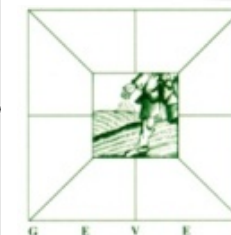




Projet CLAVITOM

« contrat de branche » 2008-2011

GESTION DE CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP MICHIGANENSIS, UN ENJEU SANITAIRE MAJEUR POUR LA PRODUCTION DE TOMATE EN FRANCE



Problématique

Depuis 2006,

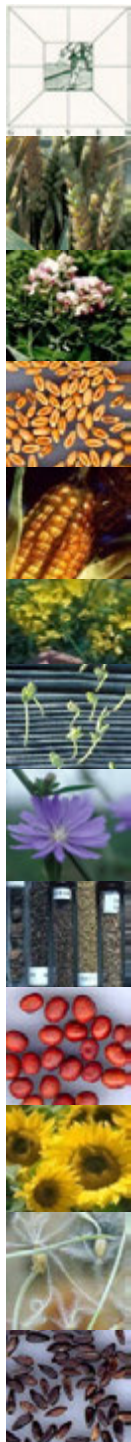
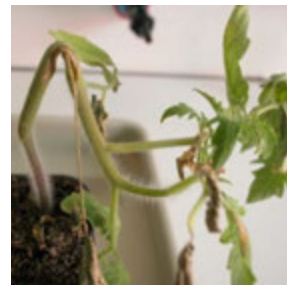
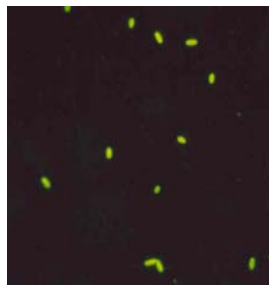
Recrudescence importante
des cas de *Clavibacter
michiganensis* subsp
michiganensis (Cmm) en
culture de tomate

Malgré une prophylaxie et
des contrôles sanitaires
continus



Contexte

- Cmm, bactérie de quarantaine problématique à tous les niveaux de la filière tomate (semence, pépinière, production)
 - Evolution des techniques culturales (greffage)
 - Absence de produit de traitement
 - 2 grands types de méthodes de détection utilisées, chacune imparfaite:
 - Méthodes « sérologiques »: risque de faux positifs
 - surcoût semenciers
 - Isolement sur milieux semi-sélectifs: risque de faux négatifs
 - dissémination
- ↪ **Qualité sanitaire des semences, préalable indispensable à la maîtrise de la dissémination de Cmm**
- ↪ **Remise en cause de la fiabilité des protocoles de détection de Cmm sur semences**



Objectifs du projet collaboratif CLAVITOM

Mettre à disposition des professionnels de nouvelles méthodes de détection de Cmm sur semences, plus spécifiques, répétables, sensibles et utilisables également sur plantes

Acquérir une meilleure connaissance de la transmission de Cmm dans les conditions actuelles de production de la tomate.



7 actions

N° d' ACTION	TITRE de l'ACTION
I	Constitution d'une collection d'isolats et de lots contaminés
II	Mise au point des méthodes d'extraction et d'enrichissement en vue de la réalisation des détections moléculaires
III	Développement d'outils de détection moléculaire du Clavibacter
IV	fiabilité des techniques actuelles de détection (milieux sélectifs, sérologie) et comparaison avec les techniques moléculaires développées
V	Efficacité et conséquence de la désinfection de semences sur la fiabilité des protocoles de détection du CMM
VI	impact des nouvelles techniques de production et de la variabilité du pathogène sur l'efficacité de sa transmission à la plantule
VII	Proposition et validation d'un protocole français de détection du Cmm



