

## Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/009

Version : 1.0

Avril 2024

# Détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* sur semences de haricot (*Phaseolus vulgaris*)

**Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences (GEVES) – Laboratoires de l'unité technique détection de bioagresseurs.**

**Laboratoire National de Référence : Bactéries phytopathogènes « Bactéries réglementées non de quarantaine sur semences vraies (sauf *Clavibacter michiganensis* subsp *insidiosus*) »**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété du GEVES. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée : GEVES, Méthode d'analyse en santé des végétaux, Détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* sur semences de haricot (*Phaseolus vulgaris*) ; M-GEVES/SV/MO/009, version 1.0 ; © 2024

### Historique de la méthode

Modification majeure : une modification majeure est une modification qui porte sur le domaine d'application de la méthode, sur un point critique de la méthode et qui peut avoir une influence sur la qualité du résultat dans la mesure où elle modifie les critères de performance de la méthode. Avant de valider une modification majeure, une étape de validation partielle ou totale est nécessaire.

Modification mineure : une modification mineure est une modification qui n'influence pas les critères de performance de la méthode. Il s'agit de modification de type correction mineure, précision, reformulation. Une modification mineure ne nécessite pas de validation.

**Tableau 1 - Récapitulatif des différentes versions de la méthode.**

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
ANSES-LSV-MOA030-V1a	Janvier 2013	-	Création
M-GEVES-SV-MO-009 v1.0	Avril 2024	Majeure	Prise en charge de la méthode par le LNR Santé des Végétaux du GEVES Modification de l'étape d'identification par qPCR

## Sommaire

<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>4</b>
1.1	<i>Validation de la méthode</i> .....	4
<b>2</b>	<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Objet et domaine d'application</b> .....	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>Principe de la méthode</b> .....	<b>7</b>
<b>6</b>	<b>Réactifs et matériels</b> .....	<b>8</b>
6.1	<i>Réactifs</i> .....	8
6.1.1	Partie A : extraction et isolement sur milieux.....	8
6.1.2	Partie B : identification par qPCR .....	8
6.1.3	Partie C : identification par test de pouvoir pathogène .....	9
6.2	<i>Matériel</i> .....	9
6.2.1	Partie A : extraction et isolement sur milieux .....	9
6.2.2	Partie B : identification par qPCR .....	9
6.2.3	Partie C : identification par test de pouvoir pathogène .....	9
<b>7</b>	<b>Echantillons</b> .....	<b>10</b>
7.1	<i>Taille, conditionnement</i> .....	10
7.2	<i>Conservation</i> .....	10
7.3	<i>Critères d'acceptation</i> .....	10
<b>8</b>	<b>Mode opératoire</b> .....	<b>10</b>
8.1	<i>Prise d'essai</i> .....	10
8.2	<i>Partie A : Extraction et isolement sur milieux</i> .....	10
8.2.1	Extraction par macération .....	10
8.2.2	Isolement sur milieux .....	10
8.3	<i>Partie B : identification par qPCR</i> .....	13
8.3.1	Réalisation de la qPCR.....	13
8.3.2	Interprétation de la qPCR .....	14
8.4	<i>Partie C : identification par test de pouvoir pathogène</i> .....	15
<b>9</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>17</b>
<b>10</b>	<b>Devenir des reliquats d'échantillon après analyse</b> .....	<b>17</b>
<b>11</b>	<b>Annexes</b> .....	<b>18</b>
11.1	<i>Milieu PTSCA</i> .....	18
11.2	<i>Milieu YDC</i> .....	18
11.3	<i>Eau saline stérile</i> .....	18
<b>12</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>19</b>
<b>13</b>	<b>Crédits (photos)</b> .....	<b>20</b>

## 1 Introduction

Cette méthode est basée sur la méthode ANSES MOA 030 v1 (2013), la méthode ISF v4.1 « Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and pv. *phaseoli* var. *fuscans* in Bean Seed » (2019) et sur la méthode ISTA 7-021 v3.2 (2021).

Les dénominations des *Xanthomonas* responsables de la gousse commune du haricot dans cette méthode sont *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) et *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*). Il existe d'autres dénominations de ces pathogènes : *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* et *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*.

La gousse commune du haricot causée par *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) et *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*) est l'une des bactérioses la plus dévastatrice sur haricot (*Phaseolus vulgaris*, Rodríguez De Luque and Creamer 2014). Ces bactéries peuvent être présentes de façon asymptomatique dans les plantes et les semences et se disséminent principalement par les semences (Belete and Bastas 2017). Dans ce contexte, il est essentiel de pouvoir détecter ces bactéries dans les semences afin de limiter la propagation de la maladie.

*Xap-Xff* ont été déclarés organismes réglementés non de quarantaine (ORNQ) sur semences de haricot selon le règlement d'exécution de l'Union Européenne 2019/2072. Il est donc interdit d'introduire ou de faire circuler des semences de haricot contaminées par *Xap-Xff* sur le territoire de l'Union Européenne (art. 37, RE 2016/2031). Pour éviter la propagation de cette bactérie, la méthode officielle présentée ici peut être appliquée.

La précédente méthode de détection officielle (MOA 030) est issue de travaux de l'ANSES, l'ISTA, l'INRAe et le GEVES. Cette méthode était basée sur une étape d'indentification par isolement sur milieux suivie d'une identification par PCR et/ou par pouvoir pathogène. La nouvelle méthode proposée ici reprend les mêmes étapes que la méthode MOA 030 à l'exception de la PCR qui est remplacée par une PCR TaqMan en temps réel (qPCR) issue de la méthode ISF et mise au point par Baldwin (2016) sur la base de Wu *et al.* (2008) et de Audy *et al.* (1994). Cette PCR présente l'avantage d'avoir un contrôle interne d'amplification, l'interprétation des résultats est simplifiée et elle permet d'éliminer les risques que comporte l'électrophorèse sur gel avec bromure d'éthidium.

### 1.1 Validation de la méthode

Les données de validation de cette méthode sont présentées dans le **Tableau 2**.

