II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 9 septembre 1997

décrivant un schéma provisoire de test pour le diagnostic, la détection et l'identification de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith dans la pomme de terre

(97/647/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 77/93/CEE du Conseil, du 21 décembre 1976, concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation dans la Communauté [1], modifiée en dernier lieu par la directive 97/14/CE [2], et notamment son article 15 paragraphe 3,

considérant que, dans la décision 95/506/CE de la Commission, du 24 novembre 1995, autorisant les États membres à prendre provisoirement les mesures nécessaires en vue de se protéger contre la propagation du *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith en provenance du royaume des Pays-Bas [3], modifiée par la décision 96/599/CE [4], et notamment son article 1er paragraphe 2 point a) bb), lorsque les États membres procèdent à des essais officiels ou contrôlés officiellement, ceux-ci sont tenus d'appliquer la procédure de quarantaine n° 26 établie pour *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith par l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) [5] ou une autre procédure approuvée conformément à la procédure définie à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE;

considérant que le groupe d'experts *ad hoc* sur les maladies bactériennes des plantes, créé par les services de la Commission des Communautés européennes sous les auspices du comité phytosanitaire permanent, a établi les modalités d'un programme d'essai provisoire qui tient compte des procédures améliorées de détection et d'essai mises au point depuis la publication de la procédure de quarantaine n° 26 de l'OEPP; que ce programme d'essai est provisoire dans la mesure où d'autres recherches sont envisagées, notamment au sujet de la sensibilité et de la spécificité des essais individuels en vue de sélectionner et de standardiser les essais optimums susceptibles d'être intégrés dans une méthode d'essai actualisée;

considérant que le programme d'essai provisoire prévu par la présente décision est conforme à l'avis du comité phytosanitaire permanent,

[1] JO L 26 du 31. 1. 1977, p. 20.
[2] JO L 87 du 2. 4. 1997, p. 17.
[3] JO L 291 du 6. 12. 1995, p. 48.
[4] JO L 265 du 18. 10. 1996, p. 18.

[5] *Bulletin EPPO/OEPP* 20, 255—262 (1990).

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

Afin de mettre en œuvre les dispositions de l'article 1er paragraphe 2 point a) bb) de la décision 95/506/CE, dans sa dernière version, la procédure de quarantaine n° 26 pour *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith telle qu'établie par l'OEPP est remplacée par le programme d'essai provisoire pour le diagnostic, la détection et l'identification de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith prévu à l'annexe de la présente décision.

Article 2

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 9 septembre 1997.

Par la Commission
Franz FISCHLER
Membre de la Commission

ANNEXE

PROCÉDURE PROVISOIRE DE TEST POUR DIAGNOSTIQUER, DÉTECTER ET IDENTIFIER *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* (SMITH) SMITH

DOMAINE D'APPLICATION DE LA PROCÉDURE

La procédure présentée ci-dessous décrit les différentes étapes à suivre pour:

i) diagnostiquer le flétrissement bactérien sur les tubercules de pomme de terre ou les plantes entières;

ii) détecter *Pseudomonas solanacearum* dans des échantillons de tubercules de pomme de terre;

iii) identifier *Pseudomonas solanacearum.*

On trouvera en appendice des indications détaillées concernant la préparation du matériel nécessaire aux tests (milieux de culture, tampons, solutions et réactifs).

TABLE DES MATIÈRES

Section I. **Application de la procédure de test** 4

1. Diagnostic du flétrissement bactérien sur les plantes et les tubercules de pomme de terre 4
2. Détection et identification de *Pseudomonas solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre 6

Section II. **Diagnostic du flétrissement bactérien sur les plantes et les tubercules de pomme de terre** 8

1. Symptômes du flétrissement bactérien 8
2. Tests rapides de tri 8
3. Procédure d'isolement 9
4. Test(s) de confirmation 9

Section III. **Détection et identification de *Pseudomonas solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre** 12

1. Préparation de l'échantillon pour le test 12
2. Test d'immunofluorescence (IF) 13
3. Test ELISA 15
4. Test PCR 15
5. Test d'étalement sur milieu sélectif 17
6. Test biologique 18
7. Test d'enrichissement 18
8. Test du pouvoir pathogène 18

Appendice 1. Milieux nutritifs d'isolement et de culture de *Pseudomonas solanacearum* 19

Appendice 2. Matériel nécessaire à la préparation de l'échantillon 20

Appendice 3. Matériel nécessaire au test d'immunofluorescence 21

Appendice 4. Détermination du degré de contamination lors du test d'immunofluorescence 22

Appendice 5. Matériel nécessaire au test ELISA 23

Appendice 6. Matériel nécessaire au test PCR 24

Appendice 7. Matériel nécessaire aux tests d'ensemencement sélectif et d'enrichissement 24

Références 25

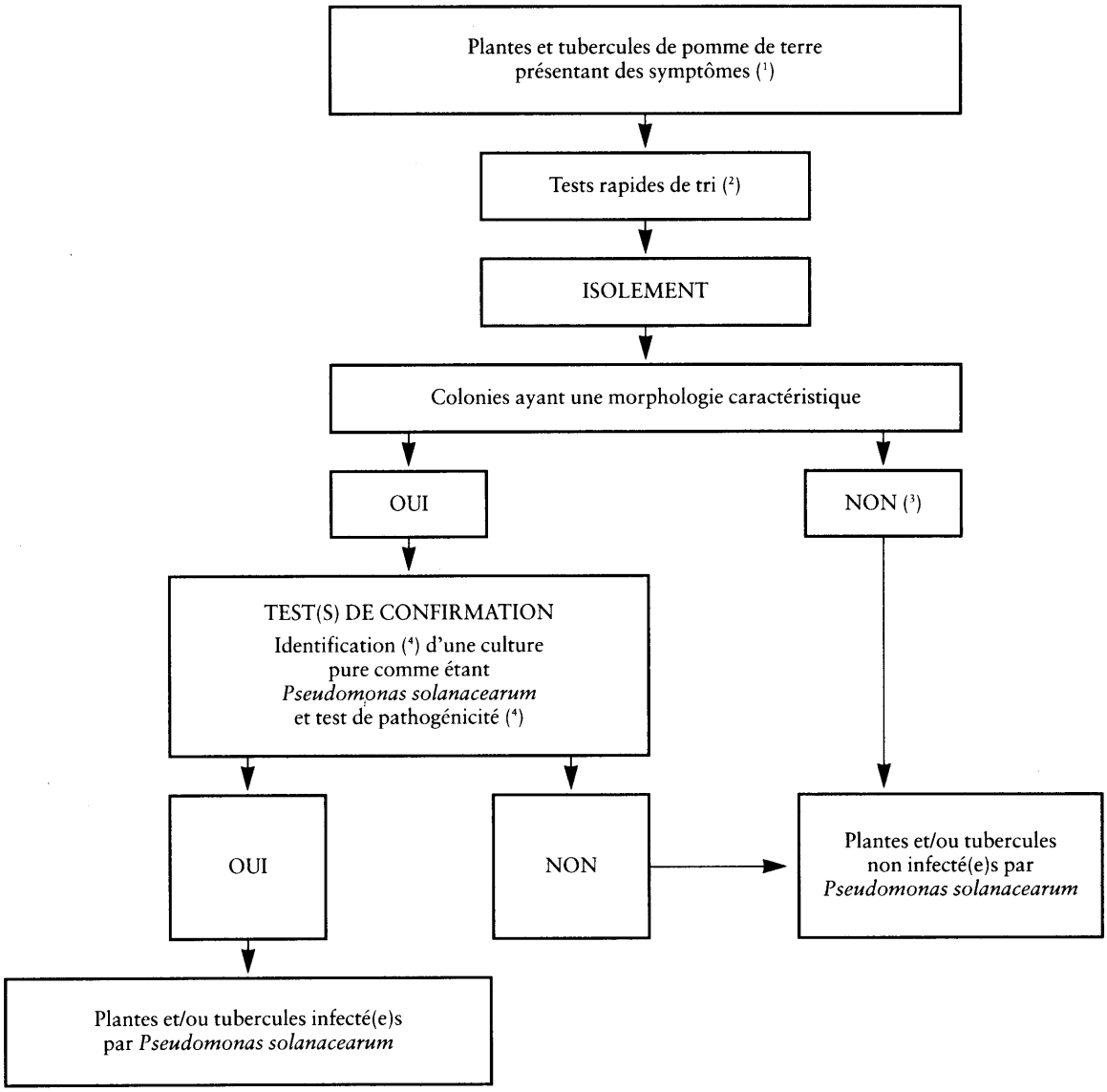
SECTION I

APPLICATION DE LA PROCÉDURE DE TEST

1. **Diagnostic du flétrissement bactérien sur les plantes et les tubercules de pomme de terre**

La procédure de test concerne des plants et des tubercules présentant des symptômes typiques du flétrissement bactérien ou permettant de soupçonner sa présence. Elle comporte un test rapide de dépistage, l'isolement de l'organisme pathogène à partir du tissu vasculaire infecté sur des milieux de diagnostic et, en cas de résultat positif, l'identification de la culture comme étant *Pseudomonas solanacearum*.

