



**CENTRE NATIONAL
DE RECHERCHE
APPLIQUEE AU
DEVELOPPEMENT
RURAL**

**LABORATOIRE DE
PATHOLOGIE
VEGETALE**

Ambatobe
101 Antananarivo
Madagascar



Convention spécifique de recherche « Epidémiologie régionale et Biocontrôle des bioagresseurs majeurs des filières végétales »

Composante 4 : Epidémiologie régionale
Action 1 : Maladies et ravageurs de la pomme de terre"

Rapport d'activités – PHASE I Novembre 2016 – Décembre 2017

par

Dr. Santatra Ravelomanantsoa, Chargée du projet EpiBio
Jacqueline Rakotoarisoa, Directeur scientifique

Antananarivo
Décembre 2017

A. Contexte du projet

L'émergence des souches Brown rot (*Ralstonia solanacearum* phylotype IIB-1) du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (ceRs) dans les bassins de cultures maraîchères des Hautes terres centrales de Madagascar est confirmée, et constitue comme la principale cause de la forte chute de la production de pomme de terre vers 2014. L'incidence accrue du flétrissement bactérien (FB) est extrêmement sérieuse, et comme il n'existe pas aujourd'hui de traitement curatif, la dispersion de ces souches représente dans le long terme une menace potentielle pour la filière pomme de terre et d'autres cultures (car elles sont capables d'infecter un large éventail d'espèces végétales), avec une crainte de dispersion vers les régions voisines du SOOI lors des échanges de matériel végétal, bien que ces souches soient déjà présentes. Dans ce contexte, l'urgence réside sans doute dans l'instauration de mesures de prévention et de contrôle de la dissémination de l'inoculum au plan national et entre les pays de la zone SOOI vers l'éradication de souche Brown rot à Madagascar.

C'est dans ce cadre que le projet EpiBio-OI « Epidémiologie régionale et Biocontrôle des bioagresseurs majeurs des filières végétales » - Composante 4 : Epidémiologie régionale - Action 1 : Maladies et ravageurs de la pomme de terre" opère, dans la phase I du projet.

B. Objectifs et stratégies d'intervention

L'assainissement du stock de semences de pomme de terre à Madagascar et la sensibilisation/information/éducation à la prévention représente l'ultime objectif de la phase I du projet et constitue une priorité stratégique. En effet, c'est un préalable permettant de réduire la prévalence et l'incidence de l'infection à un niveau acceptable. Les interventions mises en place visent ainsi à limiter toute possibilité de reprise de la transmission de l'infection.

Les stratégies d'actions entreprises par le Département des Recherches Agronomiques du FOFIFA pour mettre en œuvre les objectifs fixés concernent :

- Des campagnes d'information sur la maladie du flétrissement bactérien, de sensibilisation à la prévention et éducation aux mesures prophylactiques vis-à-vis du flétrissement bactérien ;
- Des renforcements de capacités en matière d'inspection sanitaire : diagnostic du flétrissement bactérien sur la pomme de terre et dépistage des souches de ceRs ;
- La conception et la mise au point de paquets techniques constitués de fiche technique, outil pédagogique, guide de diagnostic, outil moléculaire de détection, guide de bonnes pratiques et mesures prophylactiques ;
- Le diagnostic du ceRs sur le stock de tubercules semences de pomme de terre issus du Centre FIFAMANOR, producteur national de semences de pré-base et de base

Par ailleurs, un intérêt particulier est porté sur la capacité des souches ceRs phylotypes III et I à faire une infection latente, au même titre que le phylotype IIB-1. Dans cette optique, la présence ou non d'infection latente dans les tubercules de pomme de terre est mise en évidence.

C. Réalisations et résultats

1. COMMUNICATION SCIENTIFIQUE – RESTITUTION DE RESULTATS DE RECHERCHE SUR LA DIVERSITE GENETIQUE ET L'EPIDEMIOLOGIE DES SOUCHES CERS PREVALENTES DANS LES BASSINS DE PRODUCTION DE CULTURE DE POMME DE TERRE DES HAUTES TERRES CENTRALES

Trois (03) restitutions ont été réalisées auprès du Centre national de développement rural et de recherche appliquée/FIFAMANOR (14 Décembre 2016), du Centre national de recherche appliquée au développement rural/FOFIFA (03 Mars 2017), et pendant la 5^{ème} édition du Forum de la Recherche consacré à la « Biodiversité et développement durable » qui s'est tenu à Antananarivo (15 juin 2017).

Encadré 1 : Synthèse des messages véhiculés lors des restitutions

Les aspects de la diversité génétique du ceRs dans les bassins de production des Hauts plateaux a été exploré à l'aide de marqueurs moléculaires. L'analyse des données génétiques a démontré la présence de trois phylotypes à Madagascar : phylotypes I, III décrits auparavant et introduction du phylotype IIB-1 à Madagascar. Par ailleurs, l'étude a permis de décrire deux profils épidémiologiques contrastés du phylotype IIB-1 (épidémique) et phylotype III (endémique). Le phylotype IIB-1 est capable d'infection latente dans les tubercules de pomme de terre donc se transmet par les tubercules et a une vocation à faire une épidémie, contrairement au phylotype III. Face à l'émergence des souches de quarantaine IIB-1, la priorité immédiate réside dans l'assainissement du stock national de semences et la sensibilisation aux mesures prophylactiques essentielles pour limiter la dispersion de l'inoculum, bases de raisonnement de lutte intégrée.

Figure 1 : Restitution après des chercheurs du FIFAMANOR œuvrant pour la production de la pomme de terre (14 Décembre 2016)



FORUM DE LA RECHERCHE
« BIODIVERSITE ET OBJECTIFS DU DEVELOPPEMENT DURABLE »
 14-15-16 juin 2017 –Antananarivo
 Programme du Forum de la Recherche

Figure 2 : Participation au Forum de la Recherche du Chercheur chargée du projet EPIBIO au sein du centre FOFIFA (17 Juin 2017)

Horaires	GESTION DURABLE DE LA BIODIVERSITE	
14h30-15h00	<p>Analyse de la filière <i>Crocodylus niloticus</i> en vue de sa gestion durable à Madagascar</p> <p>ROBSOMANITRANDRASANA Eric José et al. Ecole Doctorale Gestion des Ressources Naturelles et Développement, Université d'Antananarivo, ESSA-Forêts, Université d'Antananarivo</p>	<p>Les feux de brousse à Madagascar et leur cartographie : nouvelles données, nouveaux dialogues</p> <p>M. RATIANARIJAONA (IRD GRED), G. Serpantié (IRD GRED), A. Rakotonirina (GRET), A. Serpantié (IRD GRED), K. Rajaona (IRD GRED), F. Andriamahafazafy (C3EDM), J.F. Girres (UM3 GRED)</p>
15h30-16h00	<p>Sensibiliser à la biodiversité et au développement durable: autrement et efficacement avec l'apprentissage expérientiel holistique</p> <p>RANDRIANASOLO Lalasoa Centre Interuniversitaire en Recherche et Didactiques (CIRD) - Ecole Normale Supérieure</p>	<p>Le regard d'un phytopathologiste sur la biodiversité et le développement durable : De l'usage des marqueurs moléculaires pour la connaissance de la diversité du complexe d'espèces <i>Ralstoniasolanacearum</i> pour une production durable de la pomme de terre à Madagascar</p> <p>RAVELOMANANTSOA SantatraHerilaina et al. Laboratoire de Pathologie Végétale, DRA, FOFIFA,³ UMR PVBMT, CIRAD, Saint-Pierre, La Réunion, France ; ANSES, Saint Pierre, La Réunion, France ; CNRE</p>
PAUSE		
16h30-17h00	<p>Projet SuLaMa, un modèle de recherche pour la gestion durable de ressources naturelles</p> <p>Goum Ononamandimby ANTSONANTENAINARIVONY et al. ¹Université d'Antananarivo, Département de Biologie et Ecologie végétales, ²University of Kassel, Organic Plant Production and Agroecosystems Research in the Tropics and Subtropics, Germany</p>	<p>Le développement social en contexte de conservation de la biodiversité en milieu rural malgache: à la fois une approche pour le renforcement de l'appropriation des populations locales et une finalité</p> <p>SOLO Serge WWF Madagascar Country Office</p>
17h00-17h30	<p>Formalisation et analyse de la chaîne d'actions dans la gestion des ressources naturelles renouvelables à Madagascar</p> <p>GANOMANANA Thierry et al. UMR 220 GRED, IRD Montpellier, Ecole Doctorale Modélisation-Informatique / Université de Fianarantsoa, Ecole Doctorale Gouvernance et Société en mutation / Université de Fianarantsoa</p>	<p>Contribution à la gestion et à la valorisation des espèces envahissantes des forêts de tapia-Commune Rurale d'Ambohimanjaka</p> <p>Dr RAKOTONIAINA RANAIVOSON Naritiana et al. Institut Supérieur de Technologie d'Ambositra</p>

Forum de la recherche - 14-15-16 juin 2017 - Antananarivo

2. ATELIER D'INFORMATION SUR LE FLETRISSEMENT BACTERIEN – ECHANGE SUR LA SITUATION ACTUELLE DE LA MALADIE – EDUCATION ET SENSIBILISATION A LA PREVENTION

Au total, **huit (08) ateliers** ont été réalisés à :

- Antsirabe : FIFAMANOR (29 Novembre 2016), Centre d'Expérimentation et de Formation en Fruits et Légumes - CEFFEL (16 Février, 06 et 07 Septembre 2017), Direction Régionale de l'Agriculture et de l'Elevage – DRAE Vakinankaratra (23 Juillet 2017)
- Miarinarivo : DRAE Itasy (13 Juin 2017)
- Antananarivo : DRAE Analamanga (25 Juillet 2017), Agence Nationale de Contrôle Officiel des Semences et plants – ANCOS (31 Juillet 2017)

Les ateliers ont regroupé :

- Des représentants de producteurs de pomme de terre et multiplicateurs de semences qui sont membres d'une association ou coopérative issus des régions Itasy, Analamanga, Amoron'i Mania, Vakinankaratra ;
- Des conseillers agricoles provenant du CEFFEL, Centre de Formation et d'Application du Machinisme Agricole – CFAMA, FIFAMANOR, FOFIFA, Centre de Services Agricoles – CSA, Ministère de l'Environnement, de l'Ecologie et des Forêts – MEEF Itasy, DRAE (Itasy, Analamanga, Amoron'i Mania et Vakinankaratra)
- Des inspecteurs en phytosanitaire de la Direction de la Protection des Végétaux – DPV, du Service de la Quarantaine Végétale – SQV et l'ANCOS.

Encadré 2 : Thématiques abordés au cours des ateliers d'information / échange / éducation / sensibilisation

Ces ateliers visaient à mettre à la disposition principaux acteurs du développement agricole et du monde rural des informations clés sur : • la diversité des souches (phylotypes I, IIB-1 et III) pouvant affecter le flétrissement bactérien sur des cultures de pomme de terre, • la capacité à affecter une large gamme d'hôtes, • la répartition géographique de la diversité, • les symptômes de la maladie sur la pomme de terre, • les mécanismes de d'infection, le mode de transmission et de dispersion de l'inoculum incluant sa capacité à faire des infections latentes, notamment pour les souches IIB-1), • les impacts agronomiques et socioéconomiques de la maladie, • les différents méthodes de diagnostic de la maladie, • les mesures prophylactiques, et • les réglementations sur les semences en vigueur.



Figure 3 : Illustration des ateliers d'informations/échange/éducation/sensibilisation réalisés.

Les discussions et échanges d'informations avec les paysans agriculteurs ont permis de recueillir leurs pratiques culturelles, et de déceler en conséquence quelques modes de contamination et de dispersion de l'inoculum d'une parcelle à une autre, d'une région à une autre, et d'identifier les raisons de la persistance de l'inoculum au sein d'une parcelle, à savoir :

- L'achat et utilisation de tubercules semences non certifiées indemnes de ceRs ;
- L'utilisation de tubercules issus de cultures infectées (autoproduction de semences) après triage, des tubercules qui ne présentent pas de symptôme de pourriture (infection latente) ;
- Les mauvaises pratiques comme enterrer les tubercules infectés sur la même parcelle et utiliser ensuite la bêche contaminée pour le sarclage ou pour la récolte, jeter les fanes de cultures et tubercules infectés sur les parcelles voisines et dans les canaux d'irrigation, laisser les débris des mauvaises herbes (hôtes potentiels) sur la parcelle après sarclage.



Figure 4 : Illustration de quelques mauvaises pratiques favorisant la dissémination et la persistance de l'inoculum. En haut : après le triage, les tubercules malades sont jetés dans les canaux d'irrigation et les tubercules apparemment sains sont utilisés comme semences. En bas : la bêche est utilisée pour trancher les tubercules pendant le diagnostic de la maladie et n'est pas ensuite décontaminée, et le tubercule malade est enterré dans la parcelle.

3. ATELIER COLLECTIF DE REFLEXION ET DE CONCERTATION SUR LES STRATEGIES DE LUTTE ET DE GESTION EFFICACE DU FLETRISSEMENT BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE

Après des campagnes d'information et de sensibilisation, **un (01) atelier** collectif de concertation est tenu à Antananarivo le 13 Septembre 2017, en vue de réfléchir à une stratégie nationale de gestion de la maladie, d'élimination ou d'éradication de la souche épidémique ; de définir les activités prioritaires de lutte ; et d'articuler les activités menées par les différents services concernés.

Sous la parrainage du Ministère auprès de la Présidence en charge de l'Agriculture et de l'Elevage (MPAE), l'atelier a regroupé une vingtaine de participants représentant la Direction des Protections des végétaux, l'Agence Nationale de Contrôle Officiel des Semences et plants, le Centre d'Expérimentation et de Formation en Fruits et Légumes, les directions régionales de l'Agriculture et de l'Elevage, la Direction Générale de l'Agriculture du MPAE, la plateforme pomme de terre ; et les organisations de producteurs de tubercules semences issus de 5 régions : Vakinankaratra, Itasy, Analamanga, Amoron'i Mania et Haute Matsiatra.

