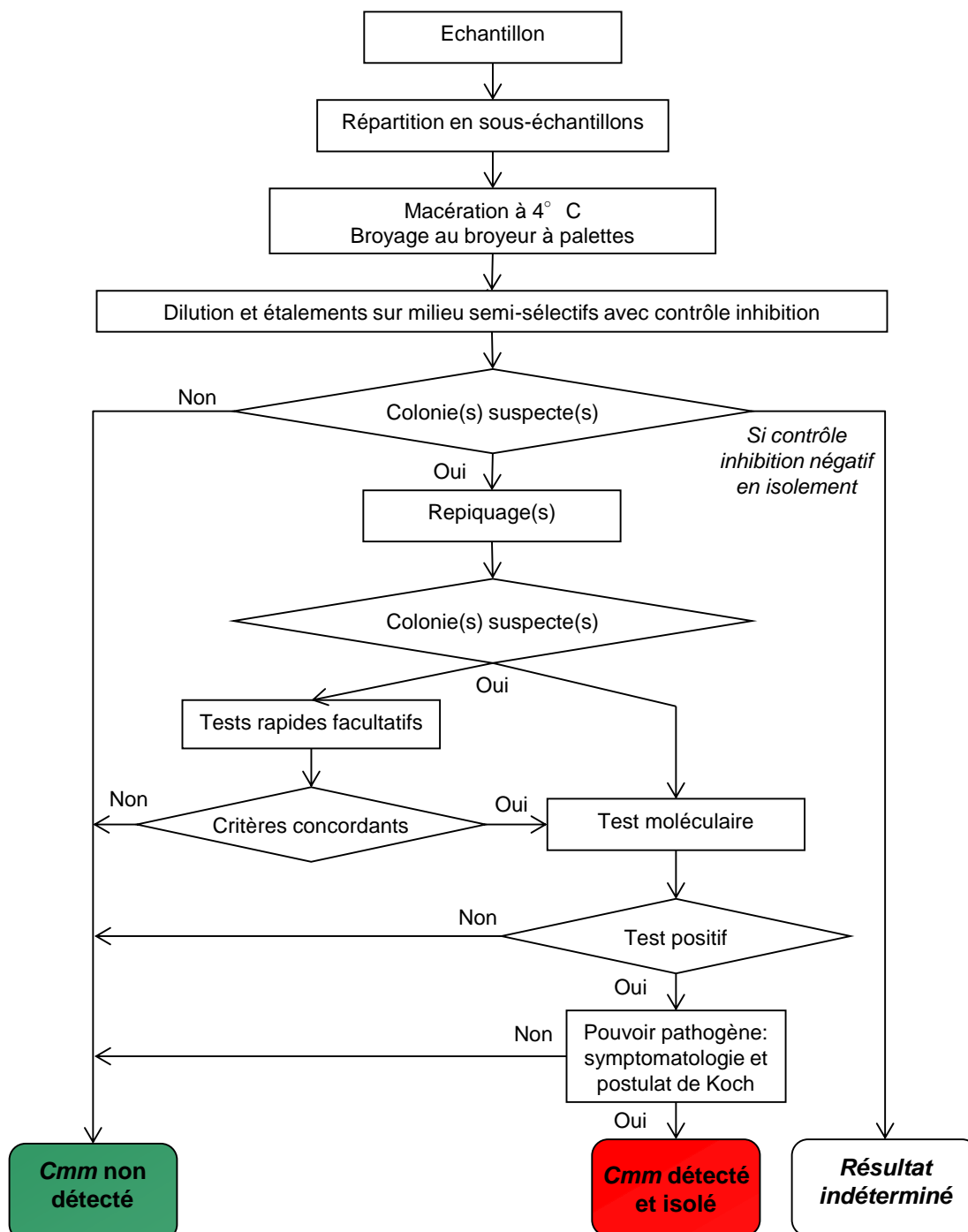
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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 :





5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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 bactérien pour les parties de la méthode de principe microbiologique, et pour les parties moléculaires à l'absence d'ADN cible, de nucléase, d'inhibiteur(s) de PCR ou de tout autre élément pouvant interférer avec les réactifs du test.

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 utilisés doivent être de qualité analytique. Préalablement à la mise en œuvre des analyses, il convient de s'assurer que la conformité des réactifs a été vérifiée, notamment la spécificité, le seuil de détection et la dilution d'emploi.

5.1 Eau

5.1.1 Préparation des échantillons, des milieux et tampons

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.