Présentation du diagramme fonctionnel



Renvois du diagramme fonctionnel

(1) La description des symptômes figure à la section II.1.

(2) Des tests rapides de tri facilitent le diagnostic présomptif.

Les tests appropriés sont:
— test de purulence des tissus vasculaires caulinaires (section II.2),
— test de mise en évidence des granules de poly-ß-hydroxybutyrate (section II.2),
— test d'immunofluorescence (section III.2),
— test ELISA (section III.3),
— test de PCR (section III.4).

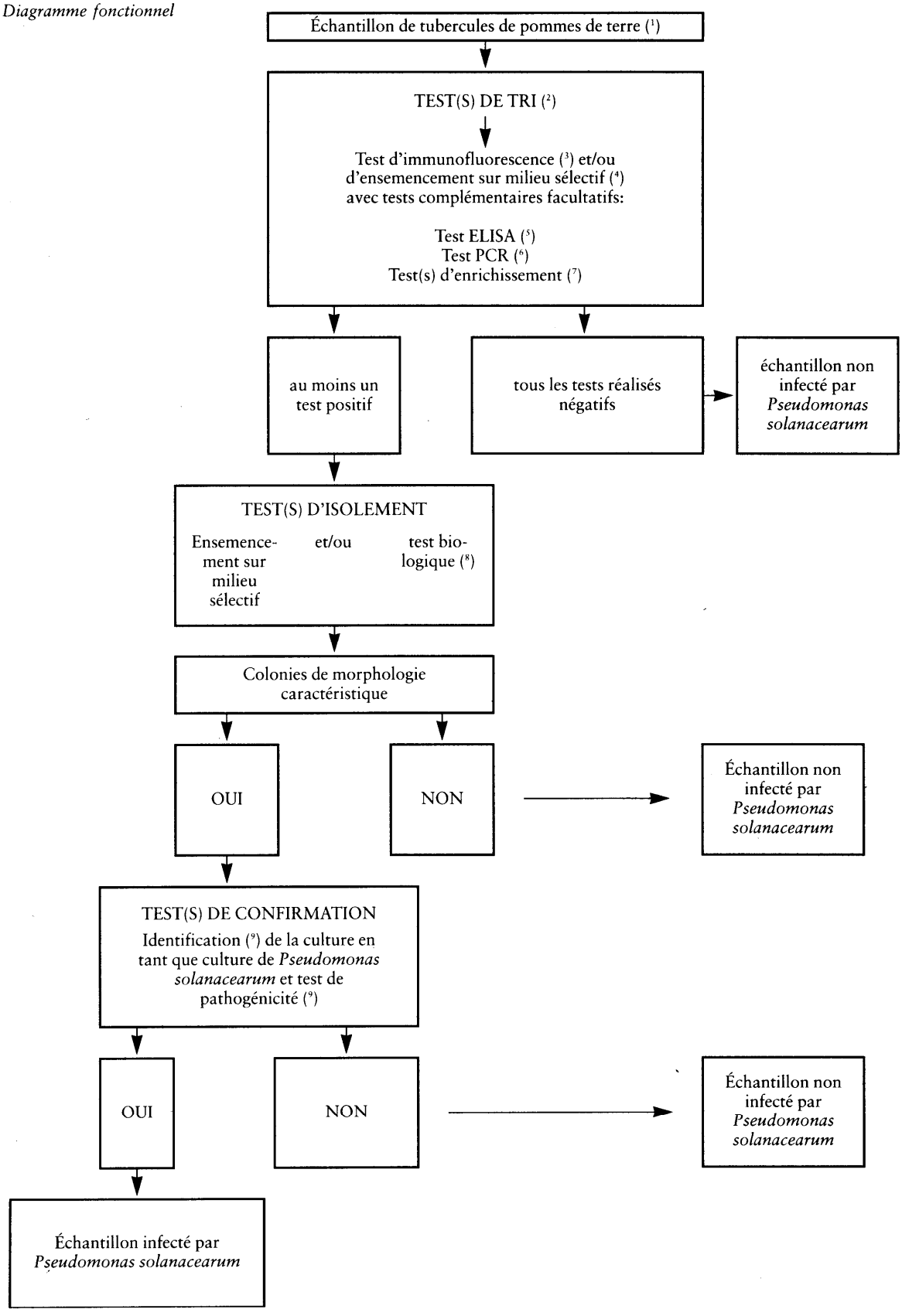
(3) Bien que l'isolement de l'agent pathogène par dilution et étalement sur milieu de culture soit une tâche simple, la mise en culture risque d'échouer à partir des stades d'infection avancés. Les bactéries saprophytes qui se développent sur un tissu malade risquent de se développer beaucoup plus rapidement que l'agent pathogène ou d'inhiber sa croissance sur le milieu d'isolement. Lorsque le test d'isolement est négatif en dépit de symptômes caractéristiques de la présence de la maladie, l'isolement doit être réitéré, de préférence par un test de dilution et étalement sur un milieu sélectif.

(4) L'identification fiable d'une culture pure de *Pseudomonas solanacearum* nécessite au minimum l'un des tests dont la liste figure à la section II.4.1, réalisé conjointement avec un test de pouvoir pathogène (section II.4.3). La caractérisation de la souche est facultative mais recommandée pour chaque cas nouveau.

2. **Détection et identification de *Pseudomonas solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre**

La procédure de test vise à détecter des infections latentes de tubercules de pomme de terre au moyen d'un test de tri ou, mieux encore, de plusieurs tests de ce type, dont les résultats, s'ils sont positifs, sont confirmés par l'isolement de l'agent pathogène. En cas d'isolement de colonies caractéristiques, on procède à l'identification d'une culture pure comme étant *Pseudomonas solanacearum*.

Diagramme fonctionnel



Renvois du diagramme fonctionnel

(1) Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules. Cependant, la procédure peut être appliquée à des échantillons de moins de 200 tubercules.

(2) Test(s) de tri

La sensibilité ou la fiabilité d'un seul test n'est pas toujours suffisante pour détecter la présence de *Pseudomonas solanacearum* dans un échantillon. Il est donc recommandé de procéder à plusieurs tests. Dans la mesure du possible, ces tests doivent être basés sur des principes biologiques différents.

(3) Test d'immunofluorescence

Le test d'immunofluorescence (méthode indirecte) est un test de tri bien connu ci-dessus. C'est un avantage par rapport à d'autres types de tests qui ne sont pas encore parfaitement mis au point, ou validés. Ce test est utilisé pour d'autres bactéries de quarantaine, comme *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Compte tenu des paramètres de lecture spécifiés dans cette méthode, il s'agit d'un test sensible (seuil de sensibilité 10^3-10^4 cellules/ml de l'extrait de pomme de terre final).

Le facteur décisif pour la fiabilité des résultats du test est la qualité de l'antisérum. Seul un antisérum ayant un titre élevé (au minimum 2 000 pour l'antisérum brut) est acceptable et tous les tests doivent être réalisés au titre de l'antisérum ou à une dilution en dessous. La méthode indirecte est utilisée de préférence. La méthode directe est applicable lorsque la sensibilité et la spécificité du test sont équivalentes à celles de la méthode indirecte.

Le test d'immunofluorescence présente l'avantage d'offrir une interprétation subjective quant à la morphologie et à l'intensité de la fluorescence des cellules qui fournissent des indications sur la spécificité de la réaction. Il est fréquent de constater des réactions croisées avec des bactéries sérologiquement proches, du sol ou associées à des tissus de pomme de terre, présentant une morphologie cellulaire de *Pseudomonas solanacearum*. Le test d'immunofluorescence peut faire office de test de tri unique, mais lorsque la présence de réactions croisées est suspectée, il convient de réaliser un autre test de tri basé sur un principe biologique différent. Dans de tels cas, l'isolement sur milieu sélectif est le test le plus approprié.

(4) Étalement sur milieu sélectif

Lorsqu'on utilise le milieu sélectif modifié SMSA et la méthodologie spécifiée, on dispose d'un test sensible et sélectif permettant de détecter *Pseudomonas solanacearum*. Le résultat est disponible dans un délai de 3 à 6 jours après la préparation de l'échantillon. L'agent pathogène est obtenu directement sous forme de culture et peut être facilement identifié. Pour mettre pleinement à profit les possibilités offertes par ce test, il faut préparer soigneusement les talons de pommes de terre afin de réduire les contaminations par les bactéries secondaires liées au tubercule; ces bactéries sont des organismes concurrents de *Pseudomonas solanacearum* sur le milieu de culture, qui sont susceptibles d'affecter le développement de l'agent pathogène. Certaines souches risquent en outre de se développer insuffisamment dans la mesure où les composants du milieu peuvent également affecter l'organisme cible. Il faut veiller également à différencier *Pseudomonas solanacearum* des autres bactéries susceptibles de se développer sur le milieu de culture.