Collection de souches

■ Constitution d'une collection de 207 souches

- 141 Cmm
- 66 saprophytes et autres sp

■ Collection caractérisée pour

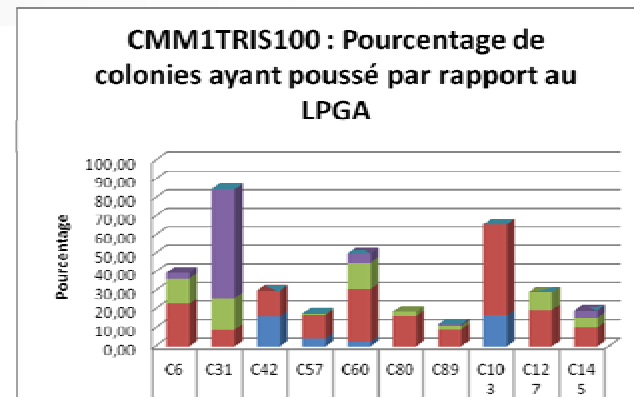
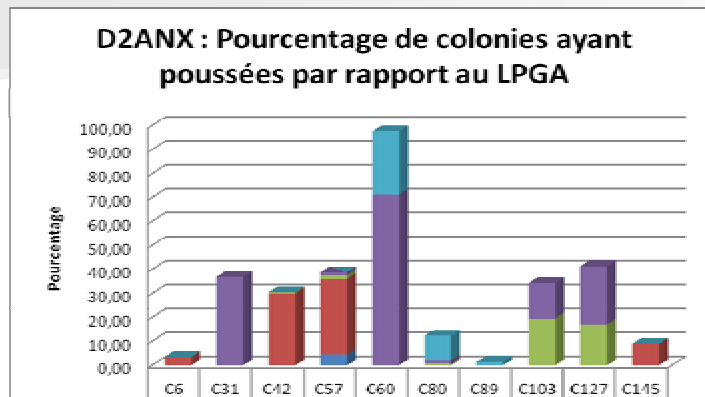
- Croissance sur 5 milieux
- Immunofluorescence
- Pouvoir pathogène
- Réaction avec amorces PCR
 - 1 non-conforme milieu
 - 11 PP chancre sans flétrissement
 - chancre = critère de diagnostic

	nb isolates	Typical Cmm on media	PP	IF	PCR			
					PSA	ZTO	CMM R/F	PSA R/8
	128	+	+	+	+ (5 non testée)	+ (5 non testée)	+	+
Cmm (141)	1	white	+	+	+	+	+	+
	1	+	-	+	+	+	+	+
	11	+	+ with OEPP, - with decapitation	+	+	+	+	+

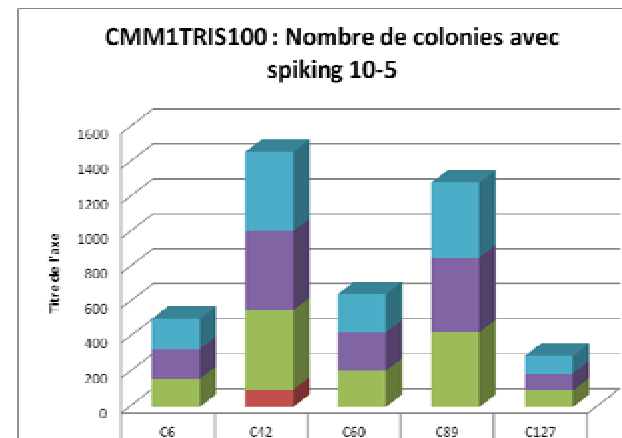
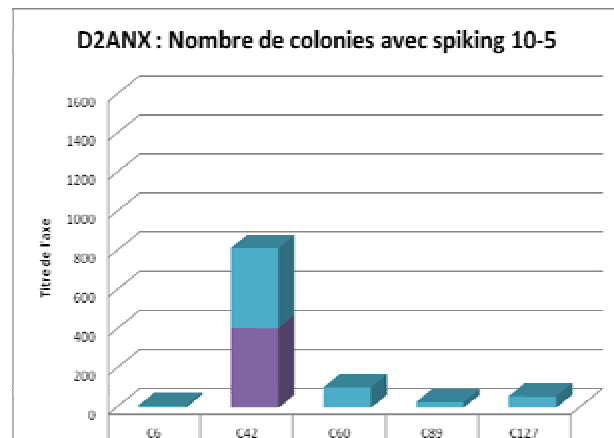


