



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture



Convention internationale pour la protection des végétaux
Protéger les ressources végétales contre les organismes nuisibles

NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC

NIMP 27
ANNEXE 13

FRE

PD 13: *Erwinia amylovora*

Produit par le Secrétariat de la Convention internationale
pour la protection des végétaux (CIPV)

Cette page est intentionnellement laissée vierge

NIMP 27

Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 13: *Erwinia amylovora*

Adopté en 2016; publié en 2016

TABLE DES MATIÈRES

1.	Informations relatives à l'organisme nuisible	3
2.	Données taxonomiques	3
3.	Détection	3
3.1	Détection à partir de plantes symptomatiques	4
3.1.1	Symptômes	4
3.1.2	Prélèvement et préparation des échantillons.....	5
3.1.3	Isolement.....	5
3.1.3.1	Isolement à partir d'échantillons symptomatiques	5
3.1.3.2	Enrichissement-isolement	6
3.1.4	Détection sérologique	7
3.1.4.1	Enrichissement-DASI-ELISA	7
3.1.4.2	Culture directe sur empreinte de tissus-ELISA	8
3.1.4.3	Immunofluorescence.....	8
3.1.4.4	Immunodosage à flux latéral.....	8
3.1.5	Détection moléculaire	9
3.1.5.1	Témoins à utiliser en analyse moléculaire	9
3.1.5.2	Extraction de l'ADN.....	10
3.1.5.3	Amplification de l'ADN par PCR	10
3.1.5.4	Considérations générales sur les analyses PCR.....	12
3.1.5.5	PCR en temps réel.....	13
3.1.5.6	Interprétation des résultats de la PCR.....	14
3.1.5.7	Amplification isotherme induite par boucle	15
3.2	Détection chez les plantes asymptomatiques.....	15
3.2.1	Échantillonnage et préparation des échantillons.....	16
3.2.2	Tests préliminaires.....	16
4.	Identification	17
4.1	Identification nutritionnelle et enzymatique	17
4.1.1	Caractérisation biochimique	18
4.1.1.1	Profil nutritionnel et enzymatique	18
4.1.1.2	Identification automatique	19
4.1.1.3	Profil d'acides gras	19
4.2	Identification sérologique	19

4.2.1	Agglutination	19
4.2.2	Immunofluorescence.....	19
4.2.3	ELISA	19
4.2.4	Immunodosage à flux latéral.....	20
4.3	Identification moléculaire	20
4.3.1	PCR.....	20
4.3.2	Macrorestriction et électrophorèse sur gel en champ pulsé	20
4.4	Techniques fondées sur la pathogénicité	20
5.	Données à conserver.....	21
6.	Points de contact pour tout complément d'informations.....	21
7.	Remerciements	21
8.	Références	22
9.	Figures.....	25

1. Informations relatives à l'organisme nuisible

Erwinia amylovora est le pathogène responsable du feu bactérien, maladie qui concerne la majorité des espèces de Maloideae, sous-famille de Rosaceae (Spiraeoideae). C'est la première bactérie décrite comme agent causal d'une maladie des plantes (Burrill, 1883). On considère qu'*E. amylovora* est originaire d'Amérique du Nord, région hors de laquelle elle a été détectée pour la première fois en 1920, en Nouvelle-Zélande. Des cas de feu bactérien ont été signalés au Royaume-Uni en 1957 et, depuis lors, *E. amylovora* a été détectée dans la plupart des zones d'Europe où sont cultivées les plantes hôtes sensibles. La bactérie est aujourd'hui présente dans plus de 40 pays. Elle n'a pas été signalée ni en Amérique du Sud, ni dans la plupart des pays africains et asiatiques (sauf dans les pays du pourtour méditerranéen). Détecté une fois en Australie, l'organisme y a depuis lors été éradiqué (van der Zwet, 2004). *E. amylovora* constitue une menace pour le secteur des fruits à pépins de tous ces pays (Bonn et van der Zwet, 2000). On trouvera de plus amples informations sur la répartition géographique de ce pathogène dans la base de données «Plant Quarantine Data Retrieval System» de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP, s.d.).

Les principales plantes hôtes, du point de vue tant économique qu'épidémiologique, appartiennent aux genres *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Malus*, *Mespilus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Sorbus* et *Stranvaesia* (Bradbury, 1986). Les souches d'*E. amylovora* isolées à partir d'espèces de *Rubus* aux États-Unis sont différentes des souches détectées chez d'autres hôtes (Starr *et al.*, 1951; Powney *et al.*, 2011b).

Dans bon nombre de pays, le feu bactérien est probablement la maladie bactérienne la plus grave qui touche les cultivars de *Pyrus communis* (poirier) et *Malus domestica* (pommier). Les épidémies sont sporadiques et dépendent de plusieurs facteurs: il faut notamment des hôtes sensibles, des conditions environnementales favorables et une quantité suffisante d'inoculum dans le verger. La maladie se dissémine facilement par le truchement d'oiseaux, d'insectes, de la pluie ou du vent (Thomson, 2000). Les symptômes du feu bactérien progressent avec le développement saisonnier de la plante hôte. La maladie commence au printemps, époque à laquelle la bactérie, après avoir passé l'hiver dans les chancres, produit l'inoculum primaire (Thomson, 2000) et infecte ainsi les fleurs, se poursuit en été avec l'infection des pousses et des fruits, et se termine en hiver avec le développement de chancres tout au long de la période de dormance de l'hôte (van der Zwet et Beer, 1995; Thomson, 2000).

2. Données taxonomiques

Nom: *Erwinia amylovora* (Burrill, 1883) Winslow *et al.*, 1920

Synonymes: *Micrococcus amylovorus* Burrill, 1883, *Bacillus amylovorus* (Burrill, 1883) Trevisan, 1889, «*Bacterium amylovorus*» [sic] (Burrill, 1883) Chester, 1897, *Erwinia amylovora* f.sp. *rubi* (Starr *et al.*, 1951)

Classement taxonomique: Proteobacteria, subdivision Y, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae

Nom commun: Feu bactérien (OEPP, 2013)

3. Détection

On peut effectuer une diagnose du feu bactérien en isolant l'organisme et en réalisant des tests sérologiques et moléculaires. Les analyses recommandées dans le présent document ont été évaluées dans le cadre d'un ou plusieurs de ces essais circulaires: projet DIAGPRO (Diagnostic Protocols for Organisms Harmful to Plants) associant dix laboratoires en 2003 (López *et al.*, 2006); projet EUPHRESKO (Coordination européenne de la recherche phytosanitaire) avec cinq laboratoires en 2009 (Dreo *et al.*, 2009); projet international avec la participation de quatorze laboratoires en 2010 (López *et al.*, 2010). La diagnose doit reposer au minimum sur les analyses présentées dans les figures 1 et 2, mais l'Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) peut exiger des essais supplémentaires, en particulier quand l'organisme nuisible est signalé pour la première fois dans un pays. Par exemple, les analyses sérologiques peuvent permettre d'établir une diagnose présumée en

recherchant une protéine spécifique dans un matériel végétal qui présente des symptômes; mais la détection devrait être confirmée par une analyse supplémentaire fondée sur un autre principe biologique. L'ensemble des analyses doivent intégrer des témoins positifs et négatifs.

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (y compris les références à des marques commerciales) sont décrites telles qu'elles ont été publiées, puisque le niveau de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité d'origine y sont définis. L'emploi de noms de réactifs, de produits chimiques ou d'équipements dans ces protocoles de diagnostic n'implique donc pas qu'ils sont approuvés à l'exclusion d'autres substances ou équipements qui peuvent également convenir. Les procédures en laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes de chaque laboratoire à condition de faire l'objet d'une validation adéquate.

3.1 Détection à partir de plantes symptomatiques

Les analyses préliminaires recommandées sont indiquées dans le diagramme des flux de la figure 1.

3.1.1 Symptômes

Les symptômes du feu bactérien sont similaires et aisément reconnaissables chez les hôtes les plus courants, comme *P. communis* (poirier), *M. domestica*, (pommier), *Cydonia* spp. (cognassier), *Eriobotrya japonica* (néflier du Japon), *Cotoneaster* spp. (cotonéasters), *Pyracantha* spp. (buisson ardent) et *Crataegus* spp. (aubépine). Le nom même de la maladie décrit sa principale caractéristique: les rameaux, les fleurs et les feuilles présentent un brunissement et une nécrose, comme sous l'effet du feu. Les symptômes typiques sont la coloration des feuilles sur les branches infectées, allant du brun au noir, la production d'un exsudat ainsi que le recourbement en forme de crosse caractéristique des pousses terminales. Selon la partie de la plante qui est infectée, la maladie brûle les fleurs, les pousses ou les rameaux, les feuilles, les fruits, les branches charpentières ou le tronc, le collet ou le porte-greffe (van der Zwet et Keil, 1979; van der Zwet et Beer, 1995).

Sur les pommiers et les poiriers, les premiers symptômes apparaissent généralement au début du printemps, quand la température moyenne dépasse 15 °C, par temps humide. Les fleurs infectées paraissent imbibées d'eau puis flétrissent, se ratatinent et prennent une coloration orange ou brune voire noire. Les pédoncules peuvent également paraître imbibés d'eau, virer au vert sombre et finalement au brun ou au noir. Ils produisent parfois des gouttelettes d'exsudat bactérien collant. Les feuilles infectées flétrissent et se ratatinent, tout le rameau brunit chez le pommier et noircit chez le poirier, sans se détacher de l'arbre pendant un certain temps. Après l'infection, les jeunes fruits brunissent mais restent également attachés à l'arbre. Les lésions des fruits immatures paraissent huileuses ou imbibées d'eau, deviennent brunes à noires, et produisent souvent des gouttelettes d'exsudat bactérien. Sous l'écorce des branches charpentières ou des rameaux infectés, les tissus présentent souvent des traînées brun-roux caractéristiques (van der Zwet et Keil, 1979; Thomson, 2000). Des chancres allant du brun au noir et légèrement concaves se forment sur l'écorce des rameaux, des branches ou du tronc des arbres touchés. Ces chancres sont ensuite délimités par des craquelures caractéristiques à proximité de la limite entre les tissus sains et les tissus malades (Thomson, 2000).

Le feu bactérien peut être confondu avec les symptômes de brûlure ou d'échaudage causés par d'autres agents pathogènes bactériens ou fongiques, ainsi qu'avec des dégâts occasionnés par des insectes ou encore des troubles physiologiques, en particulier s'agissant des fleurs et des bourgeons. D'autres bactéries peuvent entraîner des symptômes de type brûlure, parmi lesquelles: *Erwinia pyrifoliae*, agent causal de la brûlure bactérienne des pousses de *Pyrus pyrifolia* (poirier du Japon) (Kim *et al.*, 1999); *Erwinia piriflorinigrans*, isolée à partir de fleurs nécrotiques sur des poiriers en Espagne (López *et al.*, 2011); *Erwinia uzenensis*, récemment décrite au Japon (Matsuura *et al.*, 2012); d'autres espèces d'*Erwinia* signalées au Japon occasionnant la brûlure bactérienne des pousses (Tanii *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012); enfin, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, agent causal de l'échaudage des fleurs. On devrait néanmoins toujours confirmer la diagnose du feu bactérien au moyen d'analyses en laboratoire.

3.1.2 Prélèvement et préparation des échantillons

Le matériel végétal devrait être analysé aussi rapidement que possible après le prélèvement, mais on peut aussi le stocker à 4–8 °C pendant une semaine au maximum jusqu'au traitement. Les précautions nécessaires devraient être prises pour éviter une contamination croisée pendant le prélèvement, le transport et le traitement des échantillons, tout particulièrement lorsqu'il s'agit d'isoler la bactérie ou d'extraire l'ADN.