L'étalement sur milieu sélectif peut également servir de test de dépistage unique; toutefois, lorsqu'on obtient un résultat négatif et qu'un effet inhibiteur d'autres bactéries sur la croissance de *Pseudomonas solanacearum* est suspecté, il convient d'effectuer un deuxième test de dépistage. En pareille circonstance, le test d'immunofluorescence est le plus indiqué.

(5) Test ELISA

Le test ELISA est généralement moins sensible que le test d'immunofluorescence (seuil de détection de 10^4-10^5 cellules/ml d'extrait final de pomme de terre). Ce test est bon marché et rapide, mais généralement plus sensible au risque de résultats erronés positifs (réactions croisées) ou négatifs (inhibition sous l'effet des molécules phénoliques des extraits de pomme de terre). Les exigences de spécificité d'antisérum sont extrêmement rigoureuses. Le test ELISA ne peut servir de test de dépistage unique.

(6) Test PCR

Le test par PCR est potentiellement très sensible, bien que le test soit facilement inhibé par des composants de plantes ou d'extrait de tubercules aboutissant à un résultat négatif erroné. Certains cultivars de pomme de terre contiennent davantage d'inhibiteurs que d'autres. Il est donc nécessaire de les éliminer. La dilution réduit les inhibitions, mais les populations de *Pseudomonas solanacearum* sont alors également diluées. Il faut procéder avec le plus grand soin à toutes les étapes de la préparation de l'échantillon et du test pour éviter toute contamination susceptible de produire des résultats positifs erronés. Des résultats faussement positifs peuvent survenir à cause d'homologies de séquences avec d'autres organismes. Pour ces raisons, l'utilisation directe du test de PCR comme seul test de dépistage n'est pas possible.

(7) Test d'enrichissement en bouillon nutritif

L'incubation d'extrait final de pomme de terre dans un milieu nutritif liquide semi-sélectif, tel que le bouillon nutritif modifié SMSA, permet la multiplication de *Pseudomonas solanacearum* et, ce qui est peut-être plus important encore, la dilution des inhibiteurs potentiels des tests ELISA et PCR. Le test d'immunofluorescence, le test ELISA et le test de PCR permettent donc de détecter la présence de *Pseudomonas solanacearum* dans un milieu nutritif liquide d'enrichissement. Nous ne conseillons pas de procéder à un étalement direct à partir de milieux nutritifs enrichis. Ces méthodes d'enrichissement n'ont pas été complètement expérimentées et testées; elles sont mentionnées ici en raison des possibilités intéressantes qu'elles offrent. Mais faute d'une expérience suffisante, il n'est pas possible de les utiliser comme seules méthodes de dépistage.

(8) Test biologique

Le test biologique est utilisé pour l'isolement de *Pseudomonas solanacearum* à partir des extraits de pommes de terre par enrichissement sélectif dans une plante hôte et peut être effectué sur des plants de tomates ou d'aubergines. Il exige des conditions optimales d'incubation conformes aux spécifications de cette procédure. Les bactéries ayant un effet inhibiteur sur *Pseudomonas solanacearum* en présence d'un milieu nutritif SMSA ne risquent guère de gêner le déroulement de ce test.

(9) Test(s) de confirmation

Il est possible d'identifier de manière fiable une culture pure de *Pseudomonas solanacearum* en utilisant au moins l'un des tests énumérés à la section II.4.1, associé à un test de pouvoir pathogène (section II.4.3). La caractérisation de la souche est facultative, mais conseillée en présence d'un cas nouveau.

SECTION II

DIAGNOSTIC DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN SUR LES PLANTES ET LES TUBERCULES DE POMME DE TERRE

1. **Symptômes du flétrissement bactérien**

Plante de pommes de terre

Le premier stade de l'infection se traduit par un flétrissement des feuilles du haut de la plante à température élevée pendant la journée et un retour à l'aspect normal pendant la nuit. Le flétrissement devient rapidement irréversible et se traduit par la mort de la plante. On peut observer un brunissement du tissu vasculaire des tiges de plantes flétries coupées transversalement, et un exsudat laiteux apparaît à la surface de la coupe ou peut en être extrait facilement en pinçant la tige. Lorsqu'une tige coupée est placée dans l'eau verticalement, des filets de productions bactériennes s'écoulent des faisceaux vasculaires.

Tubercule

Les tubercules de pomme de terre doivent être coupés transversalement en passant par le talon. Le premier stade d'infection se traduit par une coloration jaune vitreux à brun clair de l'anneau vasculaire, d'où émerge un suintement crémeux pâle, soit spontanément après quelques minutes, soit lorsqu'on applique une légère pression des doigts à proximité de la coupe, sur l'épiderme du tubercule. Par la suite, la décoloration vasculaire devient plus nettement brune et la nécrose s'étend parfois au tissu parenchymateux. Aux stades avancés, l'infection se propage à partir du talon et des yeux, et l'épiderme des tubercules présente alors des lésions brun rougeâtre légèrement concaves; de ces lésions suinte un liquide bactérien provoquant l'adhérence des particules de sol.

2. **Tests rapides de tri**

Des tests rapides de tri facilitent le diagnostic présomptif. Utilisez un ou plusieurs des tests suivants:

Test d'exsudation des tiges

La présence de *Pseudomonas solanacearum* dans des tiges de pommes de terre flétries peut être mise en évidence en procédant au test simple de présomption suivant:

Sectionner la tige juste au-dessus du sol. Placer l'extrémité de la tige sectionnée dans un becher rempli d'eau. Peu de temps après, des filets de productions bactériennes s'écouleront spontanément des faisceaux vasculaires. Aucune autre bactérie responsable de l'infection vasculaire des plants de pommes de terre ne fera apparaître ce phénomène.

Mise en évidence des granules de poly-ß-hydroxybutyrate (PHB)

La coloration au bleu du Nil A ou au noir du Soudan B permet de visualiser les granules de PHB présents dans les cellules de *Pseudomonas solanacearum*.

Préparer sur une lame de microscope un frottis à partir de l'exsudat ou du tissu placé en suspension ou préparer un frottis d'une culture de 48 heures sur gélose avec levure, peptone et glucose (YPGA) ou sur gélose avec peptone (SPA) (appendice 1). Préparer un témoin positif obtenu avec une souche du biovar 2 de la race 3.

Laisser sécher. Passer rapidement à plusieurs reprises le côté inférieur de la lame dans une flamme jusqu'à ce que le frottis soit fixé.

Test au bleu du Nil

1. Recouvrir le frottis fixé dans une solution aqueuse à 1 % de bleu du Nil A. Incuber 10 minutes à 55 °C.
2. Éliminer la solution colorante. Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
3. Recouvrir le frottis dans une solution aqueuse d'acide acétique à 8 %. Incuber 1 minute à la température du laboratoire.
4. Laver sous un filet d'eau courante et sécher sur du papier absorbant.
5. Réhumecter en déposant une goutte d'eau. Recouvrir d'une lamelle.
6. Examiner le frottis coloré au microscope à épifluorescence sous un film d'huile de 450 nm, à un grossissement de 1 000.

   Observer la fluorescence orange vif des granules de PHB. Faire également des observations en lumière normale afin de vérifier le caractère intracellulaire des granules; vérifier que la morphologie des cellules est caractéristique de *Pseudomonas solanacearum*.

Test au noir du Soudan

1. Recouvrir le frottis fixé dans une solution de noir du Soudan B à 0,3 % dans de l'éthanol à 70 %. Incuber 10 minutes à la température du laboratoire.
2. Égoutter la solution colorante. Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever la quantité d'eau excédentaire au papier absorbant.
3. Plonger rapidement le frottis dans du xylol. Sécher au papier absorbant. Attention, le xylol est un produit dangereux. Travailler sous une hotte de chimiste.
4. Recouvrir le frottis dans une solution aqueuse de safranine à 0,5 % et incuber 10 secondes à la température du laboratoire.

   Attention, la safranine est un produit dangereux. Opérer sous une hotte de chimiste.
5. Laver sous un filet d'eau courante. Sécher au papier absorbant et recouvrir d'une lamelle.
6. Examiner le frottis coloré au microscope à immersion sous un film d'huile, à un grossissement de 1 000, sous lumière transmise normale.

   Les granules de PHB présents dans les cellules de *Pseudomonas solanacearum* présentent une coloration bleu noir. Les parois des cellules sont colorées en rose.

Autres tests

Les autres tests de tri appropriés sont l'immunofluorescence (section III.2), l'ELISA (section III.3) et la PCR (section III.4).

3. **Procédure d'isolement**

3.1. Prélever de l'exsudat ou des morceaux de tissu décoloré, soit à partir de l'anneau vasculaire du tubercule, soit à partir des vaisseaux de la tige. Mettre en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile ou dans un tampon au phosphate 50 mM. Laisser reposer 5 à 10 minutes sur la paillasse.