Comparaison de croissance sur 2 milieux Cmm1Tris 100 et D2ANX

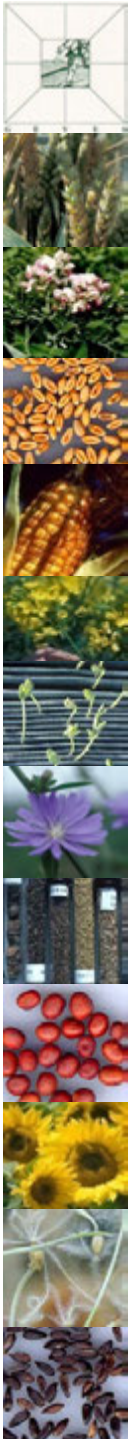
- 10 souches de Cmm en culture pure



- 10 souches dans du macérat de semences

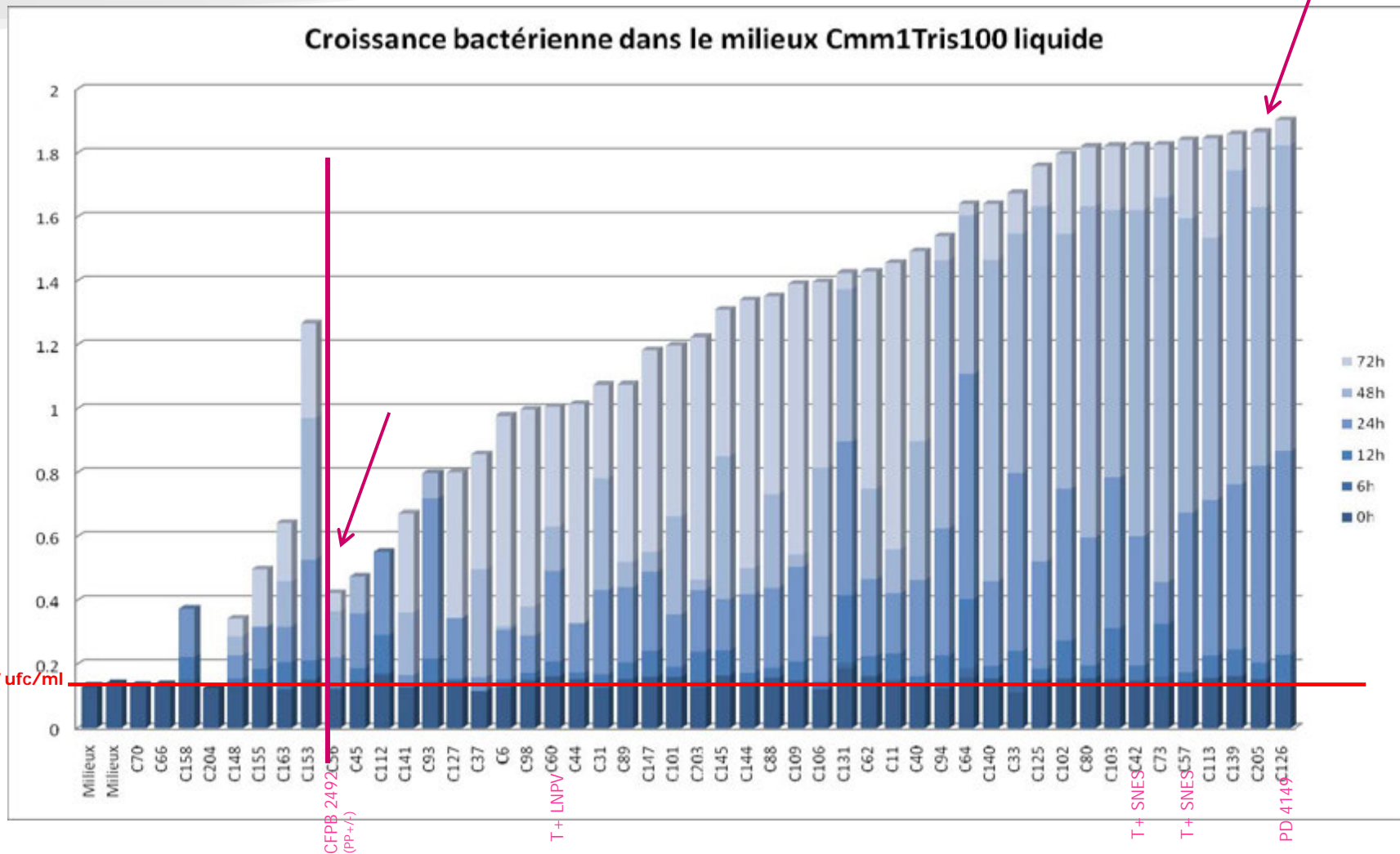


- Meilleurs résultats sur CMM1 Tris 100, abandon du D2ANX
- Des différences de croissance entre souches



Comparaison de la croissance sur milieu

- Croissance de 48 souches sur Cmm1Tris100 liquide (4 Cm, 4 saprophytes et 40 Cmm)



Amorces PCR

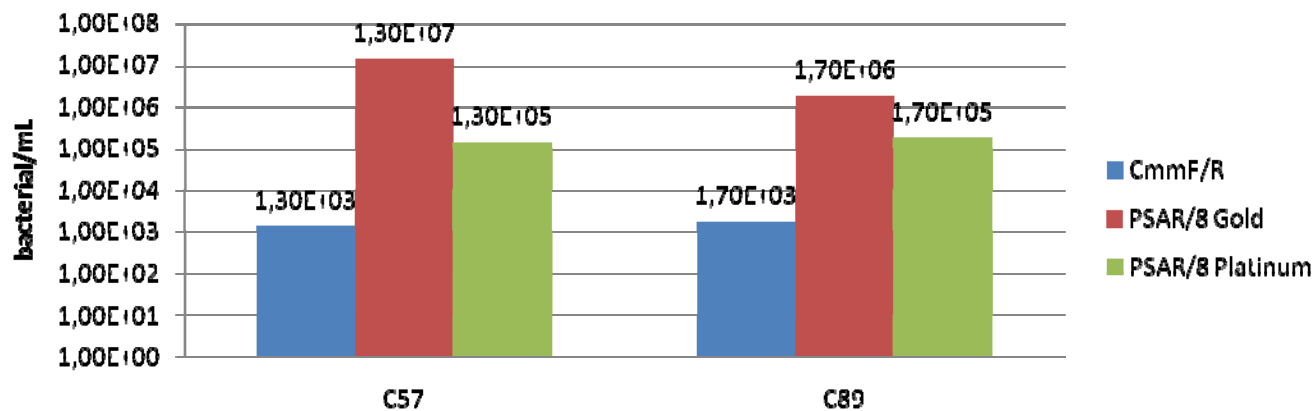
■ 7 couples d'amorces étudiés

strains	Nb of strains	PSAR/8	CmmF/R	ZTO	Cmm392	Cmm11/1 2	PSAF/R	PFC1/PRC3
Cmm	136	+	+	+	+ (98 tested)	+ (98 tested)	+	8 - (23 tested)
Other pathogens on tomato	X. vesicatoria P,Syringae	-	-	-	-	-	2+ (weaks bands)	-
Other Clavibacter	3 Cmi 2 Cmn 2 Cmi 2 Cms 1Cmt	-	1+ (Cm 148: PP- and IF+)	1+ (Cm 148: PP- and IF+)	2+ (Cm149 and Cm148 PP- and IF+)	1+ (Cmi)	5+ (weaks bands: Cmn, Cmi, Cms)	2+ (Cmi)
saprophytes	42	-	-	-	- (18 tested)	2+ (weaks bands)	7+ (weaks bands)	- (17 tested)
syngenta "lookalikes"	12	1+	10+	10+	11+ (3 with weaks bands)	10+	6+ (weaks bands)	-