Les critères de performance de chaque étape de la méthode ont été évalués. Ils ont été évalués au GEVES pour l'étape d'isolement sur milieux (ANA/PAT/VAL/MET/E/043), par l'ISHI-Veg (ISF, Baldwin 2019) et le GEVES (ANA/PAT/VAL/MET/E/043) pour l'étape d'identification par qPCR et par l'ISTA (Grimault 2012) pour l'étape d'identification par test de pouvoir pathogène.

L'étape d'extraction et d'isolement des bactéries s'effectue sur le milieu PTSCA qui donne des résultats équivalents aux deux autres milieux MT et XCP1 utilisés dans d'autres méthodes.

L'évaluation de la sensibilité analytique de la qPCR montre que la qPCR fonctionne pour des suspensions bactériennes à un  $DO_{600nm} \approx 0.05$  comme préconisé dans la méthode.

La spécificité analytique, la sensibilité diagnostique, la spécificité diagnostique, l'exactitude, l'accordance et la concordance de la qPCR ont un niveau de 100 %. La robustesse de cette qPCR a été validée en testant différents mix qPCR, les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'effet majeur sur les résultats en cas de variation du mix qPCR.

L'étape d'identification par test de pouvoir pathogène est réalisée à partir d'une suspension bactérienne à  $10^7$  cfu/mL, il n'est donc pas nécessaire d'évaluer la sensibilité analytique. Des essais ont montré que M-GEVES/SV/MO/009, version 1.0

ce test fonctionnait sur des suspensions autour de la concentration d'usage préconisée ( $10^7$  cfu/mL soit  $DO_{600nm} \approx 0.05$ ). La spécificité analytique de cette étape a été évaluée avec une inclusivité de 97.6 % (deux résultats faux négatifs sur 30 souches cibles testées) et une exclusivité de 98.9 % (un résultat faux positif sur 30 souches non-cibles testées). La sensibilité diagnostique et la spécificité diagnostique de cette étape correspondent respectivement à l'inclusivité et l'exclusivité (spécificité analytique) car dans le cas de cette étape, l'évaluation est faite à partir de souches pures. L'exactitude de cette étape a un niveau satisfaisant (98.3 %). L'accordance de cette étape n'a pas été évaluée, cependant la concordance a été évaluée à 96.6 % avec 96.2 % dans le cas de souches cibles et à 97.8 % dans le cas de souches non-cibles.

**Tableau 2 - Niveaux des critères de performance de la méthode.** ND : non déterminé. NA : non applicable.

Critère de performance		Méthode complète	Partie A isolement sur milieux <sup>1</sup>	Partie B identification par qPCR	Partie C identification par test de pouvoir pathogène <sup>3</sup>
Sensibilité analytique		ND	ND	De $DO_{600nm} = 0.001$ à $1.730$ <sup>1,2</sup>	NA
Spécificité analytique	Inclusivité	ND	ND	100 % <sup>1</sup>	97,6 %
	Exclusivité	ND	ND	100 % <sup>1</sup>	98,9 %
Sensibilité diagnostique		ND	PTSCA équivalent aux milieux MT et XCP1	100 % <sup>1</sup>	97,6 %
Spécificité diagnostique		ND		100 % <sup>1</sup>	98,9 %
Exactitude		ND		100 % <sup>1</sup>	98,3 %
Accordance		ND		100 % <sup>1</sup>	ND
Concordance		ND	ND	100 % <sup>1</sup>	96.6 % (96,2 % pour des souches cibles et 97,8 % pour des souches non-cibles)
Robustesse		ND	ND	Absence d'effet en cas de variation du kit PCR <sup>2</sup>	ND

<sup>1</sup> : données issues du rapport de validation du GEVES (ANA/PAT/VAL/MET/E/043)

<sup>2</sup> : données issues du rapport de validation ISHI-Veg (Baldwin 2019)

<sup>3</sup> : données issues du rapport de validation ISTA (Grimault 2012) et de l'ANSES

## 2 Avertissements et précautions de sécurité

S'agissant d'une méthode de laboratoire, il est du ressort de l'utilisateur de la présente méthode d'appliquer cette méthode dans le respect des bonnes pratiques de laboratoires. L'utilisateur est responsable de l'application des règles d'hygiène et sécurité en conformité avec la réglementation en vigueur.

En particulier il est attiré l'attention sur le travail en condition d'exposition à des semences traitées. L'utilisateur de la présente méthode, conscient des risques associés, s'engage à s'assurer du port d'équipements de protection individuelle et/ou d'utilisation d'équipements de protection collective en fonction des risques associés aux produits de traitement appliqués sur les semences.

A l'issue des essais, il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente méthode de s'assurer de l'élimination des déchets dans le respect des obligations légales a minima et en visant à limiter au maximum l'impact de l'activité sur l'environnement.

Dans le cas où la méthode nécessite l'emploi de matériel, l'utilisation de tout matériel doit être faite dans le respect des prescriptions du fabricant.

### 3 Objet et domaine d'application

Cette méthode permet de déterminer la qualité sanitaire d'échantillons de semences de haricot vis-à-vis de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) et de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*).

Cette méthode est applicable sur semences non traitées, elle n'a pas été validée sur semences traitées par pelliculage ou enrobage. Il est possible que le traitement ait une incidence sur l'étape d'isolement des bactéries. Néanmoins, lorsque la méthode est appliquée sur semences pelliculées et que les contrôles sont conformes (notamment le contrôle **Spiking**), l'analyse peut être validée. La méthode n'est pas applicable sur semences enrobées.

Cette méthode qualitative comprend une première étape d'extraction et d'isolement des bactéries suspectes sur milieux semi-sélectifs. Suite à cet isolement, les colonies suspectes doivent être identifiées par qPCR ou par un test de pouvoir pathogène sur plantes.