3.2. Préparer une série de dilutions, par exemple au 1/10 et au 1/100 de la suspension, ou plus si cela est jugé nécessaire.

3.3. Transférer un volume standard de la suspension et des dilutions sur un milieu de culture général (NA, YPGA et SPA, appendice 1) et/ou sur le milieu tétrazolium de Kelman (appendice 1), et/ou sur le milieu semi-sélectif SMSA (appendice 7). Étaler à l'aide d'une technique d'étalement en nappe ou à l'anse stérile. Si cela est jugé utile, préparer des boîtes de Petri avec chaque milieu, ensemencé avec une suspension bactérienne virulente appartenant au biovar 2, race 3, pour témoin positif.

3.4. Incuber les boîtes pendant 3 jours à 28 °C. L'incubation peut être prolongée jusqu'à 6 jours si la croissance est lente, mais les colonies sur milieu SMSA deviennent atypiques et meurent.

Sur milieu nutritif général, les isolats virulents de *Pseudomonas solanacearum* forment des colonies fluides, à bord irrégulier, plates, blanchâtres et présentant fréquemment des verticilles caractéristiques.

Sur milieu «tétrazolium de Kelman», les colonies virulentes typiques de *Pseudomonas solanacearum* sont de couleur crème, plates, à bord irrégulier, fluides, avec un centre de couleur rouge sang. Les formes avirulentes de *Pseudomonas solanacearum* donnent des colonies butyreuses, de couleur rouge sombre.

Sur milieu nutritif SMSA, les isolats virulents de *Pseudomonas solanacearum* forment des colonies blanc laiteux, plates, fluides à bord irrégulier et avec un centre rouge à violacé.

Les isolats non virulents de *Pseudomonas solanacearum* forment des colonies moins fluides de couleur uniforme rose à rouge sur le milieu nutritif SMSA.

3.5. Purifier les colonies de morphologie caractéristique par repiquage sur un milieu nutritif de type général. Éviter les repiquages successifs susceptibles de provoquer une perte de virulence.

4. **Test(s) de confirmation**

4.1. *Identification de* Pseudomonas solanacearum

Identifier des cultures pures de *Pseudomonas solanacearum* en utilisant au moins l'une des procédures suivantes:

Tests nutritionnels et enzymatiques

Note: inclure les témoins appropriés dans chacun des tests utilisés.

Les caractéristiques phénotypiques de *Pseudomonas solanacearum* listées ci-après sont systématiquement présentes ou absentes.

Pigment fluorescent	–
Inclusions de granules de PHB	+
Test du métabolisme oxydatif-fermentatif (O/F)	O+/F–
Catalase	+
Oxydase de Kovacs	+
Réduction des nitrates	+
Utilisation de citrate	+
Croissance à 40 °C	–
Croissance dans une solution à 1 % de NaCl	+
Croissance dans une solution à 2 % de NaCl	–
Arginine dihydrolase	–
Liquéfaction de gélatine	–
Hydrolyse de l'amidon	–
Hydrolyse de l'esculine	–
Production de levane	–

Les milieux et les techniques sont donnés dans Lelliott et Stead (1987).

Test d'immunofluorescence

Préparer une suspension de 10^6 cellules/ml au moyen de la culture réalisée et d'une souche témoin positive. Préparer une série de dilutions au demi de l'antisérum. Suivre la procédure du test d'immunofluorescence (section III.2). Le titre obtenu avec la culture en immunofluorescence doit être identique à celui obtenu avec la souche témoin.

Test ELISA

Préparer une suspension contenant plus de 10^6 cellules/ml de la culture bactérienne et d'une souche témoin positive. Appliquer la procédure du test ELISA (section III.3). Les valeurs obtenues en ELISA avec la culture doivent être équivalentes à celles obtenues avec la souche témoin.

Test de PCR

Préparer une suspension contenant 10^6 cellules/ml au moyen de la culture bactérienne et d'une souche témoin positive. Appliquer la procédure du test de PCR (section III.4). Le produit PCR de la culture doit avoir la même taille et le même profil de restriction (REA) que ceux obtenus avec la souche témoin positive.

Hybridation fluorescente *in situ (FISH-Fluorescent in situ hybridisation)*

Préparer une suspension de 10^6 cellules/ml au moyen de la culture bactérienne et d'une souche témoin positive. Appliquer la procédure du test FISH (van Beuningen *et al.*, 1995), avec l'amorce PCR OLI-1 (Seal *et al.*, 1993). La culture doit présenter une réaction identique à celle de la souche témoin positive.

Profil protéique

Les protéines totales de la bactérie sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en conditions dénaturantes (Stead, 1992a).

Test de profil des acides gras *(FAP, fatty acid profiling)*

Cultiver la culture bactérienne et celle d'une souche témoin positive pendant 48 heures à 28 °C sur des boîtes gélosées de trypticase soja, puis appliquer la procédure du test FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Le profil de la culture doit être identique à celui du témoin positif. Dans les conditions spécifiées, les acides gras caractéristiques sont les suivants: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH et 18:1 2OH.

4.2. *Caractérisation de la souche*

La caractérisation de la souche est facultative mais conseillée en présence d'un cas nouveau. Utilisez au moins l'un des tests suivants:

Détermination du biovar

On distingue différents biovars de *Pseudomonas solanacearum* en fonction de leur aptitude à utiliser et/ou à oxyder trois hexoses alcools et trois sucres (Hayward, 1964 & 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilisation de:					
— maltose	-	+	+	-	+
— lactose	-	+	+	-	+
— cellobiose	-	+	+	-	+
— mannitol	-	-	+	+	+
— sorbitol	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Des tests supplémentaires différencient le biovar 2 en trois phénotypes secondaires (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utilisation du tréhalose	-	+	+
Utilisation de l'inositol	+	-	+
Utilisation du D-ribose	-	-	+
Activité pectolytique	faible	faible	forte

Détermination de la race

La race (Buddenhagen *et al.*, 1962) est déterminée sur la base du résultat d'un test de pouvoir pathogène effectué sur des plants de tomates ou d'aubergines et sur des plants de tabac grâce à un test de réaction d'hypersensibilité (HR) sur des feuilles de tabac (Lozano et Sequeira, 1970):

	Race (*)		
	1	2	3
Réaction sur:			
— plantes de tomates/aubergines	flétrissement	pas de réaction	flétrissement
— plantes de tabac	flétrissement	pas de réaction	pas de réaction
— feuilles de tabac	nécrose (48 h) et flétrissement (7—8 j)	hypersensibilité (12—24 h)	chlorose (2—8 j)

(*) La race 4 (pathogène du gingembre et de quelques autres hôtes) et la race 5 (pathogène du mûrier seulement) ne sont pas incluses.

La caractérisation de la race par le test du pouvoir pathogène ou par le test d'hypersensibilité sur tabac peut n'être pas très répétable, aussi la race peut-elle être déduite du biovar et de l'hôte naturel d'origine.

La caractérisation de la culture peut être complétée comme suit:

Emprunte génomique

Les procédés suivants permettent de réaliser une différenciation moléculaire des souches à l'intérieur du complexe *Pseudomonas solanacearum*:

Analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) (Cook *et al.*, 1989)

PCR sur des séquences répétitives (rep-PCR) [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995)]

4.3. *Test du pouvoir pathogène*

Ce test est pour la confirmation des diagnostics de *Pseudomonas solanacearum* et pour confirmer la virulence des cultures identifiées en tant que *Pseudomonas solanacearum*.

Préparer un inoculum de 10^6 cellules/ml à partir de la culture et d'une souche témoin positive. Inoculer 5 à 10 plantes de tomates ou d'aubergines au stade, de préférence, de la troisième vraie feuille ou plus (section III.6). Incuber pendant une période pouvant atteindre 2 semaines à une température de 22 à 28 °C à raison d'un arrosage quotidien, en maintenant une humidité relative élevée. Observer l'apparition de symptômes de flétrissement et/ou d'épinastie, de chlorose et de rabougrissement.

Isolement à partir des plantes symptômatiques, comme suit:

— prélever un morceau de tige à 2 cm du point d'inoculation,

— réduire et dilacérer dans un petit volume d'eau stérile ou de tampon phosphates 50 mM. Puis étaler sur des boîtes, incuber, et rechercher l'apparition des colonies typiques de *Pseudomonas solanacearum*.

SECTION III

DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* SUR DES ÉCHANTILLONS DE TUBERCULES DE POMME DE TERRE

Note: La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules. Cependant, la procédure peut être appliquée à des échantillons de moins de 200 tubercules.

1. **Préparation de l'échantillon pour le test**

NB: L'extrait concentré de pomme de terre obtenu suivant cette procédure peut servir également à la détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opérations préalables éventuellement utiles:

i) incuber l'échantillon à une température de 25 à 30 °C pendant une période pouvant atteindre 2 semaines afin de faciliter la multiplication des faibles populations de *Pseudomonas solanacearum*;

ii) laver les tubercules à l'eau courante en utilisant des désinfectants et des détergents appropriés. Sécher les tubercules à l'air.