Le traitement des échantillons devrait s'effectuer selon une procédure générale valide permettant d'isoler l'organisme et de l'analyser en s'appuyant sur la sérologie ou des réactions de polymérisation en chaîne (PCR). Pour obtenir un enrichissement satisfaisant, il convient d'employer un tampon de macération antioxydant fraîchement préparé (polyvinylpyrrolidone (PVP)-10, 20 grammes; mannitol, 10 grammes; acide ascorbique, 1,76 gramme; glutathion réduit, 3 grammes; tampon phosphate salin (PBS), 10 mM, 1 litre; pH 7,2; stérilisé par filtration), selon Gorris *et al.* (1996). Les échantillons peuvent aussi être traités dans de l'eau distillée stérile ou du PBS à pH 7,2 (NaCl, 8 grammes; KCl, 0,2 gramme; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 grammes; KH₂PO₄, 0,2 gramme; eau distillée, 1 litre) mais uniquement pour effectuer directement un isolement ou des analyses par immunofluorescence ou PCR.

Veiller à choisir les parties de la plante (fleurs, pousses, rameaux, feuilles ou fruits) qui présentent les symptômes les plus caractéristiques ainsi qu'un exsudat bactérien, dans la mesure du possible. Prélever le matériel destiné à l'analyse sur le front de progression des lésions de la maladie. Découper le tissu végétal en morceaux d'environ 0,1–1,0 gramme, puis broyer légèrement dans le tampon de macération antioxydant, le PBS ou l'eau distillée stérile (comme indiqué dans le paragraphe précédent), jusqu'à une concentration massique de 1:50 (m/v). Laisser reposer cette suspension pendant au moins 5 minutes, puis la placer sur la glace pendant quelques minutes. Transférer trois parties aliquotes (1 ml) de chaque macérat dans des tubes à microcentrifugeuse stériles. Conserver un de ces tubes à –20 °C pour une analyse PCR ultérieure et verser du glycérol (jusqu'à 30 %) dans le deuxième tube ensuite stocké à –80 °C destiné à un éventuel essai de confirmation. Conserver le troisième tube sur la glace pour l'étape d'enrichissement préalable à l'analyse par dosage immunoenzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou par PCR, et pour l'isolement sur des milieux sélectifs (figure 1). En cas d'analyse par immunofluorescence (facultative), préparer et fixer les lames le jour même de la macération des échantillons. L'analyse PCR devrait être réalisée aussi tôt que possible à partir de l'échantillon stocké à –20 °C.

3.1.3 Isolement

3.1.3.1 Isolement à partir d'échantillons symptomatiques

En règle générale, il est conseillé de réaliser des cultures sur trois milieux afin d'avoir les meilleures chances de récupérer *E. amylovora*, notamment quand les échantillons ne sont pas en bon état. En fonction de la quantité et de la composition des microorganismes contenus dans l'échantillon, un milieu peut se révéler plus ou moins efficace. Trois milieux (CCT, King B et levane) ont été validés par deux essais circulaires, la culture sur levane s'y révélant la plus efficace.

Quand les symptômes sont très prononcés ou quand les conditions environnementales consécutives à l'infection ne sont pas favorables à la prolifération bactérienne, le nombre de cellules d'*E. amylovora* cultivables peut être très faible. Dans ces conditions, les plaques peuvent contenir quelques rares cellules du pathogène noyées dans une multitude de bactéries saprophytes et antagonistes. En cas de suspicion en ce sens, l'échantillon devrait être analysé à nouveau et/ou enrichi puis isolé. Des analyses réalisées à partir de fruits par Ordax *et al.* (2009) indiquent qu'*E. Amylovora* peut rester viable mais non cultivable après traitement au cuivre. Cet état, réversible, peut entraîner des faux négatifs par isolement. Voici comment préparer les milieux recommandés:

- Le milieu CCT est préparé en deux parties. Partie 1: saccharose, 100 grammes; sorbitol, 10 grammes; Niaproof 4, 1,2 ml; cristal violet, 2 ml (solvant éthanol 0,1 %); gélose nutritive, 23 grammes; eau distillée, 1 litre; pH 7,0–7,2; stérilisation en autoclave à 115 °C pendant

10 minutes. Le milieu autoclavé est refroidi à environ 45 °C. Partie 2: nitrate de thallium, 2 ml (solution aqueuse à 1 % m/v); cycloheximide, 0,05 gramme; stérilisation par filtration. Ajouter la partie 2 à 1 litre de partie 1 stérile (Ishimaru et Klos, 1984).

- Milieu King B: protéose-peptone n° 3, 20 grammes; glycérol, 10 ml; K₂HPO₄, 1,5 gramme; MgSO₄·7H₂O, 1,5 gramme; gélose, 15 grammes; eau distillée, 1 litre; pH 7,0–7,2; stérilisation en autoclave à 120 °C pendant 20 minutes (King *et al.*, 1954).
- Milieu levane: extrait de levure, 2 grammes; bactopectone, 5 grammes; NaCl, 5 grammes; saccharose, 50 grammes; gélose, 20 grammes; eau distillée, 1 litre; pH 7,0–7,2; stérilisation en autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

Si l'on s'attend à une prolifération fongique lors de l'isolement, ajouter 0,05 gramme/litre de cycloheximide dans les milieux King B et levane. Diluer chaque macérat au 1:10 et 1:100 dans du PBS (NaCl, 8 grammes; KCl, 0,2 gramme; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 grammes; KH₂PO₄, 0,2 gramme; eau distillée, 1 litre).

Procéder de préférence comme suit: ensemercer des plaques de 130 mm avec 100 µl des macérats et de leurs dilutions sur trois stries, ou ensemercer des boîtes de Pétri classiques de 90 mm avec 50 µl. Incuber les plaques à 25 °C pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre jours. On détermine généralement le résultat après 72 heures. Les colonies d'*E. amylovora* sont violet pâle, circulaires, fortement convexes voire bombées, lisses et mucoïdes sur le milieu CCT, tandis qu'elles se développent plus lentement dans les milieux King B ou levane. Dans le milieu King B, les colonies sont d'un blanc crémeux, circulaires et non fluorescentes sous lumière ultraviolette (UV) à 366 nm. Les colonies cultivées sur levane sont blanches, circulaires, bombées, lisses et mucoïdes. Bereswill *et al.* (1997) font état de colonies d'*E. amylovora* négatives sur levane.

Pour chaque échantillon, on obtient des cultures pures des diverses colonies suspectes par dilution et ensemencement en stries sur milieu King B. Les colonies présumées d'*E. amylovora* sont caractérisées de préférence par analyse par dosage immunoenzymatique indirect utilisant deux antisérums spécifiques (DASI-ELISA), par PCR ou à l'aide d'une autre méthode appropriée (par exemple essai biochimique, test d'immunofluorescence ou analyse du profil d'acides gras), ou encore par inoculation des organes sensibles d'un hôte d'*E. amylovora* disponible afin de vérifier la pathogénicité, comme indiqué à la section 4.

L'analyse des échantillons symptomatiques doit aboutir à une bonne corrélation entre les résultats obtenus par isolement, immunofluorescence, enrichissement-DASI-ELISA (section 3.1.4.1) et PCR.

Les essais circulaires de 2003 et 2010 ont respectivement dégagé une exactitude de l'analyse par isolement de 0,88 et 0,81 sur King B, 0,92 et 0,89 sur levane, et 0,92 et 0,95 sur CCT (López *et al.*, 2006; M.M. Lopez, communication personnelle, 2012). L'isolement a donné une exactitude de 0,96 sur CCT lors de l'essai circulaire de 2009 (Dreo *et al.*, 2009).

3.1.3.2 Enrichissement-isolement

L'enrichissement sert à multiplier la population initiale d'*E. amylovora* cultivable dans un échantillon dans le cadre des méthodes combinées enrichissement-DASI-ELISA ou enrichissement-PCR. On devrait enrichir la population préalablement à l'isolement (même dans le cas d'échantillons symptomatiques) quand le nombre de cellules d'*E. amylovora* cultivables est présumé faible (par exemple dans le cas d'échantillons traités au cuivre, présentant des symptômes anciens, ou prélevés durant des conditions météorologiques défavorables au feu bactérien, comme en hiver). L'enrichissement accroît considérablement la sensibilité de la méthode DASI-ELISA. Il est recommandé d'employer deux milieux d'enrichissement liquides validés –un non sélectif (King B) et l'autre semi-sélectif (CCT) –, car la taille et la composition de la population de microorganismes ne sont pas connues.

Faire macérer l'échantillon de tissu selon les modalités décrites à la section 3.1.2, puis verser immédiatement 0,9 ml de cette solution, respectivement, dans deux tubes stériles de 10–15 ml (pour assurer une aération efficace) contenant 0,9 ml de chacun des milieux d'enrichissement liquides (King B non gélosé, et CCT préparé avec un bouillon nutritif au lieu de la gélose). Incuber les tubes à 25 °C pendant 48–72 heures sans agitation. Pour les échantillons de plantes prélevés en hiver, il est conseillé d'opter pour une incubation plus longue. Préparer les solutions d'enrichissement et leurs dilutions (1:10 et 1:100) à l'aide de PBS, puis ensemercer les plaques contenant le milieu CCT par striation (trois stries) afin d'isoler des colonies. Incuber les plaques à 25 °C pendant 72–96 heures. Déterminer le résultat en examinant les plaques CCT après 72 heures, après quoi les colonies doivent être purifiées et identifiées.

Il est recommandé de recourir à un milieu de culture semi-sélectif pour l'ensemencement et à des dilutions car l'étape d'enrichissement favorise la croissance du pathogène mais permet aussi à d'autres bactéries de proliférer. Il est ressorti de l'essai circulaire de 2010 que l'analyse combinée enrichissement-isolément sur les milieux King B et CCT avait une exactitude de 0,97.

3.1.4 Détection sérologique

3.1.4.1 Enrichissement-DASI-ELISA

Un kit permettant de combiner enrichissement et DASI-ELISA a été validé par deux essais circulaires. Il est disponible dans le commerce auprès de Plant Print Diagnostics SL¹. Cette méthode utilise un mélange des deux anticorps monoclonaux spécifiques décrits dans Gorris *et al.* (1996) et nécessite un enrichissement préalable des échantillons, comme décrit précédemment. Le protocole qui suit doit être appliqué à la lettre afin de garantir une exactitude optimale. Avant le test ELISA, incuber la quantité nécessaire d'extraits enrichis et de témoins dans un bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes. Ce traitement permet d'optimiser la spécificité. Les échantillons bouillis sont analysés (à température ambiante) par ELISA le même jour (ou stockés à –20 °C pour une analyse ultérieure) conformément aux instructions du fabricant du kit commercial.

Le test ELISA est négatif si la densité optique (DO) moyenne des puits dédoublés d'un échantillon est $< 2 \times$ la DO obtenue pour les puits contenant le témoin négatif (à condition que la DO des puits contenant le témoin positif soit supérieure à 1,0 après 90 minutes d'incubation, et soit plus de deux fois supérieure à la DO des témoins négatifs). Le test ELISA est positif si la DO moyenne obtenue pour l'ensemble des puits dédoublés d'un échantillon est $> 2 \times$ la DO obtenue pour les puits contenant le témoin négatif (à condition que tous les témoins négatifs présentent une DO plus de deux fois inférieure à la DO moyenne des témoins positifs).

Des résultats négatifs pour des puits contenant un témoin positif indiquent que l'analyse ELISA n'a pas été réalisée correctement et/ou que les réactifs n'ont pas été bien préparés. Des résultats positifs pour des puits contenant un témoin négatif sont le signe d'une contamination croisée ou de la liaison d'anticorps non spécifiques. Dans les deux cas, il faudrait répéter l'analyse ou appliquer une autre méthode fondée sur un principe biologique différent, par exemple une PCR.

Pour cette méthode combinée, les essais circulaires de 2003 et 2010 ont respectivement dégagé une exactitude de 0,79 et 0,82 avec un enrichissement sur King B (King B-DASI-ELISA), ainsi que 0,83 et 0,77 avec un enrichissement sur CCT (CCT-DASI-ELISA) (López *et al.*, 2006, 2010).