Tableau 1 : Programme de l'atelier collectif de concertation sur les stratégies de gestion efficace du flétrissement bactérien

Heure	Activités
09 h 00	Accueil des participants
09 h 30	Discours – Introduction – Ouverture – Présentation
10 h 00	Présentation 1 : Épidémie du flétrissement bactérien de la pomme de terre à Madagascar : Situation actuelle, impacts et Perspectives (Dr. Santatra Ravelomanantsoa, FOFIFA)
10 h 30	Discussion : Échange d'informations, Questions-réponses
11 h 00	Présentation 2 : Politique et stratégies de contrôle phytosanitaire appliquée à Madagascar : Surveillance sanitaire, réglementation en vigueur et stratégies vis-à-vis de l'agent de la pourriture brune de la pomme de terre (Direction de la protection des végétaux et Service de Quarantaine)
11 h 15	Pause-Café
11 h 40	Présentation 3 : Contrôle et certification des semences et des plants : Règlements techniques de la production, du contrôle et de la certification en vigueur et réglementation vis-à-vis du ceRs (Agence Nationale de Contrôle Officiel des Semences et plants)
11 h 55	Présentation 4 : Système de production de semences de pomme de terre et contrôle sanitaire appliquée par le Centre FIFAMANOR (FIFAMANOR)
12 h 15	Présentation 5 : Système de production de semences de pomme de terre et contrôle sanitaire appliquée par le Centre CEFFEL (CEFFEL)
12 h 30	Discussion : Échange d'informations, Questions-réponses
13 h 00	Pause Déjeuner
14 h 30	Travaux de groupe 1. Réflexion sur les stratégies de gestion et éradication de la souche épidémique et articulation des activités menées par les différents services concernés
	Travaux de groupe 2. Système de production, inspection, contrôle et certification des semences de pomme de terre : harmonisation du système et amélioration des différentes procédures
16 h 00	Restitution des travaux de groupe
16 h 30	Bilan et recommandations
17 h 00	Clôture

Cette rencontre a ainsi eu le mérite de réunir les principaux acteurs de la filière semences pomme de terre, tous concernés par le problème du flétrissement bactérien de la pomme de terre. L'approche participative a été privilégiée durant l'atelier car permettant d'aboutir à des solutions concertées et l'implication des parties prenantes. A l'issue de l'atelier :

- L'engagement des acteurs présents ont été obtenus accompagné de la formulation d'un draft de plan d'action (Annexe 1) ;
- Le système de production, de contrôle et de certification de semences a été révisé : le dépistage du ceRs est inséré dans les étapes de production de semences aux champs ;

Les recommandations suivantes sur les procédures de production de semences pour assurer la qualité des semences produites ont été également formulées, à savoir :

- L'inscription des variétés de pomme de terre diffusées par FIFAMANOR dans le catalogue national ;
- L'enregistrement des producteurs/multiplicateurs de semences pour agrément par l'ANCOS (structuration et règlements) ;
- La déclaration de culture dédiée à la production de tubercules semences et le respect des réglementations techniques ;
- La mise en place d'un système de traçabilité comme ce qui est réalisée au sein du CEFFEL.



Figure 5 : Illustration sur l'atelier de concertation. En haut, de gauche à droite : Dr. Santatra Ravelomanantsoa, chargé du projet EPIBIO au sein du FOFIFA ; les vingtaines de participants ; et Mr. Lucien Ranarivelo, Directeur générale de l'Agriculture du MPAE. En bas, les participants en plein travaux de groupe.

4. RENFORCEMENT DE CAPACITES EN MATIERE DE DIAGNOSTIC DU FLETRISSEMENT BACTERIEN ET DETECTION DES SOUCHES DU CERS

- **Deux (02) ateliers de formation** sur la prophylaxie et diagnostic du flétrissement bactérien de la pomme de terre ont été réalisées le 05 et 06 Septembre 2017.

Les ateliers ont regroupé des techniciens et conseillers agricoles, des multiplicateurs de tubercules semences de pomme de terre issus de 6 régions productrices de pomme de terre : Vakinankaratra, Itasy, Amoron'i Mania, Haute Matsiatra, Ihorombe et Alaotra Mangoro.

La formation a été axée sur la symptomatologie, la biologie de l'agent pathogène, et les techniques simples de diagnostic de la maladie pendant différentes étapes : avant installation, pendant l'installation, en cours de végétation, pendant la récolte et post-récolte (stockage), comme le test d'exsudation, le test d'incubation des tubercules à 28 – 30°C pendant une semaine, l'utilisation de plantes indicatrices, etc.



Figure 6 : Illustration des travaux pratiques de diagnostic du flétrissement bactérien sur terrain.

- **Deux (02) ateliers** de renforcement de capacités sur les techniques de diagnostic du ceRs ont été réalisées le 01 et 02 Août 2017.

Les ateliers ont regroupé des inspecteurs du service de protection des végétaux et de quarantaine, des contrôleurs de qualité de semences des centres multiplicateurs de semences de base comme FIFAMANOR et CEFFEL.

La formation a été axée sur l'observation des symptômes, les tests rapides de diagnostic aux champs, les méthodes de diagnostic au laboratoire : isolement sur milieu sélectif, test PCR phylotypage.



Figure 7 : Illustration des ateliers de renforcement de capacités en diagnostic du flétrissement bactérien.

5. ELABORATION DE PAQUET TECHNOLOGIQUE ADAPTE POUR LES AGRICULTEURS, TECHNICIENS AGRICOLES, INSPECTEURS DU SERVICE DE LA QUARANTAINE VEGETAL ET LA PROTECTION DES VEGETAUX, ET CONTROLEURS DE SEMENCES

LeAu total, **six (06) documents** version française et/ou malgache sont élaborés et distribués aux conseillers et techniciens agricoles, inspecteurs et contrôleurs de semences. Le paquet technologique concernent :

- La reconnaissance des symptômes du flétrissement bactérien de la pomme de terre (Figure 8) ;
- Les mécanismes d'infection, de transmission et de dispersion du ceRs (Figure 9) ;
- La méthode de diagnostic rapide du flétrissement bactérien (Figure 10) ;
- Les différentes méthodes de détection des souches du ceRs : du champ au laboratoire (Annexe 2) ;
- Le schéma du système de production et de contrôle de tubercules semences au sein du centre FIFAMANOR (Figure 11) ;
- Les bonnes pratiques et mesures prophylactiques vis-à-vis du flétrissement bactérien (Annexe 3).



ARETINA FANDAZO

Fomba fisehon'ny fandazo amin'ny ovy



1
Miorina ny ravina ary malazo maitso ny voly



2
Ahitana tsiranoka fotsy feno mikroba ny ati-taho rehefa mihombo ny aretina



3
Miloko volon-tany matroka ny ati-taho rehefa mihombo ny aretina



4
Fahalovan'ny hoditra ivelan'ny ovy ary misy tsiranoka fotsy mandray vovo-tany




5
Misy tsiranoka fotsy feno mikroba hita eo amin'ny mason'ovy rehefa mihombo ny aretina




6
Misy faritra boribory miloko volon-tany matroka sy ahitana tsiranoka fotsy amin'ny ovy nosilahina

Namolavola ny tsy : Dr. Santatra Ravelomanantsoa – Mpikaroka – Sampam-pikarohana momba ny Fambolena FOFIFA/CENRADERU – +261 34 13 927 83 – rakotoarisoaravel@gmail.com
 Sary : S. Ravelomanantsoa (FOFIFA), G. Celler (ANSES) Copyright : FOFIFA, Décembre 2017




SYMPTOMES DU FLETRISSEMENT BACTERIEN


Agent pathogène : Complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*




1
Flétrissement et épinastie (port tombant) des feuilles




2
Présence d'exsudat bactérien à l'intérieur d'une tige sectionnée (stade avancé de l'infection)




3
Coloration brune de l'intérieur d'une tige coupée en deux (stade avancé de la maladie)



4
Pourriture sur tubercule (stade avancé de l'infection)



5
Présence d'exsudat bactérien au niveau des yeux du tubercule (stade avancé de l'infection)



6
Coloration brune de l'anneau vasculaire et présence d'exsudat bactérien (stade avancé de l'infection)

Réalisation de la fiche : Dr. Santatra Ravelomanantsoa – Chercheur – Département des Recherches Agronomiques (DRA) FOFIFA/CENRADERU – +261 34 13 927 83 – rakotoarisoaravel@gmail.com
 Crédits photos : S. Ravelomanantsoa (FOFIFA), G. Celler (ANSES) Copyright : FOFIFA, Décembre 2017

Figure 8 : Fiches de reconnaissance des symptômes du flétrissement bactérien sur la pomme de terre. A gauche : version malgache, à droite : version française

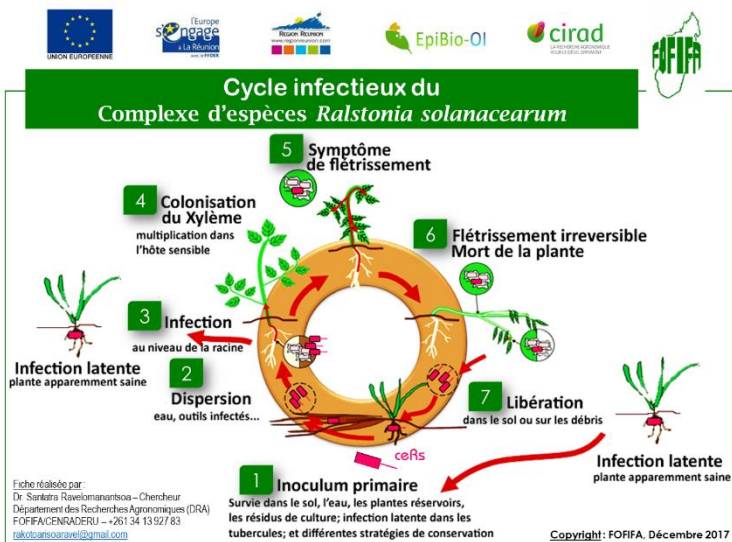


Figure 9 : Fiches du cycle infectieux du Complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* chez la pomme de terre. A gauche : version malgache, à droite : version française

Figure 10 : Fiche sur le dépistage rapide du ceRs au champ et sur les tubercules destinés pour la semence, adaptée pour les paysans agriculteurs (version malgache)

FOMBA FITILIANA TSOTRA NY ARETINA FANDAZO

• Fitiliana eny amin'ny toeram-pambolena

1 Angalana saritany 10 sentimetran'ny talon'ovy tsalalana sonit'aretina fandrazo

2 Tapahany taho 10sm (misakany tany, maikotra)

3 Moka veramadio any fenoan'arano madio

4 Moka 5 hatramin'ny 10 maitra eo lovo, masy tsiranoka fotsy mavoaka midimany taho miendrika setro tagara

• Fitiliana ny zanak'ovy atao masomboly

Sary 1, 2, 3, 4: Teknika novakolakan'ny vona toerana CEFEL Andranobe / Antsirabe

1 Moka saritany mato amin'ny zanak'ovy atao masomboly ary atao anaty kitapo mihady tsara (tsakany karezoany)

2 Maitso lavaka lalina hamotrehina ny zanak'ovy misafidy toerana azo ny masoandro baranika (ahazo hafanana)

3 Atao anaty lavaka mafanany kitapo masy ireo zanak'ovy

4 Sarcozana sy totofanany lavaka ary ahotraka farafahakeliny eo amin'ny herina ireo ny zanak'ovy

5 Rehefa vitany fanoretana dia heratsiran'ny zanak'ovy. Rahamisy madio sy tsiranoka fotsy mavoakany masoandro, na lo sy madio masoandro ovy dia by azo atao masomboly ny zanak'ovy rehetra

Fomba fanotehana hafa:
Apetrika amin'ny toerana fana- ny kitapo mihady masy ny sarin'andany zanak'ovy (ho any ao an-dakozia akorany fatan'ny ahotrika mandritray herina ireo farafahakeliny)

Nimolavola ny fity: Dr. Saritra Ravelomanantsoa - Mpiavoka - Sampam-pikarakana momba ny Fambolena
FOF FACENADERU - (+261) 034 13 927 63 - rako@saritra@gmail.com

Copyright: FOFA, Décembre 2017

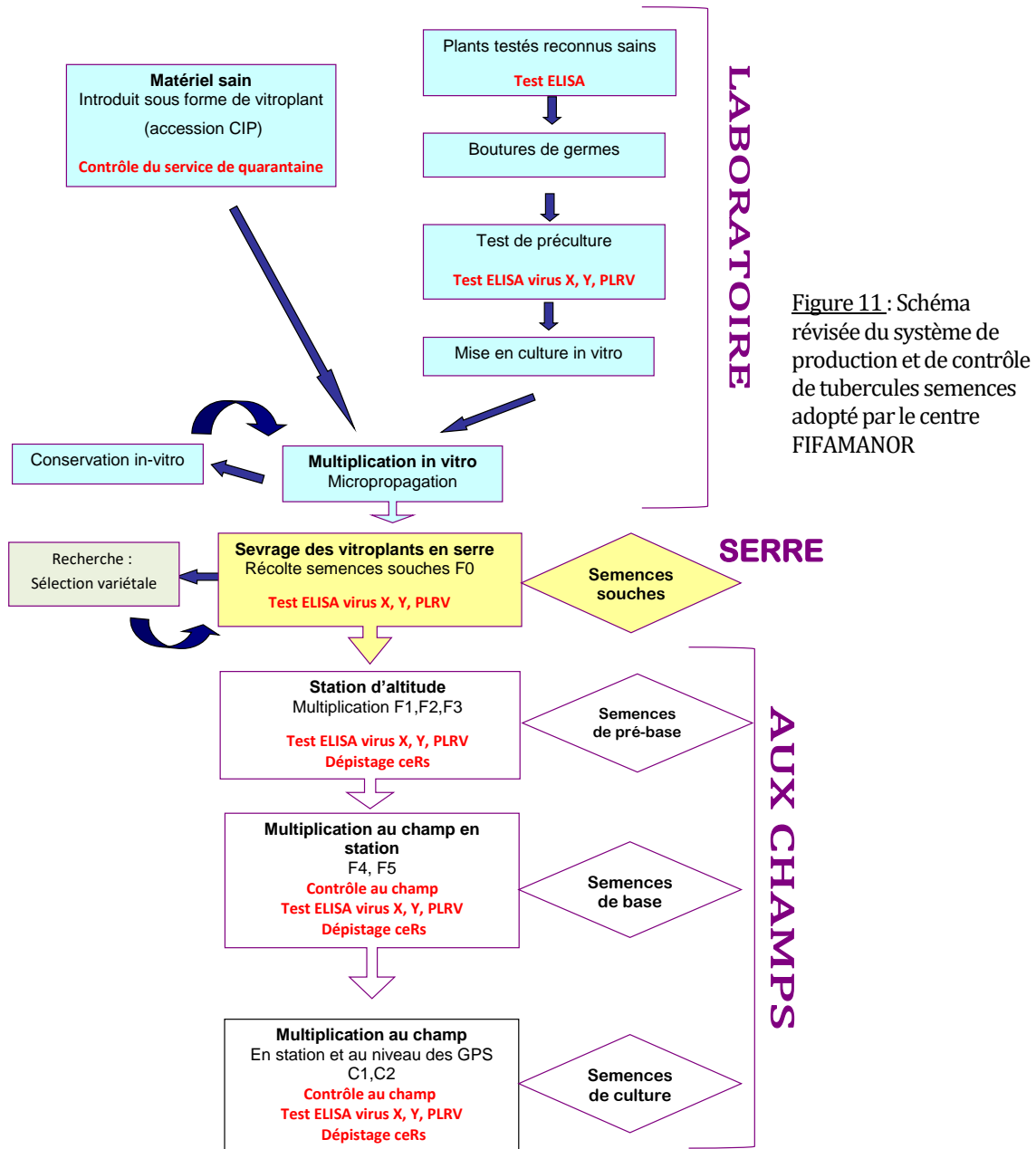


Figure 11 : Schéma révisé du système de production et de contrôle de tubercules semences adopté par le centre FIFAMANOR

- Par ailleurs, dans le but de renforcer les capacités de Madagascar en diagnostic du flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*, il est prévu de mettre à disposition des services de contrôle phytosanitaire et de certification des semences de pomme de terre, un outil de diagnostic rapide et sensible pouvant être utilisé en routine utilisable sur terrain et au laboratoire. La détection précoce des souches bactériennes faciliterait la prévention de la dissémination de l'inoculum par le biais de tubercules semences infectées ou de matériel végétal asymptomatique, et faciliterait également la prise de décision sur le déploiement de stratégies de gestion de la maladie. Les méthodes d'amplification isotherme tels que la technique LAMP (Loop-Mediated Amplification) et la technique RPA (Recombinase Polymerase Amplification) sont deux méthodes sensibles et spécifiques pouvant être développées pour la détection rapide des agents pathogènes au laboratoire et pouvant être déclinées sous forme de kits de détection utilisables directement sur la parcelle.

