



HAL
open science

Méthodes d'évaluation de la qualité sanitaire des jeunes plants horticoles

Marie-Laure Winocq

► **To cite this version:**

Marie-Laure Winocq. Méthodes d'évaluation de la qualité sanitaire des jeunes plants horticoles. Innovations Agronomiques, 2011, 15, pp.1-8. 10.17180/wr2v-ac04 . hal-02642386

HAL Id: hal-02642386

<https://hal.inrae.fr/hal-02642386>

Submitted on 28 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Méthodes d'évaluation de la qualité sanitaire des jeunes plants horticoles

Winocq M.-L.

AREXHOR Seine Manche, 32 rue Alfred Kastler, 76 130 Mont Saint-Aignan

Correspondance : marie-laure.winocq@astredhor.fr

Résumé

Ce projet issu d'une demande des entreprises fournisseurs de jeunes plants a pour objectif d'améliorer la qualité sanitaire des plantes horticoles en amont de la filière. Pour ce faire, un programme d'action a été défini en 2 parties :

- Etablir un document sur les principales maladies des plantes ornementales afin d'acquérir de meilleures connaissances sur les pathogènes, et d'établir un guide de bonnes pratiques culturales dans les entreprises horticoles.
- Harmoniser des méthodes de diagnostic en évaluant l'efficacité des méthodes de détection de *Xanthomonas campestris pv. pelargonii* (Xcp). L'étude menée s'est basée sur le principe de test inter-laboratoires, à savoir des envois d'échantillons aux différents laboratoires partenaires.

Mots-clés : Diagnostic, Pelargonium, *Xanthomonas campestris*, Qualité sanitaire, ELISA, Immunofluorescence, PCR

Abstract: Methods for evaluating sanitary quality of young horticultural plants

This project met a demand of companies producing young horticultural plants and aimed at improving sanitary quality of plants in the first steps of the supply chain. The strategy included two steps: 1) to establish a document on the main diseases of ornamentals in order to get better knowledge of their pathogens, and to write guidelines for good agricultural practices in these companies; 2) to harmonize diagnosis methods through evaluation of efficacy of detection methods targeting *Xanthomonas campestris pv. pelargonii* (Xcp). The study included a ring test among laboratories based upon common samples sent to all participating laboratories

Keywords: diagnosis, Pelargonium, *Xanthomonas campestris*, Sanitary Quality, ELISA, Immunofluorescence, PCR

Contexte

Suite à un audit réalisé sur 21 entreprises fournisseurs de jeunes plants et obtenteurs de la filière plante ornementale, volontairement regroupés au sein du groupe GROPO (Groupement de recherche et d'obtentions pour les plantes ornementales) au sein de la FNPHP (Fédération Nationale des Producteurs de l'Horticulture et des Pépinières), il est ressorti que de nombreuses méconnaissances et interrogations concernent les problèmes pathologiques des plantes ornementales, les références sur les problèmes pathologiques étant faibles sur certains genres. Par ailleurs, les professionnels s'interrogent sur la fiabilité des méthodes de diagnostic qu'ils peuvent utiliser (notamment sur *Xanthomonas*).

Fortes de ce constat, les 21 entreprises auditées ont souhaité qu'un programme de recherche et d'étude soit développé pour améliorer la qualité sanitaire de leur culture. Une demande sur ce projet a été faite auprès du CTPS et une convention a été signée (2005) entre le Ministère de l'agriculture et l'ASTREDHOR, AREXHOR Seine Manche étant le porteur de ce projet.

Objectifs et description du programme

L'objectif principal est d'améliorer la qualité sanitaire des plantes horticoles en amont de la filière à savoir dès le stade jeune plant. Pour ce faire, un programme d'action a été défini en plusieurs phases :

- recensement des maladies par genre et élaboration d'un cahier des charges, d'un guide de bonnes pratiques.
- harmoniser des méthodes de diagnostic en évaluant l'efficacité des méthodes de détection de *Xanthomonas campestris pv. pelargonii*

L'intérêt pour la filière horticole est multiple, à savoir une meilleure connaissance des pathogènes, une bonne identification des compétences nationales, une harmonisation des techniques d'analyses ainsi que des préconisations de procédures simples pour les entreprises horticoles.