¹ Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (y compris les références à des marques commerciales) sont décrites telles qu'elles ont été publiées, puisque le niveau de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité d'origine y sont définis. L'emploi de noms de réactifs, de produits chimiques ou d'équipements dans ces protocoles de diagnostic n'implique donc pas qu'ils sont approuvés à l'exclusion d'autres substances ou équipements qui peuvent également convenir. Les procédures en laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes de chaque laboratoire à condition de faire l'objet d'une validation adéquate.

3.1.4.2 Culture directe sur empreinte de tissus-ELISA

Pour réaliser des «empreintes» de tissus, presser délicatement des sections fraîchement prélevées de la plante sur une membrane en nitrocellulose. Préparer des empreintes de ce type pour les témoins positifs et négatifs. Les membranes sur lesquelles les tissus ont été pressés peuvent être conservées pendant plusieurs mois dans un endroit sec à température ambiante. On devrait utiliser une source d'anticorps dirigés contre *E. amylovora* validée, par exemple le kit commercialisé par Plant Print Diagnostics SL¹. Les instructions du fabricant pour développer les empreintes devraient être suivies. Observer les empreintes à faible grossissement ($\times 10$ ou $\times 20$). Le test est positif quand un précipité pourpre-violet se forme dans les sections de tissu végétal pressées dans la membrane mais n'apparaît pas dans les empreintes du témoin négatif. Si des exsudats ou des colonies sont pressés sur membrane, les résultats positifs devraient également prendre une coloration violette. Le test est négatif lorsqu'aucun précipité pourpre-violet ne se forme dans les empreintes ni de l'échantillon, ni du témoin négatif.

3.1.4.3 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une méthode sérologique de remplacement recommandée. Il existe un protocole normalisé facile à mettre en œuvre (auteurs anonymes, 1998). On devrait faire appel à une source validée d'anticorps dirigés contre *E. amylovora*. Deux anticorps commerciaux ont été validés par un essai circulaire: l'anticorps monoclonal commercialisé par Plant Print Diagnostics SL¹ et l'anticorps polyclonal proposé par Loewe Biochemicals¹.

L'immunofluorescence devrait être réalisée sur des échantillons venant d'être extraits fixés sur des lames. Déposer les macérats non dilués et les dilutions aux 1:10 et 1:100 dans le PBS sur les cavités des lames à immunofluorescence. L'anticorps monoclonal ou polyclonal est employé dilué dans du PBS, à la dilution qui convient. Diluer une quantité adéquate de conjugué marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) dans du PBS: ce conjugué contient soit l'anticorps de chèvre anti-souris (GAM-ITCF) comme anticorps monoclonal, soit l'anticorps de chèvre anti-lapin (GAR-ITCF) ou anti-chèvre comme anticorps polyclonal.

Le résultat est négatif si des cellules fluorescentes vertes ayant la morphologie typique d'*E. amylovora* apparaissent dans les cavités du témoin positif, mais pas celles contenant l'échantillon. Le résultat est positif si des cellules fluorescentes vertes ayant la morphologie typique d'*E. amylovora* apparaissent dans les cavités du témoin positif et de l'échantillon, mais pas dans celles qui contiennent les témoins négatifs. On estime qu'un test par immunofluorescence est positif pour les échantillons qui comptent plus de 10^3 cellules/ml, car ce chiffre est considéré comme la limite de fiabilité de cette méthode de détection. En revanche, quand la population de l'échantillon est inférieure à 10^3 cellules/ml, ou quand la fluorescence est faible, le résultat peut être considéré comme incertain.

L'exactitude de l'immunofluorescence obtenue à l'issue de l'essai circulaire de 2003 s'élevait à 0,70 avec l'anticorps monoclonal de Plant Print Diagnostics SL¹ et 0,72 avec les anticorps polyclonaux de Loewe Biochemicals¹, confirmant que la sensibilité de cette technique se situe autour de 10^3 unités formant colonies (UFC)/ml.

3.1.4.4 Immunodosage à flux latéral

Deux dispositifs de dosage à flux latéral permettant d'analyser rapidement le matériel végétal sont disponibles dans le commerce: Ea AgriStrip (Bioreba¹) et Pocket Diagnostics (Forsite Diagnostics¹). Les essais circulaires de 2009 et 2010 ont déterminé respectivement, en suivant les instructions du fabricant, une exactitude de 0,66 et 0,55 avec Ea AgriStrip¹ ainsi que 0,64 et 0,56 avec Pocket Diagnostics¹. Ces chiffres découlent d'analyses sur des échantillons contenant entre 1 et 10^6 UFC/g d'*E. Amylovora*; l'exactitude est ainsi proche de 1,0 quand les échantillons sont infectés par 10^5 à 10^6 UFC/g, soit la population minimale attendue dans les échantillons symptomatiques (López *et al.*, 2010). Il est donc recommandé de n'employer ces kits que lorsque les échantillons sont symptomatiques.

3.1.5 Détection moléculaire

Plusieurs analyses PCR ainsi qu'un protocole d'amplification isotherme induite par boucle (LAMP, pour *loop-mediated isothermal amplification*)² sont indiqués pour détecter *E. amylovora*. Plusieurs laboratoires ont évalué ces méthodes en profondeur lors d'un essai circulaire (Lopez *et al.*, 2010; M.M. Lopez, communication personnelle, 2012). La spécificité de certaines de ces méthodes est évaluée dans le document de Powney *et al.* (2011a). Les protocoles de PCR classique peuvent être plus onéreux, plus longs et, généralement, nécessiter davantage de formation que les analyses sérologiques. Toutes ces raisons, auxquelles s'ajoute le risque de contamination, expliquent qu'ils ne conviennent pas toujours aux essais à grande échelle. Cela étant, comme les méthodes de PCR en temps réel, certaines PCR classiques et les protocoles de PCR gigogne dans un seul tube ont donné des résultats très exacts, ce sont les analyses moléculaires recommandées. Toutes les analyses PCR devraient être effectuées sur de l'ADN extrait à partir des échantillons, car les hôtes d'*E. Amylovora* contiennent de fortes quantités d'inhibiteurs, ou à partir d'échantillons enrichis, qui offrent une meilleure fiabilité en matière de détection.

3.1.5.1 Témoins à utiliser en analyse moléculaire

Pour que les résultats des analyses soient considérés comme fiables, des témoins adaptés – qui dépendront du type d'analyse réalisée et du degré de certitude requis – devraient être intégrés dans chaque série d'isolements d'acide nucléique et d'amplifications d'acide nucléique de l'organisme ciblé. Pour la PCR, un acide nucléique témoin positif, un témoin négatif de l'amplification et un témoin négatif de l'extraction (témoin exempt de matrice) sont, au minimum, les témoins qui devraient être employés.

Acide nucléique témoin positif

Ce témoin sert à contrôler l'efficacité de la méthode d'essai (sans tenir compte de l'extraction), et plus particulièrement de l'amplification. À cet effet, on peut faire appel à un acide nucléique préparé (et conservé) au préalable, à l'intégralité du génome amplifié ou à un témoin de synthèse, par exemple un produit de PCR cloné.

Témoin interne

Pour les PCR classique et en temps réel, le protocole devrait comporter des témoins végétaux internes, par exemple un gène domestique comme les gènes qui codent la COX (Weller *et al.*, 2000) ou l'ARN ribosomique (ARNr) 16S (Weisberg *et al.*, 1991) afin d'éliminer l'éventualité d'obtenir des faux négatifs dus à une mauvaise extraction ou à la dégradation de l'acide nucléique, ou encore à la présence d'inhibiteurs de PCR.

Témoin négatif de l'amplification (témoin exempt de matrice)

Ce témoin est nécessaire pour les méthodes de PCR classique et en temps réel afin d'éliminer l'éventualité de faux positifs dus à une contamination pendant la préparation du mélange réactionnel. Pour ce faire, on ajoute l'eau de qualité PCR qui a servi à préparer ce mélange à l'étape d'amplification.

² Pour employer régulièrement la méthode LAMP dans une région où elle est visée par un brevet, comme le Japon (numéros de brevet 3 313 358, 3 974 441 et 4 139 424), les États-Unis (US6 410 278, US6 974 670 et US7 494 790), l'Union européenne (n^{os} 1 020 534, 1 873 260, 2 045 337 et 2 287 338), la Chine (ZL008818262), la République de Corée (n^o de brevet 10-0612551), l'Australie (n^o 779160) et la Fédération de Russie (n^o 2 252 964), les opérateurs doivent obtenir une autorisation auprès d'Eiken Chemical Co., Ltd préalablement à l'utilisation, conformément au droit de propriété intellectuelle.

Témoin positif de l'extraction

Ce témoin permet de vérifier que la qualité et la quantité de l'acide nucléique cible sont suffisantes et que le pathogène est détecté. L'acide nucléique est extrait des tissus infectés de l'hôte ou de tissus végétaux sains auxquels l'organisme cible a été inoculé.

Ce témoin positif devrait correspondre approximativement à un dixième de la quantité de tissu foliaire utilisée par plante pour extraire l'ADN.

Pour la PCR, il convient de veiller à éviter toute contamination croisée due aux aérosols issus du témoin positif ou des échantillons positifs. Si nécessaire, le témoin positif utilisé par le laboratoire devrait être séquencé de manière que cette séquence puisse être directement comparée à celles obtenues à partir des amplicons PCR de la taille correcte. Une autre solution consiste à créer des témoins positifs à partir d'une séquence connue qui, là encore, peut être comparée aux amplicons PCR de la taille correcte.

Témoin négatif de l'extraction

Ce témoin sert à suivre la contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et/ou une réaction croisée avec le tissu hôte. Il est constitué d'acide nucléique extrait à partir de tissus sains de l'hôte puis amplifié. Il est recommandé d'employer des témoins multiples quand on s'attend à ce qu'un grand nombre d'échantillons soient positifs.

3.1.5.2 Extraction de l'ADN

Trois méthodes d'extraction de l'ADN –Llop *et al.* (1999), Taylor *et al.* (2001) et le kit d'analyse PCR de végétaux REDEExtract-N-Amp de Sigma-Aldrich¹ –ont été évaluées par l'essai circulaire de 2009 (Dreo *et al.*, 2009) pour quatre protocoles de PCR et on a obtenu des exactitudes situées entre 0,67 et 0,76. Elles ont donné des résultats comparables à l'issue de l'essai circulaire de 2010 (Lopez *et al.*, 2010), comme en témoignent les exactitudes indiquées ci-dessous pour les différentes méthodes PCR. La dilution des extraits au 1:10 n'a pas amélioré l'efficacité, ce qui traduit une quantité faible, voire nulle, d'inhibiteurs. Partant de ces constats, c'est la méthode d'extraction décrite dans Llop *et al.* (1999) qui est recommandée: largement éprouvée dans de nombreux pays, elle est bon marché et facile à mettre en œuvre par un laboratoire.

Extraction d'ADN de Llop et al. (1999)

Centrifuger un millilitre de macérat d'un échantillon préparé conformément à la section 3.1.2 et/ou 1 ml de macérat enrichi à 10 000 g durant 5 minutes à température ambiante. Éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension dans 500 µl de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,5, 24,2 grammes; NaCl, 14,6 grammes; acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), 9,3 grammes; dodécyl sulfate de sodium (SDS), 5 grammes; PVP-10, 20 grammes; eau distillée, 1 litre; stérilisation par filtration) puis incubé pendant une heure à température ambiante avant une nouvelle centrifugation à 4 000 g pendant 5 minutes. Mélanger 450 µl environ de surnageant à un volume égal d'isopropanol, retourner les tubes et laisser à température ambiante durant 30 minutes à 1 heure. Centrifuger le précipité d'acide nucléique à 10 000 g pendant 5 minutes, éliminer le surnageant et sécher le culot à l'air. Si le fond du tube contient encore un précipité brun ou vert, le retirer délicatement en même temps que le surnageant afin d'obtenir un culot d'ADN plus propre. Remettre en suspension le culot dans 200 µl d'eau. Cette suspension devrait être analysée immédiatement par PCR ou entreposée à –20 °C.

