



Détection de

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli*

sur semences de haricot

par isolement sur milieu nutritif
et identification de la souche.

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Réf. : MOA 030 parties A, B et C version 1 a



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

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

MOA 0xx Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
BHs/99/02 version b	-	-	1999	Janvier 2013
MOA 030_parties A, B et C version 1 consultation	Octobre 2012	Fin novembre 2012		
MOA 030_parties A, B et C version 1a	-	-	Janvier 2013	

SOMMAIRE

PREAMBULE	5
Objet des méthodes officielles	5
Glossaire, abréviations et documents connexes	5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus	5
Échantillonnage et échantillon	5
Modification des méthodes officielles	5
Considérations d'ordre métrologique.....	6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité.....	6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification	7
ORIGINE DE LA METHODE	8
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE.....	9
Modifications	9
Améliorations	9
DESCRIPTION DE LA METHODE	10
1. Objet.....	10
2. Domaine d'application	11
3. Présentation schématique de la détection et de l'identification de <i>Xap</i>	12
Partie A.....	14
Détection par isolement sur milieu	14
1. Produits et consommables	14
1.1. Milieux et solution	14
1.2. Autres consommables	15
2. Appareillage et matériel	15
3. Contrôles et témoins.....	15
4. Etapes de l'analyse	16
4.1. Extraction bactérienne par macération	16
4.2. Dilutions et étalements	16
4.3. Incubation.....	16
4.4. Lecture.....	17
4.5. Repiquage pour identification	17
4.6. Identification	18

Partie B.....	19
Identification des souches isolées par Test de pouvoir pathogène	19
1. Contrôles et témoins	19
2. Description de la méthode (Darsonval et al., 2009)	19
3. Validation et interprétation des résultats	21
4. Expression des résultats	21
Partie C : Identification par Test moléculaire appliqué sur souches isolées	22
1. Produits et consommables	22
1.1. Réactifs de biologie moléculaire	22
1.2. Tampons	22
1.3. Autres consommables	23
2. Appareillage et matériel	23
3. Contrôles et témoins	23
4. Etapes de l'analyse	24
4.1. Extraction d'ADN	24
4.2. Test obligatoire : amplification – PCR avec les amorces Audy.....	24
4.2.1. Répliquats d'amplification	24
4.2.2. Préparation du mélange réactionnel (modifié INRA)	24
4.2.3. Programme d'amplification.....	25
4.2.4. Électrophorèse et Révélation.....	25
4.3. Test optionnel : amplification – PCR Boureau avec le kit triplex DIAG-GENE	26
4.3.1. Répliquats d'amplification	26
4.3.2. Préparation du mélange réactionnel	26
4.3.3. Programme d'amplification.....	26
4.3.4. Électrophorèse et Révélation.....	26
5. Résultats	27
5.1. Validation et interprétation des résultats PCR Audy	27
5.2. Validation et interprétation des résultats PCR Boureau en triplex.....	27
5.3. Interprétation des résultats	28
5.4. Expression des résultats	29
Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	30
Conservation des reliquats de matériels utilisés.....	30
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	31
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE	32
REMERCIEMENTS.....	33
ANNEXE 1 – Composition Solution saline	34
ANNEXE 2 : Gel d'électrophorèse avec PCR quadriplex DIAG-GENE.....	35

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode. Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

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 des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés. Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Toute autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, 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 des méthodes).

Volume	volume < à 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume \geq à 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$ congélateur froid intense : $\leq -65^\circ\text{C}$
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique ...).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des Services Régionaux de l'Alimentation des directions régionales de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode a été évaluée par un groupe constitué de l'INRA-IRHS d'Angers, du GEVES et de l'Anses-LSV sur la base des travaux réalisés en 2011 par l'INRA-IRHS d'Angers (Boureau *et al.*, 2013) et de l'essai inter-laboratoire de validation ISTA organisé par le GEVES (Grimault *et al.*, 2012)

En effet, en 2011, des résultats contradictoires d'identification de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) ont été obtenus avec la méthode française de référence BHS/99/02b. Des travaux initiés par l'INRA et le GEVES ont montré la présence d'isolats positifs en test de pouvoir pathogène selon la méthode de référence française mais négatifs en identification moléculaire avec les amorces Audy *et al.* Des résultats similaires ont été obtenus, en particulier aux USA et aux Pays Bas, avec la méthode ISTA 7-021. Sur la base des résultats de l'INRA (Darsonval *et al.*, 2009), un nouveau test de pouvoir pathogène permettant de discriminer *Xap* des autres isolats non pathogènes a été développé et validé. De même, des travaux de caractérisation moléculaire des souches atypiques ont été conduits et coordonnés par l'INRA permettant de sélectionner les couples d'amorces les plus discriminants (Audy *et al.*, 1994 et Boureau *et al.*, 2013). Enfin, une étude collaborative entre l'ISTA, l'INRA, l'Anses et l'ISHI-Veg sur les nouveaux tests de pouvoir pathogène et d'identification moléculaire a permis de valider les tests décrits dans la présente méthode (Grimault *et al.*, 2012) sur 30 souches cibles et 30 souches non cibles, à l'exception du système « quadriplex ». La validation de ce dernier système sera publiée dans Boureau *et al.*, 2013 (soumission en cours).

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

- Scission en 2 méthodes

Seule la partie correspondant à la détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* fait l'objet d'une nouvelle méthode à savoir :

- Le pouvoir pathogène par piqûre ne permettant pas de discriminer des bactéries appartenant au « pv. *phaseoli* » de bactéries phylogénétiquement proches mais non pathogènes sur haricot a été supprimé et remplacé par une méthode de pouvoir pathogène mise au point par l'INRA-IRHS.
- L'identification moléculaire de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a été rajoutée.
- Le schéma de détection et d'identification a été modifié en conséquence.

AMELIORATIONS

Les améliorations portent d'une part sur des aspects formels, d'autre part sur la correction d'erreurs relatives aux points suivants :

- Suppression des descriptions de milieux de culture disponibles dans le répertoire des recettes MOA REP001 version en vigueur

DESCRIPTION DE LA METHODE

Semences de haricot, détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* par isolement et identification de la souche

1. Objet

Deux bactéries sont responsables de graisses du haricot (*Phaseolus vulgaris*) ; il s'agit de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp) provoquant la graisse à halo (halo blight) et *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) provoquant la graisse commune (common blight). Elles sont notamment transmissibles par la semence, laquelle représente une source importante d'inoculum. Cependant, la présente méthode qualitative s'applique uniquement à la détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* dans les semences de haricot.