Seuil de détection PCR

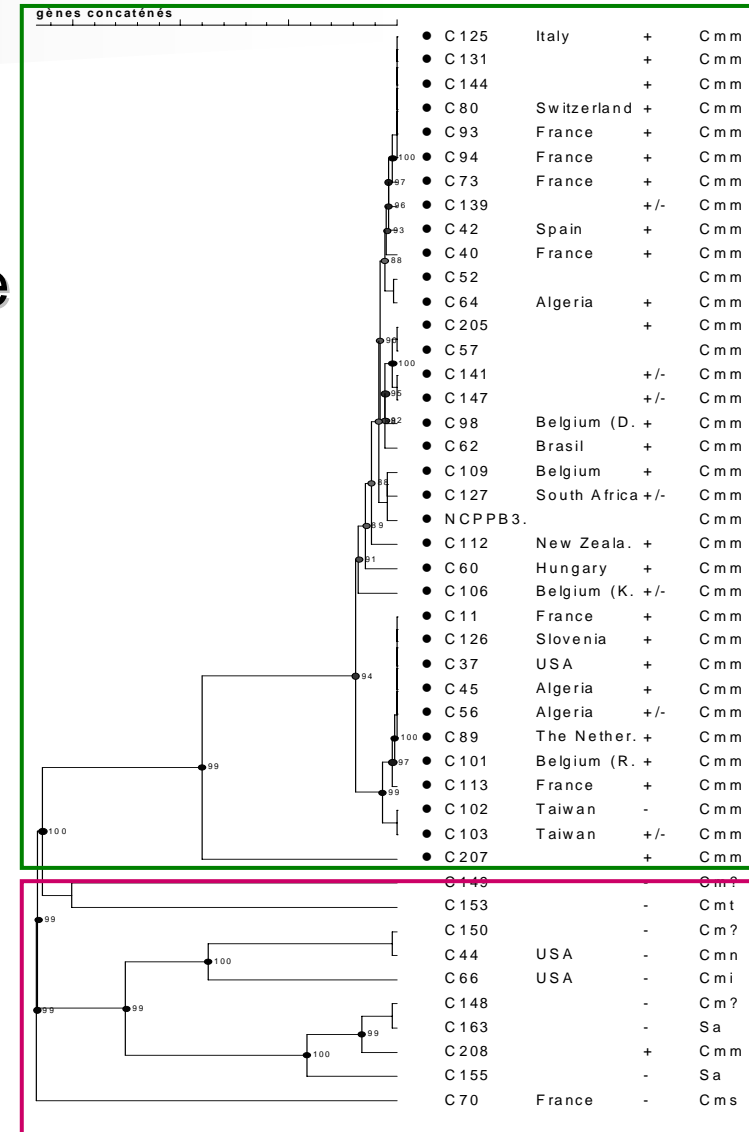
- Comparaison des Taq Hot Start Gold et Platinum avec PSAR/8
- Souches C57 et C89 en culture pure diluées dans de l'eau, extraction par ébullition



- Meilleur seuil de détection avec la Taq Platinum pour PSAR/8

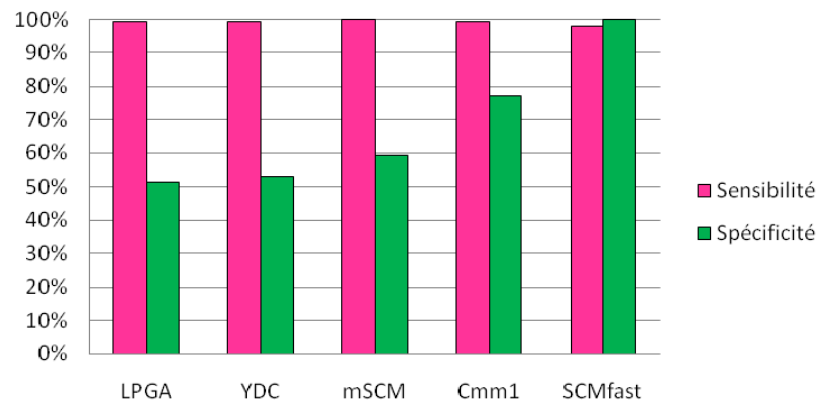
Caractérisation moléculaire par séquençage (MLSA)