3.1.5.3 Amplification de l'ADN par PCR

La littérature présente de nombreux protocoles et amorces PCR permettant de détecter *E. amylovora*, avec dans certains cas des problèmes de spécificité (Roselló *et al.*, 2006; Powney *et al.*, 2011a). Voici les amorces et protocoles qui ont été validés par des essais circulaires: Bereswill *et al.* (1992) et Llop *et al.* (2000), avec ou sans enrichissement préalable, en 2003; Taylor *et al.* (2001), Stöger *et al.* (2006) ainsi qu'Obradovic *et al.* (2007) en 2009 et 2010. La découverte de souches d'*E. amylovora* tout à fait virulentes dépourvues de plasmide pEA29 (Llop *et al.*, 2006) ainsi que diverses expériences menées

dans différents pays (Powney *et al.*, 2011a) indiquent qu'on devrait employer deux protocoles de PCR: dans un cas les amorces visent des séquences du plasmide pEA29, dans l'autre elles ciblent des séquences chromosomiques uniques. Si la PCR est négative avec les amorces pEA29 et positive avec les amorces chromosomiques, on considère que le résultat est positif pour *E. amylovora*. La PCR peut être réalisée avec les amorces et dans les conditions validées par les essais circulaires, mais les conditions d'amplification devraient être optimisées en fonction des différents thermocycleurs.

PCR de Bereswill et al. (1992)

Les amorces sont les suivantes:

A (sens): 5'-CGG TTT TTA ACG CTG GG-3 '

B (antisens): 5'-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3 '

Les séquences ciblées sont dans la région codant le plasmide pEA29. Le mélange pour PCR est composé comme suit: eau ultrapure, 17,4 µl; tampon 10×, 2,5 µl; MgCl₂ 50 mM, 1,5 µl; dNTP 10 mM, 0,5 µl; amorce A 10 pmol/µl, 0,25 µl; amorce B 10 pmol/µl, 0,25 µl; et Taq DNA polymérase 5 U/µl, 0,1 µl. Il convient d'ajouter 2,5 µl d'extrait d'ADN aux 22,5 µl de mélange pour PCR. Les paramètres de thermocyclage sont: une étape de dénaturation de 5 minutes à 93 °C suivie de 40 cycles de 30 secondes à 93 °C, 30 secondes à 52 °C et 1 minute 15 secondes à 72 °C, puis une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72 °C. D'après Bereswill *et al.* (1992), l'amplicon doit comporter 900 paires de bases (pb), même si la taille peut varier entre 900 et 1 100 pb en fonction du nombre de répétitions de 8 pb au sein du fragment amplifié (Jones et Geider, 2001).

L'essai circulaire de 2003 a déterminé une exactitude de 0,51 pour ce protocole, avec néanmoins une amélioration (0,74 et 0,78) après l'enrichissement des échantillons dans les milieux King B et CCT, respectivement (López *et al.*, 2006).

PCR de Taylor et al. (2001)

Les amorces sont les suivantes:

G1-F: 5'-CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-3 '

G2-R: 5'-GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC-3 '

Elles ciblent des séquences chromosomiques. Le mélange pour PCR est composé comme suit: eau ultrapure, 14,3 µl; tampon 10×, 2,5 µl; MgCl₂ 50 mM, 0,75 µl; dNTP 10 mM, 0,25 µl; amorce G1-F 10pmol/µl, 1 µl; amorce G2-R 10pmol/µl, 1 µl; et Taq DNA polymérase 5 U/µl, 0,2 µl. On met en présence 5 µl d'extrait d'ADN et 45 µl de mélange pour PCR. Les paramètres de thermocyclage sont: une étape de 3 minutes à 95 °C suivie de 40 cycles de 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 60 °C et 1 minute à 72 °C, une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72 °C et un refroidissement à 15 °C. L'amplicon attendu mesure 187 pb.

Il est ressorti de l'essai circulaire de 2010 que la procédure d'extraction de l'ADN de Llop *et al.* (1999) avait une exactitude de 0,77.

PCR de Stöger et al. (2006)

Les amorces indiquées par Llop *et al.* (2000) sont:

PEANT1-F: 5'-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3'

PEANT2-R: 5'-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3'

Les séquences ciblées sont dans la région codant le plasmide pEA29. Stöger *et al.* (2006) recommandent d'appliquer cette méthode avec un extrait d'ADN obtenu grâce au REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit de Sigma-Aldrich¹. Le mélange pour PCR a la composition suivante: eau ultrapure, 5 µl; REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich¹), 10 µl; PEANT1-F 10 pmol/µl, 0,5 µl; PEANT2-R 10 pmol/µl, 0,5 µl; et extrait d'ADN, 4 µl. Les paramètres de thermocyclage sont: 5 minutes à 95 °C

puis 35 cycles de 15 secondes à 95 °C, 30 secondes à 58 °C et 45 secondes à 72 °C, élongation finale de 5 minutes à 72 °C, puis refroidissement à 15 °C. L'amplicon attendu mesure 391 pb.

Le kit d'extraction de l'ADN ici recommandé a été évalué lors des essais circulaires de 2009 et 2010, obtenant respectivement une exactitude de 0,76 et 0,72.

PCR de Gottsberger (2010) (d'après Obradovic et al. (2007))

Les amorces sont les suivantes:

FER1-F: 5'-AGC AAT TAA TGG CAA GTA TAG TCA-3 '

rgER2-R: 5'-AAA AGA GAC ATC TGG ATT CAG ACA AT-3 '

Ces amorces visent des séquences chromosomiques. Le mélange pour PCR est composé comme suit: eau ultrapure, 14,3 µl; tampon 10×, 2,5 µl; MgCl₂ 50 mM, 0,75 µl; dNTP 10 mM, 0,25 µl; FER1-F 10 pmol/µl, 1 µl; rgER2-R 10 pmol/µl, 1 µl; Taq DNA polymérase 5 U/µl, 0,2 µl; et extrait d'ADN, 5 µl. Les paramètres de thermocyclage sont les suivants: une étape de 3 minutes à 94 °C suivie de 41 cycles de 10 secondes à 94 °C, 10 secondes à 60 °C et 30 secondes à 72 °C, une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72 °C et un refroidissement à 15 °C. L'amplicon attendu mesure 458 pb.

Les évaluations des essais circulaires de 2009 et 2010 ont établi une exactitude de 0,76 et 0,68, respectivement, pour la méthode d'extraction de l'ADN proposée par Llop *et al.* (1999).

PCR gigogne de Llop et al. (2000)

Le protocole de PCR gigogne décrit par Llop *et al.* (2000) fait appel à deux paires d'amorces combinées dans un seul tube à essai. Comme les amorces ont différentes températures d'anneauage, les deux PCR ont lieu l'une après l'autre. Les amorces externes sont celles de McManus et Jones (1995), qui ciblent des séquences codant le plasmide pEA29. Les amorces internes sont celles décrites par Llop *et al.* (2000).

Amorces externes:

AJ75-F: 5'-CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT-3 '

AJ76-R: 5'-ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA-3 '

Amorces internes:

PEANT1-F: 5'-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3 '

PEANT2-R: 5'-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3 '

Le mélange pour PCR est composé comme suit: eau ultrapure, 36,25 µl; tampon 10×, 5 µl; MgCl₂ 50 mM, 3 µl; dNTP 10 mM, 0,5 µl; AJ75-F 0,1 pmol/µl, 0,32 µl; AJ76-R 0,1 pmol/µl, 0,32 µl; PEANT1-F 10 pmol/µl, 1 µl; PEANT2-R 10 pmol/µl, 1 µl; et Taq DNA polymérase 5 U/µl, 0,6 µl. 2 µl d'échantillon d'ADN devraient être ajoutés à 48 µl de mélange pour PCR. Les paramètres de thermocyclage sont les suivants: étape de dénaturation de 4 minutes à 94 °C, 25 cycles de 60 secondes à 94 °C et 90 secondes à 72 °C. Cette première PCR est suivie, dans le même appareil, d'une seconde étape de dénaturation de 4 minutes à 94 °C puis 40 cycles de 60 secondes à 94 °C, 60 secondes à 56 °C et 60 secondes à 72 °C, et une élongation finale de 10 minutes à 72 °C. L'amplicon attendu mesure 391 pb, mais des variations de taille peuvent être observées.

Les essais circulaires de 2003 et 2010 ont respectivement mis en évidence une exactitude de 0,69 et 0,72, mais la méthode est plus exacte après une étape d'enrichissement, atteignant 0,84 (King B) et 0,86 (CCT) en 2003, puis 0,79 (King B) et 0,88 (CCT) en 2010.

3.1.5.4 Considérations générales sur les analyses PCR

Le laboratoire peut être amené à modifier (optimiser) les protocoles PCR s'il utilise des réactifs ou des thermocycleurs différents.

Après l'amplification, la présence d'*E. amylovora* peut être confirmée par séquençage des produits de la PCR ou par analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP). Il est possible d'observer les fragments de restriction obtenus après digestion des amplicons produits par les amorces de Bereswill *et al.* (1992) ou par la PCR gigogne de Llop *et al.* (2000) pour confirmer la spécificité de la PCR par comparaison avec la fragmentation d'une souche témoin connue par les mêmes enzymes de restriction. Pour ce faire, ce sont les endonucléases DraI et SmaI qui devraient être utilisées.

Le résultat est négatif quand tous les témoins positifs produisent l'amplicon de taille correcte d'*E. Amylovora*, mais pas l'échantillon, dont les amplicons ne donnent pas les fragments de restriction ou ne correspondent pas à la séquence caractéristiques de cette bactérie, si ces analyses supplémentaires sont réalisées. Le résultat est positif si la PCR de l'échantillon produit l'amplicon de taille attendue pour *E. amylovora*, si toutefois aucun témoin négatif n'est amplifié, et si les fragments de la restriction enzymatique ou les séquences obtenues à partir des amplicons (le cas échéant) sont caractéristiques de la bactérie.

3.1.5.5 PCR en temps réel

D'après les évaluations des protocoles de PCR en temps réel effectuées lors des essais circulaires de 2009 et 2010 (Dreo *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010), c'est la méthode décrite par Pirc *et al.* (2009), qui vise des séquences chromosomiques, qui est recommandée. Il existe également un protocole de PCR duplex en temps réel fondé sur des séquences chromosomiques, mais il n'a pas été évalué dans le cadre d'un essai circulaire (Lehman *et al.*, 2008).

PCR en temps réel de Pirc et al. (2009)

L'amplification repose sur les oligonucléotides suivants:

Amorce sens Ams116F: 5'-TCC CAC ATA CTG TGA ATC CA-3'

Amorce antisens Ams189R: 5'-GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG-3'

Sonde Ams141T: FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA

Le volume réactionnel final est de 25 µl. Le mélange pour PCR est composé comme suit: eau ultrapure, 2,5 µl; TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems¹), 12,5 µl; Ams116F 10 pmol/µl, 2,25 µl; Ams189R 10 pmol/µl, 2,25 µl; sonde Ams141T marquée avec FAM 10 pmol/µl, 0,5 µl; et 5 µl d'extrait d'ADN (ajoutés aux 20 µl de mélange pour PCR). Les paramètres de thermocyclage sont: 2 minutes à 50 °C; 10 minutes à 95 °C; et 40 cycles de 15 secondes à 95 °C et 1 minute à 60 °C. La configuration standard de progression de la température des analyseurs 7900HT et 7900HT Fast (Applied Biosystems¹) correspond à 1,6 °C/seconde, à la hausse comme à la baisse. Il est possible d'effectuer les réactions en ralentissant cette progression; en revanche, une progression plus rapide (environ 3,5 °C/seconde, hausse et baisse) n'a pas donné de résultats acceptables. L'amplicon attendu mesure 74 pb.