Dans ce contexte, en collaboration avec le CIRAD-3P (Saint-Pierre, La Réunion), une **appropriation de la méthode LAMP** jointe à des travaux préliminaires de **mise au point de la technique LAMP**, et une **étude préliminaire sur l'utilisation de la méthode RPA** ont été entreprises le 25 Mars 2017 au 15 Avril 2017 au Cirad-3P par la post-doctorante chargée du projet. Les premiers résultats ont été peu concluant car nous avons rencontré des problèmes récurrents de faux positifs donc manque de sensibilité (Figure 7). De plus, la durée de la réaction pour obtenir un test positif avec les souches témoin positif a nécessité plus d'une heure de temps. Des problèmes de ce genre ont été fréquemment évoqués, néanmoins, dans la littérature (Kuboki et al, 2003 ; Senarath et al., 2014 ; Wang et al., 2015 ; Suleman et al., 2016). Comme la technique LAMP est extrêmement sensible, le faux positif pourrait être causé par une légère contamination d'ADN par aérosols ou autres choses qui restent encore à déterminer. En résumé, l'amplification non spécifique constitue un facteur limitant dans l'applicabilité de la méthode LAMP. Le compte-rendu de mission est présenté dans l'Annexe 4.

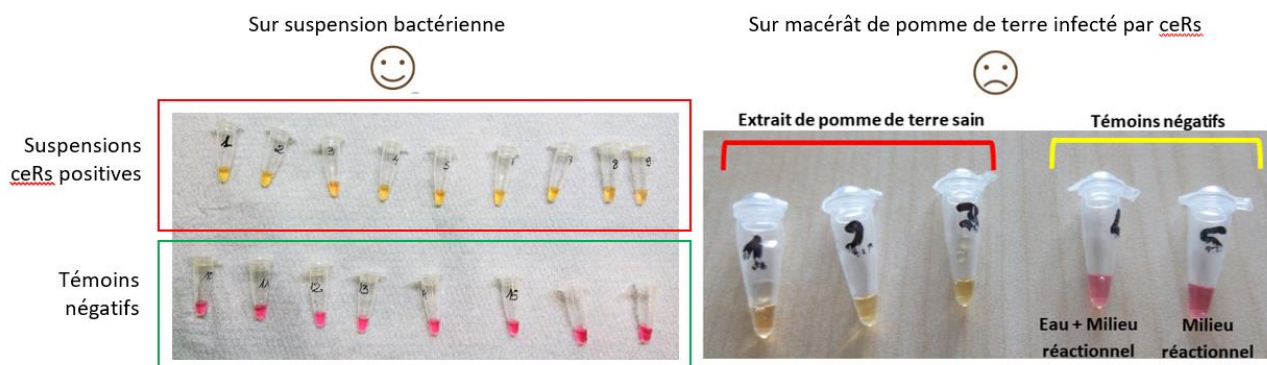


Figure 12 : Détection des souches du ceRs par la méthode LAMP. A gauche : résultat concluant en utilisant des suspensions bactériennes pures. A droite : faux positifs sur les extraits de pomme de terre sain.

Le développement d'outils de diagnostic sur site sont poursuivis par l'équipe EpiBio du CIRAD-3P avec la mise au point de la méthode LAMP et de la méthode RPA. A ce sujet, 101 échantillons de macérât de tubercules semences sont envoyés au CIRAD-3P La Réunion pour validation des méthodes LAMP et RPA développées.

6. DIAGNOSTIC DU CERS SUR LE STOCK DE TUBERCULES SEMENCES DE POMME DE TERRE ISSUS DU CENTRE PRODUCTEUR NATIONAL DE SEMENCES DE PRE-BASE ET DE BASE FIFAMANOR

Comme les souches IIB-1 se transmettent par les semences, le premier facteur à respecter pour limiter la dispersion d'inoculum consiste à utiliser des semences saines indemnes de ceRs. Dans ce contexte, nous avons procédé au diagnostic du ceRs sur le stock de tubercules semences de pré-base et de base produits par le centre FIFAMANOR. Ces tubercules semences qui seront ensuite certifiées par l'ANCOS et destinées pour la multiplication de semences de base et de culture par le centre CEFTEL, semences de culture par les centres multiplicateurs de semences, et pour la production de pomme de terre pour la consommation par les agriculteurs (Figure 13).



Figure 13 : Organisation de la production de semences et plants certifiés de pomme de terre

METHODOLOGIE

La détection du ceRs a été réalisée sur **121 lots de tubercules semences de pré-base**, et est procédé comme suit :

1. Incubation des tubercules à 28°C pendant une semaine
2. Désinfection de surface des tubercules
3. Prélèvement du faisceau vasculaire
4. Immersion dans de l'eau distillée stérile
5. Après 1h d'immersion, récupération du macérât
6. Isolement sur milieu Kelman
7. Purification
8. PCR-phylogénétique : suspension bactérienne (matrice 1), macérât (matrice 2)
9. Migration su gel
10. Révélation au BET



Figure 14 : Illustration des manipulations sur le diagnostic du ceRs sur 121 lots de tubercules semences

RESULTATS

Comme résultat du diagnostic, 4 lots sur les 221 ont été positifs à la présence de ceRs IIB-1. Des recommandations ont été émises, voire la fiche « Résultats d'analyse » suivante (figure 15) :

<p>CENTRE NATIONAL DE RECHERCHE APPLIQUEE AU DEVELOPPEMENT RURAL</p> <p>LABORATOIRE DE PATHOLOGIE VEGETALE</p> <p>Ambatobe 101 Antananarivo Madagascar</p>				
	<h3>RESULTATS D'ANALYSE</h3>			
	Objet :	Diagnostic du Complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>		
	#1 CLIENT	Nom :	FIFAMANOR Andranomaletra, Antsirabe	
		Mail :	it.fifamanor@moov.mg	
		Tel :	0340727902	
#2 ECHANTILLON	Date de réception :	14 Novembre 2017		
	Nature :	Tubercules (semences)		
	Conditionnement :	mis dans sac plastique		
	Nombre :	121 lots (sachets)		
#3 PRISE EN CHARGE	Contrôleur :	Dr. Santatra Ravelomanantsoa		
	Manipulateur(s) :	Dr. Santatra Ravelomanantsoa Mlle. Harena Razafindrazaka		
#4 MANIPULATIONS	<ul style="list-style-type: none">- Nettoyage à l'eau et stérilisation de surface avec l'alcool 70°C- Prélèvement du faisceau vasculaire- Préparation de la matrice : immersion du tissu dans l'eau distillée stérile (1h)- Isolement et purification sur milieu gélosé : Kelman- PCR-phylogénétique : Témoin phylotypes I, IIB-1, III- Migration sur gel- Révélation au BET- Conservation du macérat (1 mois, pour d'éventuelle utilisation ultérieure)			
#5 RESULTATS	Quatre (04) lots de semences sur les 121 lots sont testés : ceRs IIB-1 positifs. N° des lots positifs : 125, 152, 154 et 179			
#6 RECOMMANDATION	Les 4 lots positifs : 125, 152, 154 et 179 ne peuvent pas être utilisés comme semences. Il est recommandé : <ul style="list-style-type: none">- La destruction des lots de tubercules par autoclavage (120°C pendant 20 min).- L'assainissement des serres/parcelles, des locaux d'entreposage où chaque lot positif a été cultivé/entreposé : enlèvement total et stérilisation du substrat (Température > 120°C pendant 20 min), stérilisation du sol (dallage) par immersion avec du désinfectant bactéricide comme l'eau de javel, le crésyl. En effet, le ceRs peut se conserver dans les mottes de terre se trouvant sur sol et sur les locaux d'entreposage et constituer ainsi un pouvoir de contamination non négligeable.- Solarisation du sol à l'aide d'un film plastique transparent plaqué sur un sol humidifié pendant 6 à 8 semaines. C'est une technique de désinfection thermique du sol utilisant l'énergie solaire- D'avoir de bonnes mesures d'hygiène au sein de l'exploitation.			
	Fait au FOFIFA-LPV, le 11 Décembre 2017			
	 Dr. Santatra H. RAVELOMANANTSOA Chercheur - Biologiste 034 13 927 83 - srakotoariouaravel@gmail.com			

Figure 17 : Fiche « Résultats d'analyse : Diagnostic du ceRs sur tubercules »

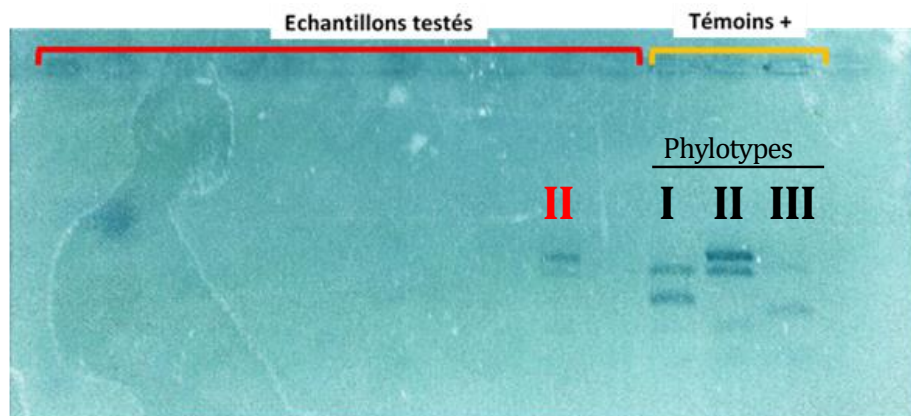


Figure 18 : Gel d'électrophorèse sous UV : Détection du profil ceRs phylotype II dans les échantillons testés

7. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE OU NON D'INFECTION LATENTE DANS LE TUBERCULE DE POMME DE TERRE CHEZ LES SOUCHES DU CERS PHYLOTYPE III

La question est de savoir si les souches ceRs phylotype III fait d'infection latente dans les tubercules, au même titre que les souches IIB-1. Cette étude se situe en premier lieu au niveau académique permettant de compléter les connaissances sur le phylotype III. S'il ne fait pas d'infection latente, il peut devenir un modèle d'étude pour comprendre les mécanismes moléculaires qui gouvernent les infections latentes (III vs IIB-1).

Cette étude sera valorisée par un **mémoire de Master II** (Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo) par Mlle. Harena Razafindrazaka, Responsable du Contrôle des semences du FIFAMANOR.



Figure 19 : Mlle. H. Razafindrazaka en train de faire des manipulations pour son Master II

METHODOLOGIE

Des prospections et essais de mise en évidence de la présence d'infection latente dans les tubercules chez le phylotype III ont été effectués :

• **Manipulation 1** : Détection des souches phylotype III sur tubercules, à partir des cultures au champ supposées naturellement infectées par ceRs phylotype III.

- Identification et piquetage des plants de pomme de terre présentant un flétrissement bactérien au stade de floraison (supposée période d'apparition des symptômes causés par le phylotype III)
- Prélèvement de tige issu de plant de pomme de terre présentant le symptôme de flétrissement au stade de floraison (au champ) : stade de floraison, période avant défanage
- Récolte des tubercules en fin de cycle de développement
- Détection du ceRs phylotype III sur tige et tubercules : incubation des tubercules à 28°C, PCR-phylotypage

• **Manipulation 2** : Inoculation de plants de pomme de terre issu de vitroplants (testé indemnes de ceRs) par des souches phylotype III (essai sous-serre)

- Production de vitroplants indemnes de ceRs (2 variétés : Meva et Maneva ; 30 plants par souche ; production d'un total de 200 plants à inoculer)
- Production d'inoculum de souches : suspensions bactériennes phylotypes I, IIB-1 et III (concentration : 10^7 cfu/ml)
- Inoculation des souches au niveau des racines blessées
- Notation des symptômes tous les 7 jours
- Prélèvement des tubercules formés à la maturation
- Détection du ceRs phylotype III sur tubercules : incubation des tubercules à 28°C, isolement sur milieu Kelman, PCR-phylotypage



Figure 20 : Production des plants destinés pour l'essai d'inoculation des souches ceRs sur plants de pomme de terre

• **Manipulation 3** : Inoculation de tubercules de pomme de terre saines et évaluation de la durée de vie des souches dans les tubercules (protocole adaptée de Milling et al, 2009)

- Acquisition des tubercules issu d'une culture certifiée indemnes de ceRs (2 variétés utilisées : Meva et Maneva ; 5 tubercules par souche à inoculer ; au total, 120 tubercules à inoculer)
- Production d'inoculum de souches phylotype III et témoins (phylotypes IIB-1 et I) (concentration : 10^9 cfu/ml)
- Inoculation des suspensions bactériennes dans les tubercules
- Prélèvement périodique : tous les 10 jours et pendant 1,5 mois (période équivalent au temps de stockage et production de plants germés)
- Détection du ceRs phylotype III sur tubercules : incubation des tubercules à 28°C, isolement sur milieu Kelman, PCR-phylotypage

La tubercule étant de très petit calibre, nous avons injecté la suspension bactérienne dans la tubercules. Cependant, l'aiguille de la seringue se bouche rapidement par la chair de pomme de terre. Ainsi, nous avons créé des blessures sur les tubercules, notamment au niveau des yeux et les tubercules sont ensuite immergés dans la suspension bactérienne pendant 10 minutes.

