

Etude sur la présence de la bactérie de la pourriture brune *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (*Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith) dans les cours d'eau de l'Alzette et de la Sûre

par

Claudine SCHMIT ¹⁾, Gilbert STOOS ²⁾ et Johan VAN VAERENBERGH ³⁾

Résumé: Dans le cadre de la surveillance des eaux, une étude détaillée a été faite sur l'état phytosanitaire - la présence de la bactérie de la pourriture brune - de l'eau de l'Alzette et de la Sûre. L'Alzette a été analysé entre Luxembourg et Prettingen et entre Colmar-Berg et Ettelbruck. Les plantes hôtes de *R. solanacearum*, à savoir les morelles *Solanum dulcamara* L., ont été répertoriées. Les échantillons d'eau et de plantes ont été analysés dans deux laboratoires différents par des techniques moléculaires et sérologiques. Aucune bactérie de *Ralstonia solanacearum* (bactérie de quarantaine) n'a pu être détectée au cours de cette campagne.

Introduction

L'infection par la bactérie *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., connue sous le nom de pourriture brune, peut provoquer dans les climats chauds des pertes énormes suite au fanage des feuilles en culture et suite à la pourriture des tubercules de pommes de terre *Solanum tuberosum* L. en postrécolte. L'infection se développe moins vite dans les climats froids, mais peut rester à l'état latent dans les tubercules et tiges de pommes de terre, de la morelle *Solanum dulcamara* ou d'autres plantes hôtes (Elphinstone 1996). Ainsi, dans les climats froids les plantes hôtes constituent l'environnement le plus protégé pour la bactérie et permettent ainsi une persistance plus longue (Elphinstone 1996).

La bactérie, *R. solanacearum*, est reprise depuis 1995 dans l'annexe 1A-II de la directive européenne 77 (93) CEE et par conséquent elle est soumise à une surveillance très stricte. Le statut d'organisme de quarantaine a une plus grande importance que les dégâts causés par la bactérie dans nos régions.

En ce qui concerne les cours d'eau, la présence de bactéries entraîne une interdiction d'utilisation de cette eau à des fins d'arrosage. La morelle (*Solanum dulcamara* L.,

¹⁾ Centre de Recherche Public - Centre Universitaire, 162a, avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg.

²⁾ ASTA, 16 route d'Esch, L-1019 Luxembourg.

³⁾ Rijksstion voor Plantenziekten, Burg, Vaan Gansberhelaan 96, B-9820 Merelbeke, Belgique.

fig. 1) une des plantes hôtes de la bactérie (Hayward 1991) est présente le long des cours d'eau, notamment de l'Alzette au Grand-Duché de Luxembourg. La plus grande source d'infection bactérienne est la survie des bactéries dans la morelle, car cette plante qui pousse le long des cours d'eau peut héberger les bactéries pendant plusieurs années. Elphinstone (1996) insiste dans son étude sur la nécessité absolue de surveiller les cours d'eau régulièrement et que le rôle potentiel de dissémination de la maladie par des déchets industriels et ménagers des tubercules importés doit être analysé. En Belgique les plantes hôtes sont éliminées le long des canaux dans le cadre d'un programme d'assainissement des berges. Il est donc important, en cas de contamination de connaître les endroits de présence de la plante.



Fig. 1. *Solanum dulcamara*.

Objectifs

L'objectif de cette étude réalisée par le Centre de Recherche Public - Centre Universitaire, l'ASTA et la Station de Protection des Végétaux de Merelbeke (Belgique) au cours de l'été 1998 était d'étudier la présence de *R. solanacearum* dans les cours d'eau luxembourgeois, mais aussi dans la plante hôte, la morelle (*S. dulcamara*) par des méthodes de détection classique et moléculaire.

Vu l'absence d'une cartographie exacte de la flore le long de l'Alzette, notamment de la plante hôte de la bactérie, *S. dulcamara*, un des objectifs a été aussi la signalisation et la cartographie des morelles enracinées dans l'eau de l'Alzette. Lors de cette étude uniquement les plantes enracinées et donc hôtes potentielles de la bactérie ont été relevées. Les berges de l'Alzette sont relativement hautes, notamment entre la ville de Luxembourg et Mersch, ainsi celles-ci ont été abordées à partir du cours d'eau.