Les partenaires du programme

Les partenaires scientifiques et techniques suivants ont été associés à la réalisation du projet :

- SNES (Valérie GRIMAUULT) pour les tests inter-laboratoire,
- INRA Avignon (Eric VERDIN) et INRA Sophia Antipolis (Jean Paul ONESTO) pour la bibliographie,
- FNPHP, (Fédération Nationale des Producteurs de l'Horticulture et des Pépinières)
- les laboratoires privés (AGRODIAGNOSTIC, BBV, Laboratoire de AREXHOR Seine Manche, LCA),
- et les laboratoires des fournisseurs de jeunes plants (GERAFLORE, EGD, GERANIUM HABERSHILL, SUD GERANIUM, GERANIUM PLANT, OROFLOR, CHALLET HERAULT).

I- Réalisation d'un recueil sur les principales maladies des plantes ornementales

Ce recueil est destiné à l'ensemble des professionnels de jeunes plants, les obtenteurs, producteurs et conseillers horticoles. Il regroupe un descriptif des maladies virales, bactériennes et fongiques portant sur douze espèces ornementales. Le choix s'est porté sur des espèces dont la valeur économique, en terme de production et de vente, est très forte dans le domaine de l'horticulture ornementale. L'intérêt de ce recueil est de regrouper des informations sur des maladies dont les références bibliographiques sont diverses, souvent limitées et rarement compilées.

Pour les maladies d'origine virale, le livre des « maladies à virus des plantes ornementales » de Josette Albouy et Jean-Claude Devergne (1998) a servi de base. Pour certaines espèces, l'absence de référence classique a conduit à utiliser d'autres sources d'informations (notamment internet).

Ce recueil aborde les maladies des principales plantes ornementales en pot ou à massif :

- Plantes à multiplication végétative : chrysanthème, dipladénia, fuchsia, hibiscus, hortensia, impatiens de Nouvelle-Guinée, pélargonium, pétunia et verveine.
- Plantes à multiplication par graines : cyclamen, pensée et primevère

La recherche des maladies provoquées par les bactéries et les virus a été conduite de manière exhaustive pour chaque espèce. Concernant les maladies fongiques, en raison de la grande diversité des champignons dommageables dans les cultures, nous avons privilégié celles pour lesquelles il

n'existe que peu ou pas de méthode de lutte. Ainsi, les champignons vasculaires et les champignons responsables de rouilles ont particulièrement été recherchés.

Afin d'encourager une utilisation pratique par les professionnels, le recueil se présente sous forme de fiches interrogeables par agent pathogène et s'articule autour de différentes rubriques comme l'origine et la répartition géographique, la gravité sur la culture, la fréquence sur la culture, la gamme d'hôtes naturels, les symptômes, la transmission, les méthodes de diagnostic, le type d'échantillon pour le diagnostic, les méthodes d'assainissement en amont.

Un guide de bonnes pratiques est édité en fin de recueil et aborde les méthodes d'assainissement en production (schéma de sélection, prescriptions sanitaires et conduite de culture).

Ce recueil a été envoyé aux professionnels fournisseurs de jeunes plants adhérents au groupe GROPO et il est consultable sur le site internet de l'ASTREDHOR : www.astredhor.fr

2- Evaluation de l'efficacité des méthodes de détection de *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*

Parmi les maladies qui sont identifiées pour chaque genre, un certain nombre de méthodes de diagnostic existe. Si ces méthodes permettent l'identification de la maladie, les seuils de détection peuvent présenter des différences.

Les travaux d'harmonisation de ces méthodes se sont concentrés sur les méthodes de diagnostic du *Xanthomonas*. En effet, *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* est l'une des maladies les plus importantes du Pelargonium (culture majeure au niveau national). Les symptômes peuvent survenir sur boutures avec des brunissements de la base de la tige et une grande difficulté d'enracinement. En culture, le symptôme courant sur feuille est la tâche en coin d'abord chlorotique qui se nécrose progressivement, les feuilles peuvent s'affaisser en parapluie sur certaines branches (Figure 1) (Lajoux, 1995).



Xanthomonas campestris pv. *pelargonii* sur geranium zonal



Xanthomonas campestris pv. *pelargonii* sur geranium lierre double

Figure 1 : Dégâts de *Xanthomonas campestris* sur géranium. Photo : AREXHOR Seine Manche

Le *Xanthomonas* fait l'objet d'un contrôle rigoureux effectué par les entreprises produisant de jeunes plants. Des contrôles entrant dans le cadre des campagnes de certification montrent que le *Xanthomonas* fait de temps en temps sa réapparition, et fait toujours l'objet de doute dans les interprétations d'analyses.