### 4 Termes, sigles et définitions

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

CFU : colonie formant unité

GEVES : Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

IAC : Internal Amplification Control

INRAe : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

ISF : International Seed Federation

ISHI-Veg : International Seed Health Initiative for Vegetable crops

ISTA : International Seed Testing Association

LNR : Laboratoire National de Référence

MMS : Masse de Milles Semences (en g)

NA : non applicable

NAC : Negative Amplification Control

ND : Non Déterminé

NPC : Negative Process Control

NTC : Non Template Control

ORNQ : Organisme Réglementé Non de Quarantaine

PAC : Positive Amplification Control

PPC : Positive Process Control

RE : Règlement d'Exécution

UE : Union Européenne

*Xap* : *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

*Xff* : *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*

## 5 Principe de la méthode

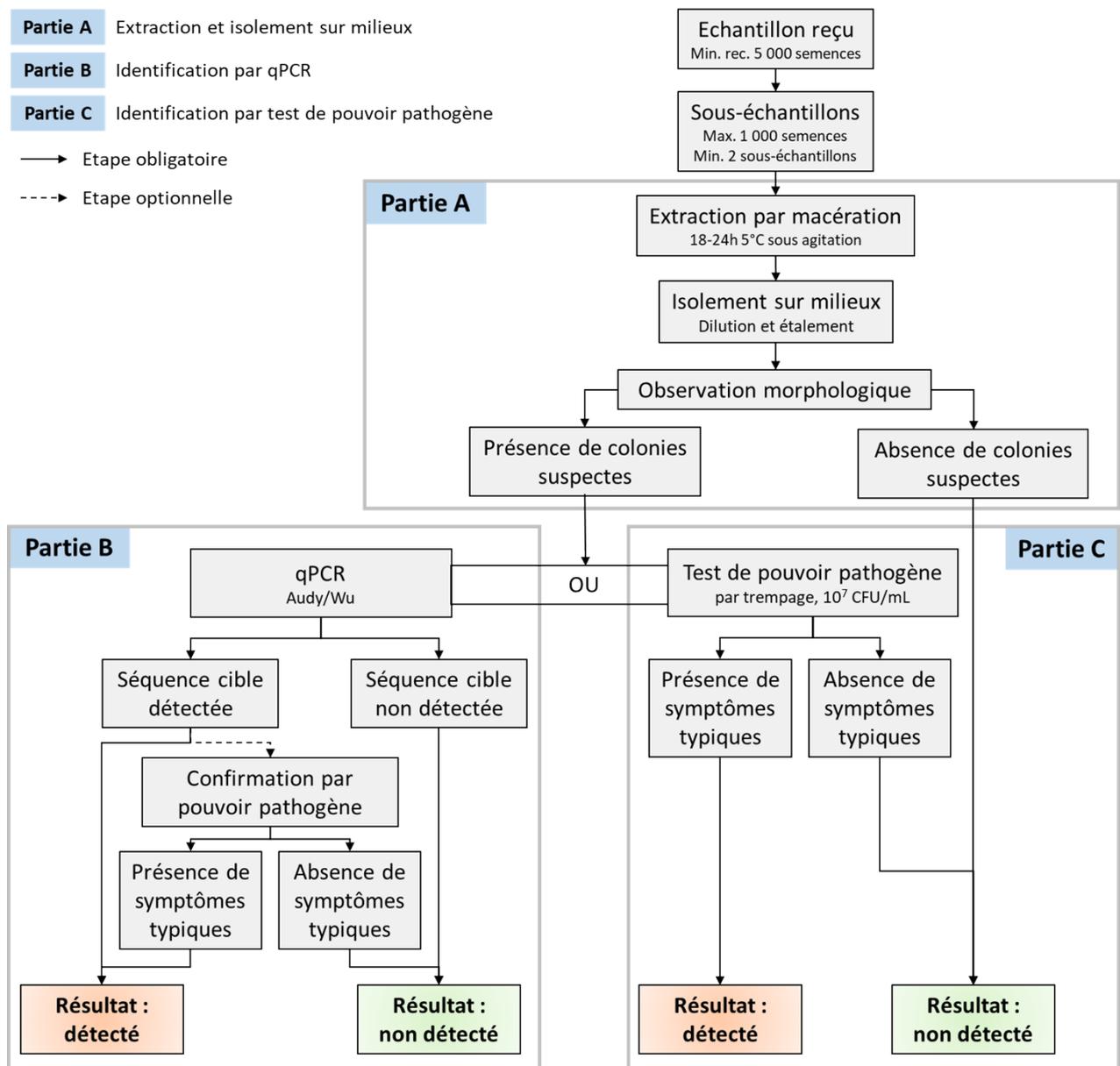
La méthode est décrite comme suit (**Figure 1**).

La méthode est divisée en trois parties différentes :

- Partie A : extraction et isolement sur milieux
- Partie B : identification par qPCR
- Partie C : identification par test de pouvoir pathogène

Elle peut être réalisée des deux façons suivantes :

- Extraction et isolement sur milieux des bactéries suspectes puis identification des colonies suspectes par qPCR (Partie A et Partie B)
- Extraction et isolement sur milieux des bactéries suspectes puis identification des colonies suspectes par test de pouvoir pathogène (Partie A et Partie C)



**Figure 1 - Principe de la méthode de détection de *Xap-Xff* sur semences de haricot.**

## 6 Réactifs et matériels

Le matériel de mesure utilisé doit respecter les considérations métrologiques présentées dans le **Tableau 3**. Les recommandations du fournisseur concernant les conditions de stockage et de conservation des réactifs ou du matériel doivent être suivies.

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des réactifs ou matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cependant, des réactifs ou matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

**Tableau 3 – Considérations métrologiques concernant le matériel et les réactifs utilisés dans cette méthode.**

Paramètre		Ecart maximal toléré
Volume	< 10mL	± 10 %
	≥ 10 mL	± 5 %
Masse		± 10 %
pH		± 0.3
Température	Incubateur	± 3 °C
	Réfrigérateur	5°C (± 4 °C)
	Congélateur	≤ -18 °C
	Serre/module climatique	± 5°C
Longueur		± 10 %
Temps		± 10 %

### 6.1 Réactifs

Le laboratoire doit disposer d'une solution désinfectante à action bactéricide (exemple : alcool à 70 %). La composition des différents réactifs indiqués avec une \* est détaillée en **Annexe**.