5.1.2 Analyse par PCR

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

5.2 Solutions salines et milieux (annexe)

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

Il est recommandé d'ajouter du Na₂S₂O₃ dans le tampon de macération pour les échantillons connus pour être désinfectés à l'hypochlorite.

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

- Oligonucléotides : Oosterhof & Berendsen, 2011 (ou équivalent)

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



Un contrôle interne d'amplification peut être ajouté au mélange réactionnel.

- Kit de mélange réactionnel prêt à l'emploi PCR

Le kit utilisé dans le cadre de la validation de cette méthode est le qPCR Mastermix Applied Biosystem.

5.4 Réactifs sérologiques pour immunofluorescence

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

- Antisérum polyclonal dirigé 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 :
 - o Désinfectant à action bactéricide ;
 - o 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) ;
 - o 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 :
 - o Coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté ;
 - o Sacs plastiques pour macération ou pots plastiques stériles de volumes suffisant.
- Pour centrifugations et isolements sur milieux:
 - o Tubes pour centrifugation de type Falcon;
 - o Microtubes de 1,5 ou 2 mL ;
 - o Boîtes de Petri ;
 - o Tubes pour dilutions en série.
- Pour biologie moléculaire :
 - o Microtubes ou capillaires pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Pour le test de pouvoir pathogène :
 - o Seringues de 1 mL et aiguilles à insuline ou piques en bois de type cure dents stériles ;
 - o Plantes 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, sérologie 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.

Dans ce protocole, des témoins sont inclus pendant l'étape de dilution/étalement des macérats de semences, permettant de valider l'absence d'inhibition de la bactérie-cible par la flore d'accompagnement des semences lors de cette étape et de vérifier la croissance des colonies-cibles sur les milieux en l'absence de compétition (témoin positif).

- un contrôle positif d'isolement (T+) : suspension de souche-cible, produite au préalable, introduite à l'étape de dilutions/étalements et devant produire un résultat positif à l'issue de la manipulation. Celui-ci garantit la qualité de la manipulation et permet la visualisation des colonies bactériennes sur les différents milieux, en absence de compétition avec la flore des semences.
- un contrôle inhibition de croissance (TI +) obligatoire pour chaque échantillon : des contrôles de croissance de Cmm par dopage des macérats de chaque sous-échantillon doivent être ajoutés systématiquement, en particulier avec une souche **à croissance lente**, lors de l'étape post-centrifugation. En effet, la capacité de croissance de la bactérie-cible 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. Les contrôles inhibition doivent être traités dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ils doivent permettre de visualiser des colonies de Cmm en absence d'inhibition totale ou partielle (cf 8.1.2). Ils donnent au minimum l'assurance d'un déroulement correct de l'étape d'isolement et des manipulations suivantes.
- un contrôle négatif d'isolement (T -) : il est réalisé avec le tampon servant à la macération des semences, ne contenant pas l'organisme cible, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Un seul est nécessaire par série d'analyse. Ce contrôle doit être déclaré non contaminé à l'issue de la manipulation.

En identification des isolats par biologie moléculaire et en sérologie, les témoins de référence doivent être inclus au cours du processus de PCR et d'IF (facultative) pour valider respectivement les étapes d'amplification génique et de coloration d'immunofluorescence. Cependant, des témoins internes d'amplification peuvent être directement inclus dans les mélanges réactionnels de PCR.

Conformément aux exigences des méthodes officielles d'analyse MOA 022 et MOA 010 (si utilisation de l'IF), les témoins sont constitués *a minima* de :

- un contrôle positif d'IF (IF+) : suspension de souche-cible, produite au préalable, introduite à l'étape de coloration d'IF et devant produire un résultat positif à l'issue de la manipulation. Celui-ci garantit la qualité de la manipulation pendant la phase de coloration d'immunofluorescence.
- un contrôle négatif d'amplification de PCR (A -) : contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction PCR.
- un contrôle positif d'amplification de PCR (A+) : solution d'ADN cible introduite à l'étape d'amplification et devant produire un résultat positif à l'issue de la manipulation. Ceci garantit la qualité de la manipulation pendant la phase d'amplification génique ainsi que le bon fonctionnement du matériel. Ce contrôle nécessite au préalable de réaliser une extraction d'ADN via par exemple une lyse thermique.



Lors du test de pouvoir pathogène, des plantes sont inoculées avec une souche-cible et d'autres avec de l'eau afin de s'assurer de la qualité des symptômes attendus (témoin positif) et de l'absence de contamination croisée (témoin négatif).