Pour exclure l'effet des contaminations en surface en ceRs lors des prélèvements des tissus vasculaires (car cela pourrait créer un biais d'interprétation), nous avons procédé à la stérilisation de surface des tubercules avant le prélèvement des tissus.



Figure 21 : Illustration de la manipulation 2 (22 au 23 Novembre 2017). De gauche à droite : Production de l'inoculum (suspension bactérienne) ; Inoculation des souches ceRs dans les tubercules (injection dans la tubercules /création de blessure)

RESULTATS

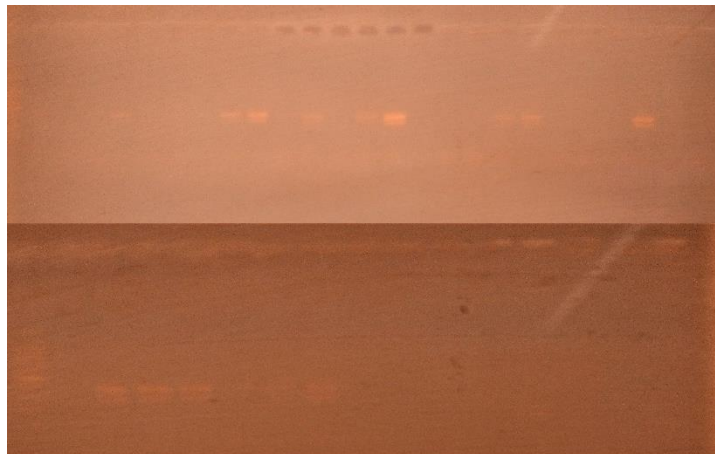
• **Résultat 1** : 47 échantillons de tiges prélevés au stade de floraison, 47 échantillons de tiges prélevés avant le défanage et 47 échantillons de tubercules issus des plants flétris ont été testés (au total 141 échantillons). Les échantillons sont positifs à l'infection de souches du ceRs mais ils sont infectés par le phylotype IIB-1. Dans ce contexte, nous n'avons pas pu atteindre notre objectif. Néanmoins, nous pouvons émettre qu'au champ, la période d'apparition du symptôme de flétrissement au stade de floraison n'est pas associée seulement à l'infection du phylotype III.

Notre hypothèse est que soit l'infection a eu lieu plus tard au niveau des racines mais non issue d'une infection latente dans les tubercules ; soit il y a eu infection latente dans le tubercule mais le pouvoir pathogène des souches s'est manifesté plus tard. Par exemple, l'agent pathogène peut croître dans la plante

sans effet pathogène jusqu'à ce qu'il atteigne une certaine concentration (quorum sensing et production de biofilm) (Annous et al., 2009).

Au vu des résultats, il serait préférable de faire des échantillonnages dans les zones agricoles où le phylotype III est majoritaire comme dans la zone agricole de Faratsiho, Antanifotsy ou Ambatolampy (Ravelomanantsoa, 2016). L'étude sera reprise en période de culture pluviale (vers Janvier-Février 2018) sur des cultures sur tanety où nous pourrons avoir plus de cas de flétrissement causé par les souches ceRs phylotype III.

Figure 22 : Profil électrophorétique montrant la présence de phylotype II dans les échantillons de tiges et tubercules prélevés au champ (manipulation 1)



- **Résultat 2 :** L'essai mis en place n'a pas abouti car au moment de l'inoculation des plants, nous avons entrevu la formation de tubercule sur quelques plants (Figure 21). Ce qui va créer un biais dans l'interprétation des résultats. Nous avons refait de nouveau repiquages de vitroplants de pomme de terre et l'inoculation sera prévue vers le début du mois de Janvier 2018.

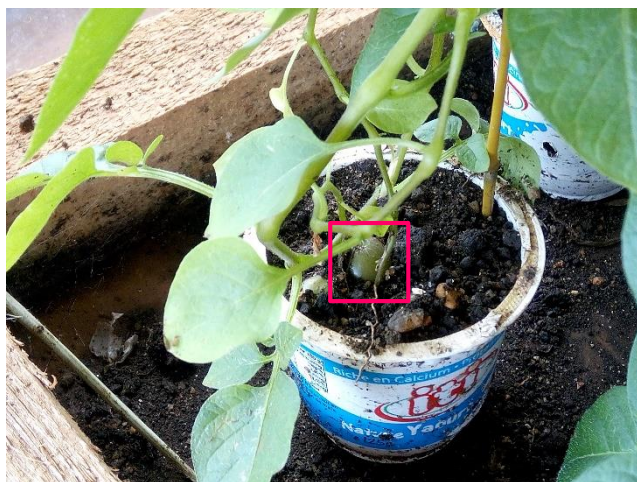


Figure 23 : Photo montrant la présence de microtubercules sur les plants avant l'inoculation des souche

- **Résultat 3 :** L'essai est en cours de réalisation. Des prélèvements périodiques (5 tubercules par traitement sont prélevés tous les 10 jours) sont réalisés. L'essai se terminera mi-janvier 2018.

D. Bilan

Une première approche a été réalisée en phase I du projet EPIBIO-OI, basée sur l'assainissement de la filière et des semences de pomme de terre. Cette approche a été axée sur l'amélioration du schéma de production, de contrôle et certification avec vérification de l'état sanitaire des plants aux différentes étapes de la production doublée de formations aux principaux acteurs impliqués dans la filière semences de pomme de terre.

Le projet a dans l'ensemble été exécuté. En résumé,

- 16 ateliers ont été réalisés avec la participation active de 177 participants issus de 7 régions productrices de pomme de terre, dont :
 - 25 coopératives et associations faitières couvertes
 - 49 conseillers agricoles et techniciens informés/sensibilisés/formés
 - 63 multiplicateurs de semences sensibilisés/formés
 - 3 projets de développement rural touchés
 - 15 inspecteurs et contrôleurs phytosanitaires sensibilisés
 - Chercheurs informés pendant le forum de la Recherche
 - Au niveau du MPAE : la DGA, les CSA, les DRAE, la DPV et le MEEF informés/sensibilisés
- 06 fiches techniques ont été élaborées

A travers les différentes actions présentées plus haut :

- Les actions prioritaires à entreprendre dans l'assainissement de la filière semences pomme de terre ont été concertées et la répartition des tâches définies (voir le plan d'action en Annexe 1).
- Le système de production de semences de pomme de terre a été révisé avec l'identification des entités productrices pour chaque catégorie de semences (Annexe 1)
- Les étapes de contrôle et dépistage du ceRs ont été définies et insérées dans le schéma de contrôle et de certification des semences. Cela sous-tend une mise à jour du protocole de contrôle et de certification des semences de pomme de terre.
- Le stock de tubercules semences (121 lots) produits par FIFAMANOR sont contrôlés : 117 lots testés négatifs au ceRs, et 4 lots testés positifs et sont immédiatement détruits.
- Des fiches techniques de diagnostic du flétrissement bactérien sont disponibles pour les services de contrôles de semences du FIFAMANOR, de l'ANCOS et du Service de la Quarantaine. Ces services ne sont toutefois pas opérationnels pour réaliser un diagnostic impliquant les tests microbiologique (isolement sur milieu sélectif), sérologique (kit de détection) et moléculaire (PCR-phylogénétique) en raison notamment de manque de ressources financières pour acheter les réactifs et la non disponibilité de certains équipements et matériels.
- Une collaboration entre le Centre National de Recherche Appliquée au Développement rural FOFIFA, le Centre d'Expérimentation et de Formation en Fruits et Légumes (CEFFEL), la Direction des Protection des Végétaux (DPV), les Directions Régionales de l'Agriculture et de l'Élevage (DRAE), des centres de services Agricoles (CSA) et le centre FIFAMANOR est développé en matière

d'épidémiosurveillance du ceRs à Madagascar. Les compétences techniques du FOFIFA sont surtout sollicités en matière de diagnostic et d'épidémiologie.

- Les centres FIFAMANOR et CEFFEL se sont engagés pour vulgariser les bonnes pratiques et les mesures préventives ; pour améliorer le système de production de semences : auto-contrôle sanitaire des semences, mise en place d'un système de traçabilité...
- Les compétences des agriculteurs, techniciens et conseillers agricoles du CSA, du CEFFEL et de FIFAMANOR sur le diagnostic du flétrissement bactérien sont renforcées. A ce propos, des guides pratiques de reconnaissance des symptômes du flétrissement bactérien et de test rapide de dépistage du ceRs sont disponibles. Ils disposent ainsi d'outils pour mener à leur tour des actions de sensibilisation et d'information sur la notion de contamination du ceRs, son enjeu, les dispositions et les pratiques pour lutter contre le flétrissement bactérien
- Les instances communale, régionale et nationale ont pris conscience des enjeux de se doter d'une stratégie nationale sur l'assainissement de la filière pomme de terre et la lutte intégrée contre le flétrissement bactérien.
- Les paysans agriculteurs présents de chaque atelier ont pris conscience des enjeux et conséquences de la maladie. Ils se sont également rendu compte des leurs mauvaises pratiques favorisant la dispersion de l'inoculum et ont prévu de corriger et d'améliorer leurs pratiques culturales en se basant aux recommandations préconisés. Dans ce contexte, les enquêtes menées auprès des agriculteurs depuis la formation ont permis de constater que la prévalence du flétrissement bactérien pendant la période de contre-saison a sensiblement diminué ; probablement effet positif concernant l'utilisation de semences saines après application du test d'incubation à chaud des semences tubercules avant le semis.
- Les différentes services et entités représentées lors des différents ateliers ont exprimé leur satisfaction aussi bien sur la forme des ateliers que sur le contenu et les supports pédagogiques, et souhaitent une continuité des activités de sensibilisation, d'accompagnement et de formation en zone rurale.

E. Perspectives

Etant donné que des souches phylotypes I et III sont présentes à Madagascar et qui ont aussi montré des dégâts sur les Solanacées (aubergine...) et cultures de rente (géranium, haricot...), **les perspectives d'avenir du projet** portent sur la collection et le typage des souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* présentes dans les autres zones non prospectées (Nord, Ouest, Est, Centre et Sud de Madagascar) afin d'évaluer les risques pour les filières de production de Solanacées (tomate, aubergine, piment, pomme de terre, etc.) et d'autres cultures d'importance économique. Comme le ceRs héberge des souches génétiquement et phénotypiquement très diverses et qui sont capables d'infecter une large gamme de plantes, ces prospections seront combinées avec des prélèvements sur les plantes soupçonnées d'être un réservoir potentiel d'inoculum.

Une typologie de la distribution de la diversité génétique des souches du ceRs à Madagascar paraît indispensable afin de continuer à établir la structure des populations de ce complexe d'espèces à Madagascar. Ces données serviront de référentiel pour des futures études sur la dynamique des populations des souches au niveau national, sur leur dispersion au niveau de la zone SOOI et également l'évaluation de leur comportement au champ vis-à-vis des espèces hôtes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Annous BA, Fratamico PM, Smith JL (2009). Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *J Food Sci* 74:24–37.
- Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D. J., Suzuki, H., ... & Igarashi, I. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of clinical microbiology*, 41(12), 5517-5524.
- Milling A, Meng F, Denny TP, Allen C (2009) Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99: 1127–1134.
- Ravelomanantsoa, S. (2016). Biologie des Populations Du Complexe D'espèces *Ralstonia Solanacearum* Appliqué à l'épidémiologie de la bactériose vasculaire de la pomme de terre à Madagascar. PhD. Université de la Réunion et Université d'Antananarivo, 226.
- Senarath, K. D., Usgodaarachchi, R. B., Navaratne, V., Nagahawatte, A., Wijayarathna, C. D., Alvitigala, J., & Goonasekara, C. L. (2014). Non specific amplification with the LAMP technique in the diagnosis of tuberculosis in Sri Lankan settings. *Journal of Tuberculosis Research*, 2(04), 168.
- Suleman, E., Mtshali, M. S., & Lane, E. (2016). Investigation of false positives associated with loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Toxoplasma gondii* in archived tissue samples of captive felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), 536-542.
- Wang, D. G., Brewster, J. D., Paul, M., & Tomasula, P. M. (2015). Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*, 20(4), 6048-6059.