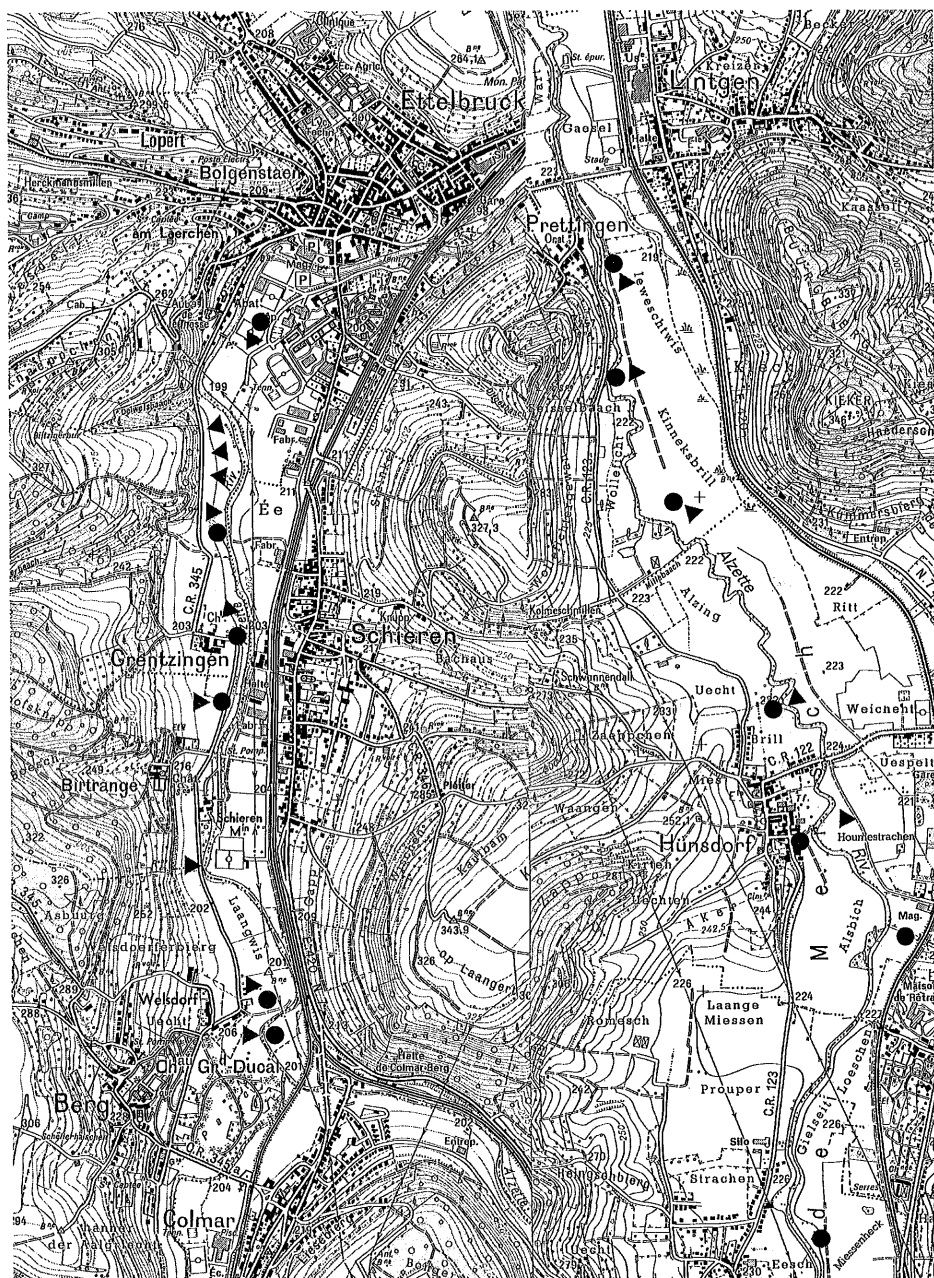


Fig. 2. Cartes topographiques reprenant les endroits de prélèvement et les endroits de présence de *S. dulcamara*. (Extraits des cartes topographiques 1: 20 000, Ettelbrück 11 et Junglinster 17. Autorisation de l'Administration du Cadastre et de la Topographie du 12 octobre 1998).
 ▲ *Solanum dulcamara*. ● endroit de prélèvement.

Le travail de terrain

Une campagne d'échantillonnage a été réalisée fin août 1998. Des échantillons d'eau ont été prélevés dans l'Alzette (entre Müllendorf et Prettingen, entre Colmar-Berg et Ettelbrück) et dans la Sûre (Erpeldange, Ingeldorf, Bettendorf et Reisdorf) (voir tabl. 1 et fig. 2).