Dans la présente méthode, les souches utilisées comme témoin positif lors de l'isolement, des tests d'identification et du test de pouvoir pathogène doivent être des souches de référence de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Des isolats du laboratoire, préalablement vérifiés sur milieu, en test moléculaire et/ou de pouvoir pathogène et déposés à la CIRM-CFBP*, peuvent également être utilisés comme souches témoins de référence.

*CIRM - CFBP : Centre International de Ressources Microbiennes – Collection Française de Bactéries associées aux Plantes

La manipulation de ces souches doit s'effectuer de manière à éviter toute contamination croisée avec les isolats de l'analyse en cours.

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. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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).

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
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 = $\pm 3^\circ\text{C}$ thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$
Temps	EMT = 10%



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

6.1 Pour la préparation des solutions, milieux et échantillons

- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons ;
- Agitateur rotatif ou orbital pouvant assurer une agitation suffisante des semences sans débordement des contenants à 4°C.

6.2 Pour le broyage

Système de broyeur à palettes avec minuterie. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations croisées.

6.3 Pour l'incubation des milieux

Incubateur bactériologique régulé autour de 25-28°C.

6.4 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 ».

6.5 Pour le test de pouvoir pathogène

Chambre climatique ou serre permettant une régulation entre 21 et 30°C, entre 70 et 80% d'humidité, avec un minimum de 8h de lumière/jour.

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 10000 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 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

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 concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat positif et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents 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.



8 Mode opératoire

8.1 Matériaux de référence

Des différences de vitesse de croissance des colonies bactériennes ont été observées sur les milieux semi-sélectifs en fonction des souches (photo 1). Il convient donc d'utiliser au minimum une souche de référence connue pour sa vitesse de croissance lente pour l'étape d'isolement. Pour les étapes d'identification, une seule souche est nécessaire.

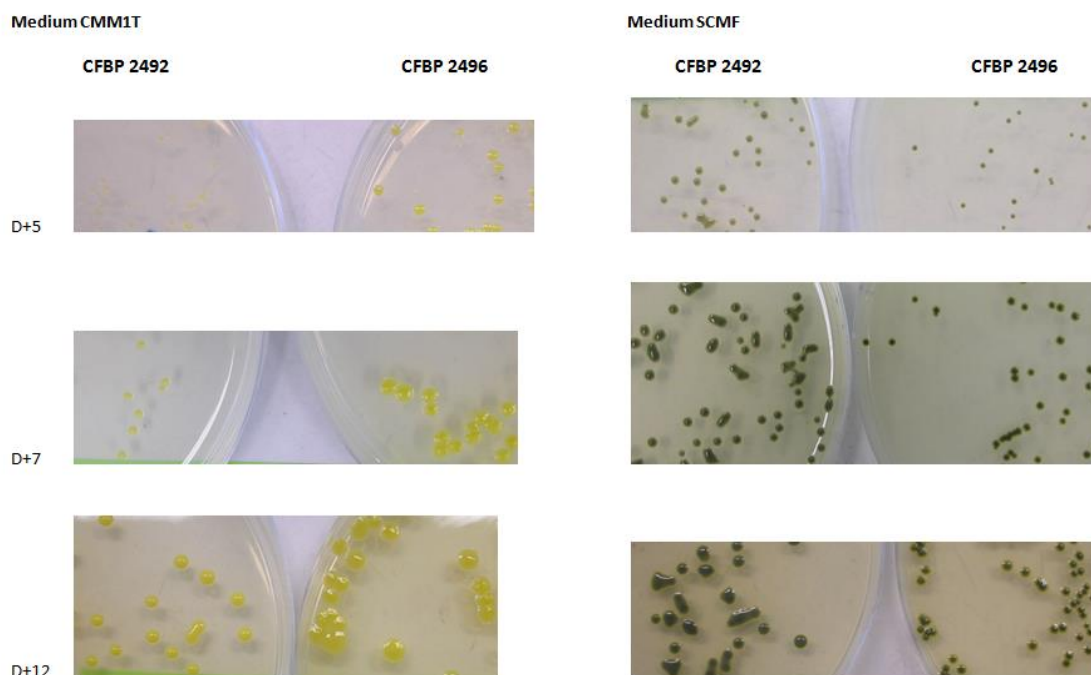


Photo1 : différences de vitesse de croissance en fonction des souches CFBP2492 et CFBP2496 (GEVES)

Ces souches doivent être fraîchement repiquées au moment de leur usage.