Pour cette étude, il s'agit dans un premier temps de définir et d'évaluer les seuils de détection sur culture pure de bactérie des différentes méthodologies d'analyse du *Xanthomonas campestris pv pelargonii* (Xcp) puisque celles-ci sont nombreuses.

Les méthodes les plus utilisées par les laboratoires privés et fournisseurs de jeunes plants sont le DIBA ELISA et DAS ELISA (méthode officielle), l'immunofluorescence (IF). Des tests de mise en culture et tests PCR ont été ajoutés pour avoir un comparatif complet des seuils de détection.

Les méthodes ELISA, Immunofluorescence correspondent à des méthodes de détection sérologique basées sur la visualisation d'une réaction de reconnaissance entre un antigène (protéine de l'agent pathogène) et l'anticorps (protéine spécifique dirigée contre l'antigène).

La technique PCR permet quand à elle d'identifier les agents pathogènes par la mise en évidence de leurs acides nucléiques (ADN ou ARN). En général, elles sont d'une sensibilité supérieure à celle d'un test ELISA ce qui permet le diagnostic des agents pathogènes présents en faible concentration dans les plantes malades ou leurs vecteurs. L'inconvénient majeur est leur coût élevé par rapport aux autres techniques.

Dans un deuxième temps, un test inter-laboratoire de détection sur boutures de *Pelargonium* a été mis en place sur l'ensemble des laboratoires français faisant du diagnostic (12 laboratoires), cette étude permettant aux différents laboratoires de se positionner et de connaître les performances de leur méthodologie d'analyse. Seules les méthodes DAS, DIBA ELISA et Immunofluorescence ont été comparées dans ce test inter-laboratoire.

2.1. Evaluation des seuils de détection sur culture pure de bactérie

Mise en œuvre et méthodologie

Les échantillons, composés de 3 suspensions bactériennes (concentration 10^7) à diluer, ont été préparés par la SNES. Les suspensions bactériennes ont été diluées par les laboratoires partenaires dans du tampon de broyage au $1/10^e$ (10^6) jusqu'au $1/10\ 000\ 000^e$ (10^0), le tampon de broyage étant celui utilisé par le laboratoire.

Chaque laboratoire a ensuite analysé 3 répétitions de chaque dilution par sa propre technique (ELISA, DIBA ou IF) et ses propres sérums (Agdia ou LCA). Un total de 72 analyses a ainsi été réalisé, comprenant 9 analyses (3 échantillons x 3 répétitions/échantillon) par concentration bactérienne. Des témoins négatifs (tampon seul) et positifs (des kits) ont été inclus à l'analyse. Afin de vérifier la concentration bactérienne des suspensions envoyées, la SNES (laboratoire n°1) a réalisé des étalements sur milieux de culture (LPGA). Un laboratoire a testé la détection par PCR.

Résultats

Sur culture pure (suspension bactérienne), l'isolement (laboratoire n°1) reste la technique la plus sensible (10^0). En effet, le dénombrement effectué indique que les valeurs théoriques correspondent bien aux quantités de bactéries observées (Tableau 1).

Le seuil de détection de la technique DAS ELISA reproductible sur les 3 répétitions se situe à 10^2 cfu/ml pour les 3 laboratoires. Les sérums différents (Agdia et LCA) utilisés n'ont pas influencé les résultats.

Il existe une très forte hétérogénéité entre les laboratoires pour les résultats obtenus avec la technique DIBA ELISA. Pour un laboratoire, le seuil se situe à 10^4 cfu/ml de façon reproductible. Pour le second laboratoire, le seuil se situe de façon reproductible sur les 3 répétitions à 10^3 cfu/ml et à 10^2 cfu/ml sur 2 échantillons (avec un signal faible).

	labo n°1	labo n°2	labo n°3	labo n°4	labo n°5	labo n°6	labo n°7	labo n°8
concentration	mise en culture	DAS ELISA	DAS ELISA	DAS ELISA	DIBA ELISA	DIBA ELISA	IF	PCR
10 ⁷	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁶	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+	+	détection ech A,B et 2 répét ech C	+
10 ³	+	+	+	+	-	+	+	-
10 ²	+	+	+	+	-	détection ech A,B	détection 2 répét ech A,B et 1 répét ech C	-
10 ¹	+	détection ech C	-	-	-	-	détection ech C et 1 répét ech A,B	-
10 ⁰	+	-	-	-	-	-	détection 2 répét ech C	-

Tableau 1 : Seuil de détection des différentes méthodes sur culture pure de *Xcp* (3 échantillons : A, B et C).