Pour l'analyse des résultats de la PCR en temps réel, il existe généralement plusieurs options pour paramétrer automatiquement ou manuellement les limites du signal et du bruit de fond. Les instructions relatives au logiciel qui convient devraient être suivies. La ligne de base devrait être établie automatiquement mais la valeur du cycle seuil devrait être déterminée manuellement, à l'intersection de la ligne de base et de la partie exponentielle des courbes d'amplification des témoins.

L'essai circulaire de 2010 a mis en évidence une exactitude de 0,80, 0,85 et 0,76 respectivement avec la méthode d'extraction de l'ADN de Llop *et al.* (1999), le REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich¹) et le protocole de Taylor *et al.* (2001).

PCR en temps réel de Gottsberger (2010)

Les oligonucléotides suivants ciblent le chromosome d'*E. amylovora*:

Amorce sens hpEaF: 5'-CCG TGG AGA CCG ATC TTT TA-3'

Amorce antisens hpEaR: 5'-AAG TTT CTC CGC CCT ACG AT-3'

Sonde hpEaP: FAM-TCG TCG AAT GCT GCC TCT CT-MGB

Le volume réactionnel final est de 20 µl. Le mélange pour PCR est composé comme suit: eau ultrapure, 6 µl; TaqMan Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems¹), 10 µl; hpEaF 10 pmol/µl, 1 µl; hpEaR 10 pmol/µl, 1 µl; hpEaP 1 pmol/µl, 1 µl; et 1 µl d'extrait d'ADN (ajouté aux 19 µl du mélange pour PCR). Les paramètres de thermocyclage sont les suivants: 2 minutes à 50 °C; 10 minutes à 95 °C; 50 cycles de 15 secondes à 95 °C et 1 minute à 60°C. L'amplicon attendu mesure 138 pb.

Pour l'analyse des résultats de la PCR en temps réel, il existe généralement plusieurs options pour paramétrer automatiquement ou manuellement les limites du signal et du bruit de fond. Les instructions relatives au logiciel qui convient devraient être suivies. La ligne de base devrait être établie automatiquement mais la valeur du cycle seuil devrait être déterminée manuellement, à l'intersection de la ligne de base et de la partie exponentielle des courbes d'amplification des témoins.

L'exactitude de cette PCR en temps réel n'a pas pu être évaluée dans l'essai circulaire de 2010, mais un laboratoire a testé la méthode parallèlement à la PCR en temps réel de Pirc *et al.* (2009) et a obtenu les mêmes résultats qualitatifs, avec la méthode d'extraction d'ADN de Llop *et al.* (1999).

3.1.5.6 Interprétation des résultats de la PCR

PCR classique

L'analyse PCR propre à l'espèce de pathogène ne sera considérée comme valide que si les conditions suivantes sont satisfaites:

- (1) le témoin positif produit un amplicon de la taille correcte, c'est-à-dire correspondant à la bactérie;
- (2) aucun amplicon de la taille correcte, correspondant à la bactérie, n'est produit avec le témoin négatif de l'extraction négatif et le témoin positif de l'amplification.

Si des amorces témoins internes visant l'ADNr 16S sont également utilisées, le témoin négatif (tissu végétal sain), s'il est inclus, le témoin positif et chacun des échantillons d'essai doivent produire un amplicon de 1,6 kilobases (kb) (ADNr 16S). Il faut garder à l'esprit que les témoins synthétiques ou les témoins positifs pour le plasmide ne produiront pas d'amplicon de cette taille. Si les amorces témoins internes n'amplifient pas les échantillons, cela peut indiquer par exemple que l'extraction de l'acide nucléique a échoué, que l'acide nucléique n'a pas été incorporé au mélange réactionnel, que l'extrait d'ADN contient des composés inhibant la PCR ou que l'ADN est détérioré.

On estime qu'un échantillon est positif s'il produit un amplicon de la taille correcte.

PCR en temps réel

Une analyse PCR en temps réel ne sera considérée comme valide que si les conditions suivantes sont satisfaites:

- (1) le témoin positif donne une courbe d'amplification avec les amorces caractéristiques du pathogène;
- (2) les témoins négatifs de l'extraction et de l'amplification ne donnent aucune courbe d'amplification (soit une valeur du cycle seuil (Ct) de 40).

Si l'analyse utilise les amorces témoins internes COX, le témoin négatif (le cas échéant), le témoin positif et chacun des échantillons d'essai doivent produire une courbe d'amplification. Si les amorces témoins internes n'induisent pas de courbe d'amplification avec les échantillons, cela peut indiquer par exemple que l'extraction de l'ADN n'a pas fonctionné, que l'acide nucléique n'a pas été incorporé au mélange réactionnel, que l'extrait d'ADN contient des composés inhibant la PCR ou que l'ADN est détérioré.

Le résultat est considéré comme positif pour un échantillon si ce dernier produit une courbe d'amplification comportant une phase exponentielle typique. La Ct doit être vérifiée dans chaque laboratoire lors de la première mise en œuvre de l'essai.

3.1.5.7 Amplification isotherme induite par boucle

Le protocole LAMP a été mis au point et décrit par Temple *et al.* (2008) ainsi que Temple et Johnson (2011). Il a été évalué dans l'essai circulaire de 2010, car on a estimé qu'il s'agissait d'une méthode facile à mettre en œuvre adaptée aux laboratoires qui ne disposent pas d'équipements pour la PCR. Il est ressorti de cet essai circulaire que le protocole LAMP faisant appel à des amorces qui ciblent le gène chromosomique *amsL* d'*E. amylovora* n'était pas assez sensible pour analyser des échantillons contenant des populations bactériennes à faible effectif. Par conséquent, le protocole LAMP décrit ci-dessous ciblant le gène chromosomique *amsL* n'est recommandé que pour l'analyse d'échantillons symptomatiques qui contiennent plus de 10^5 – 10^6 UFC/ml. Le protocole décrit par Temple et Johnson (2011), qui fait appel à des amorces détectant pEA29, n'a pas été évalué dans le cadre de l'essai circulaire.

Les amorces de la méthode LAMP ciblant *amsL* sont les suivantes:

ALB Fip: 5'-CTG CCT GAG TAC GCA GCT GAT TGC ACG TTT TAC AGC TCG CT-3 '
ALB Bip: 5'-TCG TCG GTA AAG TGA TGG GTG CCC AGC TTA AGG GGC TGA AG-3 '
ALB F: 5'-GCC CAC ATT CGA ATT TGA CC-3 '
ALB B: 5'-CGG TTA ATC ACC GGT GTC A-3 '

L'analyse a été réalisée avec des concentrations finales de 2,4 μ M pour les amorces Fip et Bip, et 0,2 μ M pour les amorces F et B. Les températures de fusion des amorces s'échelonnent entre 58 et 60 °C. Le mélange réactionnel LAMP a la composition suivante: tampon ThermoPol 10 \times (New England Biolabs¹), 5 μ l; dNTP 10 mM, 5 μ l; MgSO₄ 100 mM, 2 μ l; albumine sérique bovine (BSA) 10 mg/ml, 2 μ l; ALB Fip 100 μ M, 1,2 μ l; ALB Bip 100 μ M, 1,2 μ l; ALB F 10 μ M, 1 μ l; ALB B 10 μ M, 1 μ l; ADN polymérase *Bst* 8 U/ μ l, 2 μ l; ADN matrice, 5 μ l; eau ultrapure, 24,6 μ l. Il est à noter que l'ADN polymérase *Bst*, l'ADN matrice et l'eau ultrapure ne sont pas ajoutés directement au mélange principal (master mix), mais séparément après la répartition du mélange principal en parties aliquotes. Avant de lancer la LAMP, fixer la température d'un bain-marie ou d'un thermocycleur à 65 °C. Préparer le mélange principal et prélever à la pipette des parties aliquotes de 18,4 μ l ajoutées dans chaque tube de PCR de 0,2 ml. Ajouter séparément à la pipette l'ADN polymérase, l'ADN matrice et l'eau ultrapure dans chaque tube contenant déjà le mélange principal. Agiter les tubes sur une centrifugeuse (1 000 tours/minute pendant 30 secondes), les maintenir pendant 55 minutes dans le thermocycleur (65 °C) ou sur un support dans le bain-marie (65 °C) de manière que le mélange réactionnel soit immergé. Retirer les tubes et laisser refroidir pendant 10 secondes.

Un échantillon est positif si l'on observe un précipité (solution trouble ou solide blanc constitué de pyrophosphate de magnésium au fond du tube), avec les mêmes résultats dans les témoins positifs. Si la solution est limpide dans les tubes de l'échantillon comme des témoins négatifs, le résultat est négatif.

L'essai circulaire de 2010 a donné une exactitude de 0,64 pour ce protocole; toutefois, pour les échantillons comptant 10^5 – 10^6 UFC/ml, ce chiffre grimpe à 0,80. C'est la raison pour laquelle le protocole LAMP n'est recommandé que pour les échantillons symptomatiques.

3.2 Détection chez les plantes asymptomatiques

Les analyses recommandées pour le dépistage sont indiquées dans le diagramme des flux présenté à la figure 2.

3.2.1 Échantillonnage et préparation des échantillons

Les échantillons asymptomatiques peuvent être préparés individuellement, de préférence, ou regroupés en lots allant jusqu'à 100 échantillons (OEPP, 2013). Des précautions devraient être prises pour éviter la contamination croisée lors des étapes d'échantillonnage et d'extraction. Le prélèvement et la préparation des échantillons peuvent suivre l'un ou l'autre des protocoles suivants:

- Prélever les fleurs, pousses, jeunes fruits ou segments de tige et les placer dans des sacs ou récipients stériles en été ou au début de l'automne, à la suite de conditions favorables à la multiplication d'*E. amylovora* et quand les températures moyennes dépassent 15 °C (van der Zwet et Beer, 1995). Sur les plantes suspectes, sectionner de jeunes pousses d'environ 20 cm de long ou des fleurs, le cas échéant. S'il est nécessaire d'effectuer des analyses en hiver, prélever cinq à dix bourgeons par plante. Au laboratoire, sur les plantes sélectionnées, sectionner les fleurs (le cas échéant), le pédoncule et la base du rameau de plusieurs feuilles situées à partir de la base des pousses ou des segments de tige. Peser environ 0,1–1,0 gramme de matériel végétal et le mettre à macérer dans le tampon antioxydant conformément au protocole décrit à la section 3.1.2.
- La procédure d'échantillonnage suivante est décrite pour l'analyse de rameaux de matériel ligneux asymptomatique issu de pépinières, mais n'a pas été validée. Un échantillon comprend 100 rameaux d'environ 10 cm de long chacun et provenant de 100 plantes. Quand un lot est composé de plantes de plusieurs genres, ces derniers devraient être représentés en parts égales tout en n'étant pas plus de trois par échantillon. Prélever aléatoirement trente rameaux dans chaque échantillon, et sectionner chaque rameau en quatre tronçons; on obtient donc 120 segments. Déposer ces échantillons dans des erlenmeyers et les recouvrir de PBS stérile contenant du Tween 20 à 0,1 %. Agiter vigoureusement les erlenmeyers sur agitateur rotatif pendant 1,5 heure à température ambiante. Verser l'extrait sur un entonnoir en verre fritté muni de papier filtre, filtrer sous vide et récupérer le filtrat. Analyser le filtrat directement ou centrifuger à 10 000 g pendant 20 minutes puis mettre le culot en suspension dans 4,5 ml de PBS stérile. Appliquer les techniques de détection indiquées ci-dessous. Un protocole similaire peut être mis en œuvre pour les feuilles, les pousses, les fleurs et les bourgeons.

La quantité d'*E. amylovora* récupérée varie en fonction de la période à laquelle l'échantillonnage a lieu, sachant qu'elle est maximale en été (sous réserve de conditions météorologiques favorables à la bactérie) et moindre en hiver. Les échantillons devraient être analysés immédiatement par DASI-ELISA, PCR et isolement, conformément aux protocoles décrits pour chacune de ces méthodes dans le document López *et al.* (2006) à appliquer aux échantillons symptomatiques. L'analyse par immunofluorescence n'est pas obligatoire; le cas échéant, il convient de la réaliser directement sur les extraits avant l'enrichissement.