Sur le plan taxonomique, trois propositions validées coexistent. Selon Vauterin *et al.* (1995), les souches sont groupées dans le pathovar *phaseoli* de l'espèce *X. axonopodis*; les souches *fuscans* étant considérées comme un variant de ce pathovar. En 2006, Schaad *et al.* proposa de séparer ce pathovar en deux groupes, les souches *fuscans* formant une sous espèce d'une nouvelle espèce nommée *X. fuscans*, la nomenclature des souches non-*fuscans* restant inchangée (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*). Ah-You *et al.* en 2009, proposa de maintenir les souches *fuscans* en tant que variant du pathovar *phaseoli* mais d'une nouvelle espèce proposée *X. citri*.

Dans ce document, nous utiliserons seulement la nomenclature selon Vauterin *et al.* (1995 confirmé en 2000) et adopterons donc le nom de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pour désigner l'agent responsable de la graisse commune. Si nécessaire, les souches de type *fuscans* seront sous l'appellation *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* présente une variabilité génétique certaine (Birch *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2006, Schaad *et al.*, 2006, Vauterin *et al.*, 1995 et 2000). En effet, les souches peuvent être regroupées en quatre lignées génétiques différentes, trois pour les souches non-*fuscans* et une pour les souches de type *fuscans* (Alavi *et al.*, 2008; Mkandawire *et al.*, 2004).

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* figure à l'annexe IIA chapitre II de la Directive 2000/29/CE du 8 mai 2000. L'annexe II, partie A2 de l'arrêté du 22 novembre 2002 modifié transposant la Directive 2000/29/CE du conseil, considère Xap comme un organisme nuisible présent dans l'Union Européenne mais important pour cette dernière; l'introduction et la dissémination doivent donc être interdites dans tous les Etats membres s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux.

La technique utilisée permet l'isolement direct sur milieu semi-sélectif de colonies suspectes (partie A). L'identification finale de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* est réalisée par test du pouvoir pathogène (partie B) et/ou par amplification génique (partie C). Toutes ces méthodes sont qualitatives, c'est à dire qu'elles donnent un résultat du type « positif » ou « négatif ».

Un résultat positif indique la présence ou la suspicion de présence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Un résultat négatif indique l'absence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

La présente méthode est à utiliser pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'import ou à l'export de végétaux.

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode s'applique aux échantillons de semences de haricot, avec ou sans traitement phytosanitaire. En présence de traitement, les semences devront subir un lavage rapide avant analyse.

Il ne peut être exclu *a priori* que la présence de traitement ait une incidence sur l'isolement bactérien.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, non altérés par décomposition ou autre. Dans le cas contraire, le laboratoire peut refuser de traiter l'échantillon ou émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

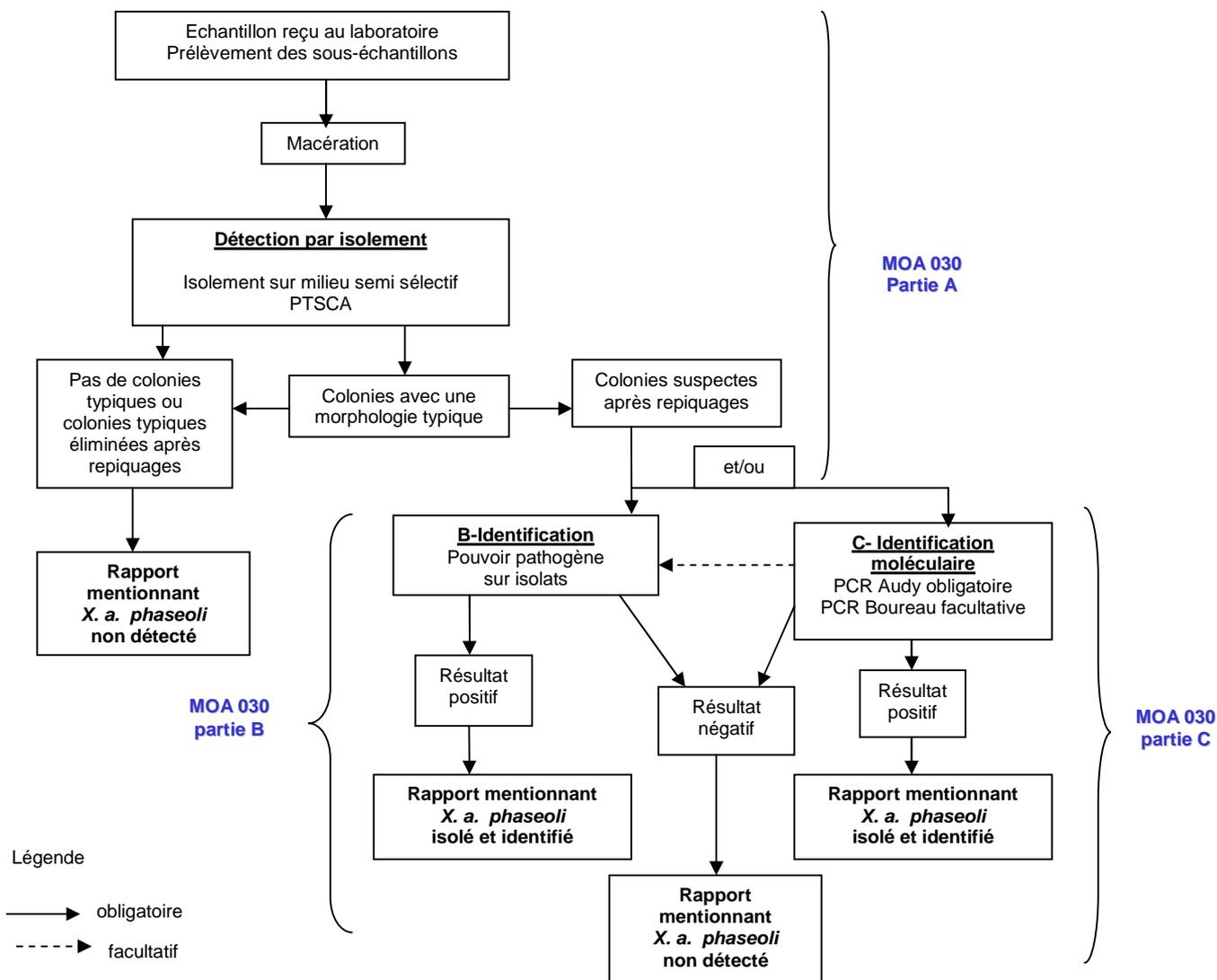
L'analyse est réalisée sur un échantillon pour laboratoire d'au moins 5000 graines.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

En attente de l'analyse, les échantillons seront conservés à +5°C.

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* a un statut de parasite de quarantaine réglementé. La bactérie doit être manipulée dans de strictes conditions de quarantaine en accord avec la directive 2008/61/CE. Les exigences en termes de confinement pour la détention et la manipulation de cet agent pathogène sont de type L2 (arrêté du 13 août 1996).