1.1. Enlever la peau du tubercule au niveau du talon au moyen d'un scalpel ou d'un couteau à légumes propre et désinfecté, de façon à faire apparaître les tissus vasculaires. Découper soigneusement un petit cône de tissu vasculaire (de 3 à 5 mm de diamètre) au niveau du talon de chaque tubercule. Prélever aussi peu que possible de tissu non vasculaire. Procéder ainsi pour chacun des tubercules de l'échantillon.

NB: Il est possible à ce stade de procéder à un examen visuel des tubercules (section II.1). Mettre de côté les tubercules présentant des symptômes et les tester à part (section II).

1.2. Rassembler les talons dans un récipient fermé. Il est préférable de traiter immédiatement les talons. Sinon, il est possible de les entreposer pour une période de moins de 24 heures ou de moins de 72 heures, à 4 °C.

1.3. Traiter les talons en suivant l'une des procédures ci-dessous:

i) Placer les talons dans un récipient approprié:

Ajouter un volume suffisant de tampon de macération (appendice 2) de façon à recouvrir les talons.

Réduire les talons dans un mixeur de type Waring Blender ou dans un mixeur de type Ultra Thurrax jusqu'à homogénéisation complète. Éviter une homogénéisation excessive.

Laisser le macérat reposer pendant 15 à 30 minutes.

ii) Placer les talons dans un récipient approprié.

Ajouter un volume suffisant de tampon de macération pour couvrir les talons.

Placer les cônes sur un agitateur rotatif.

Incuber à une vitesse de 50 à 100 tours par minute pendant 4 heures à une température de 20 à 22 °C ou pendant 16 à 24 heures à une température de 4 °C.

iii) Placer les talons dans un sac de macération jetable résistant (par exemple sac Stomacher de 105 mm × 150 mm, stérilisé par radiations ionisantes)

Broyer les talons soigneusement au moyen d'un outil approprié, par exemple un marteau, jusqu'à homogénéisation juste complète.

Ajouter une quantité suffisante de tampon de macération de façon à recouvrir les talons broyés.

Laisser le macérat décanter de 15 à 30 minutes.

1.4. Extraire les bactéries des cônes provenant des talons par l'une des méthodes suivantes:

i) Transférer doucement le macérat dans un tube de centrifugation en laissant les débris dans le récipient ou dans le sac. Si le macérat décanté reste trouble, le centrifuger à 180 g au maximum pendant 10 minutes, à une température inférieure à 10 °C.

Centrifuger le macérat décanté, ou le liquide surnageant issu de la première phase de centrifugation, à une vitesse de 7 000 g pendant 15 minutes ou à 10 000 g pendant 10 minutes à une température inférieure à 10 °C.

Jeter le liquide surnageant sans déranger le culot.

ii) Filtrer le macérat dans un dispositif filtrant (pores de diamètre 40-100 μm). Accélérer la filtration à l'aide d'une pompe à vide.

Recueillir le filtrat dans un tube de centrifugation.

Laver le filtre au moyen du tampon de macération.

Centrifuger le filtrat à une vitesse de 7 000 g pendant 15 minutes ou à une vitesse de 10 000 g pendant 10 minutes à une température inférieure à 10 °C.

Jeter le liquide surnageant sans déranger le culot.

1.5. Remettre en suspension le culot dans un tampon de 1 ml (appendice 2).

Le diviser en deux parties égales et placer chacune dans un microtube.

Utiliser l'un des microtubes pour effectuer le test. Pendant ce temps, conserver la partie restante de cet extrait à une température de 4 °C.

Ajouter de 10 à 25 % (en volume) de glycérol stérile à l'autre microtube. Vortexer et conserver à une température de - 18 °C (plusieurs semaines) ou de - 70 °C (plusieurs mois).

2. **Test d'immunofluorescence**

Utiliser un antisérum anti-*Pseudomonas solanacearum* de préférence dirigé contre la race 3/biovar 2. Déterminer le titre requis sur une suspension contenant 10^6 cellules/ml de la souche homologue de *Pseudomonas solanacearum*, au moyen d'une dilution appropriée de l'antisérum conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), conformément aux recommandations du fabricant. L'antisérum brut devrait avoir un titre d'immunofluorescence d'au moins 1 : 2 000.

Utiliser des lames à plusieurs puits pour microscope comportant de préférence 10 fenêtres d'au moins 6 mm de diamètre.

Placer sur chaque lame un témoin conjugué FITC. Il convient de répéter le test avec une préparation témoin PBS en cas d'occurrence de cellules positives sur la préparation témoin conjugué FITC.

Préparer des lames témoins positives distinctes avec une suspension contenant 10^6 cellules/ml d'une souche de race/biovar appropriée de *Pseudomonas solanacearum*. Prévoir une lame de ce type pour chaque série de tests.

2.1. Préparer les lames en utilisant l'une des méthodes suivantes:

i) Extraits finals contenant relativement peu d'amidon:

Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 μl est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm — choisir une quantité plus importante pour les puits de plus grand diamètre) de la suspension d'extrait final. La rangée suivante peut servir de double ou servir à un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 1.

ii) Dans le cas des autres extraits:

Préparer des dilutions décimales (1/10, 1/100 et 1/1 000) de l'extrait final dans la solution tampon. Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 μl est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm — choisir une quantité plus importante pour les puits de plus grand diamètre) de la suspension d'extrait pur et de chaque dilution. La rangée suivante peut servir de double ou servir à un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 2.

2.2. Laisser sécher les gouttes. Fixer les cellules bactériennes sur la lame en chauffant, en passant à la flamme, ou avec de l'éthanol à 95 °.

2.3. Procédure du test d'immunofluorescence

i) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée en 2.1.i):

Préparer une série de dilutions au demi de l'antisérum dans un tampon d'immunofluorescence (appendice 3):

1/4 du titre (T/4), 1/2 du titre (T/2), titre (T) et deux fois le titre (2T).

ii) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée en 2.1.ii):

Préparer la dilution de travail de l'antisérum dans un tampon d'immunofluorescence. La dilution de travail est la dilution de l'antisérum offrant la spécificité optimale et égale habituellement à la moitié du titre.

Figure 1

Préparation de la lame de test conformément aux indications fournies en 2.1.i) und 2.3.i)

Dilution standard de l'extrait concentré en suspension

(T = titre)

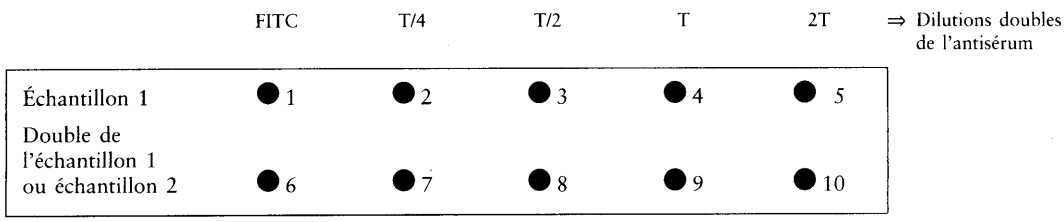
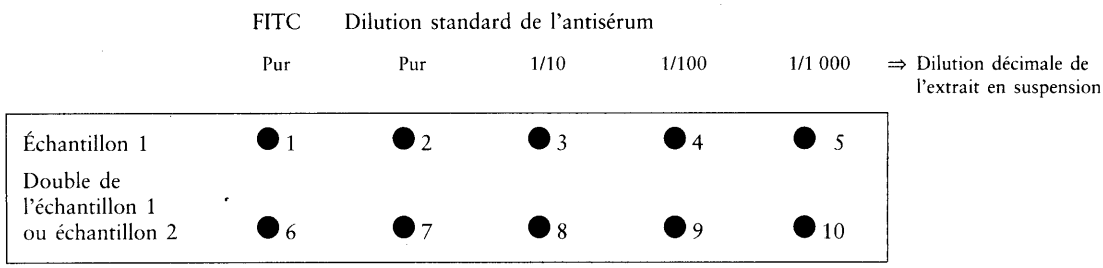


Figure 2

Préparation de la lame de test conformément aux indications fournies en 2.1.ii) et 2.3.ii)



2.3.1. Disposer les lames sur du papier absorbant.

Couvrir les puits de lame de test avec des dilutions d'antisérum. Appliquer le tampon PBS sur les puits FITC. La quantité d'antisérum appliquée doit être équivalente à la quantité d'extrait concentré.

2.3.2. Incuber sous un couvercle pendant 30 minutes à la température ambiante.

2.3.3. Éliminer les gouttelettes d'antisérum et rincer soigneusement les lames dans une solution tampon pour immunofluorescence. Laver 5 minutes dans une solution tampon IF-Tween et après laver 5 minutes dans une solution tampon IF (appendice 3).