ANNEXE 1 : DRAFT DE PLAN D'ACTION

Restitution Travaux de Groupe 1 : Réflexion sur les stratégies de gestion et éradication de la souche épidémique et articulation des activités menées par les différents services concernés

~ ASAM-BAOMIERA ~

Groupe 01 :

Activités	Responsables
1° - Structuration des acteurs de filière Pomme de Terre	DRAE - Projet / Programme
2° - Campagne d'information sur la maladie CERS II B.1 • Supports et Mass médias • Supports d'information	MPAE - DRAE - FOFIPA FIFAMANOR
3° - Campagne de sensibilisation sur la maladie Fletrissement Bactérienne.	DRAE
4° - Formation en cascade sur les différents Techniques de production et Maintenance des Cultes contre la maladie de fletrissement • Pratique de l'eddy gory • Application de la Rotation culturale • Pratique de l'Ecobuage • Gestion rationnelle de la fertilité du sol	MPAE - DRAE FIFAMANOR FOFIPA
5° - Renforcement de Sulu Phytosanitaire et mesure d'accompagnement	MPAE - DRAE DPV ANGOS - FOFIPA

- | | | |
|-----|--|--|
| 6° | Implantation des collaborations des intervenants sur l'éradication de CERST B.1 | MPAE - DPAE |
| 7° | Rédaction de projet d'éradication de la maladie | MPAE - DPAE
DPV
Intervenants |
| 8° | Organisation de Regroupement Régionale sur l'éradication de maladie CERST B.1 / Atelier
→ "Centre et noyau de reorientation de stratégie et Plan d'action sur l'éradication de cette maladie" | MPAE
Projet/Programme
Progrès |
| 9° | Matérialisation de Centre de Recherche / Laboratoire | MPAE - PROJET |
| 10° | Formations ny Sora - pitsohane ny fahasalamany ovy ny ny Mbatra ovy | DPV - ANCOs |
| 11° | Formations ny Lalana mifely ny fampidraza zanamany eto M/er individus fa ny Voly ovy | MPAE |
| 12° | Elaboration de Programme d'éradication des plants et semenciers infectés | MPAE
Intervenants |
| 13° | Appui au financement de Centre de Recherche et lutte contre le Retroussement Bactérien. | MPAE
Projet
Programmes |
| 14° | Campagne de ^{large} Diffusion de Résultat de Recherche et Verdicté Résultant au maladie | MPAE
Centre de Recherche
Projets
Programmes |
| 15° | Implantation du Centre d'achat de Semence indemne | |

Restitution Travaux de Groupe 2 : Système de production, inspection, contrôle et certification des semences de pomme de terre : harmonisation du système et amélioration des différentes procédures

<p>1/ Inscription des variétés dans le catalogue variétale nationale</p> <p>2/ Recensement des établissements producteurs de semences, des paysans multiplicateurs de semences par zone</p> <p><u>Attribution des activités :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - DRAE :suivi et conseil technique - FIFAMANOR, CEFFEL, Paysan Multiplicateur (PM) - DPV 	<p>3/ Agrément des producteurs/multiplicateurs : demande à envoyé au niveau du DRAE, ensuite ANCOS</p> <p>4/Orientation à la certification semencière assurée par ANCOS régional et central: inspection et contrôle au champ, au stockage et à la vente</p> <p>5/Recherche de partenariats et financement pouvant subventionner les PM, coût de la certification)</p>
<p>6/Collaboration avec la DRAE (Responsable des protections des végétaux, ANCOS, et DPV) pour obtenir les base des données (fonctionnelles, opérationnelles, disponibles)</p> <p>7/ Faire au préalable un planning de production semencière</p> <p>8/ Application de sanction pour ceux qui ne suivent pas les réglementations en vigueur</p> <p>9/Mise en place d'un système de traçabilité</p>	<p>10/Dotation des services de contrôle de semences (ANCOS) de matériels et équipements nécessaires pour le diagnostic du ceRs</p> <p>11/Aider FIFAMANOR à trouver des parcelles indemnes de ceRs pour la production de semences de pomme de terre</p> <p>12/Construction de magasins de stockage/banques de semences collectifs par zone et région de production, qui seront gérées par l'Etat</p>

Répartition sur la production de catégories de semences

Producteur	Catégorie de semences	Génération	Inspection et contrôle	Certification
FIFAMANOR	Souche Pré-base Base	F0,F1,F2,F3	DPV	ANCOS
FIFAMANOR, CEFFEL, Ets Robens	Base	F1,F2,F3	DPV	ANCOS
FIFAMANOR, Paysans multiplicateurs agréés	Certifiées	F4,F5,F6	DPV	ANCOS

ANNEXE 2 : LES DIFFERENTES METHODES DE DETECTION DES SOUCHES DU CERS : DU CHAMP AU LABORATOIRE

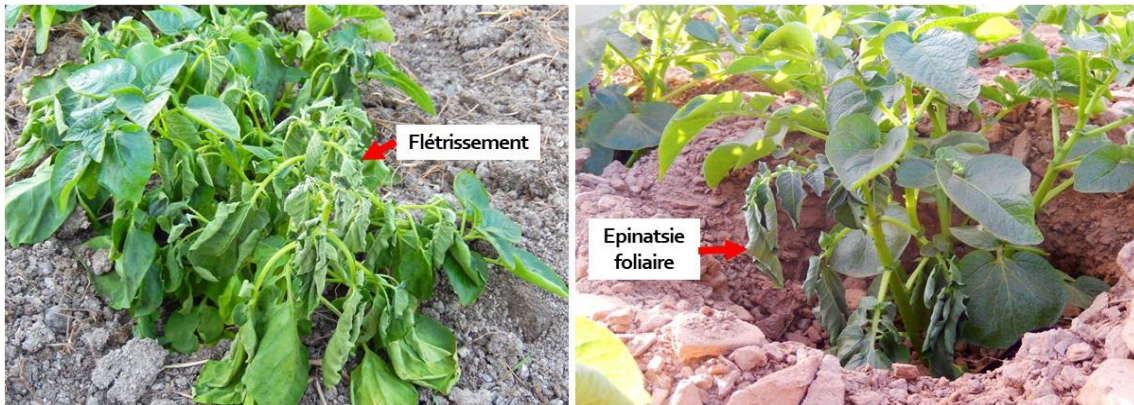
DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

1. Examen visuel au champ, test d'exsudation

Matériels



- **Les symptômes caractéristiques du FB sur les plants de pomme de terre**



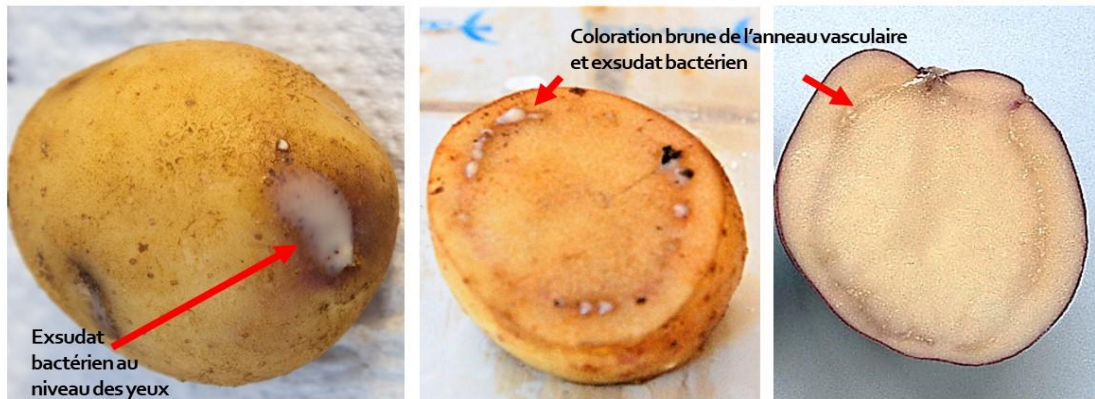
- **Prélèvement d'une portion de tige (10 cm)**



- **Les symptômes au niveau de la tige**



- **Les symptômes sur la tubercule**



Jambe noire ou pourriture molle
Dickeya et Pectobacterium



DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

2. Test rapide de dépistage
Test sérologique (champ, labo)

Test sérologique

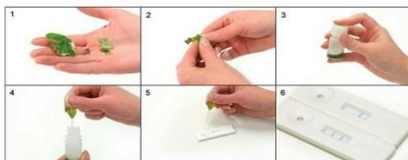
Kit de diagnostic **abordable, rapide, facile à utiliser, MAIS** sensibilité à 10^5 cfu



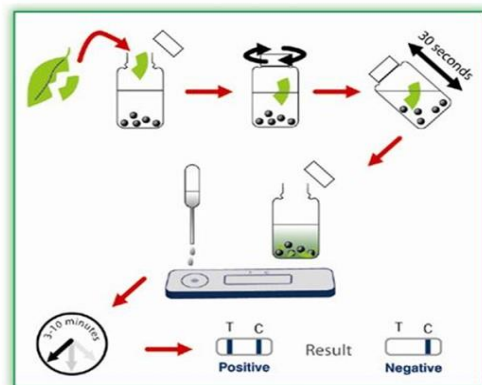
- Kit Rs ImmunoStrip Test

POCKET
DIAGNOSTIC

Plant disease test kits



Rapid Positive/Negative results
in the field or laboratory



DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

3. Isolement sur milieu sélectif Milieux Kelman et Sequeira

- **Nettoyage des échantillons**



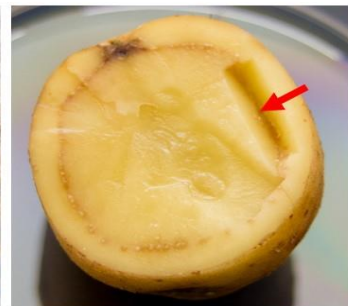
- **Obtention de la bactérie**



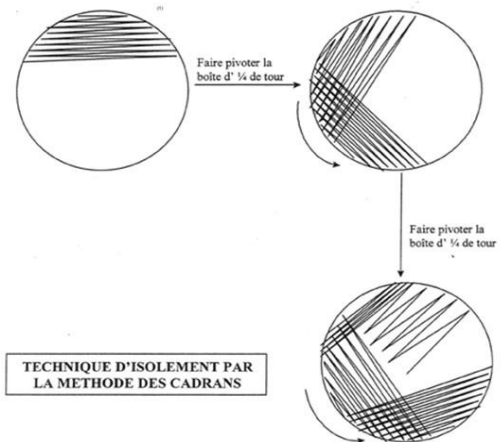
Repos 5 à 10 mn



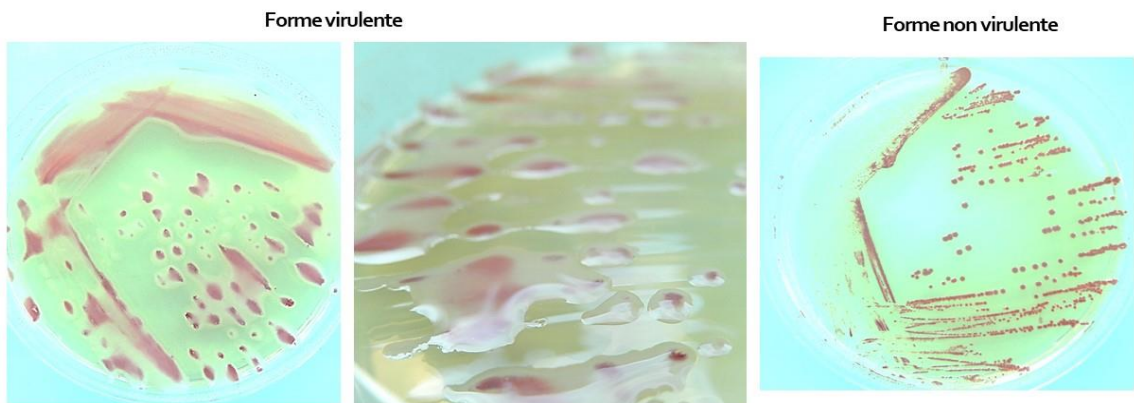
Incubation à 28–30°C



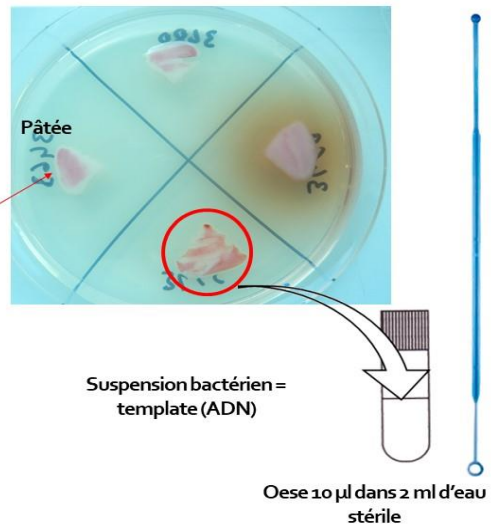
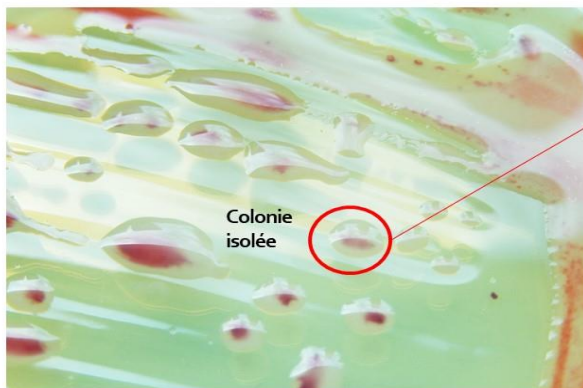
- **Etalement par épuisement, méthode des cadrans**



- **Incubation à 28°C pendant 48h**



- **Purification**



DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

4. Test PCR : Phylotypage Amplification d'ADN cible Méthode plus sensible

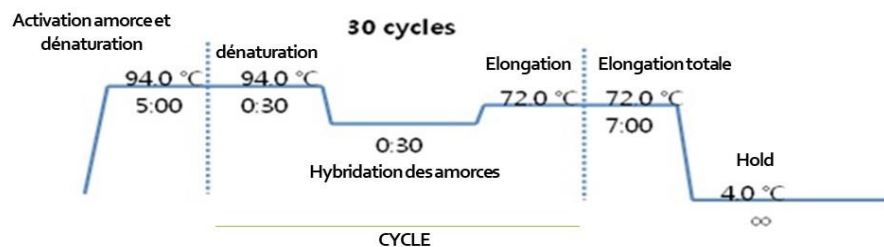
Thermocycler



Bloc chauffant

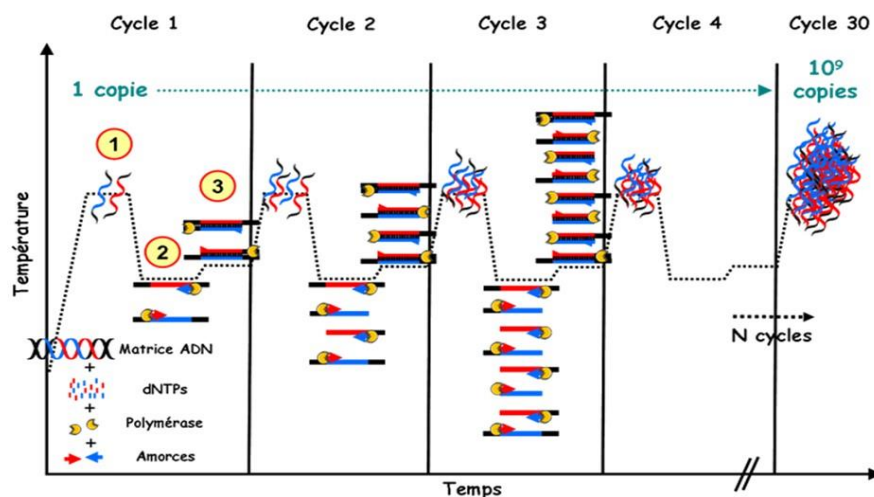
Clavier pour la programmation des cycles