Les échantillons ont été pris à la fin de l'été. En effet, c'est pendant cette période et en automne que les populations de bactéries sont élevées, car les colonies se multiplient rapidement, et sont lâchées par les racines aquatiques des plantes hôtes (Elphinstone 1998). Par endroit de prélèvement deux échantillons de 1 l d'eau ont été prélevés à l'aide de bouteilles en plastique (bouteille d'eau minérale) à une profondeur d'au moins 30-40 cm et à proximité des racines de la morelle. Les échantillons sont stockés à 4° C jusqu'au moment de l'analyse qui doit se faire de préférence dans les 48 heures qui suivent le prélèvement. Uniquement les parties les plus vieilles du rhizome submergé des pieds de morelle ont été prélevées. Les échantillons ont été conservés à 4° C.

Tabl. 1. Endroits de prélèvement sur l'Alzette et présence de *S. dulcamara*.

Hünsdorf (IFBL: L8.45.42), berge de l'Alzette, 25.8.1998.
Hünsdorf, Brill (IFBL: L8.45.24), berge de l'Alzette, 25.8.1998.
Entre Hünsdorf et Prettingen, Alzing (IFBL: L8.45.24), berge de l'Alzette, 25.8.1998.
Entre Hünsdorf et Prettingen, Wolleficht (IFBL: L8.45.21), berge de l'Alzette, 25.8.1998.
Prettingen (IFBL: L8.45.21), berge de l'Alzette, 25.8.1998.
Colmar-Berg (IFBL: L8.15.13), berge de l'Alzette, 26.8.1998.
Colmar-Berg (IFBL: L8.15.13), îlot dans l'Alzette, 26.8. 1998.
Birtrange (IFBL: K8.55.33), berge de l'Alzette, 26.8.1998.
Schieren (IFBL: K8.55.33), berge de l'Alzette, 26.8.1998.
Entre Schieren et Ettelbrück (IFBL: K8.55.31), berge de l'Alzette, 26.8.1998.
Schieren (IFBL: K8.55.31), berge de l'Alzette, 26.8.1998.

Analyse au laboratoire

Trois types d'analyses ont été faites sur les échantillons de plantes et d'eau afin de comparer les méthodes de détection dont le "selective plating" sur le milieu semi-sélectif SMSA (Elphinstone et al. 1996), le test d'immunofluorescence (Janse 1988) et la polymérase chain reaction (PCR) (Seal et al. 1993).

Le test du selective plating

Le "selective plating" est une méthode de détection sensible nécessitant peu de matériel de laboratoire et facilement réalisable dans un laboratoire de routine. La culture sur milieu sélectif permet d'éliminer d'autres bactéries de l'échantillon. Le résultat du test est obtenu en dedans trois jours et l'agent pathogène peut être facilement isolé à partir du milieu sélectif pour des tests complémentaires. Lorsqu'on obtient un test négatif, suite à un effet inhibiteur, l'immunofluorescence est un test de dépistage complémentaire.

Echantillons d'eau

L'échantillon d'eau de 1 l est divisé en 6 échantillons de 50 ml. Centrifugation pendant 20 minutes à 6700 rpm. Le culot est resuspendu dans 200 µl de 10 mM tampon phosphate (pH 7,2). Des dilutions de 1/10 sont préparées. 2 x 50 µl de l'extrait concentré sont étalés sur tout

le milieu nutritif sélectif SMSA (Elphinstone *et al.* 1996). Flamber l'anse entre chaque échantillon. Un témoin, une suspension bactérienne de 10^6 bactéries, est étalé sur le milieu SMSA (fig. 3). Les milieux sont incubés à 28° C pendant trois jours.

Echantillons de plante

Les échantillons de plante sont lavés avec de l'eau de Javel 0,5 % et séchés sur du papier buvard pendant la nuit. Les échantillons sont ensuite coupés en petits morceaux et broyés dans un sac de broyage à l'aide d'un marteau. Un volume d'eau est ajouté et le tout est macéré pendant 30 minutes. 25 μ l des dilutions de 1/10 sont étalés sur le milieu nutritif sélectif SMSA. Les milieux sont incubés pendant trois jours à 28° C.

Trois jours après la première inoculation les colonies sont prélevées et analysées par un test moléculaire, la PCR.



Fig. 3. Selective plating. Etalement des bactéries de *R. solanacearum* sur le milieu sélectif SMSA.