Éliminer avec soin le tampon excédentaire.

2.3.4. Poser les lames sur du papier absorbant humide.

Couvrir les puits correspondant à l'échantillon et ceux du puits témoin FITC avec du conjugué FITC à la dilution utilisée lors du titrage. La quantité de conjugué appliquée aux puits doit être identique à la quantité d'antisérum utilisée.

2.3.5. Laisser incuber 30 minutes sous un couvercle à la température ambiante.

2.3.6. Éliminer les gouttes de conjugué. Rincer et laver comme indiqué ci-dessus (2.3.3).

Enlever soigneusement l'humidité excédentaire.

2.3.7. Déposer à la pipette 5 à 10 μl d'un tampon phosphate 0,1 M avec glycérol (appendice 3) ou un support similaire, sur chaque puits; recouvrir d'une lamelle.

2.4. Lecture du test d'immunofluorescence

Examiner les lames de test avec un microscope équipé d'une source lumineuse épifluorescente et de filtres adaptés pour travailler avec l'isothiocyanate de fluorescéine, sous huile à un grossissement de 500 à 1 000. Examiner les puits selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour.

Commencer par contrôler la lame témoin positif. Les cellules doivent présenter une fluorescence vive, surtout leur pourtour. *Note: Le test doit être recommencé si la coloration n'est pas bonne.*

Contrôler tout d'abord l'absence de cellules fluorescentes dans les puits témoins FITC. La présence de cellules fluorescentes dans le témoin FITC indique une liaison non spécifique du conjugué ou la présence de cellules autofluorescentes ou de cellules contaminantes. *Note: Dans ce cas, le test doit être recommencé.*

Rechercher la présence de cellules présentant une fluorescence vive, ayant une morphologie caractéristique de *Pseudomonas solanacearum* dans les puits échantillons. L'intensité de fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positive pour une dilution d'antisérum identique. Les cellules dont la coloration est incomplète ou dont la fluorescence est faible ne doivent pas être prises en considération à moins qu'elles ne soient particulièrement nombreuses (voir l'interprétation du test IF).

Interprétation du test d'immunofluorescence

i) Le test d'immunofluorescence est négatif pour tout échantillon ne contenant aucune cellule présentant une fluorescence vive et une morphologie caractéristique.

ii) Si l'échantillon contient des cellules avec une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, déterminer le nombre moyen de cellules par champ microscopique et calculer le nombre de cellules (N)/ml d'extrait concentré remis en suspension (appendice 4).

Une population d'approximativement 10^3 cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension est considérée comme étant la limite de détection pour le test IF:

— pour des échantillons contenant $N > 10^3$ cellules/ml, le test d'immunofluorescence est considéré positif,

— pour des échantillons contenant $N < 10^3$ cellules/ml, le test d'immunofluorescence peut être considéré comme positif.

iii) Si un grand nombre ($N > 10^5$ cellules par ml) de cellules incomplètement ou faiblement fluorescentes est observé au titre de l'antisérum, un second test doit être réalisé:

— soit un test basé sur un autre principe biologique,

— soit un test IF préparé avec un autre antisérum ou avec une dilution au dixième du culot.

3. **Test ELISA**

(d'après Robinson-Smith *et al.*, 1995)

Utiliser un antisérum anti-*Pseudomonas solanacearum* dirigé de préférence contre la race 3/biovar 2. Déterminer le titre avec une suspension contenant 10^6 cellules/ml préparée avec la souche homologue de *Pseudomonas solanacearum*.

Il est conseillé d'utiliser les plaques de microtitration *NUNC-Polysorp*.

Utiliser comme témoin négatif un extrait de pomme de terre saine et un témoin PBS.

Utiliser une suspension contenant plus de 10^6 cellules/ml d'une souche appropriée (race/biovar) de *Pseudomonas solanacearum* à titre de témoin positif. Tester de la même façon que les échantillons, mais en les séparant soigneusement sur la plaque de microtitration.

3.1. Pipetter 100 à 200 µl de l'extrait final et le déposer dans un microtube.

Chauffer 4 minutes à 100 °C. Plonger le microtube dans la glace.

3.2. Ajouter un volume identique de tampon carbonate concentré 2 fois (appendice 5). Homogénéiser au vortex.

3.3. Déposer des aliquots de 100 µl sur au moins deux puits de la plaque de microtitration. Incuber une heure à 37 °C ou une nuit à 4 °C.

3.4. Éliminer les extraits concentrés des puits. Laver ces derniers à trois reprises. Utiliser PBS-Tween (appendice 5), en laissant la dernière solution de lavage dans les puits pendant au moins 5 minutes.

3.5. Préparer la dilution appropriée d'antisérum anti-*Pseudomonas solanacearum* dans la solution tampon de saturation (appendice 5). Déposer 100 µl de dilution antisérum dans les puits.

Incuber 1 heure à 37 °C.

3.6. Éliminer l'antisérum contenu dans les puits. Laver les puits comme indiqué ci-dessus (3.4).

3.7. Préparer la dilution appropriée de l'antisérum conjugué à la phosphatase alcaline dans le tampon de saturation. Déposer 100 µl de la dilution conjuguée dans les puits.

Incuber une heure à 37 °C.

3.8. Éliminer le conjugué versé dans les puits. Laver ces derniers comme indiqué ci-dessus (3.4 et 3.6).

3.9. Préparer la solution du substrat de la phosphatase alcaline (appendice 5). Déposer 100 µl dans les puits. Incuber 30 minutes à une heure à l'obscurité, à la température du laboratoire.

3.10. Mesurer l'absorbance à 409 nm.

Interprétation du test ELISA

Le test ELISA est négatif si la densité optique de l'échantillon est inférieure au double de celle du témoin négatif.

Le test ELISA est positif si la densité optique de l'échantillon est supérieure au double de celle du témoin négatif.

4. **Test PCR**

(d'après Seal *et al.*, 1993)

Note: Il faut utiliser des cônes de pipettes à filtre pour toutes les étapes de la préparation des échantillons et pour les autres manipulations concernant la PCR.

Préparer une suspension de 10^6 cellules/ml de la race 3/biovar 2 de *Pseudomonas solanacearum* à titre de témoin positif. Tester de la même façon que l'échantillon.

4.1. Déposer à la pipette 100 µl de l'extrait concentré en suspension dans un microtube.

Il est également possible de déposer 90 µl de l'extrait concentré remis en suspension dans un microtube contenant 10 µl d'une solution à 0,5 M de NaOH. Mélanger en retournant le microtube à plusieurs reprises.

4.2. Chauffer pendant 4 minutes à 100 °C. Transférer immédiatement le microtube sur la glace.

4.3. Préparer au moins deux dilutions au dixième (par exemple au 1/10 et au 1/100 ou plus si nécessaire), dans de l'eau distillée stérile ou dans de l'eau ultrapure.

4.4. Préparer le mélange destiné à la PCR (appendice 6) dans un microtube stérile, en ajoutant les composants suivants dans l'ordre indiqué ci-dessous:

Pour un volume de réaction de 50 µl

Composant	Quantité	Concentration finale
Eau distillée stérile ou ultra épurée	30,8 µl-33,8 µl	
10 × Tampon PCR	5,0 µl	1 ×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
Amorce OLI 1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Amorce Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Polymérase *taq* (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Volume total	45 µl-48 µl	

Pour un nombre plus important de réactions

Calculer la quantité de chaque composant nécessaire au nombre requis de réactions. Mélanger les composants et verser de 45 à 48 µl du mélange dans des microtubes stériles de test de PCR. Conserver sur glace les microtubes contenant le mélange réactionnel destiné à la PCR.

Pour des volumes de réaction du 25 µl:

Réduire proportionnellement les quantités de chaque composant.

4.5. Amplification par PCR

4.5.1. Facultatif! Centrifuger pendant quelques instants les microtubes contenant les échantillons bouillis et le témoin positif.

Ajouter dans l'ordre prescrit de 2 à 5 µl des échantillons, du témoin eau et du témoin positif aux différents microtubes contenant le mélange de PCR. Placer les microtubes dans le bloc chauffant du cycleur.

4.5.2. Exécuter le programme suivant:

1 cycle de:
i) 2 minutes à 96 °C: dénaturation de la matrice

50 cycles de:
ii) 20 secondes à 94 °C: dénaturation
iii) 20 secondes à 68 °C: hybridation avec les amorces
iv) 30 secondes à 72 °C: extension de l'ADN complémentaire

1 cycle de:
v) 10 minutes à 72 °C: extension finale

1 cycle de:
vi) maintien à 4 °C

NB: Ces paramètres correspondent à un appareil Perkin Elmer 9600. D'autres types de cycleur thermique peuvent exiger la présence d'une goutte d'huile minérale dans les microtubes ou une modification de la durée des étapes ii), iii) et iv) du profil d'amplification.

