

**Arrêté du 11 février 1999 relatif à la lutte
contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.**

NOR : AGRG9900326A

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Vu la directive 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. ;

Vu le code rural, et notamment ses articles 342 à 364 ;

Vu le décret n° 93-1259 du 10 novembre 1983 relatif aux mesures de protection contre les organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets ;

Vu l'arrêté du 2 septembre 1993 modifié relatif aux exigences sanitaires des végétaux, produits végétaux et autres objets ;

Vu l'arrêté du 10 juin 1998 fixant les modalités relatives à l'introduction et à la circulation à titre scientifique d'organismes nuisibles, de végétaux, produits végétaux et autres objets,

Arrête :

Art. 1^{er}. - La lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., auparavant connu sous la dénomination *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (ci-après dénommé « l'organisme »), sur les plantes hôtes de cet organisme énumérées à l'annexe I, section I, du présent arrêté (ci-après dénommées « matériel végétal concerné ») est obligatoire. Elle a pour but :

- de le localiser et de déterminer sa diffusion ;
- de prévenir son apparition et sa propagation ;
- et s'il est détecté, de prévenir sa propagation et de le combattre en vue de son éradication.

Art. 2. - 1. Les agents chargés de la protection des végétaux procèdent chaque année à des recherches systématiques visant à détecter l'organisme sur le matériel végétal concerné provenant du territoire métropolitain et des départements d'outre-mer.

Afin de déterminer les autres sources éventuelles de contamination menaçant la production du matériel végétal concerné, les agents chargés de la protection procèdent à une évaluation des risques et, à moins qu'aucun risque de propagation de l'organisme n'ait été constaté à l'issue de l'évaluation, ils procèdent, dans les zones de production du matériel végétal concerné, à des recherches ciblées visant à détecter l'organisme sur des végétaux n'appartenant pas au matériel végétal concerné y compris sur les plantes sauvages hôtes de la famille des solanacées, de même que dans les eaux superficielles utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation du matériel végétal concerné et dans les eaux usées rejetées par les entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal concerné et utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation du matériel végétal concerné.

L'ampleur de ces recherches ciblées est déterminée en fonction du risque décelé.

Les agents chargés de la protection des végétaux peuvent également procéder à des recherches visant à détecter l'organisme sur d'autres matériels, tels que le milieu de culture, le sol et les déchets solides provenant d'entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement.

2. Les recherches visées au paragraphe 1 sont effectuées :

a) Pour le matériel concerné, selon les critères prévus à l'annexe I, section II, point 1, du présent arrêté ;

b) Pour les plantes hôtes autres que le matériel végétal concerné et pour les eaux, y compris les eaux usées, selon des méthodes appropriées ; le cas échéant, des échantillons sont prélevés et soumis à des tests par les laboratoires de la protection des végétaux ou par les laboratoires placés sous son contrôle ;

c) En tant que de besoin pour d'autres matériels, selon des méthodes appropriées.

Pour la réalisation de ces recherches, les modalités complémentaires des procédures d'inspection ainsi que le nombre, l'origine, la stratification et le calendrier de prélèvement des échantillons sont établis chaque année par la direction générale de l'alimentation (sous-direction de la protection des végétaux) sur la base de principes scientifiques et statistiques fondés et des caractéristiques biologiques de l'organisme et compte tenu des systèmes particuliers de production du matériel végétal concerné et, le cas échéant, d'autres plantes hôtes de l'organisme.

Art. 3. - Toute apparition suspectée ou toute présence confirmée de l'organisme doit être immédiatement signalée au directeur régional de l'agriculture et de la forêt (service régional de la protection des végétaux) ou au directeur de l'agriculture et de la forêt (service de la protection des végétaux) pour les départements d'outre-mer.

Art. 4. - 1. Lorsque des cas d'apparition suspectée ont été signalés, les tests pour le matériel végétal concerné sont effectués par les laboratoires de la protection des végétaux ou par les laboratoires placés sous son contrôle, selon la méthode décrite à l'annexe II et conformément aux conditions énumérées à l'annexe III, point 1, du présent arrêté, afin de confirmer ou d'infirmer ladite apparition. Si la présence de l'organisme est confirmée, les dispositions de l'annexe III, point 2, du présent arrêté s'appliquent.

2. Dans l'attente de la confirmation ou de l'infirmer de l'apparition suspectée visée au paragraphe 1, dans chaque cas d'apparition suspectée où l'on a constaté :

i) Des symptômes diagnostiques de la présence de la maladie causée par l'organisme et une réaction positive au(x) test(s) de dépistage rapide précisé(s) à l'annexe II, section I, point 1, et section II du présent arrêté, ou

ii) Une réaction positive au(x) test(s) de dépistage précisé(s) à l'annexe II, section I, point 2, et section III du présent arrêté.