Programme PCR



• Amplification en chaîne par polymérase

Principe



- **Détection ceRs et phylotypes**

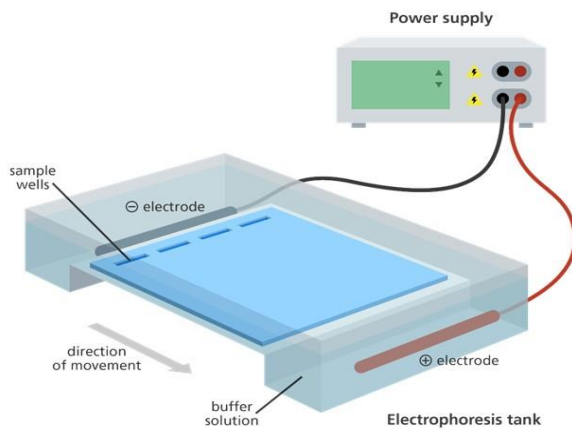
15 µL						20 µL				
Diagnostic Ralsto						Primers MIX (µM) 10x				
Réactif	[Ci]	[Cf]	/tube	8	Primer	[Ci]	[Cid]	Vol		
Eau			8,18	65,40	HPLC Water			13,3		
Buffer	5	x	1	x	3	24	Nmult:21:1F (I)	100	4	0,8
MgCl2	25	mM	1,5	mM	0,9	7,2	Nmult:21:2F (II)	100	4	0,8
dNTPs	10	mM	0,2	mM	0,3	2,4	Nmult:22:inF (IV)	100	4	0,8
							Nmult:23:AF (III)	100	12	2,4
Primer Mix	10	x	1	x	1,5	12	Nmult:22:RR (reverse)	100	4	0,8
GoTaq Flexi	5	U/µL	0,625	U	0,125	1	759R	100	2,7	0,5
ADN (susp bact.)					1		760F	100	2,7	0,5
Total					15,00	Total			20	

30 cycles		
96°C 5min	I	144 pb
94°C 15s	II	372 pb
59°C 30s	III	91 pb
72°C 30s	IV	213 pb
72°C 10min	Rs	282 pb
12°C		

gel1,5% 1h/140V

Primers MIX 10x		
	[Cid] pmol	[Cf] µM
Nmult:21:1F (I)	6	4
Nmult:21:2F (II)	6	4
Nmult:22:inF (IV)	6	4
Nmult:23:AF (III)	18	12
Nmult:22:RR (reverse)	6	4
759R	4	2,7
760F	4	2,7

- **Electrophorèse et visualisation des bandes spécifiques**



- **Phylotypage ceRs**

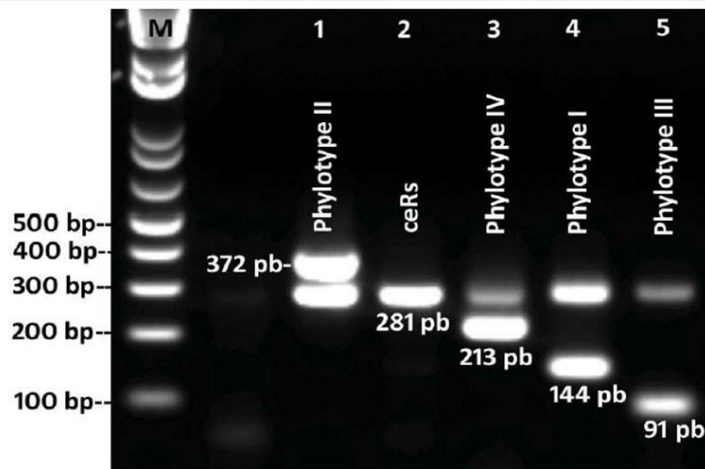


Figure 21 – Gel d'électrophorèse montrant les produits PCR : la bande à 281 pb indique l'appartenance au ceRs (piste 2), la bande à 91 pb au phylotype III (piste 5), 144 pb au phylotype I (piste 4), 213 pb au phylotype IV (piste 3), 372 pb au phylotype II (piste 1). La piste M est le marqueur de taille à 100 pb.

ANNEXE 3 : LES BONNES PRATIQUES ET MESURES PROPHYLACTIQUES VIS-A-VIS DU FLÉTRISSEMENT BACTERIEN

AVANT LA PERIODE DE CULTURE

- Choisir des semences saines, de qualité et certifiées indemnes du ceRs
- Choisir une parcelle non infestée où il n'y a pas eu d'antécédent de flétrissement bactérien
- Evaluation de la santé de la parcelle par des techniques simples comme cultiver et évaluer la santé des plantes indicatrices à croissance rapide comme la tomate, ou des mauvaises herbes comme le *Bidens pilosa*
- Fabriquer une fosse profonde réservée seulement pour jeter et brûler les résidus de culture
- Désherber et nettoyer la parcelle de culture : les résidus seront brûlés dans la fosse à résidus de culture
- Pour les rizières, sécher la parcelle au moins 1 mois avant la mise en place
- Dépister la présence du ceRs dans les tubercules semences : test d'incubation au chaud (environ à une température de 28°C à 30°C)
- Déclaration des cultures destinées pour la production de semences
- Construire des canaux de drainage pour éviter que les eaux de pluie (pouvant entraîner avec elles des sols contaminés) ne se déversent pas sur la parcelle

PENDANT L'INSTALLATION DES CULTURES

- Choisir des semences saines et certifiées indemnes du ceRs
- Apport de dolomite pour les sols rouges (acides)
- Ne pas trancher les tubercules semences
- Utiliser des outils agricoles décontaminés : nettoyage avec de l'eau de javel ou flambage au feu
- Ne pas nettoyer les outils agricoles dans l'eau de rivière ou l'eau d'irrigation
- Ne pas irriguer la parcelle avec de l'eau contaminée

PENDANT LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DES CULTURES

- Sarclage et enlèvement des mauvaises herbes : ils seront brûlés dans la fosse à résidus de culture
- Utiliser des outils agricoles décontaminés : nettoyage avec de l'eau de javel ou flambage au feu
- Eviter de blesser les racines des plants de pomme de terre pendant le binage et l'apport de l'urée
- Ne pas jeter les plants malades sur la parcelle, ni dans l'eau d'irrigation ou sur les parcelles voisines : ils seront directement jetés dans la fosse à résidus de culture et brûlés.
- Ne pas nettoyer les outils agricoles dans l'eau de rivière ou l'eau d'irrigation
- Demander le passage des inspecteurs et contrôleurs de semences en suivant le planning de contrôle des cultures (stipulés dans la réglementation technique)
- En cas de suspicion d'infection par le ceRs, piquer le plant malade et suivre l'évolution de la maladie.
- Si les symptômes de flétrissement sont présents :
 - Arracher le plant entier avec les terres environnant les racines,
 - Jeter et brûler dans la fosse,
 - Brûler en profondeur le sol dans le trou laissé (écobuer) ou faire une solarisation

PENDANT LA RECOLTE

- Trier la récolte et pour les tubercules destinés pour la semence, choisir ceux qui ne sont pas blessés et malades : sans exsudat bactérien, ni pourriture
- Jeter et brûler les tubercules malades dans la fosse réservée aux résidus de culture

PENDANT LE STOCKAGE

- Faire des observations régulières de l'état des tubercules
- Si des tubercules sont pourris pendant le stockage, les jeter et brûler dans la fosse
- Ne plus utiliser les lots de semences qui présentent de la pourriture brune

AUTRES MESURES A PRENDRE

- Ne pas utiliser les débris et ordures dans la fosse comme engrais
- Ne pas donner à manger les fanes de cultures malades au bétail
- Pratiquer la rotation de culture en utilisant des cultures non hôte du ceRs comme le maïs, le sorgho, les carottes, le coriandre...
- Privilégier la fertilisation organique : compost, engrais de ferme et l'apport d'urée.

ANNEXE 4 : COMPTE-RENDU SUR L'APPROPRIATION ET LA MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE LAMP



COMPTE-RENDU DE MISSION

« Formation aux méthodes d'amplification isothermale pour diagnostiquer le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* »

du 25 Mars 2017 au 15 Avril 2017
au CIRAD 3P, Saint pierre, La Réunion

Cadre de l'étude :

Composante 4 du projet EPIBIO, action 1 : Maladies et ravageurs de la pomme de terre, en vue de l'amélioration du système de certification de la pomme de terre à Madagascar

CONTEXTE

Dans le but de renforcer les capacités de Madagascar en diagnostic du flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*, il est proposé de mettre à disposition des services de contrôle phytosanitaire et de certification des semences de pomme de terre, un outil de diagnostic rapide et sensible pouvant être utilisé en routine au laboratoire voire utilisable sur terrain.

La détection précoce des souches bactériennes faciliterait la prévention de la dissémination de l'inoculum par le biais de tubercules semences infectées ou de matériel végétal asymptomatique, et faciliterait également la prise de décision sur le déploiement de stratégies de gestion de la maladie.

Les méthodes d'amplification isotherme tels que la technique LAMP (Loop-Mediated Amplification) et la technique RPA (Recombinase Polymerase Amplification) sont deux méthodes sensibles et spécifiques pouvant être développées pour la détection rapide des agents pathogènes au laboratoire et pouvant être déclinées sous forme de kits de détection utilisables directement sur la parcelle.

Dans ce contexte, une formation aux méthodes d'amplification isothermale a été dispensé par l'UMR-PVBMT Cirad 3P pendant la période du 25 Mars 2017 au 15 Avril 2017.

OBJECTIFS

Le but de cette formation est de s'approprier en premier lieu : la méthode d'amplification isotherme médiée par des boucles (LAMP) qui est une méthode moléculaire permettant de dépister les souches bactériennes responsable de la maladie dans des matériels végétaux infectés ; et d'effectuer une étude préliminaire sur l'utilisation de la méthode RPA.

Les objectifs spécifiques assignés à cette mission étaient d'effectuer une étude bibliographique sur les méthodes d'amplification isothermale LAMP et RPA ; et de mettre au point le protocole LAMP pour détecter la présence ou non du ceRs.

LES PARTICIPANTS

Stagiaire : Dr. Santatra Ravelomanantsoa, Chercheur postdoc en Pathologie végétale dans le cadre du Projet EPIBIO | Composante 4 – Action 1, basée au CENRADERU/FOFIFA Antananarivo, Madagascar

Encadreurs : - Dr. HDR Isabelle Robène, Chercheur en Pathologie végétale, UMR-PVBMT CIRAD-3P
- Véronique Lebon, Assistante Chercheur, UMR-PVBMT CIRAD-3P

DEROULEMENT DE LA MISSION

- CHRONOLOGIE DES ACTIVITES

	MARS 2017							AVRIL 2017														
	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S
	25	26	27	28	29	30	31	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
Arrivée à La Réunion - Installation																						
Réunion de travail																						
Bibliographie																						
Préparation des manipulations et établissement du protocole LAMP																						
Localisation du gène spécifique IIB-1 (630-631) - design des amorces et sondes (RPA)																						
Apprentissage de la technique RPA : choix et design des amorces et sondes, Kit TwistAmp																						
Labo LAMP : détection du ceRs à partir d'ADN																						
Labo LAMP : détection du ceRs à partir de suspension bactérienne																						
Préparation manip inoculation du ceRs du tubercules de pomme de terre																						
Microbiologie : préparation inoculum/suspension bactérienne																						
Inoculation sur tubercules de pomme de terre																						
Extraction de l'inoculum à partir des tubercules de pomme de terre																						
Labo LAMP : détection du ceRs à partir de broyat de tissus vasculaires																						
Retour à Madagascar																						

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

• TECHNIQUE LAMP (Loop-Mediated Amplification)

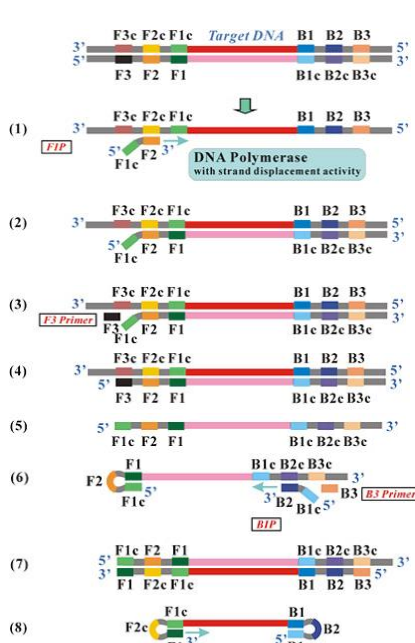
C'est une méthode moléculaire basée sur la technique de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) facilitée par boucle et réalisée à une température constante comprise entre 60 à 65 °C (Notomi et al., 2000). Elle présente un très haut niveau de spécificité, lié à l'utilisation de 6 amorces (Nagamine et al., 2002). Contrairement à la PCR classique, la réaction est peu sensible aux différents inhibiteurs potentiels présents dans les échantillons et ne nécessite pas ainsi d'étapes de purification des acides nucléiques (Nagamine et al., 2001).

Principe :

La première étape consiste à produire une structure de départ ressemblant à un haltère : le gène cible va être amplifié par l'ADN polymérase successivement à partir des amorces sens, puis anti-sens et, par complémentarité de séquences, des boucles d'auto-appariement vont se former à chaque extrémité du produit d'amplification. Cette structure va servir de matrice pour la deuxième étape de la réaction : l'amplification cyclique. L'ADN polymérase va, à partir de la structure en haltère et des amorces internes, amplifier des fragments de gène cible de taille de plus en plus importante, tout en renouvelant en permanence cette structure de base (Notomi et al., 2000).

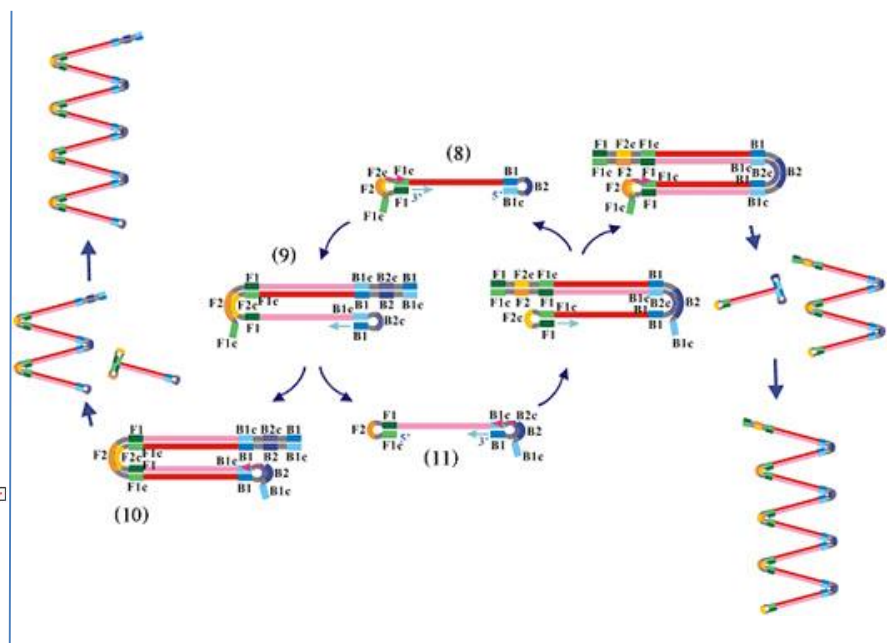
Etape non-cyclique :

Génération d'ADN de boucle de tige avec une structure en forme d'haltère aux deux extrémités



Etape cyclique :

Amplification exponentielle de l'ADN de la boucle de la tige en forme d'haltère avec des amorces internes



Cette méthode génère des sous-produits qui forment un précipité blanc et augmentent la turbidité de la solution. La détection des produits d'amplification se fait à l'œil grâce à la détermination turbidimétrique ou à l'aide d'une réaction colorée du milieu réactionnel (Mori et al., 2001 ; Tomita et al., 2008 ; Parida et al., 2008).