4.5.3. Retirer les microtubes du cycleur thermique. Analyser le produit de la PCR. Si l'analyse n'est pas faite immédiatement, les microtubes doivent être conservés à 4 °C en vue d'une utilisation le jour même ou à – 18 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

4.6. Analyse du produit de réaction PCR

Les produits d'amplification par PCR sont détectés par électrophorèse en gel d'agarose et par coloration au bromure d'éthidium.

4.6.1. Préparer un gel d'agorose approprié en amenant doucement à ébullition l'agorose dans une solution tampon d'électrophorèse tris-acétate.

4.6.2. Refroidir l'agarose fondu à une température de 50 à 60 °C. Verser dans le moule du bloc d'électrophorèse et introduire le peigne. Laisser la solution se solidifier.

4.6.3. Retirer le peigne. Recouvrir le gel de tampon tris-acétate jusqu'à ce qu'il soit à peine recouvert (2-3 mm) par la solution tampon.

4.6.4. Déposer des gouttes de 3 µl du tampon de lest sur du parafilm. Ajouter 12 µl du produit de PCR provenant des échantillons, du témoin positif ou du témoin eau et mélanger en aspirant doucement avec l'extrémité de la pipette avant de déposer dans le gel. Les volumes indiqués peuvent être modifiés afin de les ajuster à la capacité des puits du gel d'agarose.

4.6.5. Remplir soigneusement les puits du gel. Introduire pour référence dans l'un des puits au moins un marqueur de poids moléculaire approprié.

4.6.6. Reccorder le générateur et la cuve d'électrophorèse. Mettre le gel sous une tension de 5 à 8 V/cm jusqu'à ce que le front de l'indicateur de suivi se trouve à moins de 1 cm de l'extrémité du gel.

4.6.7. Couper l'alimentation. Débrancher les fils de la cuve d'électrophorèse.

Retirer soigneusement le gel. Le tremper pendant 30 à 45 minutes dans une solution de bromure d'éthidium.

NB: Il faut toujours porter des gants jetables pour manipuler le bromure d'éthidium qui est un agent mutagène puissant.

4.6.8. Décolorer dans l'eau distillée pendant 10 à 15 minutes.

4.6.9. Visualiser les fragments d'ADN amplifiés sous lumière ultraviolette. Le produit de PCR de *Pseudomonas solanacearum* en présence des amorces OLI-1 et Y-2 à une longueur de 288 bp. Vérifier à nouveau par rapport au marqueur d'ADN et par rapport au témoin positif.

NB: Le témoin eau doit être négatif dans tous les cas. Sinon le test est à recommencer.

4.6.10. Photographier le gel si l'obtention d'un enregistrement permanent est nécessaire.

4.6.11. Confirmer l'authenticité du fragment amplifié par analyse de restriction enzymatique (REA — *Restriction enzyme analysis*).

4.7. Analyse de restriction enzymatique

4.7.1. Transférer 8,5 µl du produit de PCR (4.5.3) dans un autre microtube. Ajouter 1 µl d'une solution tampon enzymatique concentré (10× et 0,5 µl d'enzyme de restriction *Ava*II.

4.7.2. Mélanger en aspirant doucement avec l'extrémité de la pipette. Si des gouttelettes subsistent sur les parois du microtube, le passer à la centrifugeuse à impulsions. Incuber pendant une heure à 37 °C.

4.7.3. Analyser le fragment de PCR digéré par électrophorèse en gel d'agarose comme indiqué au point 4.6.

Interprétation du résultat du test PCR

Le test PCR est négatif si le fragment caractéristique de 288 bp n'est pas détecté et si le fragment est détecté pour la souche témoin positive de *Pseudomonas solanacearum.*

Le test PCR est positif si le fragment caractéristique de 288 bp est détecté et si l'analyse d'enzyme de restriction du fragment amplifié est identique à celle de la souche témoin positive de *Pseudomonas solanacearum.*

5. **Test d'étalement sur milieu sélectif**

(d'après Elphinstone *et al.,* 1996)

5.1. Effectuer le test en utilisant une technique appropriée d'ensemencement par dilution, par exemple en procédant comme suit:

i) Préparer au moins deux dilutions au dixième, par exemple au 1/10 et au 1/100, de l'extrait concentré mis en suspension dans la solution tampon. Déposer à la pipette un volume standard (par exemple, de 50 à 100 µl) de l'extrait concentré mis en suspension et de chacune des dilutions sur un milieu nutritif sélectif SMSA (appendice 7) et étaler sur une boîte, sur toute la surface du support.

Si cela est jugé nécessaire, réaliser également un étalement en strie avec une anse platinée de 10 µl. Flamber l'anse entre chaque série de stries.

ii) Verser un volume standard (50-100 µl) de l'extrait concentré sur un milieu sélectif nutritif modifié SMSA, puis l'étaler au moyen d'une tige de verre sur toute la surface du milieu nutritif. Ensemencer au moins deux boîtes de milieu SMSA modifié sans flamber la tige entre 2 étalements du même échantillonnage.

5.2. Au moyen de la même technique d'ensemencement par dilution, appliquer une suspension de 10^6 cellules/ml d'une souce de race 3/biovar 2 de *Pseudomonas solanacearum* à titre de témoin positif sur une autre série de boîtes de milieu nutritif SMSA modifié.

5.3. Incuber les boîtes à 28 °C. Commencer le relevé des observations après 3 jours. En cas de résultats négatifs, prolonger l'incubation jusqu'à 6 jours. Les souces virulentes de *Pseudomonas solanacearum* forment des colonies de couleur blanc laiteux, planes, irrégulières et fluides avec des centres rouges à violacés nettement apparents, présentant des stries internes ou des verticilles.

5.4. Purifier les colonies présentant une morphologie caractéristiques en les repiquant sur un milieu nutritif de type général (appendice 1).

5.5. Identifier les cultures pures (section II.4.1) et confirmer la présence de cultures positives au moyen d'un test de pouvoir pathogène (section II.4.3).

Interprétation du résultat du test de dilution-étalement

Le test de dilution-étalement est négatif si aucune colonie bactérienne n'est apparue au bout de 6 jours, ou si aucune colonie caractéristique de *Pseudomonas solanacearum* n'est isolée, sous réserve qu'aucune colonie d'autres bactéries n'ait été susceptible d'inhiber leur développement et que *Pseudomonas solanacearum* est isolé à partir des témoins positifs.

Le test de dilution-étalement est positif si l'on peut isoler des colonies caractéristiques de *Pseudomonas solanacearum.*

6. **Test biologique**

(d'après Janse, 1988)

6.1. Utiliser 10 plantes tests des plantules sensibles de tomates ou d'aubergines, au stade de la troisième vraie feuille. S'abstenir d'arroser les plantes tests durante les 24 heures précédant l'inoculation.

6.2. Répartir 100 µl d'extrait concentré entre les différentes plantes tests. Inoculer dans la tige entre les cotylédons et en plusieurs autres endroits.

6.3. Inoculer par la même technique 10 plantules avec une suspension de 10^6 cellules/ml d'une souche de race 3/biovar 2 de *Pseudomonas solanacearum* à titre de témoin positif et 10 autres avec le tampon de reprise des culots, à titre de témoin négatif. Séparer les plantes du témoin positif des autres plantes pour éviter des contaminations croisées.

6.4. Poursuivre la culture des plantules jusqu'à 4 semaines à une température de 22 à 28 °C et avec un arrosage quotidien et une humidité relative élevée. Séparer les plantes témoins positives des autres plantes, en évitant toute contamination. Observer l'apparition des symptômes du flétrissement: épinastie, chlorose et/ou atrophie.

6.5. Isoler la bactérie à partir des plantules des plantes infectées (section II). Identifier les cultures pures d'après leur morphologie caractéristique (section II.4.1) et confirmer la présence de cultures de *Pseudomonas solanacearum* au moyen d'un test de pouvoir pathogène (section II.4.3).

6.6. Si cela est jugé nécessaire, vérifier l'absence d'infection sur des lots de plantes tests ne présentant aucun symptôme d'infection. Prélever sur chaque plante échantillon, 2 cm au-dessus au point d'inoculation, une section de tige de 1 cm. Homogénéiser les tissus en les plaçant dans une solution tampon de macération. Procéder à un test d'ensemencement par dilution (section III.5.1). Si le test est positif, identifier les cultures d'après leur morphologie caractéristique (section II.4.1) et confirmer la présence de cultures de *Pseudomonas solanacearum* au moyen d'un test de pouvoir pathogène (section II.4.3).

Interprétation des résultats du test biologique

Le test biologique est négatif si les plantes tests ne sont pas infectées par *Pseudomonas solanacearum* sous réserve que les plantes témoins inoculées soient infectées par *Pseudomonas solanacearum.*

Le test biologique est positif si les plantes échantillons sont infectées par *Pseudomonas solanacearum.*

7. **Test d'enrichissement**

(d'après J. G. Elphinstone *et al.*, 1996)

7.1. Verser 100 µl d'extrait dans 3 ml de milieu nutritif modifié SMSA (appendice 7).

7.2. Incuber pendant au moins 48 heures sans toutefois dépasser 72 heures à une température de 28 °C, sans refermer hermétiquement le bouchon du tube, pour permettre son aération.