3. Présentation schématique de la détection et de l'identification de *Xap*



Détection et identification de *Xap*.

Les laboratoires mettant en œuvre la détection de *Xap* doivent en réaliser l'isolement selon la partie A. A partir des souches suspectes isolées en A, les tests d'identification sont au choix :

- Le test de pouvoir pathogène (partie B)
- Ou l'identification moléculaire par une à deux PCR (partie C)
- Ou la combinaison du test de pouvoir pathogène et d'une PCR (parties B + C)

Les résultats de la partie B s'interprètent de la façon suivante :

Pouvoir pathogène sur isolats	Résultats
POSITIF	Résultat positif pour l'identification de <i>Xap</i>
NEGATIF	Résultat négatif pour l'identification de <i>Xap</i>

Les résultats combinés des tests PCR (partie C) et de pouvoir pathogène (partie B) s'interprètent de la façon suivante :

		PCR facultative (Boureau) sur isolats		Test de pouvoir pathogène sur isolats	
		POSITIF	NEGATIF	POSITIF	NEGATIF
PCR (Audy) sur isolats	POSITIF	Résultat positif pour l'identification de <i>Xap</i>	Résultat négatif ⁽¹⁾ pour l'identification de <i>Xap</i>	Résultat positif pour l'identification de <i>Xap</i>	Résultat négatif ⁽¹⁾ pour l'identification de <i>Xap</i>
	NEGATIF	Sans objet Résultat négatif pour l'identification de <i>Xap</i>			

(1) Un résultat faussement négatif avec la PCR Audy est possible dans le cas d'isolats de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (cf. introduction de la partie C)

Ainsi *Xap* est isolé et identifié dans les échantillons si :

- au moins une colonie suspecte a été isolée
- et le test de pouvoir pathogène est positif sur cet isolat
- et/ou le test moléculaire est positif sur cet isolat

Xap est non détecté dans les échantillons si :

- aucune colonie suspecte, ni typique n'est isolée
- ou au moins une colonie suspecte a été isolée mais le test d'identification moléculaire ou celui de de pouvoir pathogène est négatif

Si *Xap* a été détecté et identifié dans au moins un sous échantillon, le résultat de l'échantillon est positif.

PARTIE A

DETECTION PAR ISOLEMENT SUR MILIEU

1. Produits et consommables

En règle générale, l'opérateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

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

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

Pour la composition des milieux, se reporter à la méthode officielle d'analyse MOA REP 001 Répertoire des recettes.

1.1. Milieux et solution

La liste des milieux et solutions nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

1.1.1. Milieux de culture pour l'isolement et repiquages :
Isolement sur PTSCA,
Repiquages sur GYCA (ou YDC) et éventuellement sur LPGA

1.1.2. Solution saline stérile pour les dilutions (cf. annexe 1).

Contrôles :

Les milieux de culture sont des réactifs critiques pour la réalisation des isolements, en conséquence, chaque lot de fabrication d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire) doit donner lieu à une vérification selon les préconisations de la MOA REP 001.

Conservation :

Les milieux de culture doivent être utilisés dans un délai de 2 mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les deux mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu est 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 $\leq 20^{\circ}\text{C}$.

1.2. Autres consommables

-Anses stériles.

-**Eau de qualité « analytique »** (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,...) **stérilisée** garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

-**Ethanol 70°** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel.

- **Tubes stériles** pour dilutions

-**Cônes stériles** sans filtre de volume adaptés

2. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera d'appareils courants de laboratoire de bactériologie et notamment :

- Etuve ou incubateur bactériologique réglé(e) à 28°C
- Système thermostaté ou auto-préparateur de milieux.
- Agitateur.
- Enceinte réfrigérée à +5°C
- Système de production d'eau déminéralisée.
- Modules climatisés à +28°C ou serres régulées autour de 28°C, avec hygrométrie élevée (95% d'humidité relative (HR)) agréés pour la manipulation de bactéries de quarantaine. Apport lumineux en hiver.
- Autoclave.
- Balances, ayant une précision au gramme, à 0,1g et au mg.
- Micropipettes dispensant des volumes adaptés

3. Contrôles et témoins

Des matériaux de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

La préparation et l'utilisation des témoins sont décrits dans le corps du texte de la méthode.

Dans la présente méthode, les souches utilisées comme témoin positif lors de l'isolement et du test de pouvoir pathogène sont des souches de référence de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de types *fuscans* et/ou non *fuscans* (exemple, souche CFBP 6546 (non *fuscans*) ou CFBP 6165 (*fuscans*)).

De plus, pour le test de pouvoir pathogène, il est recommandé d'inclure une souche de type *Xanthomonas* sp. pathogène de la tomate comme témoin négatif provenant d'une collection de référence (exemple, souche *X. euvesicatoria* CFBP 5618).

Des isolats du laboratoire, préalablement vérifiés sur milieu, en test moléculaire et 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 séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination croisée.

4. Etapes de l'analyse

Prise d'analyse

A partir de l'échantillon pour laboratoire et après homogénéisation, prélever au hasard le nombre de graines nécessaires à l'analyse (au minimum 5000 graines). Sur la base des travaux d'A. Darrasse (2006, 2007), l'échantillon est subdivisé en sous échantillons d'environ 1000 graines sur la base du Poids de Mille Grains, lorsque celui-ci est disponible.

Entre chaque échantillon, l'opérateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

4.1. Extraction bactérienne par macération

Cette étape peut être commune à la détection d'autres bactéries transmises par les semences de haricot, en particulier *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Les sous échantillons de graines sont mis à macérer de 18 à 24 heures à 5°C dans de l'eau déminéralisé e stérile, sous agitation, au moins intermittente (agitation suffisante pour permettre une bonne imbibition des semences). La masse d'eau à introduire est égale à deux fois et demi la masse des graines.

4.2. Dilutions et étalements

Prélever un aliquot de liquide de macération par groupe et le diluer au $1/10^{\text{ème}}$ et $1/100^{\text{ème}}$ dans de la solution saline stérile.

Déposer et étaler 100 µl de chaque concentration sur une boîte de milieu de culture semi-sélectif PTSCA.

Une souche témoin de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* est également étalée après avoir été diluée de façon à obtenir des colonies isolées (ex : à partir d'une suspension à environ 10^7 ufc/mL, étaler les dilutions 10^{-4} et 10^{-5} à raison de 100µL/boîte). Cette opération doit être isolée dans l'espace ou dans le temps afin de se prémunir de toute contamination.

4.3. Incubation

Incuber les boîtes de Petri à 28°C pendant 3 à 6 jours.