Le test de polymerase chain reaction (Fig. 4)

La polymerase chain reaction a été décrit par K. Mullis. La réaction est basée sur le principe fondamental de la réplification de l'ADN (acides désoxyribonucléiques) formé de deux brins complémentaires. Des ponts d'hydrogène lient les bases des deux brins enroulés en hélice. Au début de la réaction PCR cette double hélice est séparée par chauffage, il y a rupture des ponts hydrogène liant les deux brins complémentaires. L'ADN est alors monocaténaire, constitué d'un seul brin. A ce brin monocaténaire vont s'associer de part et d'autre de la région caractéristique de notre agent pathogène des morceaux d'ADN dits amorces. L'hybridation (association) des amorces permet à une enzyme la Taq polymérase de s'activer et de former ainsi un double brin de la région cible. La méthode est très spécifique, mais le problème d'inhibition de la réaction par des composées de la plante peut poser des problèmes. L'isolement des cultures à partir du milieu peut résoudre ce problème. Le test de PCR fait dans le cadre de la détection de *R. solanacearum* est basé sur l'amplification d'un fragment de 288 pb du 16 S rRNA (Seal *et al.* 1993).

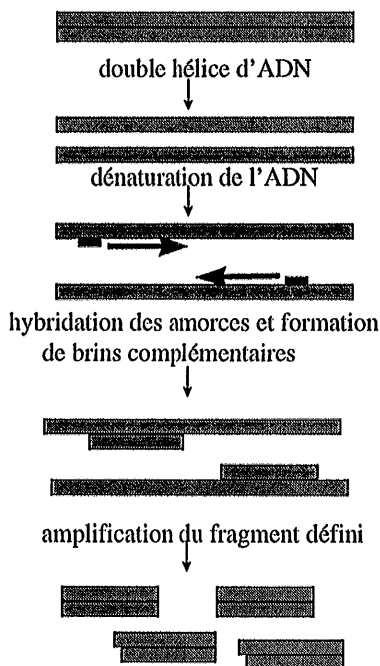


Fig. 4. Schéma de la réaction PCR.

Les colonies visibles sur le milieu sélectif après 3 jours d'incubation sont resuspendues dans 1 ml de tampon phosphate. La suspension est chauffée pendant 10 minutes à 100° C et transférée sur glace. Le mélange pour la réaction PCR; 33,8 µl H₂O, 10 µl tampon PCR, 0,2 mM dNTP (nucléotides), 1 µM amorce OLI 1, 1µM amorce Y2, 1 U Taq polymérase et 2 µl échantillon.

Le cycle PCR est le suivant: 2 min. à 96° C. 50 cycles de 20 s à 94° C, 20 s à 68° C, 30 s à 72° C, 1 cycle de 10 min. à 72° C. Les produits de la réaction PCR sont analysés sur un gel d'agarose de 1%.

Test d'immunofluorescence (IF)

Lors du test d'immunofluorescence des anticorps se lient à un antigène épitope de la bactérie. Un deuxième anticorps (rabbit anti-mouse immunoglobuline) est lié au premier anticorps. Ce deuxième anticorps est marqué à la fluorescéine isothiocyanate. La réaction est visualisée sous microscope à U.V. (fig. 5). Le test d'immunofluorescence est un des tests sérologiques les plus sensibles. La limite de détection se situe à 10³-10⁴ cfu/ml. L'erreur pour cette méthode se limite à 3 % comparé à 10% d'erreur pour le test ELISA. Le test de PCR est un complément utile pour confirmer les réactions IF positives.

Test

Les échantillons sont préparés de la même manière que pour le milieu sélectif. Déposer des gouttes d'échantillon sur les puits des lames et laisser sécher. Fixer les cellules bactériennes en passant à la flamme. Disposer les lames sur du papier absorbant. Couvrir les puits avec de l'antisérum. Incuber sous couvercle pendant 30 minutes à température ambiante. Eliminer les gouttelettes d'antisérum et rincer le tampon pour l'immunofluorescence (PBS 10 mM pH 7,2).

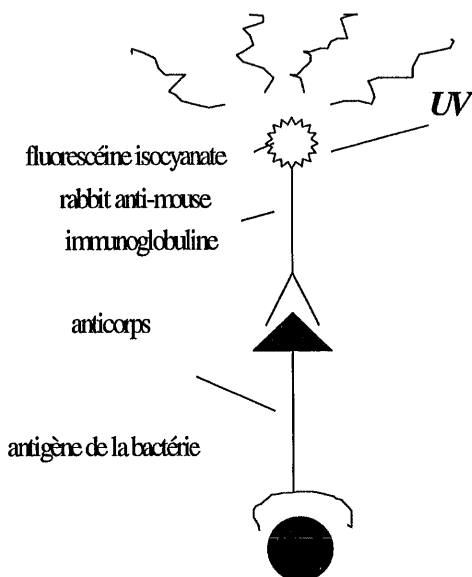


Fig. 5. Schéma du test d'immunofluorescence.