#### 6.1.1 Partie A : extraction et isolement sur milieux

- Eau osmosée stérile
- Milieu PTSCA\*
- Milieu YDC\*
- Solution saline stérile\*
- Souche de référence de *Xap-Xff*

#### 6.1.2 Partie B : identification par qPCR

- Eau osmosée stérile
- Eau ultra pure de qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire
- Colonies des souches suspectes
- Colonies d'une souche de référence de *Xap-Xff*
- Colonies d'une autre bactérie que *Xap-Xff*
- ADN de la souche de référence de *Xap-Xff*
- ADN d'une autre bactérie que *Xap-Xff*
- Amorces et sondes pour la qPCR Audy/Wu (**Tableau 4** ci-dessous)
- Mélange pour qPCR Taqman (exemple : PerfeCTa Multiplex qPCR Toughmix)

**Tableau 4 – Amorces et sondes utilisées pour la qPCR Audy/Wu.** Ces qPCR ont été développées par Baldwin (2016) sur la base des travaux de Audy *et al.* (1994) et de Wu *et al.* (2008). Les fluorophores indiqués en vert peuvent être adaptés.

Nom de la qPCR	Nom de l'amorce	Séquence (5'→3')
Audy	Au-F1	ACGGCCGGCGTCTTGTCTCT
	Au-R1	GCCGAGGTCCGCGAGATTCT
	Au-1FAM	FAM-CGTCTCTGGCTTGACTGCGGTCCG-BHQ-1
Wu	Wu-F	CAACGCGAAGAACCTTACC
	Wu-R	ACGTCATCCCCACCTTCC
	Wu-Pr2	VIC-ACGACAGCCATGCAGCACCT-QSY

### 6.1.3 Partie C : identification par test de pouvoir pathogène

- Eau stérile
- Colonies d'une souche de référence de *Xap-Xff*
- Colonies d'une bactérie *Xanthomonas euvesicatoria*
- Plantes d'une variété de haricot sensible à *Xap-Xff* (exemple de variété : Michelet, Contender ou Flavert)

## 6.2 Matériel

### 6.2.1 Partie A : extraction et isolement sur milieux

- Sac plastique étanche
- Module à 5 °C avec agitation
- Pipette de transfert
- Agitateur vortex
- Boîtes de Petri
- Réfrigérateur
- Oeses
- Tubes stériles
- Etuve ou incubateur à 28 °C
- Micropipette
- Congélateur (si nécessaire)

### 6.2.2 Partie B : identification par qPCR

- Tubes stériles résistants à la chaleur
- Oeses
- Bain sec ou équivalent chauffant à 95 °C
- Thermocycleur pour qPCR capable de mesurer la fluorescence des fluorophores présents sur les sondes
- Congélateur (si nécessaire)
- Micropipettes
- Cônes à filtre de volume adapté aux micropipettes utilisées
- Plaques ou microtubes pour qPCR adaptés au thermocycleur

### 6.2.3 Partie C : identification par test de pouvoir pathogène

- Module climatique (entre 20 et 30 °C, cycle jour/nuit 16h/8h, 95 % d'humidité relative)
- Micropipettes dispensant des volumes adaptés
- Oeses
- Cônes de volume adapté aux micropipettes utilisées
- Récipient pour contenir l'inoculum

## 7 Echantillons

### 7.1 Taille, conditionnement

L'échantillon doit être envoyé dans un contenant fermé de façon étanche pour éviter la perte des semences.

Taille de l'échantillon minimum recommandée : 5 000 semences

Taille des sous-échantillons maximum : 1 000 semences

Nombre de sous-échantillons minimum par échantillon : 2

### 7.2 Conservation

Dès sa réception, l'échantillon doit être conservé à environ 5 °C de façon étanche.

### 7.3 Critères d'acceptation

Il est de la responsabilité du préleveur de fournir un échantillon représentatif du lot de semences à analyser. L'échantillon doit être en parfait état de conservation et contenu dans un sachet fermé sans humidité.

Il est recommandé de fournir la MMS (masse de 1 000 semences) de l'échantillon.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Prise d'essai

L'échantillon sera divisé en sous-échantillons (maximum 1 000 semences par sous-échantillon). Les sous-échantillons sont réalisés par pesée selon la MMS fournie par le demandeur ou évaluée par le laboratoire d'analyse. La MMS peut être déterminée par comptage et pesée de 3 x 100 semences ou par un autre système validé.

### 8.2 Partie A : Extraction et isolement sur milieux

#### 8.2.1 Extraction par macération

1. Pour chaque sous-échantillon, les semences sont transférées dans des sachets en plastique étanche.
2. Ajouter un volume d'eau osmosée stérile dans chaque sachet. Le volume d'eau (en mL) à ajouter correspond à 2,5 fois la masse des semences (en g).
3. Préparer un sachet sans semences contenant de l'eau osmosée stérile (pour le **NPC 1**).
4. Laissez les sachets à 5 °C pendant 18 à 24 h sous agitation. Veiller à ce que les semences s'imbibent correctement (gonflement et ramollissement des semences).

#### 8.2.2 Isolement sur milieux

##### 8.2.2.1 *Dilutions et étalements*

La composition des milieux utilisés (solution saline stérile, PTSCA et YDC) est détaillée en **Annexe**. De manière générale les contrôles doivent être préparés et manipulés séparément des échantillons pour éviter toute contamination croisée. Prélever une partie du macérat de chaque sous-échantillon, effectuer les dilutions nécessaires puis étaler sur boîtes.

1. Pour chaque sous-échantillon étaler :
  - 100 µL de macérat sur 1 boîte de PTSCA
  - 100 µL de macérat dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans une solution saline stérile sur 1 boîte de PTSCA
  - 100 µL de macérat dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution saline stérile sur 1 boîte de PTSCA

2. Préparer les contrôles présentés dans le **Tableau 5** en suivant les instructions suivantes :
  - Pour le **PPC** étaler une suspension d'une souche de référence de *Xap* ou *Xff* sur 1 boîte de PTSCA. La suspension utilisée doit être calibrée à une concentration permettant d'obtenir des colonies isolées.
  - Pour le **NPC 1** prendre le macérat du sachet sans semence (Etape 8.2.1) et étaler 100 µL de macérat sur 1 boîte de PTSCA.
  - Pour le **NPC 2** étaler 100 µL de solution saline stérile (utilisée pour les dilutions des macérats des échantillons) sur 1 boîte de PTSCA.
  - En cas de semences traitées : préparer un contrôle **Spiking** en diluant une suspension d'une souche de référence de *Xap* ou *Xff* dans le macérat d'un sous-échantillon. Ce mélange (suspension de *Xap Xff* + macérat d'un sous-échantillon) doit être calibrée de sorte que le macérat spiké soit à la même concentration que le PPC. Etaler ensuite 100 µL de macérat spiké sur 1 boîte de PTSCA.