3.2.2 Tests préliminaires

Quand on analyse directement des échantillons asymptomatiques d'*E. Amylovora*, le résultat est généralement négatif en raison de la faible quantité de bactéries présentes. En l'absence de symptômes, il est donc absolument nécessaire d'inclure une étape d'enrichissement des échantillons préparés dans le tampon antioxydant (section 3.2.1) (Gorris *et al.*, 1996), qui a lieu pendant 72 heures à environ 25 °C. Il est conseillé d'effectuer au moins deux des tests de dépistage suivants, qui reposent sur différents principes biologiques:

- Enrichissement-isolement. Suivre la procédure décrite pour les échantillons symptomatiques (section 3.1.3.2).
- Enrichissement-DASI-ELISA. Suivre la procédure décrite pour les échantillons symptomatiques (section 3.1.4.1).
- Enrichissement-PCR ou enrichissement-PCR en temps réel. Extraire l'ADN à partir de 500 à 1 000 µl d'échantillons enrichis dans les milieux King B et/ou CCT, puis suivre la procédure d'amplification proposée par Taylor *et al.* (2001), par Llop *et al.* (2000) (section 3.1.5.3), ou bien les protocoles de PCR en temps réel (section 3.1.5.5).

Si l'un des tests de dépistage est positif mais l'isolement est négatif, il faudrait essayer d'isoler le pathogène à partir de l'extrait conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans du glycérol ou à partir des échantillons enrichis. Quand trois tests ou plus se révèlent positifs mais l'isolement est négatif, on peut raisonnablement avoir de fortes présomptions que l'échantillon est infecté par *E. amylovora*; il est toutefois nécessaire d'isoler le pathogène à partir de nouveaux échantillons afin de l'identifier et de confirmer qu'il s'agit de la bactérie.

4. Identification

L'identification devrait reposer sur plusieurs résultats issus de techniques variées dans la mesure où d'autres espèces du genre *Erwinia*, comme *E. piriflorinigrans* (López *et al.*, 2011), *E. pyrifoliae* (Kim *et al.*, 1999; Rhim *et al.*, 1999), *E. uzenensis* (Matsuura *et al.*, 2012) et d'autres encore (Kim *et al.*, 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012) présentent des caractéristiques morphologiques, sérologiques et moléculaires analogues à celle d'*E. amylovora*. Pour distinguer *E. amylovora* d'autres espèces du même genre très voisines, dont l'infection provoque des symptômes très similaires dans les tissus de certains hôtes, trois techniques fondées sur différents principes biologiques peuvent être combinées:

- PCR ciblant l'ADN chromosomique (sections 3.1.5.2 et 4.3.1);
- DAS-ELISA avec les anticorps monoclonaux spécifiques décrits pour la détection (section 3.1.4.1, sans l'étape d'enrichissement);
- inoculation de plantes hôtes puis nouvel isolement du pathogène inoculé afin de vérifier les postulats de Koch (section 4.4).

Il est recommandé d'employer au moins deux de ces trois techniques pour identifier les colonies. Les autres analyses décrites ci-dessous peuvent aussi être mises en œuvre, en fonction de l'expérience du laboratoire. Si nécessaire, la confirmation définitive de l'identité d'une culture devrait inclure un test de pathogénicité.

Pour les témoins positifs, il est recommandé d'utiliser les isolats d'*E. amylovora* NCPPB 683 et CFBP 1430. Différentes souches de référence d'*E. amylovora* sont disponibles auprès des collections suivantes, entre autres: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Fera, York (Royaume-Uni); Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), Institut national de la recherche agronomique (Inra), Station phytobactériologie, Angers (France); Collections coordonnées belges de micro-organismes BCCM/LMG Bacteria Collection, Gand (Belgique); International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), Manaaki Whenua Landcare Research, Auckland (Nouvelle-Zélande); American Type Culture Collection (ATTC), Manassas (Virginie, États-Unis). L'authenticité des souches n'est garantie que si elles sont obtenues directement auprès de collections de culture.

4.1 Identification nutritionnelle et enzymatique

Les essais fondés sur des phénotypes clés sont utiles et encore en usage pour identifier des organismes; il est néanmoins conseillé de les associer à des tests de pathogénicité ainsi qu'à une analyse moléculaire ou sérologique. Par définition, les espèces du genre *Erwinia* sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif, en forme de bâton, dont la motilité est assurée par une ciliature péritriche, et capables de transformer le glucose, le fructose, le galactose et le saccharose en acides. D'après les méthodes de Jones et Geider (2001), voici les propriétés phénotypiques clés (Paulin, 2000) communes à la plupart des souches d'*E. Amylovora*: test oxydase (-), test oxydation/fermentation (O/F) (+/+), pigment fluorescent dans milieu King B sous lumière UV (-), production de levane (+), réduction des nitrates (-), consommation du citrate (+), liquéfaction de la gélatine (+), uréase et indole (-) et morphologie des colonies dans milieu CCT.

Les tests suivants permettent de distinguer *E. amylovora*, *E. pyrifoliae* et *E. piriflorinigrans*, bien que certaines caractéristiques physiologiques et biochimiques puissent varier d'une souche à l'autre (tableau 1).

Tableau 1. Différences entre *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifoliae* et *Erwinia piriflorinigrans*

Test microbiologique	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	<i>Erwinia piriflorinigrans</i>
Hydrolyse de la gélatine	+	–	–
Inositol †	–	ND	+
Sorbitol †	+	+	–
Esculine †	V	–	+
Mélibiose †	–	–	+
D-Raffinose †	–	–	+
β-Gentiobiose †	+	–	+
Amplification avec ‡ EP16A/EPI62C CPS1/CPS2C	–	+	ND

†D'après Roselló *et al.* (2006) ainsi que López *et al.* (2011). Oxydation des substrats des galeries d'identification API 50 CH (bioMérieux) en suivant la méthode proposée par López *et al.* (2011). Plus de 90 % des souches donnent le résultat indiqué.

‡D'après Kim *et al.* (2001b).

ND, non déterminé; V, variable.

4.1.1 Caractérisation biochimique

4.1.1.1 Profil nutritionnel et enzymatique

E. amylovora peut être identifiée de manière biochimique grâce au profil établi à l'aide des galeries API 20 E et API 50 CH de bioMérieux¹.

API 20 E¹. Il faudrait respecter les instructions du fabricant pour préparer la suspension et inoculer la galerie. Incuber la galerie à 25–26 °C. Après 48 heures, une culture d'*E. amylovora* devrait typiquement donner les résultats suivants: négatifs pour les tests lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC), consommation du citrate (CIT), production de H₂S (SH₂), uréase (URE), tryptophane déaminase (TDA), production d'indole (IND) et oxydation du rhamnose (RHA), et positif pour le test d'oxydation du sucrose (SAC). D'autres tests peuvent varier en fonction des souches, selon Donat *et al.* (2007).

API 50 CH¹. Préparer une suspension de densité optique 1,0 (à 600 nm) dans du PBS. Ajouter un millilitre de cette suspension à 20 ml du milieu d'Ayers (NH₄H₂PO₄, 1 gramme; KCl, 0,2 gramme; MgSO₄, 0,2 gramme; bleu de bromothymol à 0,2 %, 75 ml; eau distillée, 1 litre; pH 7; stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes) (Ayers *et al.*, 1919). L'inoculation de la galerie devrait se faire conformément aux instructions du fabricant. Incuber la galerie à 25–26 °C en conditions aérobies. Quand un puits prend une coloration jaune, cela signifie que l'organisme consomme le glucide concerné. Après 72 heures, une culture d'*E. Amylovora* devrait typiquement être positive pour ces glucides: L-arabinose, ribose, D-glucose, D-fructose, mannitol, sorbitol, N-acétylglucosamine, saccharose, tréhalose et β-gentiobiose. Les autres sucres ne sont pas consommés par *E. amylovora* dans les conditions de cet essai, mais Donat *et al.* (2007) indiquent que certaines souches peuvent utiliser le glycérol et le D-fucose.

4.1.1.2 Identification automatique

Il existe dans le commerce un système d'identification automatique fondé sur les résultats différentiels de 94 tests phénotypiques dans une plaque de microtitrage, accompagné d'un logiciel d'analyse (OmniLog¹, Biolog¹). Les instructions du fabricant devraient être suivies pour obtenir une identification présomptive d'isolats présumés d'*E. amylovora*.

4.1.1.3 Profil d'acides gras

L'établissement du profil d'acides gras fait appel à des colonies positives sur levane et non fluorescentes cultivées sur gélose trypticase soja du commerce à 28 °C pendant 48 heures (Sasser, 1990). Les acides gras sont extraits selon une procédure appropriée et analysés à l'aide du Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI¹) disponible dans le commerce ou d'un autre logiciel adapté à l'identification présomptive d'*E. amylovora*, d'après Wells *et al.* (1994).

4.2 Identification sérologique

4.2.1 Agglutination

Un essai d'agglutination sur lame permet d'obtenir une identification présomptive des colonies présumées d'*E. amylovora*. Mélanger une suspension dense de cellules avec une goutte de PBS et une goutte d'antisérum spécifique dirigé contre *E. amylovora* (non dilué, ou bien dilué au cinquième ou au dixième uniquement) sur une lame. On peut avoir recours à des anticorps monoclonaux si ces derniers agglutinent les souches de référence. La spécificité des anticorps doit être établie au préalable.

4.2.2 Immunofluorescence

Préparer une suspension contenant 10⁶ cellules/ml dans du PBS à partir de colonies positives sur levane non fluorescentes et suivre la procédure d'analyse par immunofluorescence décrite à la section 3.1.4.3. La spécificité des anticorps doit être établie au préalable.

4.2.3 ELISA

Les tests suivants d'identification d'un isolat peuvent être mis en œuvre avec les anticorps monoclonaux spécifiques signalés pour la détection: culture directe sur empreinte de tissu-ELISA (section 3.1.4.2), DASI-ELISA (section 3.1.4.1) et ELISA indirect (voir ci-dessous). Un mélange d'anticorps monoclonaux pour l'analyse DASI-ELISA a été validé dans le cadre de deux essais circulaires. Préparer une suspension de 10⁸ cellules/ml environ dans du PBS à partir des colonies suspectes. Appliquer la procédure DASI-ELISA fournie à la section 3.1.4.1 à l'exception de l'étape d'enrichissement.

ELISA indirect

Chauffer des cultures pures d'isolats suspects à 100 °C pendant 10 minutes au bain-marie ou sur plaque chauffante afin de limiter les réactions non spécifiques avec les anticorps monoclonaux commerciaux. Mélanger des parties aliquotes de 200 µl de culture à un volume égal de tampon carbonate (Na₂CO₃, 1,59 gramme; NaHCO₃, 2,93 grammes; eau distillée, 1 litre; pH 9,6), et placer la solution dans au moins deux puits d'une plaque de microtitrage. Incuber la plaque à 37 °C pendant 1 heure ou à 4 °C jusqu'au lendemain. Retirer les extraits des puits et rincer la plaque trois fois à l'aide du tampon de rinçage (cf. protocole DASI-ELISA). Préparer les dilutions recommandées des anticorps spécifiques anti-*E. amylovora* commercialisés par Plant Print Diagnostics SL¹. Dans chaque puits, ajouter 200 µl de solution d'anticorps anti-*E. amylovora* diluée puis incuber la plaque à 37 °C pendant 1 heure. Retirer la solution d'anticorps et rincer les puits comme à l'étape précédente. Préparer une dilution appropriée d'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (GAM-AP) dans du PBS contenant 0,5 pour cent d'albumine sérique bovine. Dans chaque puits, ajouter 200 µl de cette dilution d'anticorps conjugué puis incuber la plaque à 37 °C pendant 1 heure. Retirer l'anticorps conjugué et rincer les puits comme à l'étape précédente. Préparer une solution de substrat de la phosphatase alcaline (p-nitrophénylphosphate) à raison d'1 mg/ml dans un tampon substrat (diéthanolamine, 97 ml; eau

distillée, 800 ml; pH ajusté à 9,8 avec HCl concentré; volume amené à 1 000 ml avec de l'eau distillée). Verser 200 µl de la solution de substrat à la phosphatase alcaline dans chaque puits. Incuber la plaque dans l'obscurité à température ambiante, et examiner les puits sous une lumière noire (405 nm) à intervalle régulier pendant 90 minutes. Le test est positif si le substrat vire au jaune.