La méthode LAMP est une méthode simple à mettre en œuvre, ne nécessitant pas d'équipements spécialisés, permettant une détection sensible et fiables avec un minimum de temps. Un simple bain ou bloc chauffant est nécessaire pour la réaliser. Ainsi, cette technique convient pour le travail de routine en laboratoire et peut être

déclinée sous forme de kit de détection utilisables directement sur le site de prélèvement, et convient beaucoup en zone de ressources limitées (Mori & Notomi, 2009).

Méthode LAMP appliquée à la détection du ceRs

Trois méthodes LAMP ont été développées et publiées pour la détection des souches du ceRs :

- Kubota *et al.* (2008) a développé pour la première fois une méthode LAMP ciblant le gène *fliC*, utilisant 5 amorces réalisée à 65°C pendant 60 min avec un seuil de détection de l'agent pathogène entre 10⁴ à 10⁶ cfu/ml. La réaction est terminée par chauffage à 80°C pour dénaturer la polymérase.

TABLE 1. The rsfliC primer sequences for loop-mediated amplification replication of the flagellar gene *fliC*^a

Primer	Sequence
rsfliC F3	5'-TTCAAGTTGCAGGTCACGT-3'
rsfliC B3	5'-AGGTTGTTTTCAACCTGGCC-3'
rsfliC FIP	5'-GAGATGTTGGTATTGAGGCTGAGCAAGCATTCA-CTCGGGCA-3'
rsfliC BIP	5'-GCCTGACCACGACCCTGAACAGGTACGAGTTGC-CACCGT-3'
rsfliC loop	5'-CGCAAACGCAAGGTATCCAGA-3'

^a FIP consists of F2 and F1c sequences as shown on Figure 1. BIP consists of B2 and B1c sequences.

- Lenarcic *et al.* (2013) a testé la méthode LAMP en ciblant le gène *egl*, d'une part, et le gène 16S rRNA, d'autre part, en comparant avec la méthode LAMP ciblant le gène *fliC* de Kubota *et al.* (2008). La méthode LAMP ciblant le gène *egl* utilisant 6 amorces s'est avérée la plus performante et adaptée pour détecter les souches ceRs. L'amplification est réalisée à 60°C pendant 30 min, avec un seuil de détection comprise entre 10⁴ à 10⁶ cfu/ml.

Table 1. Primers used in the *egl* LAMP assay.

Primer	5'-3' primer sequence	Final primer conc. (µM)	Primer position*
F3_RS_egl	GAGCAACTACATCTATCCGTC	0.2	330-350
B3_RS_egl	CATCAGCCCGAAGATGAC	0.2	637-654
FIP_RS_egl	ACAGCTCGTTCGCGTCGACGACGCGCCTACTA	2	354-371, 446-463
BIP_RS_egl	GGTTCGTCAACGCCGTGAGATCAGTTGCCGTAGTAG	2	476-493, 540-558
FLoop_RS_egl	GTCATGCCCTTGTTCTTG	2	372-390
Bloop_RS_egl	GCTCGATCCGCACAATA	2	516-533

*Position of the primer on *R. solanacearum* strain GM1100 endoglucanase precursor (*egl*) gene (GenBank accession number DQ657595) sequence. doi:10.1371/journal.pone.0096027.t001

- Huang *et al.* (2017) a développé une méthode LAMP ciblant le gène *MG67* spécifique à l'écotype Mulberry (Phylotype I), en utilisant 6 amorces. La réaction est réalisée à 64°C pendant 20 min, avec un seuil de détection de 2.2 x 10² cfu/ml.

TABLE 2 | Primer sequences for LAMP replication of the *MG67* gene.

Primer	Sequence
FIP	5'-TCCTTGTCGCCGCATGAACGATGGGTTCCGGTCCGAAC-3'
BIP	5'-GATCGGTCGAGCCACTACGAAAAACGCCGTCGGATCTC-3'
F3	5'-CGAGGAGAAGGACTACTGCT-3'
B3	5'-CTCCACTAGTTTGCCGCC-3'
LF	5'-CCGTCGTGAATGCTGACAGA-3'
LB	5'-TTTCAAATTCAGACCAAGACCG-3'

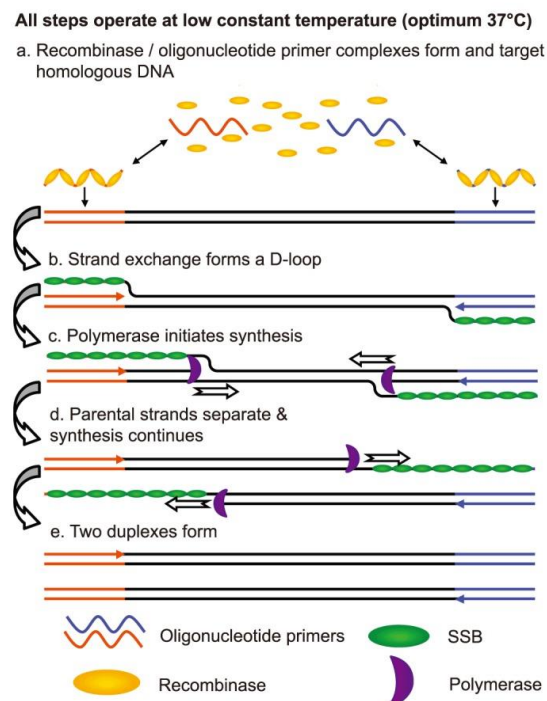
- **TECHNIQUE RPA (Recombinase Polymerase Amplification)**

C'est une méthode d'amplification isotherme réalisée à basse température comprise entre 37-42°C pendant une période de temps très court (< 20 min) (Piepenburg, Williams et al. 2006 ; TwistDx). Elle permet une analyse hautement spécifique et sensible des ADN et ARN des phytopathogènes. L'amplification RPA s'appuie sur l'utilisation de complexes formés par des amorces oligonucléotidiques et une recombinaise permettant de faciliter l'hybridation des amorces avec l'acide nucléique (Piepenburg, Williams et al. 2006). Comme pour la méthode LAMP, il n'y a pas d'étape de purification et de dénaturation de la séquence nucléique cible. Il existe un grand nombre de méthodes permettant la révélation des produits d'amplification. Le plus souvent elles sont basées sur la fluorescence, par l'utilisation de sondes ou d'agents intercalant.

Principe :

Tout d'abord, les recombinaises se lient aux amorces par rapport à la séquence complémentaire sur l'ADN matrice. À l'aide d'une protéine de liaison monocaténaire pour lier l'ADN exposé, l'amorce s'apparie à l'ADN et une boucle D est formée. La polymérase étend l'amorce, éventuellement en déplaçant les deux brins originaux de l'ADN matrice. Ce processus se répète ensuite pour l'amplification.

The RPA Cycle



Cette méthode est utilisée pour les kits de terrain. Tous les kits RPA sont actuellement produits et sous licence intellectuelle de TwistDx Limited (Cambridge, Royaume-Uni).

SYNTHESE DES MANIPULATIONS LAMP CERS

MANIPULATION 1 : Application de la technique LAMP basée sur les conditions du fournisseur WarmStart

- ✓ **Template :** ADN (20 à 25 ng)
- ✓ **Séquence cible :** gène egl
- ✓ **Polymerase :** WarmStart Colorimetric LAMP 2X MM
Information sur le produit : <https://www.neb.com/products/m1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna>
- ✓ **Préparation de la Lamp Primer Mix**

Volume final		100 μ L	
Primers MIX (μ M) 10x			
Primer	[Ci]	[C10X]	Vol
HPLC Water			56
FIP	100	16	16
BIP	100	16	16
F3	100	2	2
B3	100	2	2
LOOPF	100	4	4
LOOPB	100	4	4
Total			100

- Aliquots de 25 μ l
- Travailler à température ambiante mais déposer les réactifs sur de la glace

✓ **Préparation de la réaction LAMP**

	Vol
WarmStart Colorimetric LAMP 2X MM	12,5
LAMP Primer Mix (10X)	2,5
Template	1
Water (nuclease free water)	9
Total Volume	25 μ l

✓ **Protocole**

- Pipeter 24 μ l par réaction
- Ajouter 1 μ l de template par réaction
- Mélanger : mélange de couleur rose
- Couvrir de façon hermétique les tubes
- Incuber à 65°C pendant 30 minutes
- Retirer et laisser au frais
- Révélation par colorimétrie : JAUNE (réaction positive)
ROSE (réaction négative)
- Si la couleur n'a pas bien virée, réincuber à 65°C pendant 15 min
- Prendre une photo

✓ **Liste des souches**

N°1	RUN0157	PSS4	I15
N°2	RUN0054	GMI1000	I18
N°3	RUN0546	RF32	IIA7
N°4	RUN0001	IPO1609	IIB1
N°5	RUN0160	JT516	IIB1
N°6	RUN0280	JY200	IIB4NPB
N°7	RUN2293	MG27	III19
N°8	RUN133	CMR15	III29
N°9	RUN1314	UQRS627	BDB

N°10	RUN0064	JT663	SZY
N°11	Témoin négatif	CFBP7122	<i>Xanthomonas</i>
N°12	Témoin négatif	LMG16206	<i>Pseudomonas</i>
N°13	Témoin négatif	LMG2804	<i>Dickeya</i>
N°14	Témoin négatif	LMG2894	<i>Clavibacter</i>
N°15	Témoin négatif (sans template)		
N°16	Témoin (eau)		
N°17	Témoin (sans template)		

✓ **Résultats**



- A peu près une 1 heure pour obtenir un signal positif pour les souches ceRs
- **Les tests *egl* LAMP s'allument sur les témoins négatifs : *Xanthomonas vasicola*, *Dickeya* et *Clavibacter*.**
- Après vérification *in silico* par blast de génome, les amorces n'accrochent pourtant pas sur les 4 génomes.
- Il a été supposé que peut être le fait de travailler avec des ADN et non des suspensions induit de faux positifs. Il a été évoqué que le même problème de spécificité est rencontré chez une autre équipe qui travaille sur la LAMP. Elle utilise également de l'ADN comme template.
- Puisque le but est d'utiliser la technique pour des détections de routine pouvant être appliquée sur terrain, **il a été recommandé de travailler sur des suspensions bactériennes.**

MANIPULATION 2 : Application de la technique LAMP en utilisant des suspensions bactériennes et les conditions du fournisseurs WarmStart

- ✓ **Template :** suspension bactérien (10^5 cfu/ml)
- ✓ **Séquence cible :** gène *egl*
- ✓ **Polymerase :** WarmStart Colorimetric LAMP 2X MM
- ✓ **Préparation de la Lamp Primer Mix**

Volume final		100 μL	
Primers MIX (μM) 10x			
Primer	[Ci]	[C10X]	Vol
HPLC Water			60
FIP	100	16	16
BIP	100	16	16
F3	100	2	2
B3	100	2	2
LOOPF	100	4	4
LOOPB	100	4	4
Total			100

- Aliquots de 25 μl
- Travailler à température ambiante mais déposer les réactifs sur de la glace

✓ **Préparation de la réaction LAMP**

	Vol
WarmStart Colorimetric LAMP 2X MM	12,5
LAMP Primer Mix (10X)	2,5
Template	1
Water (nuclease free water)	9
Total Volume	25 μl

✓ **Protocole**

- pipeter 24 μl par réaction
- Ajouter 1 μl de template par réaction
- Mélanger : mélange de couleur rose
- Couvrir de façon hermétique les tubes
- Incuber à 65°C pendant 30 minutes
- Retirer et laisser au frais
- Révélation par colorimétrie : JAUNE (réaction positive)
ROSE (réaction négative)
- Si la couleur n'a pas bien virée, réincuber à 65°C pendant 15 min
- Prendre une photo

✓ **Liste des souches (10⁵cfu/ml)**

N°1	RUN0332	III19
N°2	RUN1794	III48
N°3	RUN0001	IIB1
N°4	RUN2266	IIB1
N°5	RUN0018	IIB4NPB
N°6	RUN0319	I
N°7	RUN3210	I
N°8	RUN0083	IV
N°9	RUN1309	IV
N°10	LMG2804	Dickeya

N°11	LMG16206	Pseudomonas
N°12	LMG896	Xanthomonas vasicola
N°13	LMG5942	Ralstonia picketti
N°14	Témoin négatif	(sans template)

✓ **Résultats**



- A peu près **3 heures** pour obtenir un virement de couleur positif pour les souches ceRs sauf pour la souche n°2 avec une couleur douteuse.
- Les témoins négatifs sont négatifs (couleur rose)
- **Remarque** : Dans Lenartic et al. (2013), la LAMP est effectuée avec une template de souches à 10^8 cfu/ml et avec des concentrations d'amorces plus concentrées que celles des conditions du fournisseur Warmstart : les Loops sont 5 fois plus concentrées et une petite différence sur les FIP et BIP.
- **Il a été recommandé de refaire la manip avec une concentration de suspension bactérienne à 10^8 cfu/ml et de changer les concentrations des amorces, comme dans Lenartic et al. (2013)**

MANIPULATION 3 : Application de la technique LAMP en utilisant des suspensions bactériennes à 10^8 cfu/ml et les conditions mentionnées dans Lenarcic et al. (2013).