**Tableau 5 – Contrôles à mettre en place lors de l'étape d'isolement sur milieux.**

Nom		Composition	Résultat attendu
PPC	Positive process control	Suspension d'une souche de référence de <i>Xap</i> ou <i>Xff</i> sur PTSCA.	Présence de colonies isolées de <i>Xap-Xff</i> .
NPC 1	Negative process control 1	Macérat d'un sachet sans semences sur PTSCA.	Absence de colonies de <i>Xap-Xff</i> .
NPC 2	Negative process control 2	Solution saline stérile (utilisée pour les dilutions des macérats des échantillons) sur PTSCA.	
Spiking		Macérat de semences spiké avec une souche de référence de <i>Xap</i> ou <i>Xff</i> puis étalé sur PTSCA.	Présence de colonies <i>Xap-Xff</i>

3. Toutes les boîtes préparées seront incubées à 28°C pendant 3 à 6 jours. Garder les macérats au réfrigérateur jusqu'à la lecture des boîtes.

#### 8.2.2.2 Lecture des boîtes

Vérifier d'abord la conformité des contrôles pour pouvoir interpréter les résultats des sous-échantillons.

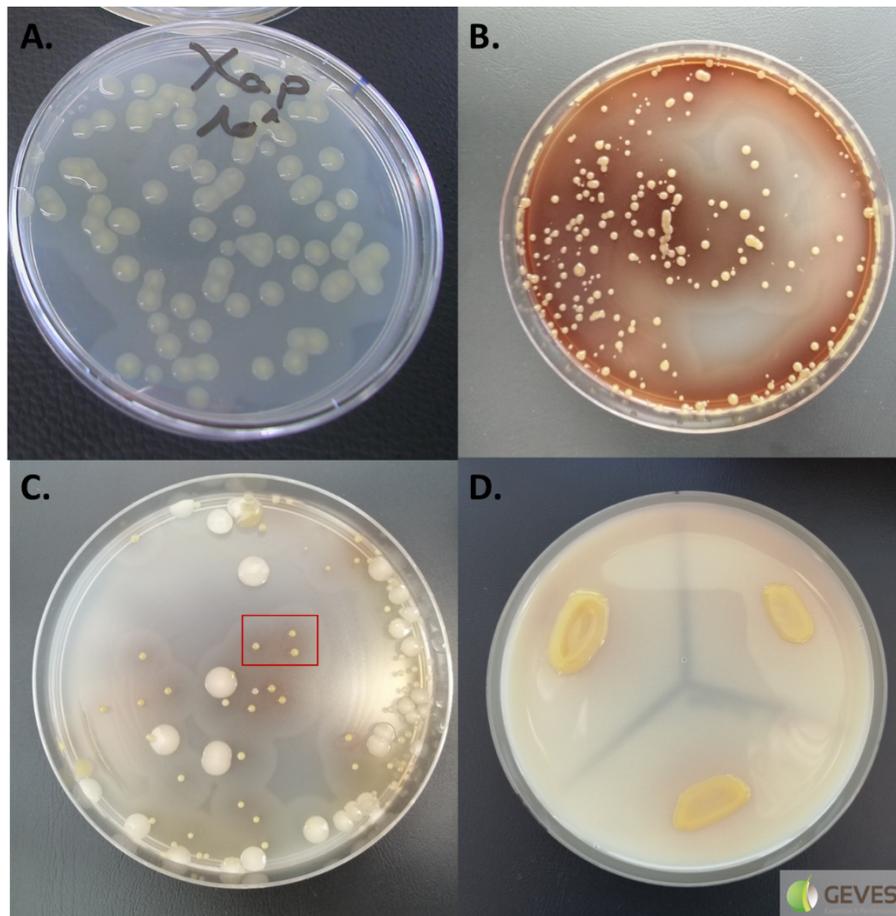
1. Les colonies de *Xap-Xff* (**Figure 2**) sont décrites comme suit après 3 à 6 jours de croissance sur PTSCA :
  - Jaunes, bombées, muqueuses
  - Entourées d'un halo d'hydrolyse de l'amidon
  - Diffusion d'un pigment brun dans le cas des souches de la lignée génétique fuscans
2. Après 3 à 6 jours d'incubation vérifier la conformité des contrôles (**Figure 2A et B**) suivant le **Tableau 5** (résultat attendu). En cas de semences traitées : un résultat final négatif sur un échantillon ne peut être validé que si le Spiking est conforme.
3. Comparer les boîtes des sous-échantillons au **PPC** et faire une estimation du nombre de colonies suspectes *Xap-Xff* ressemblant au **PPC**. Une estimation du nombre de colonies totales peut être faite pour juger de la difficulté de lecture.
4. Si des colonies suspectes ressemblant au **PPC** sont présentes sur les boîtes d'au moins un sous-échantillon, passer à l'étape suivante (8.2.2.3).  
Si les contrôles sont conformes et qu'il n'y a pas de colonies ressemblant au **PPC** sur les boîtes de tous les sous-échantillons, le résultat final de l'analyse est négatif (*Xap-Xff* non détecté).

En cas de semences traitées : Si aucune colonie suspecte n'est présente sur les boîtes des sous-échantillons et sur les **Spiking** le résultat final de l'analyse est indéterminé.

### 8.2.2.3 Repiquage

1. Si des colonies suspectes sont présentes sur boîtes, en repiquer au minimum 2 par sous échantillon sur milieu YDC (**Figure 2D**). Une colonie du PPC doit aussi être repiquée sur YDC, sur une boîte séparée des colonies suspectes à tester.
2. Incuber les boîtes des repiquages à 28 °C pendant 1 à 3 jours.
3. Observer les repiquages : les colonies suspectes ayant un aspect proche du **PPC** (jaunes, muqueuses, pigment brun si présence de souches fuscans, (voir **Figure 2**) devront être identifiées par qPCR ou par test de pouvoir pathogène. Si toutes les colonies repiquées ne ressemblent pas au **PPC**, le résultat final de l'analyse est négatif (*Xap-Xff* non détecté).