Le seuil de détection pour la technique Immunofluorescence se situe de manière reproductible à 10³ cfu/ml. Une très forte hétérogénéité a été observée sur les dilutions plus importantes. Ce résultat pourrait être dû à la manipulation elle-même. En effet, il y a eu un délai important entre le dépôt des échantillons et la lecture des résultats sur les lames, entraînant probablement une extinction de la fluorescence. Par ailleurs, la détection dans les faibles concentrations pourrait être due à une contamination croisée.

Le seuil de détection de la technique PCR sur culture pure est de 10⁴ cfu/ml (inférieur au seuil de détection ELISA), ce qui est comparable ou plus faible que le seuil décrit dans la littérature pour certaines amorces spécifiques d'autres *Xanthomonas* (Fargier, 2007). La faible sensibilité obtenue montre qu'une amélioration de la méthode serait nécessaire.

2.2. Evaluation des seuils de détection sur boutures de *Pelargonium*

Mise en œuvre et méthodologie

Les échantillons ont été préparés par la SNES, il s'agit de boutures fraîches infectées artificiellement par infiltration sous vide par *Xanthomonas campestris pv pelargonii* à 3 taux d'inoculum différents (10², 10⁴, 10⁶). La méthode de diagnostic est celle utilisée par le laboratoire.

30 échantillons codés ont été envoyés par courrier express aux 12 laboratoires partenaires. Ces 30 échantillons comprenaient 5 boutures contaminées avec une suspension bactérienne à 10⁶ cfu/ml, 10 boutures à 10⁴ cfu/ml, 10 boutures à 10² cfu/ml et 5 boutures infiltrées avec de l'eau (non inoculées).

Les échantillons reçus ont été analysés par les laboratoires avec leur propre méthode de diagnostic, chaque échantillon (=bouture) étant traité séparément.

Les méthodologies employées sont : DAS et DIBA ELISA, et immunofluorescence. Les réactifs en DAS ELISA sont ceux utilisés par les laboratoires (fournisseurs : AGDIA, LCA, BIOREBA, SEDIAG). Le laboratoire 5 a testé 2 origines de sérum. Chaque laboratoire a ajouté un témoin positif et un témoin négatif selon son protocole.

En parallèle, des boutures supplémentaires contaminées aux différentes concentrations ont été analysées par ELISA par le laboratoire officiel (SNES) afin de vérifier que 100% des boutures étaient contaminées (minimum 10 boutures analysées par concentration). Afin de déterminer la concentration

de la suspension bactérienne ayant servi à inoculer les boutures, la SNES a également analysé cette suspension par étalement.

Résultats

A. Résultat des analyses de la SNES sur les différentes dilutions issues des boutures supplémentaires analysées

Le test des boutures supplémentaires a montré que 100% des boutures étaient contaminées (Figure 2). De plus, ces résultats indiquent que la technique DAS ELISA détecte *Xanthomonas campestris pv pelargonii* sur boutures à partir de 10^4 cfu/ml.

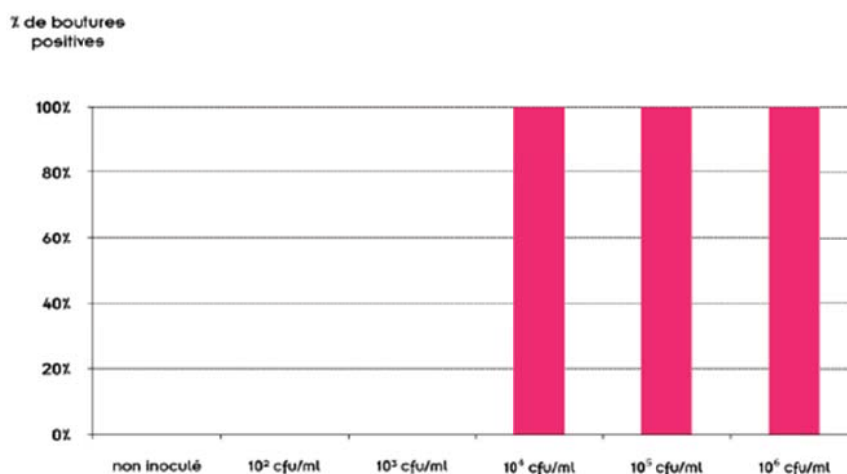


Figure 2 : Résultats des boutures supplémentaires analysées par la SNES en DAS ELISA

B. Résultats des tests inter-laboratoires

En DAS ELISA, aucune détection de *Xanthomonas campestris pv pelargonii* n'a été possible à 10^2 cfu/ml (Figure 3). Pour mémoire, le seuil de détection identifié lors du précédent test sur culture pure était de 10^2 cfu/ml (Tableau 1). Sur bouture de Pélargonium, le seuil de détection est situé à 10^4 cfu/ml (résultats obtenus par les différents laboratoires). Les boutures supplémentaires analysées par le laboratoire officiel qui étaient contaminées à 10^3 cfu/ml, sont également apparues négatives en ELISA (Figure 2).