4.4. Lecture

Observer les boîtes de PTSCA après 3 à 6 jours. Les colonies de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sont jaunes, bombées, muqueuses, à marges entières et entourées d'une zone d'hydrolyse de l'amidon (photo 1). De plus, le variant *fuscans* diffuse un pigment brun dans le milieu.

Comparer au(x) témoin(s) positif(s).

NB : la pigmentation brune du variant *fuscans* peut apparaître tardivement (photo 2).



Photo 1 : colonies typiques sur milieu PTSCA (la zone d'amidolyse n'est pas visible sur le cliché) – source Anses LSV

4.5. Repiquage pour identification

Tout échantillon présentant au moins une colonie typique *Xap* (ou suspecte) sur au moins une boîte de culture doit faire l'objet d'une identification.

Repiquer sur milieu GYCA (ou YDC) les colonies typiques ou suspectes sur PTSCA : au moins, si présentes, deux colonies par sous-échantillon de 1000 graines. Après 1 à 3 jours à 28°C, les cultures de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sont jaunes (pigmentation brune pour le variant *fuscans*), très muqueuses et luisantes sur GYCA ou YDC.

De plus, les cultures peuvent être repiquées sur LPGA, milieu sur lequel *Xap* a un aspect plus ou moins muqueux, jaune à brun pour le variant *fuscans*.

Comparer au(x) témoin(s) positif(s).

Attention ! En raison de la présence de mélanges d'isolats pathogènes et non pathogènes dans les lots de semences, il est essentiel de repiquer plusieurs colonies suspectes (si présentes) par sous échantillon et de tester toutes les cultures typiques des *Xanthomonas* «*Xanthomonas-like* » en pouvoir pathogène ou PCR. Ainsi, **tous les isolats suspects (variants *fuscans* ou non-*fuscans*) devront subir des tests d'identification.**



Photo 2 : Cultures et colonies sur milieu LPGA après 5j de croissance à +28°C de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* souche CFBP 6546 et de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var *fuscans* (source Anses LSV)

4.6. Identification

Les isolats sélectionnés à l'issue de cette étape seront identifiés selon l'un des 2 schémas possibles décrits ci-après :

Partie B : IDENTIFICATION PAR TEST DE POUVOIR PATHOGENE

Cette option est adaptée aux laboratoires non équipés / non expérimentés en biologie moléculaire. Elle nécessite une chambre climatisée ou une serre permettant le contrôle d'une forte hygrométrie. C'est l'option qui prend le moins de temps pour un faible nombre d'isolats si des plants sont disponibles pour les inoculations. La réussite et la fiabilité de ce test dépendent fortement des conditions d'hygrométrie et des concentrations d'inoculum. Il est donc essentiel d'ajouter, en plus du témoin positif, deux témoins négatifs : eau et *Xanthomonas* sp. type *vesicatoria*.

Partie C: IDENTIFICATION PAR TEST(S) MOLECULAIRE(S)

Cette option (pour laboratoires équipés et expérimentés en biologie moléculaire) est particulièrement adaptée quand un délai de réponse très court est exigé ou pour un grand nombre d'isolats à tester.

PARTIE B

IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLEES PAR TEST DE POUVOIR PATHOGENE

1. Contrôles et témoins

Les souches utilisées comme témoin positif lors du test de pouvoir pathogène sont des souches de référence de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de types *fuscans* et/ou non *fuscans* (exemples, souche non *fuscans* CFBP 6546 ou souche *fuscans* CFBP 6165).

De plus, il est recommandé d'inclure comme témoin négatif une souche de *Xanthomonas* sp. pathogène de la tomate provenant d'une collection de référence (ex : *Xanthomonas euvesicatoria* CFBP 5618).

Des isolats du laboratoire, préalablement vérifiés sur milieu, en test moléculaire et 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
<http://www-intranet.angers.inra.fr/cfbp/>

La manipulation de ces souches doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination croisée.

2. Description de la méthode (Darsonval et al., 2009)

L'identification finale des souches est réalisée par la vérification du pouvoir pathogène sur une variété sensible de haricot (type Michelet, Contender ou Flavert).

Semer et conduire les plantes de haricot d'une variété très sensible au *Xap* (ex: Flavert ou Michelet) à 20-30°C jusqu'au stade de première feuille trifoliée, soit environ 16 jours après le semis. Prévoir suffisamment de plantes pour inoculer 3 plantes par isolat à tester, ainsi que les témoins.

Un jour avant l'inoculation, placer les plantes en enceinte de confinement le cas échéant. Pour la suite de l'essai, la culture en enceinte de confinement sera avec les conditions suivantes : 28°C pendant 16h, 95% HR, 100% éclairage; 25°C pendant 8h sans éclairage, 95 % HR.

Préparer une suspension à environ 10^7 ufc/mL d'eau stérile à partir d'une culture fraîche (24 à 48h). La suspension doit être d'un volume suffisant pour permettre le trempage des folioles à inoculer (Photo 2).

Attention ! Pour le test de pouvoir pathogène, une concentration d'environ 10^7 ufc/mL doit être utilisée : une concentration plus faible peut conduire à un résultat faussement négatif ; une concentration plus forte à un résultat faussement positif.

Inoculer par trempage de la première feuille trifoliée environ 30 secondes dans un récipient contenant l'inoculum (exemple photo 2). Inoculer également des plantes avec le témoin positif *Xap* et les témoins négatifs *Xanthomonas* sp. et eau.

Incuber à 28°C 16h de lumière, 95 % HR; 25°C 8h d'obscurité, 95 % HR.



Photo 2 : Exemple de trempage de première feuille trifoliée dans l'inoculum (source GEVES)

Attention ! Le taux d'hygrométrie est particulièrement critique pour la réussite de ce test : un minimum de 95% HR est indispensable pour obtenir des lésions typiques (taches de graisse) ; une hygrométrie plus faible peut conduire à des problèmes d'interprétation du test.

Comparer et enregistrer l'apparition des symptômes, en priorité sur les témoins, puis sur l'essai à partir de 5 jours après inoculation et jusqu'à 11 jours. Si les réactions sur les témoins ne sont pas conformes aux attentes, l'essai doit être recommencé. Les symptômes typiques sont des petites taches graisseuses (Photo 3) pouvant s'étendre en plages (Photos 4 et 5). Des lésions nécrotiques peuvent se développer conduisant à la mort des tissus dans le cas d'isolats très agressifs (Photo 6). Aucune tache graisseuse, ni flétrissement ne doivent apparaître sur les témoins négatifs.



Photo 3 : Lésions graisseuses après inoculation (source GEVES)



Photos 4 et 5 : Evolution de plages nécrotiques (source Anses-LSV)



Photo 6 : Nécrose totale des folioles (source INRA)

3. Validation et interprétation des résultats

La conformité des témoins valide l'essai. Les résultats des isolats sont enregistrés.