4.2.4 Immunodosage à flux latéral

Préparer une suspension de 10^7 UFC/ml de culture pure à des fins d'identification présomptive. Employer les tampons et les procédures indiqués par les fabricants des kits, conformément à la section 3.1.4.4.

4.3 Identification moléculaire

4.3.1 PCR

Préparer une suspension de 10^6 cellules/ml environ dans de l'eau stérile de qualité moléculaire à partir de colonies positives sur levane non fluorescentes purifiées et chauffer à 100 °C durant 10 minutes. Mettre en œuvre les procédures PCR appropriées ou le protocole LAMP tels que décrits dans les sections 3.1.5.2 à 3.1.5.4 (directement, sans extraction de l'ADN). Si l'identification des colonies d'isolats repose sur une PCR, il convient d'employer 1 U de Taq DNA polymérase (au lieu de 2 U comme c'est le cas avec le matériel végétal).

4.3.2 Macrorestriction et électrophorèse sur gel en champ pulsé

L'analyse par électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP) de l'ADN génomique après digestion par *XbaI* réalisée par Jock *et al.* (2002) met en évidence six types de fragmentation pour les souches européennes d'*E. amylovora*. Cette méthode peut dégager des informations utiles pour différencier les souches, et sert à comprendre la dissémination du feu bactérien en Europe (Jock *et al.*, 2002; Donat *et al.*, 2007).

4.4 Techniques fondées sur la pathogénicité

Les colonies présumées d'*E. amylovora* devraient être inoculées à nouveau dans des plantes hôtes afin que l'on vérifie les postulats de Koch et leur pathogénicité. Les plantes inoculées à cet effet sont les cultivars sensibles du poirier (par exemple Conférence, Doyenné du Comice, Williams, Passe Crassane), du pommier (par exemple Fuji, Gala, Idared, Jonathan), du néflier du Japon (par exemple Algérie, Tanaka) ainsi que des espèces de *Crataegus*, de *Cotoneaster* ou de *Pyracantha*. Inoculer les jeunes pousses en incisant la nervure centrale d'une jeune feuille dans le sens de la longueur à l'aide de ciseaux trempés dans une suspension de chaque isolat à 10^9 UFC/ml dans du PBS. Maintenir les plantes à 20–25 °C, avec un taux d'humidité relative d'environ 80 %, pendant une à deux semaines. Il est aussi possible de procéder de la même manière avec de jeunes pousses détachées et stérilisées en surface (éthanol à 70 %, pendant 30 secondes puis trois rinçages à l'eau distillée stérile) issues de plantes cultivées en serre, en conservant ces pousses dans des tubes contenant de la gélose stérile à 1 %. Ces tubes devraient être conservés à 20–25 °C et recevoir 16 heures de lumière par jour.

On peut également inoculer des fruits immatures prélevés sur des cultivars sensibles de poirier, de pommier et de néflier du Japon en déposant 10 µl de suspensions d'isolats à 10^9 UFC/ml dans du PBS dans une plaie venant d'être pratiquée à la surface des fruits désinfectés (chlore commercial à 70 % pendant 30 minutes puis trois rinçages à l'eau distillée stérile). Les fruits devraient être incubés dans une chambre humide à 25 °C pendant trois à cinq jours.

Les colonies présumées d'*E. Amylovora* sont à nouveau isolées et caractérisées à partir des organes inoculés qui présentent des symptômes caractéristiques du feu bactérien. Le résultat est positif quand on observe un exsudat bactérien et un brunissement autour du site d'inoculation au bout de deux à sept jours, comme chez les témoins positifs à *E. amylovora*, à condition que les témoins négatifs ne présentent aucune lésion, ou simplement une petite lésion nécrotique au point d'inoculation.

D'autres techniques d'inoculation peuvent convenir. Des réactions d'hypersensibilité chez les feuilles de tabac peuvent traduire l'expression des gènes *hrp* d'*E. amylovora*, mais cet essai peut également être positif pour beaucoup d'autres bactéries phytopathogènes. Cette analyse devrait reposer sur des plants de tabac des cultivars Xanthi ou Samsun comportant plus de cinq ou six feuilles. Préparer des suspensions bactériennes à 10^9 UFC/ml (densité optique 1,0 à 600 nm), puis injecter ces suspensions à l'aide d'une seringue et d'une aiguille dans l'espace intercellulaire de feuilles matures. Le résultat est positif quand les tissus inoculés s'affaissent complètement après 24 à 48 heures à température ambiante, chez les échantillons comme chez les témoins positifs à *E. amylovora*.

5. Données à conserver

Les données et les éléments probants à consigner et à conserver sont énumérés à la section 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Dans les cas où d'autres parties contractantes peuvent être concernées par les résultats de la diagnose, en particulier dans les cas de non-conformité (NIMP 13 [*Directives pour la notification de non-conformité et d'action d'urgence*]) et lorsque l'organisme nuisible est identifié pour la première fois dans une zone, on devrait conserver les données, éléments probants et autres éléments suivants de manière à assurer une traçabilité complète: échantillon d'origine, culture(s) de l'organisme nuisible, spécimens conservés ou montés sur lame ou matériel d'analyse (par exemple photographies de gels, imprimés de résultats pour les plaques d'essai ELISA et amplicons de PCR).

6. Points de contact pour tout complément d'informations

Un complément d'informations sur le présent protocole peut être obtenu auprès des organismes suivants:

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4,5, 46113 Moncada (Valence), Espagne (María M. López; courriel: mlopez@ivia.es; tél.: +34 963424000; télécopie +34 963424001).

Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, 231 Morrin Road, St Johns, Auckland 1140, Nouvelle-Zélande (Robert Taylor; courriel: Robert.Taylor@mpi.govt.nz; tél.: +64 99093548; télécopie: +64 99095739).

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) par l'intermédiaire du Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org), qui la renverra au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD).

7. Remerciements

La première ébauche du présent protocole a été rédigée par M.M. López (Centro de Protección Vegetal, IVIA, Espagne (voir section précédente) avant d'être révisée par R. Taylor (Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, Nouvelle-Zélande (voir section précédente)) et R. Roberts (Tree Fruit Research Laboratory, USDA-ARS, États-Unis).

La plupart des techniques décrites ont été évaluées par des essais circulaires dans le cadre du projet DIAGPRO financé par l'Union européenne en 2003, du projet Euphresco en 2009 et d'un projet espagnol en 2010.

8. Références

La présente annexe contient des renvois aux NIMP. Les NIMP sont en ligne sur le Portail phytosanitaire international (PPI): <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

- Auteurs anonymes.** 1998. Directive 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* *Journal officiel des Communautés européennes*, L235: 1–39.
- Ayers, S.H., Rupp, P. et Johnson, W.T.** 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. *US Department of Agriculture Bulletin*, 782.
- Bereswill, S., Jock, S., Aldridge, P., Janse, J.D. et Geider, K.** 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 215–225.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. et Geider, K.** 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522–3526.
- Bonn, W.G. et van der Zwet, T.** 2000. Distribution and economic importance of fire blight. In J. Vanneste, (sous la direction de) *Fire blight: The disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*, p. 37–54. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International. 370 p.
- Bradbury, J.F.** 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Kew, Surrey, Royaume-Uni, CAB International Mycological Institute. 332 p.
- Burrill, T.J.** 1883. New species of *Micrococcus* (bacteria). *The American Naturalist*, 17: 319.
- Donat, V., Biosca, E.G., Peñalver, J. et López, M.M.** 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1639–1649.
- Dreo, T., Duffy, B., López, M., Paulin, J.P., Poliakoff, F. et Reisenzein, H.** 2009. *Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight (Erwinia amylovora)*. York, Royaume-Uni, EUPHRESKO. En ligne à l'adresse <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=662> (dernier accès en septembre 2012).
- Gorris, M.T., Cambra, M., Llop, P., López, M.M., Lecomte, P., Chartier, R. et Paulin, J.P.** 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411: 41–45.
- Gottsberger, R.A.** 2010. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 285–292.
- Ishimaru, E.S. et Klos, E.J.** 1984. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology*, 74: 1342–1345.
- Jock, S., Donat, V., López, M.M., Bazzi, C. et Geider, K.** 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology*, 4: 106–114.
- Jones, A. et Geider, K.** 2001. II Gram negative bacteria. B. *Erwinia* and *Pantoea*. In N.W. Schaad, J.B. Jones et W. Chum, (sous la direction de) *Guide for identification of plant pathogenic bacteria*, deuxième édition. St Paul (Minnesota), APS Press.
- Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L. et Geider, K.** 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *International Journal of Systemic Bacteriology*, 49: 899–906.
- Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S. et Geider, K.** 2001a. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 147: 2951–2959.
- Kim, W.S., Jock, S., Rhim, S-L. et Geider, K.** 2001b. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease*, 85: 1183–1188.

- King, E.O., Ward, M. et Raney, D.E.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301–307.
- Lehman, S.M., Kim, W.K., Castle, A.J. et Svircev, S.M.** 2008. Dualplex real-time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. *Phytopathology*, 98: 673–679.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. et López, M.M.** 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071–2078.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. et López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23–31.
- Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J.L., Montesinos, E. et López, M.M.** 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96: 900–907.
- López, M.M., Llop, P., Gorris, M.T., Keck, M., Peñalver, J., Donat, V. et Cambra, M.** 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 99–103.
- López, M.M., Peñalver, J., Arilla, A., Morente, C., Dreo, T., Pirc, M., Poliakoff, F., Dousset, C., Visage, M., Achbani, E., Bersgma-Vlami, M., Drenova, N., Duffy, B., Marín, M., Meekes, E., Moumni, M., Obradovic, A., Palomo, J., Taylor, R., Stockwell, V. et Reisenzein, H.** 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detections. Douzième Atelier international de la SISH sur le feu bactérien. Varsovie (Pologne), 16–20 août 2010, abstract 18.
- López, M.M., Roselló, M.M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R. et Gardan, L.** 2011. *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 61: 561–567.
- Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K. et Sawada, H.** 2012. *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, doi:10.1099/ijes.0.032011-0.
- McManus, P.S. et Jones, A.L.** 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology*, 85: 618–623.
- Obradovic, D., Balaz, J. et Kevresan, S.** 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Mikrobiologija*, 76: 844–852.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, doi:10.1111/epp.12019.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). s.d. EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Paris, OEPP. En ligne à l'adresse <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
- Ordax, M., Biosca, E.G., Wimalajeewa, S.C., López, M.M. et Marco-Noales, E.** 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 106–116.
- Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P. et López, M.M.** 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species. *Trees*, 26: 13–29.
- Paulin, J.P.** 2000. *Erwinia amylovora*: General characteristics, biochemistry and serology. In J. Vanneste, (sous la direction de) *Fire blight: The disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*, p. 87–116. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International. 370 p.
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. et Dreo, J.** 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58: 872–881.