Ainsi, une à plusieurs souche(s) de référence (ex : CFBP2492, CFBP 2496, CFBP 4999) ou toute souche de collection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, dûment purifiée, caractérisée et identifiée, est étalée stérilement sur une boîte de Petri contenant du milieu de culture de type LPGA, ou tout autre milieu favorable à la croissance de la bactérie. La boîte est placée en incubation dans une enceinte de culture adaptée, à une température permettant la croissance de la bactérie (température indicative 25-28° C), pendant le temps nécessaire à la croissance des colonies (de 72 à 96 heures). Après incubation, une colonie bactérienne est prélevée et mise en suspension dans un liquide stérile (eau, tampon de macération) afin d'obtenir une concentration donnée. Des repiquages de culture précédemment isolées sont également utilisables pour réaliser des suspensions.

Pour la PCR, les suspensions sont réalisées dans l'eau. La lyse thermique est obtenue par le traitement suivant : 15 min à 95-100°C suivi d'un passage à une température $\leq 20^\circ\text{C}$ pendant 15 minutes au minimum.



8.1.1 Témoin positif de croissance sur milieux

Pour s'assurer que Cmm est capable de se développer sur les milieux et de former des colonies de morphologie caractéristique, 100 µL d'une suspension d'environ 10^2 - 10^3 cfu/mL d'une souche de référence sont étalés sur au moins une boîte des 2 milieux semi-sélectifs CMM1T et SCMF, de sorte à obtenir une gamme de colonies entre 30 et 300. Les colonies typiques se formant dans les 10 jours serviront de référence lors des lectures de boîtes des échantillons.

8.1.2 Contrôles d'inhibition de croissance

Des aliquots de(s) macérat(s) de semences concentré(s) x10 (post centrifugation) sont additionnés pour chaque sous-échantillon d'une suspension bactérienne de Cmm de sorte à obtenir un niveau recommandé de 20 à 100 ufc / 0,1 mL. Ces extraits dopés sont ensuite étalés (100 µl par boîte) sur chaque milieu semi-sélectif (CMM1T et SCMF) et incubés pendant 10 jours à 28 °C.

Pour cela, à partir des macérats (x10) de chaque sous échantillon, ajouter par exemple 10 µL d'une suspension bactérienne de l'ordre de 10^3 et 10^2 cfu/mL du témoin positif (à croissance lente) dans 490µL de macérât. Les contrôles positifs doivent être préparés de sorte que le risque de contamination croisée avec les échantillons pour analyse soit exclu (séparation dans l'espace et/ou le temps).

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 10^2 et 10^1 cfu/mL.

8.1.3 Contrôle négatif de stérilité du tampon de macération

Pour s'assurer de la stérilité du tampon de macération, 100 µL de celle-ci sont étalés sur une boîte de chacun des milieux d'isolement.

8.2 Préparation des échantillons pour analyse

Au minimum, par échantillon, 2 sous-échantillons d'une taille maximale de 10 000 semences devraient être testés.

Si le nombre de semences est insuffisant, analyser la totalité de l'échantillon.

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 en comptant et pesant 3 x 100 semences (le laboratoire ne peut être tenu responsable des incertitudes liées à ce mode de calcul)

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).

8.3 Extraction de la bactérie-cible des semences

Chaque sous-échantillon doit être transféré dans un sachet solide en polyéthylène avec filtre, de type Bioreba. Un volume de 4 ml de solution tampon phosphate 50 mM stérile (annexe) est ajouté par gramme de graines. Bien fermer les sachets pour éviter la fuite de liquide.



Les sous-échantillons sont ensuite laissés à macérer à 4°C pendant 16 à 24 heures sous agitation (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 suffisantes pour obtenir des particules blanches résultant de l'endosperme. Quatre minutes à la vitesse maximale sont ainsi recommandées pour le broyeur Interscience Bagmixer et 8 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 (photo 2).



Photo 2 : macérat obtenu après passage au broyeur à palettes (photo ISF)

Après une phase de repos pendant environ 5 minutes 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 est transféré dans un tube stérile (le culot est jeté) et centrifugé à une vitesse d'au minimum 9000 g pendant 20 minutes à environ 4 °C. Le surnageant est jeté.

Le 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 phosphate 50 mM pour obtenir l'extrait concentré x10. La suspension obtenue sera subdivisée : une première fraction est utilisée pour l'analyse et une seconde fraction de 450 µL pour le contrôle inhibition sur boîte (cf 8.1.2). La partie restante est conservée comme reliquat jusqu'à la l'étape de lecture des boîtes.

8.4 Étape d'isolement

8.4.1 Dilutions et étalements sur milieux

Des aliquotes de 100 µl de macérats de semences concentrés x10 (après centrifugation rapide) et leurs dilutions au 1/10 et 1/100 préparées dans 50 mM de tampon PB (annexe 1) sont étalées sur au moins deux boîtes par concentration des 2 milieux semi-sélectifs CMM1T et SCMF. Les boîtes ensemencées sont mises à incuber à 28 ° C.