Conformément au point 3 de la partie A du présent document « Présentation schématique de la détection » :
Tout isolat ayant rendu un résultat positif en pouvoir pathogène est considéré comme identifié en tant que *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

Tout isolat ayant rendu un résultat négatif en pouvoir pathogène est considéré comme n'étant pas *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

4. Expression des résultats

Si aucun isolat présent dans l'échantillon n'est identifié en tant que *Xap*, l'échantillon est considéré comme non contaminé par *Xap*.

Si au moins un isolat présent dans l'échantillon est identifié en tant que *Xap*, l'échantillon est considéré comme contaminé par *Xap*.

Si *Xap* a été détecté et identifié dans au moins un sous échantillon, le résultat de l'échantillon est positif.

Cette méthode étant qualitative, les résultats pourront être exprimés de la façon suivante (ou selon une formule équivalente) :

⇒ Lorsque le résultat des analyses est négatif :
“La bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* n'a pas été isolée dans l'échantillon considéré”.

⇒ Lorsque le résultat des analyses est positif :
“La bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a été isolée et identifiée dans l'échantillon considéré”.

PARTIE C : IDENTIFICATION PAR TEST MOLECULAIRE APPLIQUE SUR SOUCHES ISOLEES

Cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

Cette partie C comprend 2 tests moléculaires : PCR Audy et PCR Boureau. La caractérisation des critères de performance des méthodes a permis de mettre en évidence des résultats faussement positifs pour la PCR Audy du fait de l'amplification aspécifique de *X. axonopodis* pv. *Dieffenbachiae*. Bien que cette bactérie soit théoriquement absente des semences de haricot, un test de pouvoir pathogène réalisé selon la partie A ou un test PCR supplémentaire avec les amorces Boureau peut être conduit pour confirmer l'identité de la bactérie.

1. Produits et consommables

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

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

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

1.1. Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent les performances des étapes d'amplification (eau de qualité ultra-pure, kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces). Ces réactifs clés doivent être utilisés et pour certains contrôlés conformément à la méthode officielle d'analyse MOA 022.

Un conseil pour le choix des fournisseurs peut être apporté par le laboratoire de référence. Il est recommandé de contacter celui-ci en cas de doute sur le réactif adéquat.

Les essais de validation ont été réalisés avec les ADN polymerases GoTaq (Promega) et Platinum (Invitrogen). D'autres ADN polymérases peuvent être utilisées sous réserve qu'elles permettent d'obtenir des résultats équivalents lors d'essais sur ADN de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* dans les conditions d'utilisation décrites dans la présente méthode.

Les PCR avec les amorces Audy et Boureau peuvent être réalisées séparément ou à l'aide d'un kit commercial quadriplex de DIAG-GENE prêt à l'emploi comprenant les amorces Audy et Boureau.

mkerkoud@diag-gene.fr

1.2 Tampons

Composition:

La liste des tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de migration (par exemple : TAE ou TBE)
- Tampon de charge

Les tampons utilisés doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs.

Le laboratoire peut aussi fabriquer certains tampons. Pour cela, le laboratoire se référera au répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux (MOA REP-001).

Conservation :

Les préparations des tampons ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur ou au répertoire des recettes le cas échéant.

1.3 Autres consommables

- **Eau** ultra pure stérile (de qualité adaptée aux applications de biologie moléculaire)

-Consommables à usage unique :

- Microcônes stériles avec et sans filtre de volume adapté
- Microtubes stériles de volume adapté
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé

-**Ethanol 70°** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai et de broyage.

-**Produits de décontamination de type DNA Away** : désinfection des surfaces de travail et du matériel à partir de l'étape d'extraction.

2. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse MOA 022.

3. Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Conformément aux exigences de la méthode officielle d'analyse MOA 022, ces références sont constituées de :

- un **contrôle négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel hormis l'acide nucléique cible remplacé par l'eau UP utilisée pour le mélange réactionnel; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- un **contrôle positif de PCR** (A+) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel et de l'acide nucléique cible obtenu à partir d'une concentration bactérienne équivalente à celle des extraits à identifier. Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la réaction PCR. Un aliquot de référence dédié peut être utilisé.

Dans la présente méthode, les souches utilisées comme témoin positif sont des souches de référence de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de types *fuscans* et/ou non *fuscans* (exemple, souche CFBP 6546 (non *fuscans*) ou CFBP 6165 (*fuscans*)).

Des isolats du laboratoire, préalablement vérifiés sur milieu, en test moléculaire et 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
<http://www-intranet.angers.inra.fr/cfbp/>

La manipulation des témoins doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination croisée.

Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022. L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

4. Etapes de l'analyse

L'ensemble des opérations décrites ci-après doit s'effectuer en portant des gants à usage unique adaptés à la manipulation d'acides nucléiques (ex : gants non poudrés).

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits. Chaque échantillon est déposé deux fois soit 2 puits par échantillon, excepté les témoins.

4.1. Extraction d'ADN

A partir d'une suspension bactérienne de l'isolat à identifier (environ 10^7 cfu/mL d'eau stérile), les ADN sont obtenus par choc thermique : les tubes sont placés à une température $\geq 95^\circ\text{C}$ pendant 5 à 10 min, puis dans la glace ou à une température $\leq -18^\circ\text{C}$.

L'extrait d'ADN est alors prêt à l'emploi. Une dilution au 1/10 peut être réalisé en supplément. En vue d'une utilisation ultérieure, conserver l'ADN à une température $\leq -18^\circ\text{C}$.

4.2. Test obligatoire : amplification – PCR avec les amorces Audy

4.2.1. Répliquats d'amplification

Chaque extrait est amplifié deux fois (2 puits PCR).

4.2.2. Préparation du mélange réactionnel (modifié INRA)

Séquences des amorces spécifiques de *X phaseoli* : p7X4c / p7X4e (Audy *et al.*, 1994) :

p7X4c : 5' GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG 3'
p7X4e : 5' CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG 3'

NB : ce couple d'amorces peut être utilisé séparément ou simultanément avec les amorces Boureau *et al.* à l'aide d'un kit PCR quadriplex mis au point et distribué par la société DIAG-GENE (Annexe 2).

La taille des amplifiats générés avec les amorces Audy est, d'après la publication de celui-ci, de 730 pb. Cependant, la taille généralement observée est plus proche de 800 pb.