- 4 gènes de ménages (gyrB, recA, rpoB, ppk)
 - pourcentage d'homologie des séquences
- 48 souches :
 - 38 Cmm,
 - 3 Saprophytes (Syngenta),
 - 3 Cm PP (-),
 - 1Cmi, 1Cmn ,1Cms,1Cmt
- Faible diversité génétique
- Outil d'aide à la décision pour l'identification

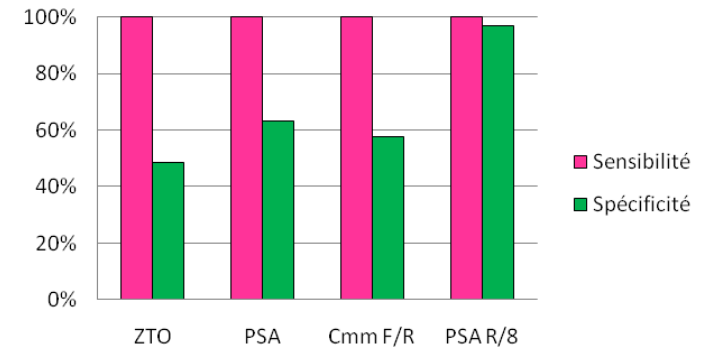


Sensibilité et Spécificité

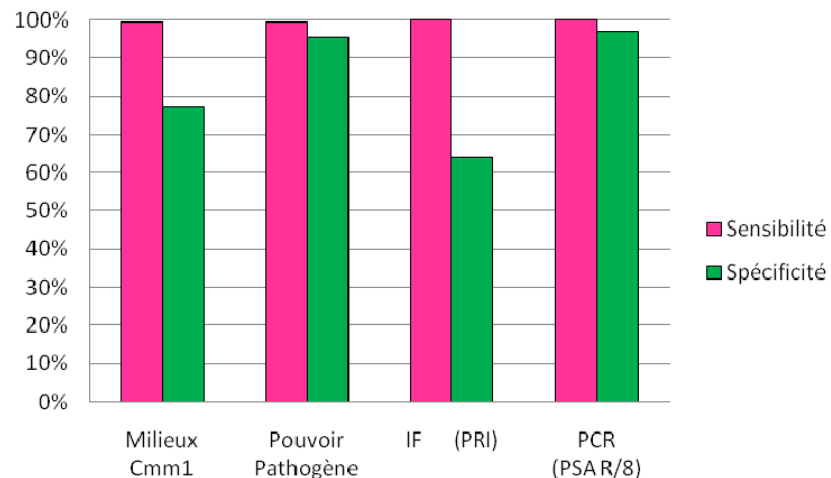
Sensibilité et Spécificité des milieux



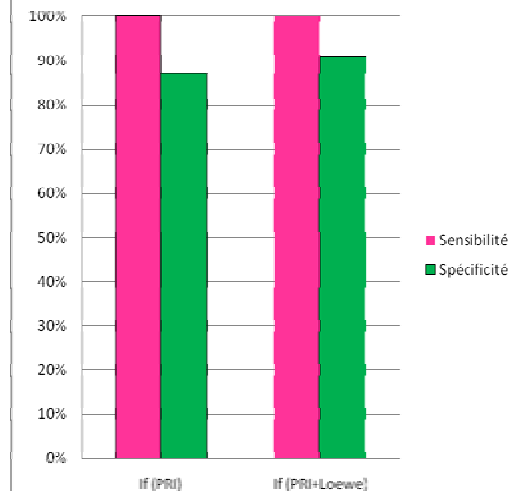
Sensibilité et Spécificité des primers



Sensibilité et spécificité des différentes méthodes



Sensibilité et Spécificité de 221 saprophytes hors collection





Etude des méthodes d'extraction et d'enrichissement en Cmm

- Méthodes d'extraction des bactéries
 - Macération au froid et extraction au Stomacher (méthode classique)
 - Broyage à sec des semences, homogénéisation
 - Macération au froid, changement de tampon et extraction au Stomacher
 - Germination des semences + broyage
 - Concentration sur filtre et analyse du filtre
- Détection de Cmm:
 - Sur milieux semi-sélectifs
 - BIO-PCR
 - Immunocapture-étalement sur milieu
- Aucune méthode n'améliore la détection