En parallèle, les contrôles inhibition dopés sont préparés de la façon suivante comme décrit en 8.1. Tous les témoins (inhibition dopés, macération dopé, témoin positif de croissance, témoin tampon négatif) sont étalés à raison de 100 µL par boîte, sur une seule boîte par dilution et par milieu.



8.4.2 Incubation

L'incubation est réalisée à 26-28°C pendant approximativement 10 jours.

8.4.3 Lectures et interprétation

A l'issue de la période d'incubation, les colonies en croissance sur les milieux sont observées. Les caractéristiques des colonies de Cmm sont les suivantes :

- Sur CMM1T: colonies jaunes, rondes, bombées, muqueuses.
- Sur SCMF: colonies gris souris avec des ponctuations noires, muqueuses, sans forme précise

Comparer les colonies au témoin positif (8.1.1).

En présence de colonies suspectes, celles-ci doivent subir un repiquage (8.5), des tests d'identification (8.6 ; 8.7) et de vérification du pouvoir pathogène (8.8).

8.5 Repiquages des isolats suspects

Si présentes, les colonies suspectes (1 à 5 par sous-échantillon) doivent être repiquées sur un milieu non sélectif, de type LPGA ou GYCA/YDC en vue d'une vérification de l'aspect cultural et de 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, fluide.

8.6 Identification rapide des isolats suspects (étapes facultatives)

Une culture est identifiée comme Cmm lorsqu'un résultat positif est obtenu à au moins un test moléculaire spécifique (8.7) et au test de pouvoir pathogène (8.8). Cependant, afin de discriminer rapidement certaines souches non suspectes, il est possible de réaliser tout ou partie des tests rapides suivants (composition en annexe) :

Pré-tests*	Résultat attendu
Gram au KOH** ou coloration de GRAM	Pas de filament Positif
Catalase	Positive
Oxydase	Négative
Immunofluorescence*** sur souche	Positif

*Les tests de Gram, catalase et oxydase sont décrits en annexe d'après Leliott et Stead (1987).
Le gram au KOH est selon Suslow *et al.*, 1982.

**Sur culture fraîche de 24h et non dense

***Se référer à la MOA010 pour la mise en œuvre de cette méthode sur souche

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 8.7 et 8.8.



8.7 Identification des isolats par test(s) moléculaire(s)

À l'issue des tests rapides facultatifs, les souches ayant les critères de conformité au Cmm doivent être identifiées par au moins un test moléculaire. Un test est proposé dans cette méthode. D'autres tests peuvent être réalisés en complément à partir du moment où ils ciblent des régions différentes, donc complémentaires et qu'ils ont été préalablement validés par le laboratoire utilisateur en particulier en inclusivité (couverture la plus large possible des souches de Cmm).

8.7.1 Extraction d'ADN par lyse thermique

Préparer une suspension à environ 10^7 cfu/mL de chaque souche suspecte. Effectuer une lyse des cellules bactériennes par chauffage environ 15 minutes à 95° C et refroidir immédiatement sur la glace ou à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ pendant 15 min.

Deux amplifications sont réalisées par ADN.

La PCR est mise en œuvre en référence à la méthode MOA 022.

8.7.2 PCR en temps réel Taqman® d'après Oosterhof & Berendsen, 2011

Cette PCR en temps réel a été dessinée pour cibler deux composants du système enzymatique de kinase (PTSSK). Elle est basée sur des données de séquençage acquises à partir de la souche de Cmm NCPPB 382. Elle doit être effectuée avec les amorces RZ_ptssk 10 / RZ_ptssk 11 et la sonde RZ_ptssk 12.

Le volume réactionnel est de 25 μL : 23 μL de mélange réactionnel et 2 μL d'ADN des isolats à tester.

Le mélange réactionnel est le suivant :

Réactifs	Concentration initiale	Volume [μL] dans 25 μL	Concentration Finale
TaqMan master mix (Applied Biosystems)	2x	12,5	1x
RZ_ptssk 10	20 μM	0,3	0,24 μM
RZ_ptssk 11	20 μM	0,3	0,24 μM
RZ_ptssk 12	20 μM	0,3	0,24 μM
lysate bactérien	-	2,0	-
Eau ultra pure	-	Jusqu'à 25,0	-
Total	-	25,0	-

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

Un contrôle interne d'amplification peut être ajouté au mélange réactionnel. Il convient alors d'ajuster les concentrations du mélange réactionnel en conséquence.