Préparer le mélange réactionnel suivant (exemple de volume final de 20 μL dont 4 μL d'ADN) :

Réactifs	Concentration initiale (exemple)	Concentration finale	Volume (µL) pour un puits de 20µL (exemple)
Eau ultra pure			10,02
Tampon Promega Go Taq*	5x	1x	4
dNTPs	2,5 mM de chaque	0,2 mM de chaque	1,6
p7X4c	20 µM	0,15 µM	0,15
p7X4e	20 µM	0,15 µM	0,15
Go Taq Polymerase	5 U/µl	0,02 U/µl	0,08
Sous total volume mix			16
Solution d'ADN			4

* La solution tampon concentrée pour l'ADN polymerase GoTaq de Promega contient déjà le MgCl₂. Les laboratoires utilisant une solution tampon sans MgCl₂ devront ajouter ce sel pour une concentration finale de 1.5 mM.

4.2.3. Programme d'amplification

Température (°C)		Durée	Cycles
T°C dénaturation initiale	94	3 min	
T°C dénaturation	94	1 min	35
T°C hybridation et élongation	72	2 min	
T°C élongation finale	72	10 min	
T°C conservation	12°C	∞	

4.2.4. Électrophorèse et Révélation

Déposer environ 10 µL de produit PCR sur un gel d'agarose à 1,5% (valeurs indicatives). Un marqueur de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille du fragment attendu (730 – 800 pb) doit être déposé afin de définir la taille des fragments obtenus.

Effectuer l'électrophorèse conformément à la méthode MOA 022.

La coloration du gel peut se faire par immersion dans un bain de bromure d'éthidium (BET) pendant environ 10 minutes suivie d'un rinçage dans un bain d'eau déminéralisée au minimum pendant 15 minutes. La révélation est réalisée sous lumière Ultra Violette. Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel. D'autres marqueurs d'ADN équivalents peuvent également être utilisés.

Remarque : veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau) et le BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port de gants adaptés (ex : gants nitriles). Tous les déchets ayant été en contact avec ces marqueurs doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

4.3. Test optionnel : amplification – PCR Boureau avec le kit triplex DIAG-GENE

4.3.1. Répliquats d'amplification

Chaque extrait est amplifié deux fois (2 puits PCR).

4.3.2. Préparation du mélange réactionnel

Le kit commercial est disponible avec le mélange réactionnel prêt à l'emploi. Celui-ci comprend deux couples d'amorces spécifiques de *X axonopodis* pv. *phaseoli* (Boureau *et al.*, 2013).

Les tests doivent être réalisés avec 4 µL d'ADN pour 16 µL de mélange réactionnel prêt à l'emploi, soit un volume final de 20 µL.

Réactifs	Volume (µL) pour un puits de 20µL
Kit commercial*	16
Solution d'ADN	4

*à faire décongeler à température ambiante, sans agitation

4.3.3. Programme d'amplification

Température (°C)		Durée	Cycles
T°C dénaturation initiale	95°C	5 min	
T°C dénaturation	95°C	30 sec	35
T°C hybridation	63°C	30 sec	
T°C élongation	72°C	45 sec	
T°C élongation finale	72°C	7 min	
T°C conservation	4°C	∞	

4.3.4. Électrophorèse et Révélation

Déposer environ 10 µL d'amplifiat mélangé à du bleu de charge, sur un gel d'agarose à 1,5% (valeurs indicatives). Un marqueur de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre les tailles des fragments attendus doit être déposé afin de vérifier la taille des fragments obtenus. En effet, le kit prêt à l'emploi contient 3 couples d'amorces permettant d'amplifier 3 séquences différentes (voir point 5.2.).

Effectuer l'électrophorèse comme dans le point 4.2.4.

5. Résultats

5.1. Validation et interprétation des résultats PCR Audy

La taille des amplifiats générés est de 730 à 800 pb. La présence de la bande attendue permet de conclure à un résultat positif. L'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Type de contrôle	Puits	Final
Contrôle négatif d'amplification (A- ou T eau)	-	NEGATIF
Contrôle positif d'amplification (A+)	+	POSITIF

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande à la taille attendue.

Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

Les résultats des duplicats s'interprètent de la manière suivante :

PCR Audy		Résultat	Formulation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR à refaire (*)	
-	-	NEGATIF	Test négatif

(*) si après reprise de la PCR, le même résultat (+/-) est reproduit, une analyse des causes du dysfonctionnement doit être entreprise.

5.2. Validation et interprétation des résultats PCR Bureau en triplex

Les résultats attendus pour les témoins positif et négatif sont présentés dans la figure 1.

Pour les échantillons positifs, 3 bandes sont attendues (cas 1).

La bande supérieure (441 pb) correspond au contrôle interne et doit donc être présente à chaque amplification. L'absence de cette bande invalide l'essai (cas 5).

Les deux bandes inférieures (393 et 257 pb) sont spécifiques de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Ces deux bandes sont donc nécessaires à la déclaration d'un résultat positif (cas 2, 3 ou 4).

Les différents cas de figure sont repris dans le tableau ci-dessous :

		Bande 1 (441 pb)	Bande 2 (393 pb)	Bande 3 (257 pb)	Résultat final PCR Bureau
Présence + Absence -	Cas 1	+	+	+	+
	Cas 2	+	+	-	-
	Cas 3	+	-	+	-
	Cas 4	+	-	-	-
	Cas 5	-	-	-	PCR à refaire