- ✓ **Template** : suspension bactérien (10^8 cfu/ml)
- ✓ **Séquence cible** : gène egl
- ✓ **Polymerase** : WarmStart Colorimetric LAMP 2X MM
- ✓ **Préparation de la Lamp Primer Mix**

Volume final		100 μ L	
Primers MIX (μ M) 10x			
Primer	[Ci]	[C10X]	Vol
HPLC Water			16
FIP	100	20	20
BIP	100	20	20
F3	100	2	2
B3	100	2	2

LOOPF	100	20	20
LOOPB	100	20	20
Total			100

- Aliquots de 25µl
- Travailler à température ambiante mais déposer les réactifs sur de la glace

✓ **Préparation de la réaction LAMP**

	Vol
WarmStart Colorimetric LAMP 2X MM	12,5
LAMP Primer Mix (10X)	2,5
Template	1
Water (nuclease free water)	9
Total Volume	25

µl

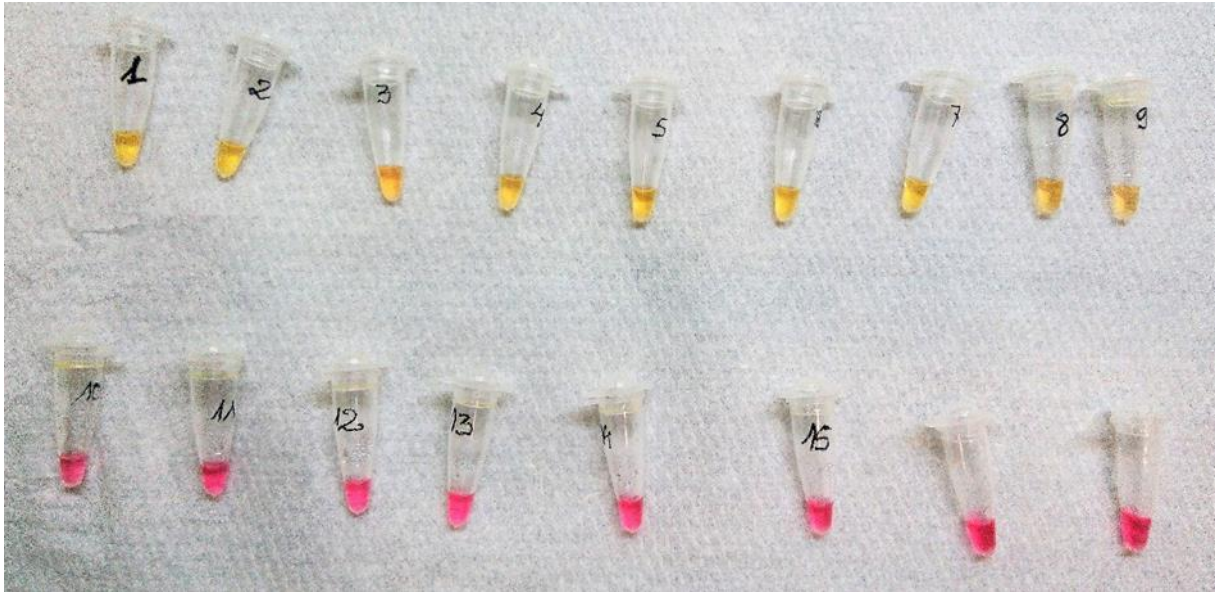
✓ **Protocole**

- pipeter 24 µl par réaction
- Ajouter 1 µl de template par réaction
- Mélanger : mélange de couleur rose
- Couvrir de façon hermétique les tubes
- Incuber à 65°C pendant 30 minutes
- Retirer et laisser au frais
- Révélation par colorimétrie : JAUNE (réaction positive)
ROSE (réaction négative)
- Si la couleur n'a pas bien virée, réincuber à 65°C pendant 15 min
- Prendre une photo

✓ **Liste des souches (10⁸ cfu/ml)**

N°1	RUN0332	III19
N°2	RUN1794	III48
N°3	RUN0001	IIB1
N°4	RUN2266	IIB1
N°5	RUN0017	IIB4NPB
N°6	RUN0319	I
N°7	RUN3210	I
N°8	RUN0083	IV
N°9	RUN1309	IV
N°10	LMG2804	Dickeya
N°11	LMG16206	Pseudomonas
N°12	LMG5942	Ralstonia picketti
N°13	LMG896	Xanthomonas vasicola
N°14	LMG16206	Pseudomonas (10 ⁶)
N°15	LMG5942	Ralstonia picketti (10 ⁶)
N°16	Témoin eau	
N°17	Témoin (sans template)	

✓ **Résultats**



- La manip a fonctionné.
- Jaune (+) pour les cibles au bout de 1h30 à 65°C avec les nouvelles conditions : concentration primers comme Lenartic et al. (2013) et 10^8 pour la concentration du template
- Rose (-) pour les non cibles.

MANIPULATION 4 : Détection des souches ceRs avec la technique LAMP en utilisant du broyat de tubercules inoculées par des suspensions bactériennes à 10^8 cfu/ml.

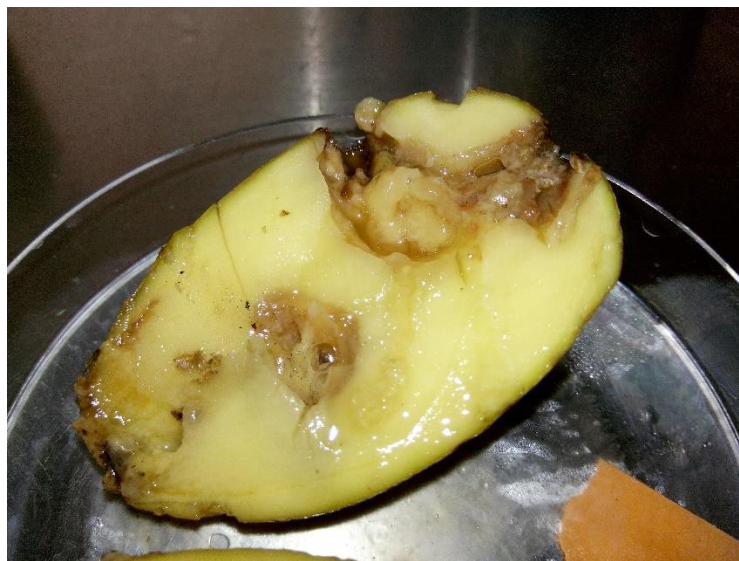
✓ **Inoculation des tubercules de pommes de terre**

Traitements : - 1 souche phylotype IIB-1 et 1 souche phylotype III (10^8 cfu/ml)

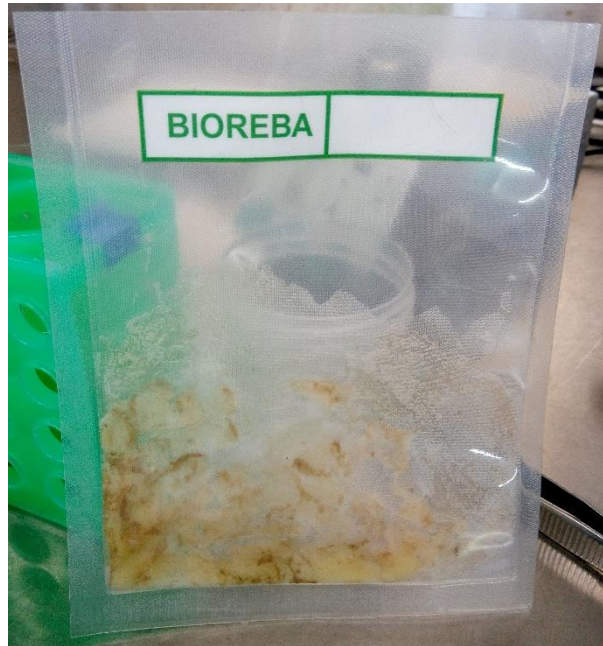
- 2 variétés de pomme de terre
- 5 tubercules à inoculer par souche
- 3 inoculations par yeux après avoir fait un trou avec un cône
- 1 inoculation au niveau des tissus vasculaires après avoir coupé le tubercule en deux
- 1 patate saine juste avec trou (témoin)



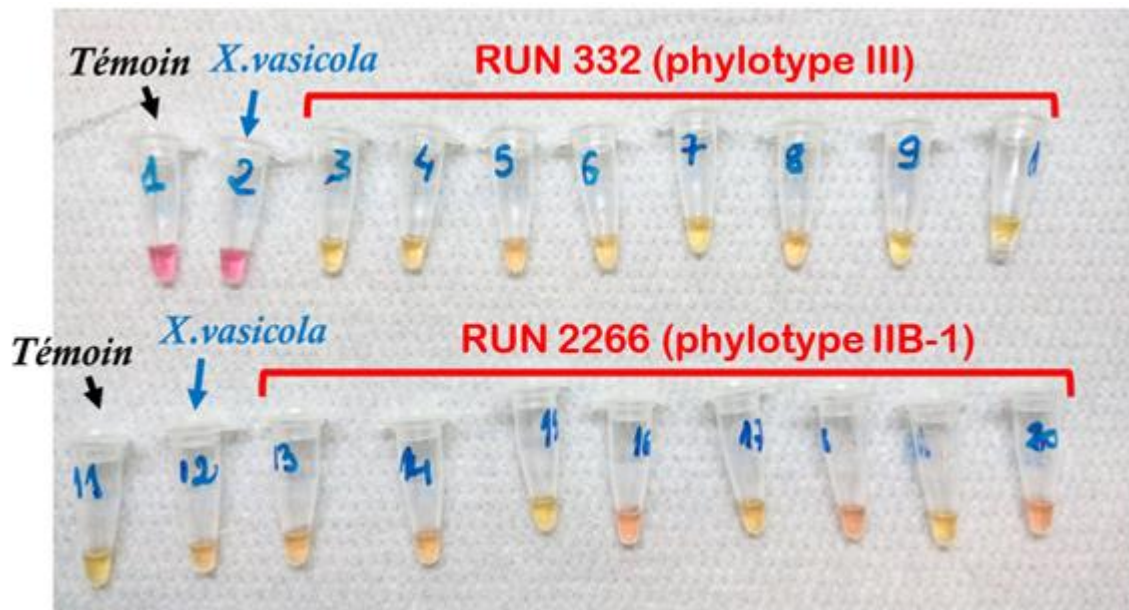
- Incubation à 28°C pendant 2 jours



- Broyat du tissu vasculaire pour la détection de la souche ceRs



- ✓ Résultat de la détection du ceRs avec la méthode LAMP (protocole Lenarcic et al., 2013)



- Le résultat a été obtenu après 1h30 d'amplification
- Les témoins négatifs : pomme de terre sain et *X. vasicola* sont identiques pour la ligne phylotype III et la ligne pour la ligne phylotype IIB-1. Or, les résultats sont différents, où une répétition affiche positive tandis que l'autre répétition affiche négative.
- Le test pour le phylotype III est positif tandis que pour le phylotype IIB-1, certains résultats sont douteux (n° 16, 18 et 20 où la coloration semble rester rose donc négatif).
- A partir de ce résultat, il a été recommandé de refaire un test avec des extraits de pomme de terre sain pour vérifier si on obtient un faux positif.

- **MANIPULATION 5** : Vérification faux positif avec les extraits de pomme de terre sain

✓ Résultat



- Le résultat a été obtenu après 1h30 d'amplification
- Les mélanges réactionnels comportant l'extrait de pomme de terre sain sont colorés en jaune, indiquant un test positif : présence de souche ceRs.

CONCLUSIONS

Une rapide analyse des résultats nous laisse entrevoir que la technique LAMP pour la détection des souches ceRs à partir du matériel végétal nécessite encore une optimisation. La durée de la réaction pour obtenir un test positif avec les souches témoin positif a nécessité plus d'une heure de temps. En outre, la LAMP *egl* s'est révélée pas très concluante en raison de problème de faux positif. Toutefois, des problèmes de ce genre ont été fréquemment évoqués dans la littérature (Kuboki *et al.*, 2003 ; Senarath *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015 ; Suleman *et al.*, 2016). Comme la technique LAMP est extrêmement sensible, le faux positif pourrait être causé par une légère contamination d'ADN par aérosols ou autres choses qui restent encore à déterminer. En résumé, l'amplification non spécifique constitue un facteur limitant dans l'applicabilité de la méthode LAMP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 150-154.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., & Notomi, T. (2001). Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clinical Chemistry*, 47(9), 1742-1743.
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*, 16(3), 223-229.
- Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D. J., Suzuki, H., ... & Igarashi, I. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of clinical microbiology*, 41(12), 5517-5524.
- Kubota, R., Vine, B. G., Alvarez, A. M., and Jenkins, D. M. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 98:1045-1051.
- Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., Armes, N.A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.*;4:1115-21.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*, 18(6), 407-421.

- Piepenburg, O., Williams, C. H., & Armes, N. A. (2008). U.S. Patent No. 7,435,561. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, 3(5), 877.
- Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*, 15(2), 62-69.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Armes, N. A., & Stemple, D. L. (2010). U.S. Patent No. 7,763,427. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., & Armes, N. A. (2011). U.S. Patent No. 8,062,850. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Armes, N. A., & Stemple, D. L. (2011). U.S. Patent No. 8,017,339. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., & Armes, N. A. (2013). U.S. Patent No. 8,580,507. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Lenarcic R, Morisset D, Pirc M, Llop P, Ravnikar M, et al. (2014) Loop-Mediated Isothermal Amplification of Specific Endoglucanase Gene Sequence for Detection of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 9(4): e96027. doi:10.1371/journal.pone.0096027
- Senarath, K. D., Usgodaarachchi, R. B., Navaratne, V., Nagahawatte, A., Wijayarathna, C. D., Alvitigala, J., & Goonasekara, C. L. (2014). Non specific amplification with the LAMP technique in the diagnosis of tuberculosis in Sri Lankan settings. *Journal of Tuberculosis Research*, 2(04), 168.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Armes, N. A., & Stemple, D. L. (2015). U.S. Patent No. 8,962,255. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wang, D. G., Brewster, J. D., Paul, M., & Tomasula, P. M. (2015). Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*, 20(4), 6048-6059.
- Suleman, E., Mtshali, M. S., & Lane, E. (2016). Investigation of false positives associated with loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Toxoplasma gondii* in archived tissue samples of captive felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), 536-542.
- Huang W, Zhang H, Xu J, Wang S, Kong X, Ding W, Xu J and Feng J (2017) Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype I Mulberry Strains in China. *Front. Plant Sci.* 8:76. doi: 10.3389/fpls.2017.00076
- Forrest, M. S., & Nentwich, O. Recombinase polymerase amplification. *Twist DX*, 39-41.
- TwistDx. Instruction Manuals.