7.3. Fermer hermétiquement le bouchon et vortexer. Préparer des aliquots pour les test d'immunofluorescence (cette section 2), le test ELISA (cette section 3) et/ou le test PCR (cette section 4).

8. **Test du pouvoir pathogène**

Voir section II.4.3.

Appendice 1

Milieux nutritifs d'isolement et de culture de *Pseudomonas solanacearum*

Gélose nutritive (NA)

Gélose nutritive (Difco)	23 g
Eau distillée	1 litre

Préparer le milieu par volumes d'un demi-litre dans des flacons d'un litre.

Dissoudre les ingrédients.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Refroidir à 50 °C. Verser dans les boîtes.

Gélose à base de levure-peptone-glucose (YPGA)

Extrait de levure (Difco)	5 g
Bacto peptone (Difco)	5 g
D(+)-glucose (monohydraté)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Eau distillée	1 litre

Préparer des milieux d'un demi-litre dans des flacons d'un litre.

Dissoudre les ingrédients.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Refroidir à 50 °C. Verser dans les boîtes.

Gélose à base de saccharose-peptone (SPA)

Saccharose	20 g
Peptone	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Eau distillée	1 litre

Préparer des milieux d'un demi-litre dans des flacons d'un litre.

Dissoudre les ingrédients. Ajuster le pH à 7,2-7,4, si nécessaire.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Refroidir à 50 °C. Verser dans les boîtes.

Milieu tétrazolium de Kelman

Acides casaminiques (Difco)	1 g
Bacto peptone (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Eau distillée	1 litre

Préparer des milieux d'un demi-litre dans des flacons d'un litre.

Dissoudre les ingrédients.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Refroidir à 50 °C.

Ajouter une solution aqueuse de chlorure de triphényltétrazolium (Sigma), stérilisée par filtration, pour obtenir une concentration finale de 50 mg par litre.

Verser dans les boîtes.

Appendice 2

Matériel nécessaire à la préparation de l'échantillon

Tampon de macération: tampon au phosphate 50 mM à pH 7,0

Ce tampon est utilisé pour la macération des tissus.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

L'ajout de 5 % de polyvinyl pyrrolidone-40 000 MWT (PVP-40) est recommandé en cas d'application du test de PCR direct pour réduire l'incidence de l'inhibition de l'amplification par les molécules aromatiques de l'extrait.

L'ajout d'un défloculant, d'un agent antimousse ou d'un antioxydant est recommandé dans les cas où les procédures d'homologénéisation Waring Blender ou Ultra Turrax sont utilisées pour la macération des cônes de tissu de pommes de terre.

Flocons de Lubrol	0,5 g par l
DC silicone antimousse	1,0 ml par l
Pyrophosphate tétrasodique	1,0 g par l

Passer à l'autoclave séparément. Ajouter jusqu'à obtention de la concentration souhaitée.

Tampon de reprise du culot: tampon au phosphate 10 mM à pH 7,2

Ce tampon est utilisé pour la resuspension et la dilution des culots de talons de pommes de terre.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Appendice 3

Matériel nécessaire au test d'immunofluorescence

Tampon IF: PBS 10 mM à pH 7,2

Ce tampon est utilisé pour la dilution des antisérums.

$Na_2 HPO_4 \cdot 12 H_2O$	2,7 g
$NaH_2 PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Tampon IF-Tween

Ce tampon est utilisé pour le lavage des lames. Ajouter 0,1 % de Tween 20 au tampon IF.

Glycérine tamponné au phosphate 0,1 M à pH 7,6

Ce tampon est utilisé comme fluide de support sur les puits de la lame IF pour renforcer la fluorescence.

$Na_2 HPO_4 \cdot 12 H_2O$	3,2 g
$NaH_2 PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,15 g
Glycérol	50 ml
Eau distillée	100 ml

Appendice 4

Détermination du degré de contamination lors du test d'immunofluorescence

Superficie (S) d'un puits d'une lame multipuits:

$$= \frac{\pi D^2}{4}$$

où D = diamètre du puits. (1)

Superficie(s) du champ de l'objectif

$$= \frac{\pi d^2}{4}$$

où d = diamètre du champ. (2)

Calculer le diamètre du champ (d) par mesure directe ou en appliquant les formules suivantes:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

où i = coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24),

K = coefficient du tube (1 ou 1,25),

G = grossissement (100×, 40×, etc.) de l'objectif.

De (2), on tire:

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad (4)$$

De (3), on tire:

$$d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par champ (c).

Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par puits (C).

$$C = c \frac{S}{s}$$

Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par millilitre d'extrait concentré (N)

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

où y = volume d'extrait concentré sur le puits,

F = facteur de dilution de l'extrait concentré.

Appendice 5

Matériel nécessaire au test ELISA

Tampon carbonate double concentration à pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Du sulfite de sodium à une concentration finale de 0,2 % peut être ajouté comme antioxydant si l'extrait contient une fraction élevée de molécules aromatiques.

10 × PBS à pH 7,4

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29 g
KCl	2 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins.

Stériliser à l'autoclave a 121 °C pendant 15 minutes.

PBS-Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % de Tween 20	5 ml
Eau distillée	895 ml

Tampon de blocage (anticorps) (doit être fraîchement préparé)

10 × PBS	10 ml
Polyvinyl pyrrolidone-44 000 MWT (PVP-44)	2 g
10 % de Tween 20	0,5 g
Poudre de lait	0,5 g
Eau distillée	jusqu'à 100 ml

Solution substrat de phosphatase alcaline à pH 9,8

Diéthanolamine	97 ml
Eau distillée	800 ml

Mélanger et ajuster le pH à 9,8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl).

Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Ajouter 0,2 g de $MgCl_2$.

Dissoudre 2 comprimés de substrat de phosphatase de 5 mg (Sigma) par 15 ml de solution.

Appendice 6

Matériel nécessaire au test PCR

Oligonucléotide amorce

Amorce OLI-1	5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'
Amorcce Y-2	5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Pour matériel: voir Seal *et al.* (1993).

Appendice 7

Matériel nécessaire aux tests d'ensemencement sélectif et d'enrichissement

Milieu sélectif SMSA (Engelbrecht 1994, modifié par Elphinstone *et al.*, 1996)

Milieu de culture

Acides casaminiques (Difco)	1 g
Bacto peptone (Difco)	10 g
Glycérol	5 ml
Gélose (Difco)	15 g
Eau distillée	1 l

Préparer le milieu par volumes d'un demi-litre dans des flacons d'un litre.

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Si nécessaire, ajuster le pH à 6,5 avant l'autoclavage. *Pseudomonas solanacearum* ne se développera pas bien sur le milieu à pH > 7,0.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Refroidir à 50 °C.

Ajouter les ingrédients suivants (tous de Sigma) pour obtenir les concentrations finales spécifiées:

Violet cristallisé	5 mg par l		
Sulfate de polymixine B	100 mg par l	(approximativement 600 000 unités)	Sigma P-1004
Bacitracine (*)	25 mg par l	(approximativement 1 250 unités)	Sigma B-0125
Chloramphénicol	5 mg par l		Sigma C-3175
Péniciline-G	0,5 mg par l	(approximativement 825 unités)	Sigma P-3032
Sels de tétrazolium	50 mg par l		

Dissoudre les ingrédients dans de l'éthanol à 70 % aux concentrations données pour le volume de milieu préparé. Certains ingrédients (polymixine B et chloramphénicol) doivent être légèrement chauffés et agités.

Bouillon SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Effectuer la même préparation que pour le milieu sélectif, mais supprimer la gélose. Répartir dans des tubes Universal de 30 ml à usage unique, à raison de 3 ml par tube.

(*) Si jugée nécessaire, une augmentation de la concentration de bacitracine à 300 ppm peut réduire la contamination par bactéries saprophytes sans réduire la récupération de *Pseudomonas solanacearum*.

Références

Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962, Description of races in *Pseudomonas solanacearum. Phytopathology* 52, 726.

Cook, D.; Elizabeth, B. and Sequeira, L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. Molecular Plant-Microbe *Interactions* 2, 113-121.

Dinesen, I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133-142.

Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith)Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.

Engelbrecht, M.C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.

Hayward, A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum. Journal of Applied Bacteriology* 27, 265-277.

Hayward, A.C., 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent,* Pseudomonas solanacearum (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127-135.

Janse, J.D., 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18, 343-351.

Janse, J.D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.

Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293-695.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 p.

Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria. Phytopathology* 85, 528-536.

Lozano, J.C. and Sequeira, L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.

Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus. Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029-1034.

Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D., 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum,* the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum, P. syzygii, P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587-1594.

Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum)* race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262-4268.

Stead, D.E., 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.

Stead, D.E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281-295.

Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse, J.D., 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent *in-situ* hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2, 266-269.