Le programme de PCR est le suivant: incubation 10 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C.



8.8 Test de pouvoir pathogène

Pour chaque échantillon dont au moins un isolat est suspect sur la base des résultats conformes aux tests des points 8.6 et 8.7, au moins un isolat doit être vérifié par le test de pouvoir pathogène.

Pour ce faire, cinq 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 (3 plants) sont inoculés avec une souche de référence et les témoins négatifs (3 plants) avec de l'eau stérile. 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 pique au cure-dents:

- par injection à l'aiguille dans la tige (OEPP PM7/42) d'une suspension bactérienne (suspension de la culture à tester dans 100 µl d'eau stérile ou 0,01 M de PBS (annexe)).
- par pique dans la tige à l'aide d'un cure-dents trempé directement dans la culture bactérienne de la souche à tester (ISH14).

Les plantules sont cultivées à 21-30 °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

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

Comme déjà précisé, l'observation et 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 :

- Témoin positif (T+) : présence de colonies isolées 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, ou à la défaillance des milieux (par exemple défaut dans la préparation, la conservation,...).
- 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 Taqman® sur isolats

Pour la détermination de la ligne de seuil, il est possible d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur ou de positionner la ligne de seuil manuellement, une valeur de Log au-dessus de la valeur de bruit de fond la plus élevée. Selon le type de thermocycleur et de logiciel utilisés, il est possible de retenir d'autres règles pour la détermination de la ligne de seuil.

La PCR étant utilisée ici sur des ADN de cultures pures, la valeur de seuil du cycle pour déterminer un résultat positif est fixée arbitrairement à 35. Cependant, il revient à chaque laboratoire de vérifier dans ses conditions la pertinence de ce seuil.

Si tous les contrôles sont conformes, un résultat est considéré positif si la courbe des valeurs de fluorescence présente une allure caractéristique (tracé de la fonction sigmoïde) et si la valeur de Ct est inférieure à 35 (OEPP, 2016).

Si les résultats obtenus pour les contrôles mis en œuvre (témoins d'amplification) ne sont pas ceux attendus, la manipulation est déclarée non conforme et devra être renouvelée avec une dilution des ADN au 1/10.

Le résultat de la PCR sur un extrait d'ADN est négatif si aucune courbe d'amplification n'est présente.

L'interprétation des courbes pour lesquelles les valeurs de Ct (cycle threshold) sont supérieures à 35 doit être prise avec précaution et le test renouvelé (d'autant plus que la PCR est réalisée sur des souches pures et non sur macérat). Si le nouveau test donne le même résultat, l'isolat doit être considéré comme n'étant pas du Cmm.

Les résultats entre duplications d'un même ADN s'interprètent comme suit (cf MOA022) :

ADN		Résultat
ampli 1	ampli 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Lors de la 2 ^{ème} amplification : <ul style="list-style-type: none">- Si au moins 1 puits sur 2 est positif, le résultat final est interprété comme positif.- Si les deux puits sont négatifs, le résultat final est interprété comme négatif.
-	-	NÉGATIF



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. Cependant, les observations doivent être poursuivies jusqu'à 21 jours après l'inoculation. En cas de symptômes rapidement marqués de la plante à l'agressivité de la souche, le test peut être interrompu plus tôt pour re-isolément 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 ».

Pour que le test de pouvoir pathogène soit considéré positif, la bactérie doit 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, il est prélevé une section de tige de 1 à 2 cm au-dessus du point d'inoculation. Après dilacération de cette section dans un liquide stérile (PBS 0,01M, solution saline, eau) (annexe), l'isolement par dilution/étalements ou épuration sur milieu générique (de type LPGA) suivi d'un test rapide d'identification (8.4 à 8.6) est alors effectué afin de se conformer au postulat de Koch.

9.2 Calculs et expression des résultats de l'isolement sur milieux

A l'issue de la période d'incubation des boîtes, les colonies en croissance sur les milieux sont observées.

En absence de colonies suspectes et si les contrôles sont conformes, l'échantillon est considéré comme non contaminé.

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

En présence de colonies ayant répondues positivement au(x) test(s) d'identification dont le test de vérification du pouvoir pathogène, l'échantillon concerné est considéré comme contaminé par Cmm: résultat « positif » ou équivalent.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performances de la méthode présentée dans le tableau ci-après est extraite de différents rapports de caractérisation et de validation de méthodes d'analyse établis par le LSV 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.