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 par sous échantillon.



**Figure 2 – Photographie de différentes boîtes de Petri contenant *Xap-Xff*.** Colonie de *Xap-Xff* non fuscans (A) et fuscans (B) sur milieu PTSCA, exemple de colonies suspectes (encadrées en rouge) sur milieu PTSCA (C) et aspects de colonies suspectes après repiquage sur YDC (D). Crédit photo : © GEVES.

### 8.3 Partie B : identification par qPCR

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

Cette qPCR a été développée par Baldwin (2016) sur la base des travaux d'Audy *et al.* (1994) et de Wu *et al.* (2008). De manière générale les contrôles doivent être préparés et manipulés séparément des échantillons pour éviter toute contamination croisée.

#### 8.3.1 Réalisation de la qPCR

1. Réaliser une suspension à environ  $10^7$  cfu/mL ( $DO_{600nm} \approx 0.05$ ) de chaque colonie suspecte dans de l'eau osmosée stérile et préparer les contrôles présentés dans le **Tableau 6**. Les cultures bactériennes doivent être âgées de moins de 5 jours.

**Tableau 6 - Contrôles à mettre en place lors de l'étape d'identification par qPCR.**

Nom		Composition
PPC	Positive process control	Suspension d'une souche de référence ( <i>Xap-Xff</i> ) dans de l'eau osmosée stérile ( $DO_{600nm} \approx 0.05$ )
NPC Souche	Negative process control (souche)	Suspension d'une autre bactérie que <i>Xap-Xff</i> dans de l'eau osmosée stérile ( $DO_{600nm} \approx 0.05$ )
NPC Réactif	Negative process control (réactif)	Eau osmosée stérile utilisée pour les suspensions bactériennes
PAC	Positive amplification control	ADN de <i>Xap-Xff</i>
NAC	Negative amplification control	ADN d'une autre bactérie que <i>Xap-Xff</i>
NTC	Non template control	Eau ultra pure utilisée pour le mélange de qPCR

2. Faire bouillir les suspensions à 95°C pendant 5 minutes. Si besoin, les suspensions peuvent être stockées dans un congélateur.
3. Réaliser pour chaque isolat suspect la qPCR en duplex Audy/Wu. Les séquences des amorces et sondes sont indiquées dans le **Tableau 4**, un exemple de mélange réactionnel et du programme PCR sont présentés dans le **Tableau 7** et **8** respectivement.

Les amorces Wu permettent d'avoir un témoin interne d'amplification (IAC : internal amplification control) en détectant l'ADN de toutes bactéries gram négatives.

**Tableau 7 – Exemple de mélange réactionnel pour la qPCR Audy/Wu.** La composition du mélange peut être adaptée.

Réactif	Concentration mère	Volume (µL)	Concentration finale
H <sub>2</sub> O	-	10.55	-
PerfeCTa Multiplex qPCR Toughmix	5 X	5	1 X
Amorce Au-F1	10 µM	1	0.4 µM
Amorce Au-R1	10 µM	1	0.4 µM
Sonde Au-1FAM	10 µM	0.20	0.08 µM
Amorce Wu-F	10 µM	1	0.4 µM
Amorce Wu-R	10 µM	1	0.4 µM
Sonde Wu-Pr2	10 µM	0.25	0.1 µM
Volume du mélange :		20 µL	
Volume de matrice :		5 µL	
<b>Volume total :</b>		<b>25 µL</b>	

**Tableau 8 – Exemple de programme à suivre pour la qPCR Audy/Wu.**

Étape	Température	Durée	Nombre de cycle
1. Activation de l'ADN polymérase	95 °C	10 min	1
2. Dénaturation	95 °C	15 sec	40
3. Hybridation et élongation	60 °C	1 min	

### 8.3.2 Interprétation de la qPCR

Toute valeur Ct doit être accompagnée d'une courbe exponentielle pour être prise en compte. La valeur du Ct doit être fixée au-dessus du bruit de fond (background), elle peut être fixée automatiquement avec le logiciel associé au thermocycleur ou manuellement.

1. Vérifier d'abord la conformité des contrôles selon le **Tableau 9**, pour pouvoir interpréter les résultats des sous-échantillons.
2. Les résultats qPCR pour chaque isolat sont analysés selon la règle de décision présentée dans le **Tableau 10**. Dans le cas d'un résultat négatif (Ct Audy > 30) sur une souche, le Ct Wu de l'isolat doit sortir au moins 3,3 Ct en amont du Ct Wu du NTC.
3. Si toutes les souches testées sont négatives et que les contrôles sont conformes, le résultat final de l'analyse est négatif. Si des souches sont positives il est possible de confirmer leur pouvoir pathogène (Partie C). Si le résultat final de l'analyse est rendu suite à l'étape d'identification par qPCR, dans le rapport il sera indiqué pour chaque échantillon le nombre de sous-échantillon positif sur le nombre total de sous-échantillons analysés (voir point 10).

**Tableau 9 – Résultats de qPCR attendus pour les contrôles.** Le Ct seuil (Wu) peut être déterminé expérimentalement par le laboratoire. Il est possible que le Ct (Wu) du NTC soit inférieur à 40. Les cases noires indiquent que ce Ct n'a pas d'influence sur l'interprétation.

Matrice qPCR	Résultats qPCR Audy/Wu		Interprétation
	Audy (Ct)	Wu (Ct)	
PPC	+ (≤ 30)		Conforme
NPC Souche	- (> 30)	+ (≤ 30)	Conforme
NPC Réactif	- (> 30)		Conforme
PAC	+ (≤ 30)		Conforme
NAC	- (> 30)	+ (≤ 30)	Conforme
NTC	- (> 30)		Conforme

**Tableau 10 – Règle de décision concernant les résultats qPCR.** Les cases noires indiquent que ce Ct n'a pas d'influence sur l'interprétation.