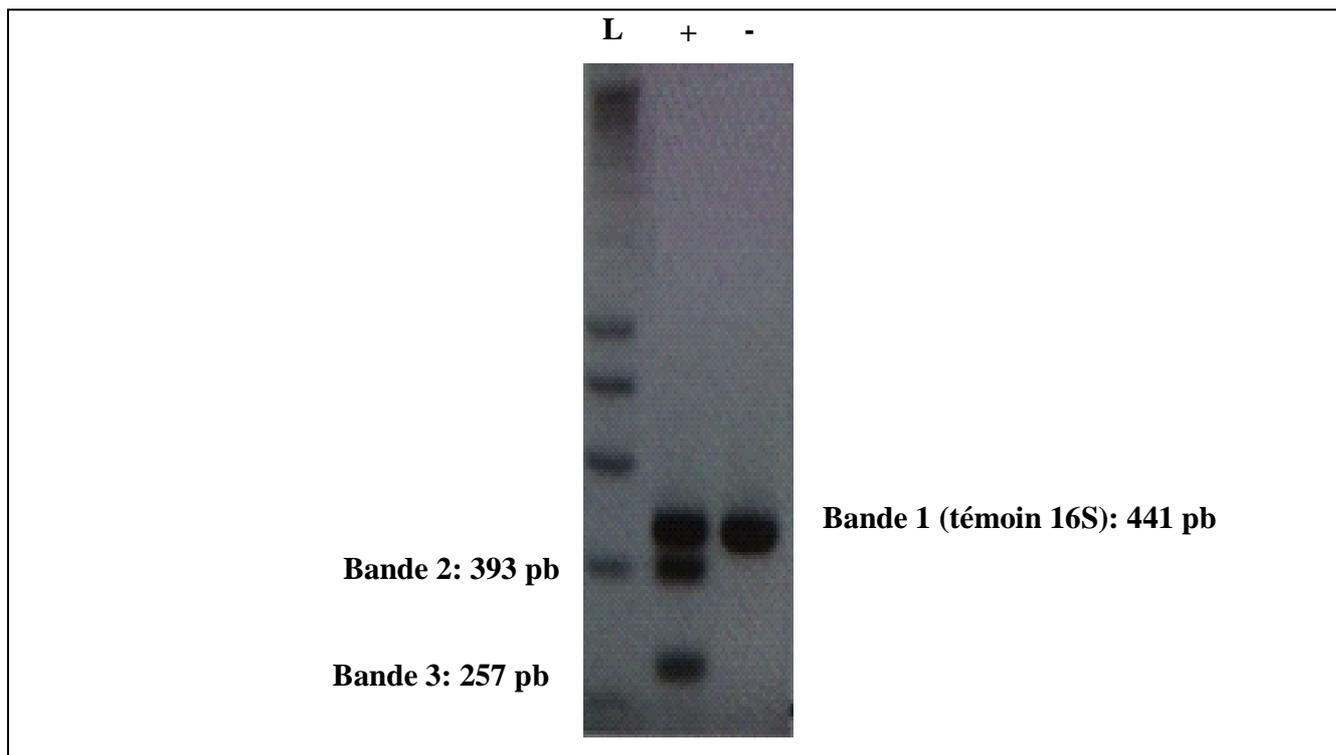


Fig.1: Electrophorèse sur gel d'agarose de produits PCR Boureau en triplex DIAG-GENE. La colonne L correspond au marqueur de taille, la colonne + au témoin positif, la colonne – au témoin négatif. Les trois bandes doivent correspondre aux nombres de paires de bases attendus : 257, 393 et 441 pb.

De même que précédemment, les résultats des duplicats s'interprètent de la manière suivante :

PCR Boureau		Résultat	Formulation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR à refaire (*)	
-	-	NEGATIF	Test négatif

(*) si après reprise de la PCR, le même résultat (+/-) est reproduit, une analyse des causes du dysfonctionnement doit être entreprise.

5.3. Interprétation des résultats

Se référer au point « Présentation schématique de la détection » de la présente méthode.

Tout isolat ayant rendu un résultat positif en pouvoir pathogène est considéré comme identifié en tant que *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

Tout isolat ayant rendu un résultat positif avec la PCR d'Audy peut être considéré comme identifié en tant que *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Néanmoins, à des fins de confirmation d'identité, il peut être réalisé la PCR Boureau (kit DIAG-GENE) ou le pouvoir pathogène. Ainsi, tout isolat ayant rendu un résultat positif avec les PCR d'Audy et de Boureau est considéré comme étant identifié en tant que *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Tout isolat ayant rendu un résultat positif avec la PCR d'Audy et en pouvoir pathogène est considéré comme étant identifié en tant que *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Tout autre cas est considéré comme n'étant pas du *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

5.4. Expression des résultats

Si aucun isolat présent dans l'échantillon n'est identifié en tant que *Xap*, l'échantillon est considéré comme non contaminé par *Xap*.

Si au moins un isolat présent dans l'échantillon est identifié en tant que *Xap*, l'échantillon est considéré comme contaminé par *Xap*.

Si *Xap* a été détecté et identifié dans au moins un sous échantillon, le résultat de l'échantillon est positif.

Cette méthode étant qualitative, les résultats pourront être exprimés de la façon suivante (ou selon une formule équivalente) :

⇒ Lorsque le résultat des analyses est négatif :

“La bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* n'a pas été isolée dans l'échantillon considéré”.

⇒ Lorsque le résultat des analyses est positif :

“La bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a été isolée et identifiée dans l'échantillon considéré”.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le matériel jetable et les déchets obtenus lors des analyses sont traités selon une procédure spécifique assurant l'inactivation des bactéries phytopathogènes (par exemple stérilisation par autoclavage).

Les consommables ayant été en contact avec le bromure d'éthidium (gants, gels, etc...) sont recueillis dans un container étanche spécialement réservé à cet effet, de même que les bains de coloration et de rinçage des gels. Le retraitement de ces déchets sera réalisé conformément à la réglementation en vigueur.

Conservation des reliquats de matériels utilisés

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, jusqu'à au moins le dixième 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 autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents (souches, extrait d'ADN, semences) 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. Le Laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux
Arrêté du 22 novembre 2002	Relatif aux exigences sanitaires des végétaux, produits végétaux et autres objets
Arrêté ministériel du 31 juillet 2000 modifié par l'arrêté du 25 août 2011	Arrêté du 31 juillet 2000 modifié par l'arrêté du 25 août 2011 établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire
Arrêté ministériel du 3 décembre 1991	Arrêté du 3 décembre 1991 modifiant l'arrêté du 03-09-1990 relatif au contrôle sanitaire des végétaux et produits végétaux
Arrêté ministériel du 3 septembre 1990	Relatif au contrôle sanitaire des végétaux et produits végétaux
MOA 010	Technique d'immunofluorescence indirecte
MOA 022	Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
ISO 17025	Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
Directive 2008/61 CE	Directive 2008/61/CE de la Commission du 17 juin 2008 fixant les conditions dans lesquelles certains organismes nuisibles, végétaux, produits végétaux et autres objets énumérés aux annexes I à V de la directive 2000/29/CE du Conseil peuvent être introduits ou circuler dans la Communauté ou dans certaines zones protégées de la Communauté pour des travaux à des fins d'essai ou à des fins scientifiques ou pour des travaux sur les sélections variétales
Arrêté ministériel du 13 août 1996	Arrêté du 13 août 1996 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