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

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)

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

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)

Caractéristique	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation	PCR Ptssk	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%



10.3 Critères de performance par essai inter-laboratoires de validation du protocole « isolement et identification de la souche » sur macérats de semences de tomate (issus d'une macération au froid):

Données EILV (2014-2016) obtenues sur 11 échantillons par 11 laboratoires d'Autriche, de la République Tchèque, du Danemark, de France, de Lettonie, des Pays-Bas, de la Russie et du Royaume-Uni dont 8 pour la procédure A (isolement) avec 8 labos ayant fourni des résultats exploitables. Ces laboratoires étaient tous expérimentés en phytobactériologie, mais l'étaient plus ou moins sur la détection sur semences de Cmm par la procédure décrite.

Critères de performance sur 11 Echantillons A, B, C au -dessus du seuil de détection, testés par laboratoire (éch homogènes et stables)	Isolement et identification de la souche par PCR et pouvoir pathogène	
	Nombre de labos avec résultats exploitables /nb total de labos ayant réalisé le protocole : 8 labos / 8	Nb de labos ayant atteint 100% aux différents critères : 6 labos / 8
Sensibilité Pourcentage d'échantillons détectés parmi les 8 échantillons cibles/laboratoire	94 (64 éch)	100 (48 éch)
Spécificité Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les 3 échantillons non-cibles	100 (24 éch)	100 (18 éch)
Exactitude Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi les 11 échantillons cibles et non-cibles	96 (88 éch)	100 (66 éch)
Répétabilité Pourcentage d'accords entre résultats des répliquats des 3 échantillons A, B C au sein des laboratoires	95	100
Reproductibilité Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons entre les laboratoires	91	100

Les résultats obtenus pour la caractérisation sont repris pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité.



<p>Critères de performance Approche du seuil de détection sur 1 Echantillon (5 réplicats) naturellement contaminé</p> <p><10 cfu/mL</p> <p>(défaut de stabilité, donc non valide pour l'établissement des critères)</p>	<p>Isolement et identification de la souche par PCR et pouvoir pathogène</p>
	<p>Nombre de labos ayant détecté l'éch /nb total de labos ayant réalisé le protocole :</p> <p>2 labos / 8</p>



Annexe

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 une vérification. 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

1.1 Solution tampon phosphate (PB) pour la macération des semences et les dilutions

50 mM PB, pH 7.4	g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	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

1.2 Solution saline tamponnée (PBS)

0.01 M PBS, pH 7.2	g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
NaCl	8.0 g
Eau déminéralisée	1000 mL
Autoclaver 15 min minimum à 121°C	



2. Milieux semi-sélectifs

CMM1T(CMM1tris100), pH 7.7	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 (solution mère: 10mg/mL d'eau déminéralisée)	10.00
Acide nalidixique - sodium Sigma N4382 (stock mère: 10mg/mL de 0,1M NaOH)	28.00
Nystatin (solution mère: 100mg/mL d'une solution 50% DMSO/50% ethanol) ou cycloheximide (soluble dans l'éthanol)	100.00

*Le pH de ce milieu est critique pour sa performance. 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 et vérifié mais pas ajusté.

SCMF (SCM Fast) pH 7.3	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 or mL/L
Acide nalidixique - sodium Sigma N4382 (stock mère: 10mg/mL de 0,1M NaOH)	20.00 mg
Trimethoprim Sigma T7883 (stock mère: 10mg/mL de méthanol 100%)	80.00 mg
100 mg acide nicotinique*/50 mL eau stérile	50.00 mL
Nystatin Sigma N6261 (solution mère :100mg/mL de solution 50% DMSO/50% éthanol)	100.00 mg
Tellurite de potassium Chapman (1% solution) Difco**	1.0 mL

*Ajouter 100 mg acide nicotinique dans 50 mL d'eau stérile

**La provenance du tellurite de potassium est critique



3. Milieux non-sélectifs (MOA REP 001)

LPGA	g/ L
Difco extrait de levure	5 g
Difco Bacto peptone	5 g
D(+) glucose	10 g
Difco bacto agar	15 g
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	50mg

YDC (<i>Yeast extract-Dextrose-Calcium Carbonate medium</i>)	g/ L
Extrait de levure	10 g
D(+) glucose	20 g
CaCO ₃	20 g
Agar bactériologique de type A	15
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
Autoclaver pendant 15 min minimum	



4. Tests rapides d'identification (Leliott et Stead, 1987 sauf test Gram au KOH)

Gram KOH (Suslow et al., 1982)

La technique du test KOH 3% est basée sur la solubilité de la paroi des bactéries dans la potasse qui contribue à la libération d'ADN. Il s'agit d'un test rapide ayant une relativement bonne corrélation avec la technique de coloration de Gram si la suspension bactérienne n'est pas dense.