Résultats qPCR Audy/Wu		Interprétation
Audy (Ct)	Wu (Ct)	
+ (≤ 30)		Résultat positif (+)
- (> 30)	+ (≤ 30 et < Ct NTC - 3,3) - (> 30)	Résultat négatif (-)
- (> 30)	- (> 30 et > Ct NTC - 3,3)	Refaire la préparation de la suspension et/ou la qPCR pour l'isolat concerné, ou identifier en pouvoir pathogène

#### 8.4 Partie C : identification par test de pouvoir pathogène

Cette option est adaptée aux laboratoires non équipés et/ou non expérimentés en biologie moléculaire. Elle nécessite une chambre climatisée ou une serre permettant le maintien d'une forte hygrométrie. Cette option est rapide pour un faible nombre d'isolats si des plants sont rapidement disponibles. La réussite et la fiabilité de ce test dépendent fortement des conditions d'hygrométrie et des concentrations d'inoculum. C'est pourquoi il est essentiel de mettre en place les contrôles indiqués dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11 – Liste des contrôles à mettre en place pour l'identification par test de pouvoir pathogène.**

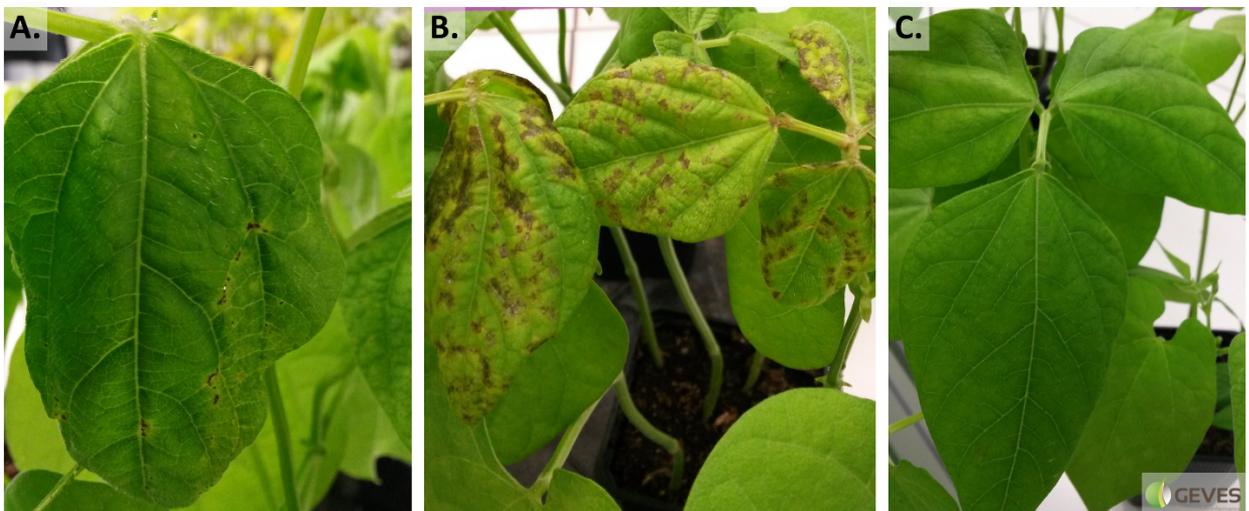
Nom		Description
PPC	Positive process control	Souche de référence de <i>Xap</i> ou <i>Xff</i>
NPC	Negative process control	Souche de <i>Xanthomonas</i> sp. pathogène de la tomate
NTC	Non template control	Eau stérile utilisée pour les suspensions

Réaliser toujours les inoculations dans l'ordre suivant : contrôle négatif, souche(s) suspecte(s), contrôle positif.

1. Cultiver des plants de haricot d'un cultivar sensible à *Xap-Xff* (exemple : Michelet, Contender ou Flavert) à 20-30 °C jusqu'au stade première feuille trifoliée (environ 16 jours après le semis). Prévoir 3 plantes par isolat à tester et par contrôle.
2. La veille de l'inoculation les plantes sont mises dans les conditions suivantes : 16h sous éclairage à 28 °C et 95 % d'humidité relative, puis 8h sans éclairage à 25 °C et 95 % d'humidité relative.
3. Préparer une suspension de chaque isolat et des contrôles à environ  $10^7$  cfu/mL ( $DO_{600nm} \approx 0.05$ ) dans de l'eau osmosée stérile à partir d'une culture fraîche sur boîte (24 à 48h). La suspension doit être d'un volume suffisant pour permettre le trempage des folioles à inoculer (**Figure 3**). Attention, une concentration  $< 10^7$  cfu/mL peut conduire à un résultat faussement négatif tandis qu'une concentration  $> 10^7$  cfu/mL peut conduire à un résultat faussement positif.
4. Pour chaque suspension (souches suspectes et contrôles) : inoculer 3 plantes en trempant la première feuille trifoliée pendant environ 30 secondes dans un récipient contenant l'inoculum (**Figure 3**).
5. Incuber les plantes inoculées dans les conditions suivantes : 16h sous éclairage à 28 °C et 95 % d'humidité relative, puis 8h sans éclairage à 25 °C et 95 % d'humidité relative. Un minimum d'hygrométrie à 95 % est nécessaire pour le développement de symptômes typiques. Une hygrométrie plus faible peut conduire à des problèmes d'interprétation des résultats.
6. Observer le développement des symptômes (de 5 à 11 jours après l'inoculation). Vérifier d'abord la conformité des contrôles pour pouvoir interpréter les résultats des souches suspectes :
  - a. Plantes **NPC** : ne doivent pas présenter de symptômes typiques de *Xap-Xff*
  - b. Plantes **PPC** : doivent présenter des symptômes typiques de *Xap-Xff*Les symptômes typiques de *Xap-Xff* sont les suivants (**Figure 4**) :
  - petites taches grasseuses pouvant s'étendre en plages
  - lésions nécrotiques pouvant entraîner la mort des tissus
7. Comparer les plantes inoculées avec les souches suspectes aux plantes contrôles. Si un isolat engendre des symptômes typiques sur plante (similaire au **PPC**) alors le sous-échantillon est considéré positif et le résultat final de l'analyse est positif. En absence de symptôme dans les 11 jours après l'inoculation le sous-échantillon est considéré comme négatif (*Xap-Xff* non détecté). Si toutes les souches issues d'un échantillon sont négatives, le résultat final est négatif.