Laver 5 minutes dans la solution tampon IF-Tween (tampon IF contenant 0,1 % Tween) et après 5 minutes dans le tampon IF. Eliminer le tampon excédentaire. Les lames sont posées sur du papier absorbant humide et les puits sont couverts avec du FITC. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Rincer les lames et éliminer l'humidité excédentaire. Déposer du tampon phosphate avec 0,1 % glycérol dans chaque puits. Faites la lecture sous huile à un grossissement de 500 à 1000. Le protocole suivi est basé sur celui de Janse (1988).

Les protocoles suivis sont repris dans la directive européenne 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* publiée dans le journal officiel L 235 du 21 août 1998. Le laboratoire belge a fait les analyses par un test de selective plating suivi d'un test d'agglutination (test sérologique).

Résultats et discussion

A partir du milieu sélectif SMSA où des colonies bactériennes diverses étaient visibles après 2-3 jours d'incubation, des colonies suspectes ont été prélevées et soumises au test. Le milieu sélectif est très sensible, mais présente le désavantage que les bactéries antagonistes peuvent inhiber la croissance de *R. solanacearum* ou que des bactéries saprophytes se développent plus rapidement que *R. solanacearum* (Elphistone 1996). Ainsi, un second test, la PCR, a été fait afin de confirmer l'identité des bactéries. Aucun fragment caractéristique de *R. solanacearum* n'a été amplifié au cours de ce test. Concernant le test d'immunofluorescence aucune bactérie caractéristique n'a été visualisée sous le microscope.

R. solanacearum n'a donc pas été diagnostiquée dans les cours d'eau de l'Alzette et de la Sûre par les deux laboratoires travaillant de manière indépendante et sur la base des mêmes échantillons. Ceci permet de mettre en valeur la fiabilité des résultats obtenus suite à la réalisation de plusieurs tests en parallèle. L'état sanitaire des deux cours d'eau concernant la bactérie de quarantaine *R. solanacearum* est donc bon. Bien que les résultats aient été négatifs au cours de cette campagne, rien ne permet d'affirmer que la situation restera telle dans l'avenir. Les résultats de la campagne sont valables pour l'année courante.

Il s'avère nécessaire dans l'avenir d'établir des points repères d'analyse pour les campagnes des années suivantes et de continuer à cartographier les berges des cours d'eau. Cette année, l'Alzette a été analysée plus en détail tandis qu'uniquement des échantillons d'eau ont été pris dans la Sûre. Il reste donc la Sûre à cartographier afin d'établir des points repères pour les analyses dans les années suivantes. La garantie sanitaire des cours d'eau doit rester une priorité pour les cultures.

Remerciements

Le premier auteur tient à remercier M. Aschman et toute l'équipe de l'ASTA pour leur accueil si chaleureux et pour avoir pu réaliser ce travail. Tous ses remerciements vont aussi à M. J. Van Vaerenbergh pour ses conseils scientifiques. Enfin elle tient à remercier M. L. Hoffmann et toutes les personnes qui par leur présence ou leurs conseils ont permis de réaliser ce travail.

Références

- Directive 77/93/CEE du Conseil du 21 décembre 1976, concernant les mesures de protection contre l'introduction dans les Etats membres d'organismes nuisibles aux végétaux et produits végétaux. Modifié par 98/002. - Journal officiel des Communautés Européennes L. 15, 21.01.1998, p 34.
- Directive 95/4/94 amendement du 21 février 1995 à la directive de santé de la commission (77/93/EEC). - Journal officiel des Communautés Européennes, No. L44, 28.02.1995: 56-60.
- Directive 98/57/CE du conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. - Journal officiel des Communautés Européennes du 21 août 1998 L 235 41 année: 235/1-235/39.
- Elphinstone, J. G., 1996. - Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. - Potato Research 39: 403-410.
- Elphinstone, J. G., J. Hennessy, J. Wilson & D. E. Stead, 1996. - Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. - EPPO Bulletin 26: 663-678.
- Elphinstone, J. G., H. M. Stanford & D. E. Stead, 1998. - Detection of *Ralstonia solanacearum* and associated irrigation water. - In: Bacterial Wilt Disease, Molecular and Ecological Aspects (Ph. Prior, C. Allen & J. Elphinstone, eds), INRA, Springer: 133-139.
- Hayward, A. C., 1991. - Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. - Ann. Rev. Phytopathol. 29: 65-87.
- Janse, J. D., 1988. - A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. - EPPO Bulletin 18: 343-351.
- Seal, S. E., L. A. Jackson, J. P. W. Young & M. J. Daniels, 1993. - Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. - Journal of General Microbiology 139: 1587-1594.