Déposer une goutte de solution aqueuse de KOH à 3% (W/V) sur une lame. A l'aide d'une anse, émulsionner la culture (âgée d'environ 24 heures) prélevée sur milieu solide dans la goutte de KOH.

Lecture immédiate :

- formation d'un filament élastique en soulevant l'anse : bactérie Gram négatif
- absence de formation de filament, la culture se détache bien de la goutte : bactérie Gram positif

La coloration de Gram

La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool, donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme et leur paroi un colorant primaire. Cette différence de perméabilité est liée à une différence de structure pariétale des deux grands groupes Gram positif et Gram négatif.

L'utilisation d'un kit prêt à l'emploi est privilégié (ex : kit de coloration Gram Bacto DIFCO).

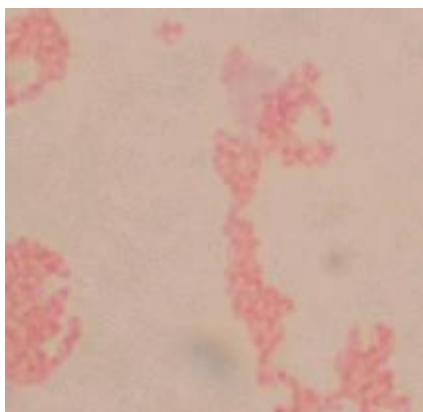
- Réalisation du frottis : sur une lame, déposer au minimum 25 µL d'une suspension bactérienne (léger trouble) d'une culture âgée de 24 à 48h; fixer le frottis
- déposer le colorant primaire (crystal violet) de manière à recouvrir le frottis ; attendre environ 1 minute
- chasser le colorant primaire avec la solution iodée stabilisée ; attendre moins d' 1 minute; rincer délicatement à l'eau courante
- déposer le décolorant de manière à recouvrir les spots ; attendre moins de 30 secondes ; rincer à l'eau courante
- déposer le contre colorant (safranine) de manière à recouvrir le spot attendre de 45 à 60 secondes ; rincer à l'eau courante
- absorber délicatement l'excès de contre colorant à la surface de la lame à l'aide d'un papier absorbant ou laisser sécher à l'air libre

N.B. : En parallèle, réaliser une lame témoin Gram positif et une lame témoin Gram négatif pour valider le test.

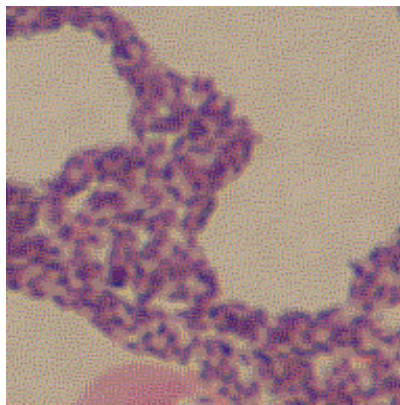
Lecture : Observer au microscope (objectif X100) en lumière blanche en utilisant de l'huile à immersion.



Coloration des spots	Interprétation
Coloration rose ou rouge	Gram –
Coloration bleu foncé ou violette	Gram +



Gram négatif



Gram positif

Le test Oxydase

La cytochrome c oxydase est une enzyme que possèdent certaines bactéries. On révèle sa présence avec le N,N diméthyl paraphénylène diamine ou le N,N diméthyl paraphénylène diamine dihydrochloride. Ces deux réactifs sont capables d'être oxydés en un produit de couleur violet pourpre ou bleu pourpre.

À l'aide d'une anse, prélever de la culture bactérienne âgée d'environ 24 heures. Emulsionner la culture sur la bandelette pré-imprégnée de réactif (de type Bactident oxydase®).

Lecture immédiate (10 à 30 secondes) :

- coloration rose-violette : bactérie oxydase positive
- absence de coloration : bactérie oxydase négative

Contrôle : prévoir éventuellement des souches bactériennes de référence comme témoins positif et négatif

Le test Catalase

La catalase est un enzyme hydrolysant le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène :

Déposer quelques gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (équivalente à de l'eau oxygénée à 10 volumes) sur une lame. Emulsionner une culture prélevée sur milieu solide avec une anse.

Lecture immédiate : dégagement gazeux (présence de bulles) : bactérie catalase positive ;
absence de dégagement gazeux : bactérie catalase négative



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.

MOA REP 001 (2010). Méthode officielle d'analyse. Répertoire des recettes en vigueur au LNPV.

MOA 010(2010). Méthode officielle d'analyse. Technique d'immunofluorescence indirecte.

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