5 laboratoires sur 8 ont détecté parfaitement tous les échantillons inoculés à partir de 10^4 cfu/ml, sans obtention de faux positifs et de faux négatifs.

Les 3 autres laboratoires ont fait quelques erreurs, à savoir quelques faux négatifs. En effet, le laboratoire (n°7) a présenté un seul faux négatif à 10^4 cfu/ml. Du fait d'une défaillance de son lecteur ELISA, ce laboratoire a effectué une lecture visuelle de ses plaques, moins précise qu'une lecture de densité optique. 2 laboratoires (n° 3 et 6) ont présenté de nombreux faux négatifs à 10^4 cfu/ml et 1 faux négatif à 10^6 cfu/ml. Le laboratoire 3 débutait ses analyses et a eu des problèmes de valeurs de Do du témoin sain anormalement élevées. Le laboratoire 6 a eu des problèmes de disponibilité de personnel et de délai entre la réception et l'analyse des boutures qui peut expliquer son résultat.

Par ailleurs, l'origine des sérums n'a pas influencé les résultats (cf notamment les histogrammes labo 5 et labo 5 bis de la figure 3).

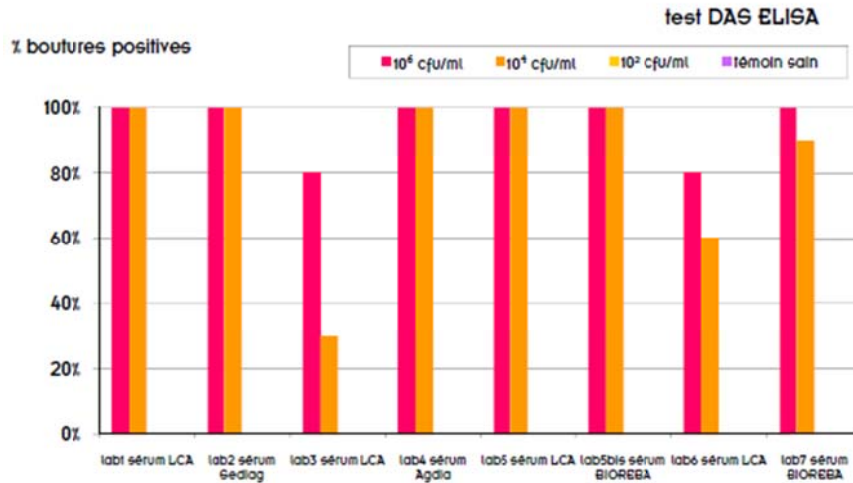


Figure 3 : Seuil de détection de *Xanthomonas campestris pv pelargonii* de différents échantillons de Pelargonium par technique DAS ELISA

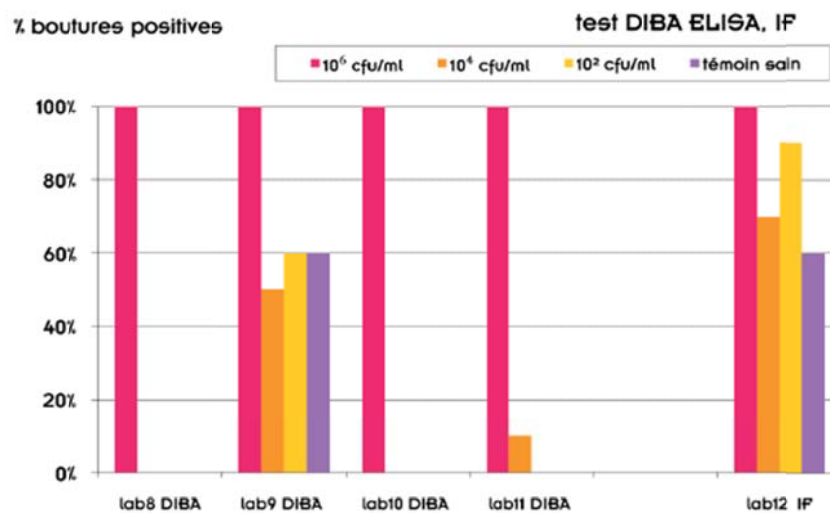


Figure 4 : Seuil de détection de *Xanthomonas campestris pv pelargonii* de différents échantillons de Pelargonium par technique DIBA ELISA et IF