- Ah-You N, Gagnevin L, Grimont PA, Brisse S, Nesme X, Chiroleu F, Bui Thi Ngoc L, Jouen E, Lefeuvre P, Verniere C, Pruvost O, 2009. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(2), 306-318.
- Alavi S.M., Sanjari S., Durand F., Brin C., Manceau C., Poussier S., 2008. Assessment of the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a Basis To Identify Putative Pathogenicity Genes and a Type III Secretion System of the SPI-1 Family by Multiple Suppression Subtractive Hybridizations. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (10), 3295-3301.
- Audy P., Laroche A., Saindon G., Huang H.C. and Gilbertson R.L., 1994. Detection of the Bean Common Blight Bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, Using the Polymerase Chain Reaction. *Molecular Plant Pathology* 84(10): 1185-1192
- Birch P. R. J., Hyman L. J., Taylor R., Opio A. F., Bragard C., Toth I. K., 1997. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 809–814.
- Boureau T. (Université d'Angers) et Kerkoud M. (DIAG-GENE), 2012. Brevet N°: FR1150388 « Procédé de dépistage de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* »
- Boureau T., Kerkoud M., Chhel F., Hunault G., Darrasse A., Brin C., Durand K., Hajri A., Poussier S., Manceau C., Saubion F., Jacques M.A., 2013. A multiplex-PCR assay for identification of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods* 92, 42-50.
- Darrasse A., 2006. Grasse commune du haricot : la transmission de la bactérie pathogène aux semences est possible en l'absence complète de symptôme sur le porte-graine. Conférence SIVAL janvier 2006.
- Darrasse A., Bureau C., Samson R., Morris C., Jacques MA., 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 203-215.
- Darsonval A., Darrasse A., Durand K., Bureau C., Cesbron S., Jacques M.A., 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seeds of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Molecular Plant-Microbes Interactions* 22, 747-757.
- Grimault V., Olivier V., Rolland M., Darrasse A., Jacques M.A., 2012. ISTA Validation Studies
Copies are available: by E-mail from ista.office@ista.ch; by mail from the ISTA Secretariat, Zürichstrasse 50, 8303 Bassersdorf, Switzerland.
- Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E., Schaad N.W., 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Sustem. Appl. Microbiol.* 27, 755-762.
- Lopez, R., Asensio C., and Gilbertson R. L.. 2006. Phenotypic and genetic diversity in strains of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests multiple introduction events. *Phytopathology* 96, 1204–1213.
- Mkandawire A. B. C., Mabagala R. B., Guzman P., Gepts P., Gilbertson R. L., 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology* 94, 593–603.
- Schaad, N. W., Postnikova E., Lacy G. H., Sechler A., Agarkova I., Stromberg P. E., Stromberg V. K., Vidaver A. K., 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 690–695.
- Simoës T.H.N., Gonçalves E.R., Rosato Y.B., Mehta A., 2007. Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpfB* and *atpD* genes. *FeMS Microbiol Lett* 271, 33-39.
- Vauterin, L., Hoste B., Kersters K., and Swings J., 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 472–489.
- Vauterin L., Rademaker J., Swings J., 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90(7), 677-82.

REMERCIEMENTS

L'unité Bactériologie – Virologie – OGM du Laboratoire de la santé des végétaux remercie le GEVES (SNES et BIOGEVES), ainsi que l'INRA-IRHS d'Angers pour leur contribution aux travaux de méthodologie et à la relecture de la méthode ainsi qu'aux Unités « Développement de méthodes et analyses » et Ravageurs et Pathogènes Tropicaux du Laboratoire de la santé des végétaux pour leurs relectures de la méthode.

ANNEXE 1 – COMPOSITION SOLUTION SALINE

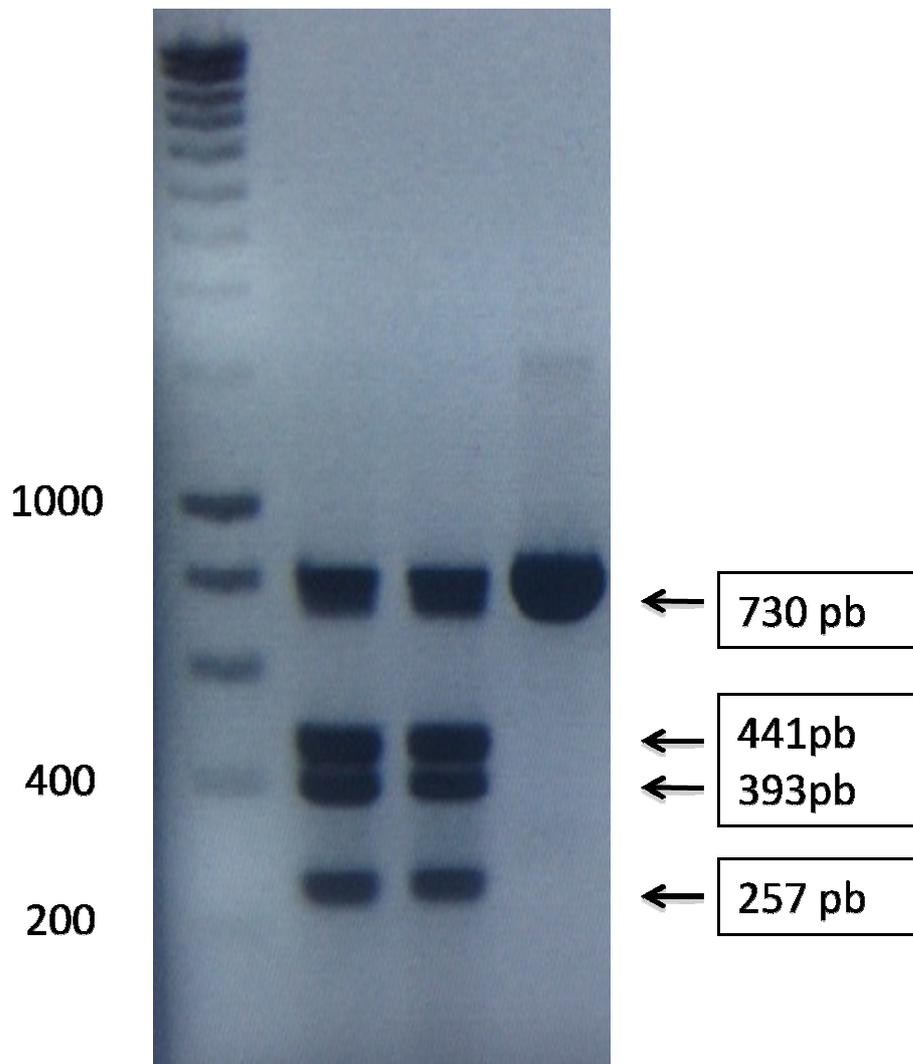
La composition est donnée pour 1 litre \pm 5% à réaliser avec de l'eau déminéralisée.

Solution saline :

NaCl8,5 g

Autoclaver 20 minutes à environ 120°C.

ANNEXE 2 : GEL D'ELECTROPHORESE AVEC PCR QUADRIplex DIAG-GENE



Electrophorèse sur gel d'agarose de produits PCR du kit quadriplex DIAG-GENE.

Les quatre bandes doivent correspondre aux nombres de paires de bases attendus : 257, 393, 441 et 730-800 pb.

Audy *et al.* : 730-800 pb

Temoin PCR 16S (seulement en triplex avec Boureau) : 441pb

Boureau *et al.* : 393 et 257 pb

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

ANSES
Laboratoire de la santé des végétaux
Unité bactériologie, virologie, OGM
7, rue Jean Dixméras
49044 ANGERS Cedex 01
angers.lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.