- Powney, R., Beer, S., Plummer, K., Luck, J. et Rodoni, B.** 2011a. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australian Plant Pathology*, 40: 87-97.
- Powney, R., Smits, T.H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Luck, J., Duffy, B. et Rodoni, B.** 2011b. Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *Journal of Bacteriology*, 193: 785-786.
- Rhim, S-L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J-P., Langlotz, C., Kim, S-L. et Geider, K.** 1999. *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology*, 48: 514-520.
- Roselló, M., Peñalver, J., Llop, P., Gorris, M.T., Charter, R., Cambra, M. et López, M.M.** 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 1-12.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In F. Klement, K. Rudolf et D.C. Sands (sous la direction de) *Methods in phytobacteriology*, p. 199–204. Budapest, Akademiai Kiadó.
- Starr, M.P., Cardona, C. et Folsom, D.** 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology*, 41: 9515-9559.
- Stöger, A., Schaffer, J. et Ruppitsch, W.** 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 154: 469-473.
- Tanii A., Tamura, O. et Ozaki, M.** 1981. The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 47: 102.
- Taylor, R.K., Guilford, P.J., Clark, R.G., Hale, C.N. et Forster, R.L.S.** 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 35-43.
- Temple, T.N. et Johnson, K.B.** 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease*, 95: 423-430.
- Temple, T.N., Stockwell, V.O. et Johnson, K.** 2008. Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae*, 793: 497-504.
- Thomson, S.V.** 2000. Epidemiology of fire blight. In J. Vanneste, (sous la direction de) *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, p. 9–36. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 370 p.
- Van der Zwet, T.** 2004. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horticulturae*, 704: 35.
- Van der Zwet, T. et Beer, S.** 1995. Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. *USDA Agricultural Information Bulletin*, No. 631.
- Van der Zwet, T. et Keil, H.L.** 1979. *Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants*. United States Department of Agriculture (USDA) Handbook 510. Washington, DC, USDA.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. et Lane, D.J.** 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. et Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853-2858.
- Wells, J.M., van der Zwet, T. et Hale, C.N.** 1994. Differentiation of *Erwinia* species in the “*amylovora*” group by class analysis of cellular fatty acids. *Journal of Phytopathology*, 140: 31-38.

9. Figures

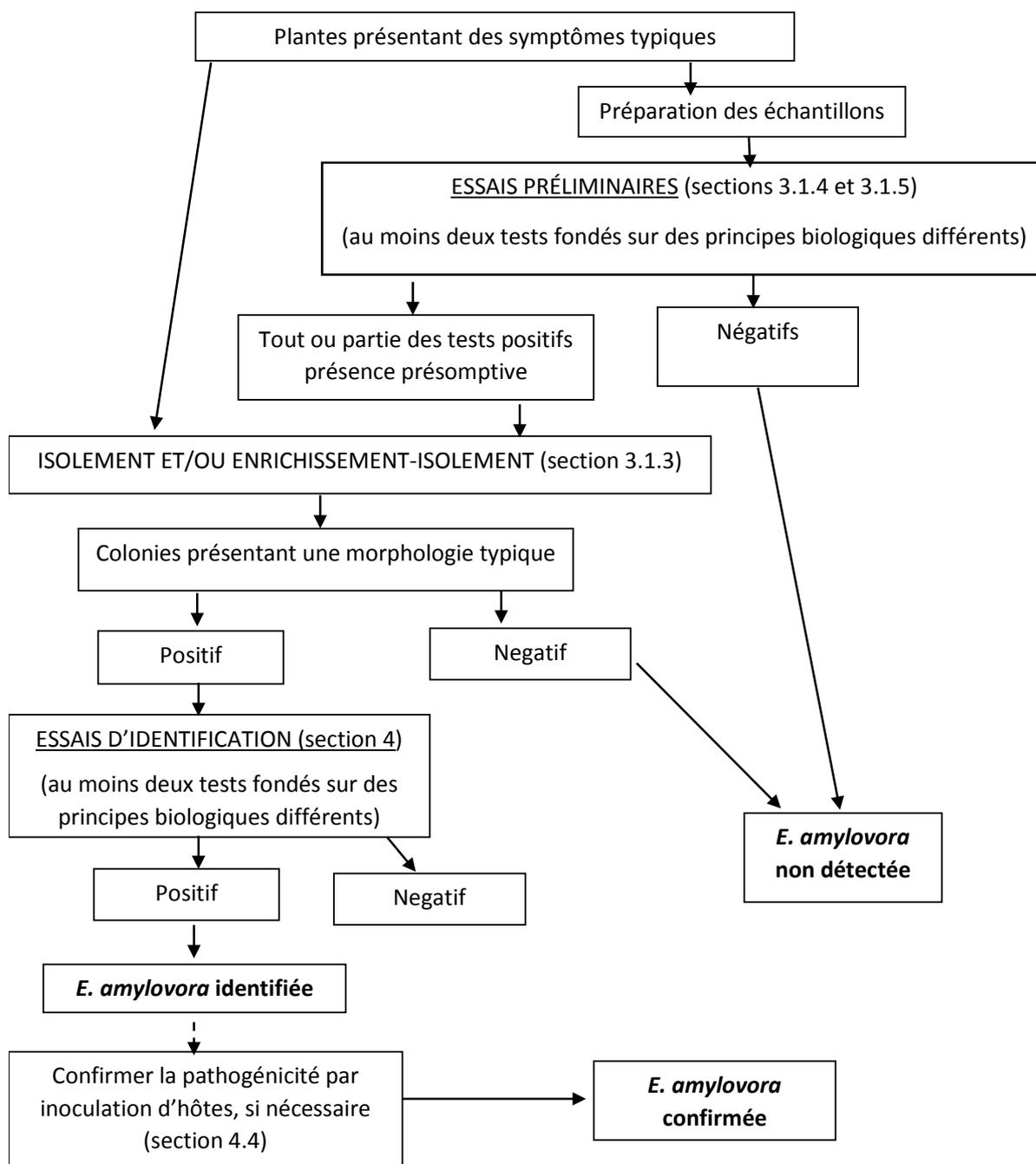


Figure 1. Diagramme de flux de la procédure d'identification d'*Erwinia amylovora* dans les échantillons présentant des symptômes de feu bactérien.

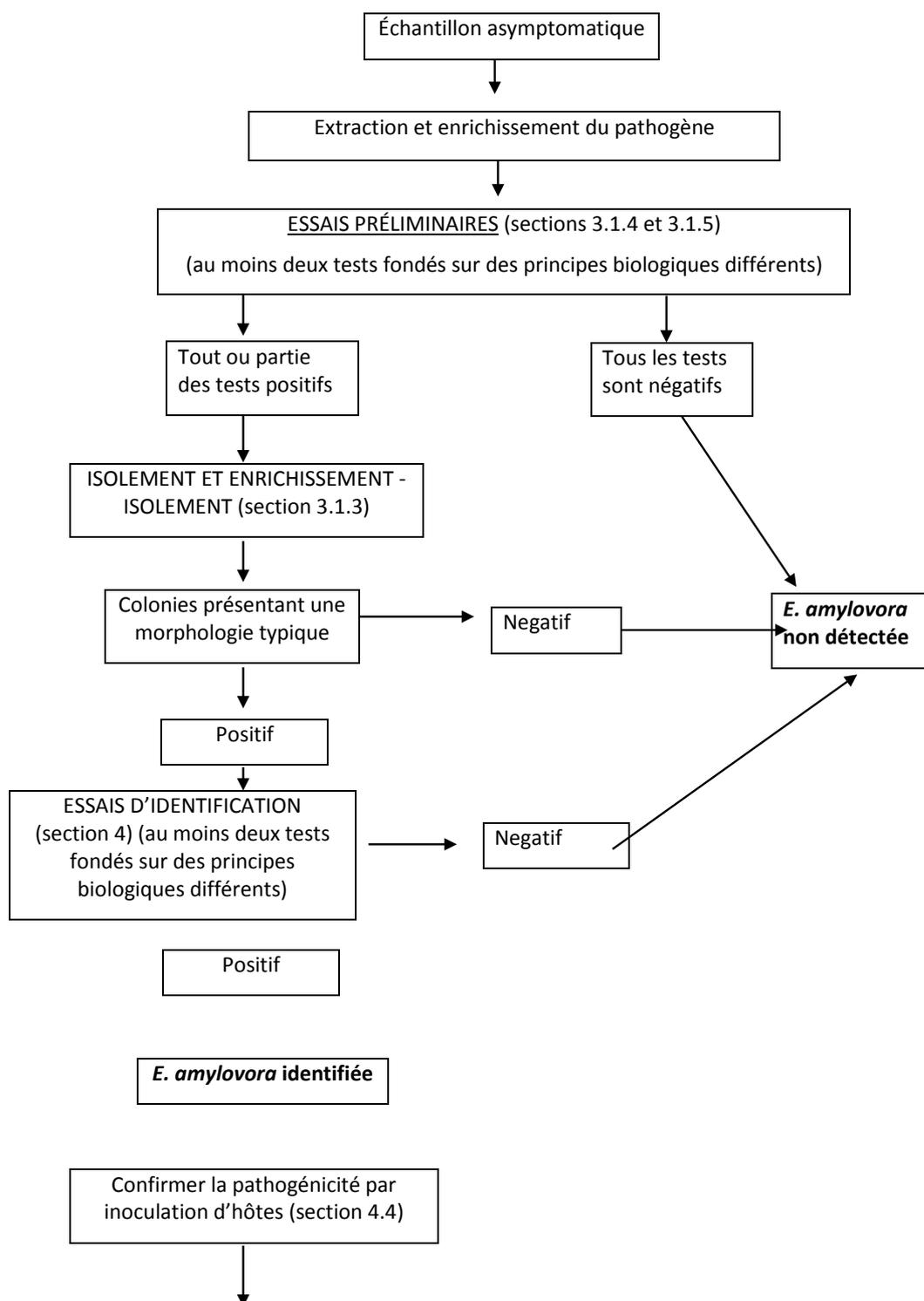


Figure 2. Diagramme de flux de la procédure d'identification d'*Erwinia amylovora* dans les échantillons asymptotiques.

* On peut raisonnablement avoir de fortes présomptions que l'échantillon est infecté par *E. amylovora*, mais il convient de le confirmer en isolant puis en identifiant le pathogène à partir de nouveaux échantillons.

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.

2004-11 Le Comité des normes (CN) ajoute initialement le sujet: *Erwinia amylovora* (2004-009).

2006-04 À sa première session, la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) ajoute le sujet au programme de travail dans le thème: Bactéries.

2012-11 Un premier projet est présenté au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD), pendant sa réunion.

2013-06 Le projet est présenté au GTPD, pendant sa réunion.

2014-05 Le CN approuve le projet en vue de la consultation des membres (2014_eSC_May_08).

2014-07 Consultation des membres.

2015-12 Le groupe de rédaction examine le projet de PD et les réponses aux observations des membres.

2016-03 Le GTPD approuve le texte par décision électronique à des fins d'adoption (2016_eTPDP_Mar_01).

2016-05 Le CN décide par voie électronique de formuler son approbation dans les 45 jours de la période de notification du PD (2016_eSC_May_12).

2016-07 Période de notification du PD.

2016-08 Le CN adopte le PD au nom de la CMP (aucune objection soulevée).

NIMP 27. Annexe 13. *Erwinia amylovora* (2016). Rome, CIPV, FAO.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2016-10.

CIPV

La Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV) est un accord international sur la santé des végétaux qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles. Les voyages et les échanges internationaux n'ont jamais été aussi développés qu'aujourd'hui. Cette circulation des personnes et des biens à travers le monde s'accompagne d'une dissémination des organismes nuisibles qui constituent une menace pour les végétaux.

Organization

- ◆ La CIPV compte plus de 180 parties contractantes.
- ◆ Chaque partie contractante est rattachée à une Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et dispose d'un Point de contact officiel de la CIPV.
- ◆ Neuf organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) agissent pour faciliter la mise en œuvre de la CIPV dans les pays.
- ◆ La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider au renforcement des capacités régionales et nationales.
- ◆ Le Secrétariat est fourni par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).



Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome (Italie)

Tél: +39 06 5705 4812 - Télécopie: +39 06 5705 4819

Courriel: ippc@fao.org - Site Internet: www.ippc.int