Comme pour la technique DAS ELISA, il n'y a pas de détection reproductible à 10²cfu/ml pour la technique DIBA ELISA (Figure 4). Les résultats avec cette technique sont apparus assez hétérogènes entre laboratoires et entre les échantillons. En effet, 3 laboratoires sur 4 (8, 10 et 11) ne détectent pas les boutures contaminées à 10⁴ cfu/ml. Le laboratoire n°9 détecte certaines boutures contaminées à 10² cfu/ml, à 10⁴ cfu/ml mais également des boutures non inoculées. Le fait d'observer des faux positifs remet donc en cause les résultats à 10² cfu/ml et 10⁴ cfu/ml et pose la question de contaminations croisées.

En immunofluorescence, les seuils de détection ne sont pas reproductibles à 10² et 10⁴ cfu/ml mais uniquement à partir de 10⁶ cfu/ml. Les résultats montrent la présence de faux positifs et certaines détections à 10² cfu/ml et à 10⁴ cfu/ml. Cependant, les détections sur les boutures contaminées sont à prendre avec précaution en raison de la présence de faux positifs. Ici encore se pose la question de contaminations croisées ou de difficultés de lecture.

Conclusion

Sur culture pure (suspension bactérienne), l'isolement reste la technique la plus sensible (10^0). Le seuil de la méthode d'isolement ne peut pas être pris comme seuil de référence car il a été déterminé ici sur culture pure et ne correspond pas à ce qui aurait pu être observé sur des isollements de plantes avec une flore saprophyte (seuil plus élevé).

La méthode DAS ELISA reste la plus efficace au vu des résultats dans la détection de *Xanthomonas campestris pv pelargonii* sur suspensions bactériennes (détection à 10^2 cfu/ml) et sur plantes contaminées (détection à 10^4 cfu/ml). Les résultats ainsi obtenus en DAS ELISA par les différents laboratoires ont prouvé que la méthode était fiable, sensible et reproductible entre laboratoires malgré l'utilisation de sérums différents et de méthodologies différentes.

La méthode DIBA, technique utilisée principalement par les fournisseurs de jeunes plants, a montré des résultats assez hétérogènes entre laboratoires. Celle-ci est moins sensible (détection de 10^3 à 10^4 cfu/ml sur suspensions bactériennes et détection à 10^6 cfu/ml sur plantes contaminées) et a provoqué l'apparition de faux négatifs à concentration faible. Cette méthodologie faisant appel à des lectures visuelles, ceci peut expliquer la difficulté d'une bonne interprétation des analyses.

L'immunofluorescence donne des résultats aléatoires et nous avons mis en évidence des contaminations croisées avec cette technique. Cependant, comme seul un laboratoire avait utilisé cette technique, il est difficile de conclure sur sa reproductibilité. La détection sur plusieurs échantillons à une même concentration est mauvaise.

Le seuil de détection de la PCR est assez élevé par rapport aux autres techniques dans notre étude. Ainsi Sulzinski *et al.* (1998) ont décrit des seuils de détection de 1 à 120 cfu par bouture, avec recours à un enrichissement qui permettrait d'améliorer le seuil de détection. Il serait donc envisageable de diminuer le seuil de détection de *Xanthomonas campestris pv pelargonii* en améliorant la méthode PCR utilisée lors de ces tests inter-laboratoires.

Remerciements

Ces travaux ont bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Agriculture.

Références bibliographiques

- Albouy J., Devergne J.-C., 1998. Maladies à virus des plantes ornementales. INRA, Paris, 473 p.
- Fargier E., 2007. L'étude de la pathologie de *Xanthomonas campestris* et de la structure génétique de ses pathovars a permis l'amélioration de la détection du pathogène dans les semences de Brassicacées. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. 234 pp
- Lajoux C., 1995. Quel est votre diagnostic. PHM Revue Horticole 362, 68-70
- Sulzinski M.A., Schlagnhauser B., Moorman G.W., Romaine C.P., 1998. PCR-based detection of artificial latent infections of geranium by *Xanthomonas campestris pv. pelargonii*. Journal of Phytopathology 146, 111-114.