Mise au point d'un protocole de Bio-PCR

Bio-PCR avec milieu Cmm1-Tris

Etapes:

- ❖ Macération 4°C + stomacher
- ❖ Témoin: contrôle d'inhibition: contamination artificielle du macérat
- ❖ Centrifugations
- ❖ Enrichissement sur Cmm1-Tris
- ❖ Lavage des boites + extraction (ébullition)
- ❖ Détection/Identification par PCR





Mise au point d'un protocole de Bio-PCR

Threshold of Bio-PCR artificially inoculated



Production de semences contaminées

- Essai réalisé dans la serre de quarantaine (niveau S2) de l'INH
- Inoculation avec une souche C144 résistante à la rifampicine (Bert Woudt, Syngenta Seeds)
- Deux méthodes d'inoculation
 - Pulvérisation au stade bouton floraux
 - Inoculation par piqûre dans la tige de la grappe lorsque la première tomate est en fruit
- Taux de contamination 3.35% (min 0.36, max 12.01)
- Faux négatifs sur Cmm1Tris 100 (méthode ISHI) avec Témoin spiking OK
- Utilisation pour validation Bio-PCR et actions 5-6 du programme



		Milieux	BioPCR
Lot 35 (5X50)	LPGArif	4+/5	5+/5
	Cmm1TRIS100rif	0+/5	5+/5



Collecte et caractérisation de lots de semences

- Caractérisation de 19 lots avec les méthodes:
 - Milieu: ISHI 3
 - IF: méthode française
 - Bio-PCR
 - IMS Agar
- Utilisation pour validation et comparaison de protocoles

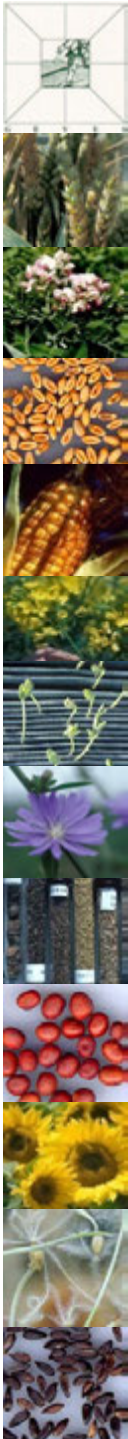
nombre de lots	Résultats avec toutes les méthodes				noms des lots
	IF (pri)	Bio-PCR	media	IMS Agar	
1	+	-	-	/	lot 3
1	+	-	-	-	lot 1620
6	+	/	-	/	lot 9, 13, 14, 15, 16, 17
1	-				Lot 1618
2	-			/	lot 7 et 11
3	+	+	-	/	lot 2, 4 et 5
2	-	+	-	/	lot 8 et 19
3	+	+	-	-	lot 18, 20 et 1619
1	+	+	+(pasconf enPP)	/	lot 1
1	+			-	lot 6
1	-	+	+	-	819
3	+				lots 10, 12 et 820

lot 12 et 20 : Attention Bio PCR Bande parfois légèrement en dessous pouvant entrainer des faux positifs

Les 4 techniques +

Milieux +

BioPCR +



Conclusion/perspectives

- Critères de validation des méthodes (spécificité et sensibilité) comparés sur une collection de souches
- Avancées pour l'amélioration de la méthode sur milieux
- Mise au point d'une méthode alternative: bio-PCR
- ↪ valider la bio-PCR, comparer son efficacité par rapport aux autres méthodes,
- ↪ étudier l'efficacité et la conséquence de la désinfection de semences sur la fiabilité des protocoles
- ↪ étudier les seuils de transmission à la plantule
- ↪ Proposer et valider un protocole de détection du Cmm