**Figure 3 – Photographie de l'étape de trempage de la première feuille trifoliée. Crédit photo : © GEVES.**



**Figure 4 – Photographie de symptômes typiques causés par *Xap-Xff* sur le PPC (A, B) et absence de symptômes sur le NPC (C). Crédit photo : © GEVES.**

## 9 Résultats

Le rapport doit indiquer :

- Le volume (nombre de semences) de l'échantillon
- Le volume (nombre de semences) des sous-échantillons
- Le nombre de sous-échantillons analysés (Y)
- Le nombre de sous-échantillons positifs (X)

Dans le cas d'un résultat final négatif, le rapport indiquera :

**« *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et/ou *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* non détecté dans l'effectif analysé »**

Dans le cas d'un résultat final positif suite à l'étape d'identification par qPCR, le rapport indiquera :

**« Séquence d'ADN de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et/ou *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* détectée dans X sous-échantillon(s) sur Y sous-échantillons(s) analysé(s) »**

Dans le cas d'un résultat final positif suite à l'étape d'identification par test de pouvoir pathogène, le rapport indiquera :

**«*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et/ou *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* détecté dans X sous-échantillon(s) sur Y sous-échantillons(s) analysé(s) »**

Dans le cas d'un résultat final indéterminé suite à l'étape d'isolement sur milieux, le rapport indiquera :

**« Résultat indéterminé : inhibition de la croissance du pathogène (spiking négatif) dans l'effectif analysé »**

## 10 Devenir des reliquats d'échantillon après analyse

Durant l'analyse les macérats sont conservés au réfrigérateur jusqu'à la lecture des boîtes.

Un reliquat représentatif (ADN ou isolat) est conservé dans des conditions qui permettent une possible reprise. Ce reliquat est conservé pendant 15 jours si le résultat final de l'analyse est négatif, ou pendant minimum 12 mois si le résultat final de l'analyse est positif.

## 11 Annexes

### 11.1 Milieu PTSCA

La composition du milieu PTSCA est indiquée dans le **Tableau A**. Ce milieu doit être autoclavé pendant 20 minutes à environ 120 °C. Il peut être conservé pendant 2 mois à 5 °C.

**Tableau A – Composition du milieu PTSCA.** \* : à ajouter après autoclavage.

Composant	Quantité par litre
Bactopeptone	10.0 g
L-tyrosine	1.0 g
Amidon de pomme de terre insoluble (ou soluble)	4.0 g (si soluble : 15.0 g)
Chlorure de sodium (NaCl)	5.0 g
Agar	15.0 g
Eau osmosée	1 L
Céphalexine*	40.0 mg
cycloheximide (Actidione)*	50.0 mg

### 11.2 Milieu YDC

La composition du milieu YDC est indiquée dans le **Tableau B**. Ce milieu doit être autoclavé pendant 20 minutes à environ 120 °C. Il peut être conservé pendant 3 mois à 5 °C.

**Tableau B – Composition du milieu YDC.**

Composant	Quantité par litre
Extrait de levure	10 g
Glucose	20 g
CaCO <sub>3</sub>	20 g
Agar	15 g
Eau osmosée	1 L

### 11.3 Eau saline stérile

Ajouter 8.5 g de NaCl dans 1 litre d'eau déminéralisée.  
Autoclaver pendant 20 minutes à environ 120 °C.

## 12 Bibliographie

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. *Phytopathology*. 84:1185–1192.

Baldwin, T. 2019. Rapport de validation de l'ISF, A real-time PCR assay for the identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* isolates. ISHI-Veg International Technical Group BBPR.

Baldwin, T. 2016. Development and validation of a real-time PCR assay for the identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* isolates.

Belete, T., and Bastas, K. 2017. Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. *J Plant Pathol Microbiol*. 08.

Grimault, V. 2012. Rapport de validation de l'ISTA, ISTA / ISHI comparative test for method 7-021 modification for the identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (sensu Vauterin *et al.*, 2000) on bean seeds 2011. OGM13-06 Method Validation Reports for ISTA Rules 2014. :45–54.

Rodríguez De Luque, J. J., and Creamer, B. 2014. Major constraints and trends for common bean production and commercialization; establishing priorities for future research. *Agron Colomb*. 32:423–431.

Wu, Y. D., Chen, L. H., Wu, X. J., Shang, S. Q., Lou, J. T., Du, L. Z., *et al.* 2008. Gram stain-specific-probe-based real-time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol*. 46:2613–2619.

Règlement d'exécution (UE) 2019/2072 du 28 novembre 2019 (journal officiel de l'Union Européenne), version consolidée du 09/08/2023.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32019R2072>

Règlement (UE) 2016/2031 du 26 octobre 2016 (journal officiel de l'Union Européenne), version consolidée du 14/12/2019.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R2031>

MOA 030 parties A, B et C version 1 a ANSES Détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sur semences de haricot par isolement sur milieu nutritif et identification de la souche, 2013 ([https://www.anses.fr/en/system/files/ANSES\\_LSV\\_MOA030\\_V1a.pdf](https://www.anses.fr/en/system/files/ANSES_LSV_MOA030_V1a.pdf)).

Méthode ISF v4.1 (ISHI-Veg) Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and pv. *phaseoli* var. *fuscans* in Bean Seed, 2019, ([https://259970.vserv2152.swisslink.ch/wp-content/uploads/2019/11/Bean\\_Xap\\_October\\_2019.pdf](https://259970.vserv2152.swisslink.ch/wp-content/uploads/2019/11/Bean_Xap_October_2019.pdf))

Méthode ISTA 7-021 v3.2 : Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in *Phaseolus vulgaris* (bean) seed, 2021. (<https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing/seed-health-methods-product-1014.html>)

Rapport de validation du GEVES de la méthode M-GEVES-SV-MO-009 v1 pour détecter *Xap-Xff* sur semences de haricot (ANA/PAT/VAL/MET/E/043), 2023.

### 13 Crédits (photos)

Figure 2 – Photographie de différentes boîtes de Petri contenant *Xap-Xff*. © GEVES – Septembre 2022  
Tous droits réservés.

Figure 3 – Photographie de l'étape de trempage de la première feuille trifoliée. © GEVES – Septembre 2022  
Tous droits réservés.

Figure 4 – Photographie de symptômes typiques causés par *Xap-Xff* sur le PPC (A, B) et absence de symptômes sur le NPC (C). © GEVES – Septembre 2022  
Tous droits réservés.