Les agents de la protection des végétaux :

a) Interdisent la circulation de végétaux et de tubercules issus de toutes les cultures, lots ou envois sur lesquels les échantillons ont été prélevés, sauf sous leur contrôle et pour autant qu'il ait été établi qu'il n'existe aucun risque identifiable de propagation de l'organisme ;

b) Prennent les mesures nécessaires pour remonter à l'origine de l'apparition suspectée ;

c) Introduisent, notamment pour la production du matériel végétal concerné et la circulation de lots de pommes de terre de semences autres que ceux visés au point a produits sur le lieu de production sur lequel les échantillons visés au point a ont été prélevés, des

mesures de précaution supplémentaires appropriées, fondées sur le degré de risque estimé, en vue de prévenir toute propagation de l'organisme.

Art. 5. – Si les résultats des tests officiels réalisés selon la méthode décrite à l'annexe II du présent arrêté, pour le matériel végétal concerné, ou, dans tous les autres cas, selon toute autre méthode officiellement agréée, confirment la présence de l'organisme dans un échantillon prélevé, conformément aux dispositions du présent arrêté, les agents chargés de la protection des végétaux, compte tenu de principes scientifiques fondés, des caractéristiques biologiques de l'organisme et des systèmes particuliers de production, de commercialisation et de transformation des plantes hôtes de l'organisme :

a) S'agissant du matériel végétal concerné :

i) Procèdent à une enquête afin de déterminer l'étendue et la ou les sources primaires de la contamination, conformément aux dispositions de l'annexe IV du présent arrêté et en effectuant des tests complémentaires conformément à l'article 4, paragraphe 1, du présent arrêté, sur au moins tous les stocks de pommes de terre de semence liés par clonage ;

ii) Déclarent contaminés le matériel végétal concerné, l'envoi et/ou le lot d'où l'échantillon a été prélevé, ainsi que le matériel, le véhicule, le récipient, l'entrepôt ou des parties de ceux-ci et tout autre objet, y compris les emballages qui ont été en contact avec le matériel végétal concerné d'où l'échantillon a été prélevé ; déclarent également contaminés, le cas échéant, le(s) champ(s), unité(s) de production de cultures protégées et lieu(x) de production où le matériel végétal a été récolté et d'où l'échantillon a été prélevé ; et, pour les échantillons prélevés en cours de végétation, déclarent contaminés le(s) champ(s), lieu(x) de production et, le cas échéant, unité(s) de production de cultures protégées d'où l'échantillon a été prélevé ;

iii) Déterminent, conformément aux dispositions de l'annexe V, point 1, du présent arrêté, l'étendue de la contamination probable, soit par contact avant ou après la récolte avec des éléments déclarés contaminés, soit par des liens avec ceux-ci au travers du système de production, d'irrigation ou de pulvérisation, soit par une relation clonale ;

iv) Et délimitent une zone sur la base de la déclaration de contamination visée au point ii) ci-dessus, de la détermination de l'étendue de la contamination probable visée au point iii) et de la propagation possible de l'organisme, conformément aux dispositions de l'annexe V, point 2, i), du présent arrêté.

b) S'agissant des cultures de plantes hôtes autres que celles mentionnées au point a), lorsque la production du matériel végétal concerné est identifiée comme soumise à un risque, les agents chargés de la protection des végétaux :

i) Effectuent une enquête conformément au point a, i) ;

ii) Déclarent contaminées les plantes hôtes de l'organisme d'où l'échantillon a été prélevé ;

iii) Et déterminent l'étendue de la contamination probable et délimitent une zone conformément aux points a, iii), et a, iv), respectivement, en ce qui concerne la production du matériel végétal concerné.

c) S'agissant des eaux superficielles (y compris les effluents liquides d'entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal concerné) et des plantes hôtes sauvages associées appartenant à la famille des solanacées, lorsque la production du matériel végétal concerné est identifiée comme soumise à un risque, que ce soit par irrigation, par pulvérisation ou par submersion par les eaux superficielles, les agents de la protection des végétaux :

i) Effectuent une enquête, y compris des recherches à des moments opportuns sur des échantillons d'eaux superficielles et de plantes hôtes sauvages de la famille des solanacées éventuellement présentes, afin d'établir l'étendue de la contamination ;

ii) Déclarent contaminées les eaux superficielles d'où le ou les échantillons ont été prélevés, sur la base de l'enquête visée au point i) ci-dessus ;

iii) Et déterminent l'étendue de la contamination probable et délimitent une zone sur la base de la déclaration de la contamination visée au point ii) et de la propagation possible de l'organisme, en tenant compte des dispositions de l'annexe V, points 1 et 2, ii), du présent arrêté.

Art. 6. – 1. Le matériel végétal concerné déclaré contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a, ii), du présent arrêté ne peut pas être planté. Sous le contrôle et avec l'autorisation des agents chargés de la protection des végétaux, il est soumis à l'une des dispositions de l'annexe VI, point 1, du présent arrêté, de telle sorte que l'absence de risque identifiable de propagation de l'organisme soit garantie.

2. Le matériel végétal concerné déclaré probablement contaminé conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a, iii), et point c, iii), et comprenant le matériel végétal concerné pour lequel un risque a été identifié produit sur les lieux de production déclarés probablement contaminés, conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a, iii), ne peut pas être planté. Sous le contrôle des agents chargés de la protection des végétaux, il est utilisé ou éliminé de la manière appropriée précisée à l'annexe VI, point 2, du présent arrêté, de telle sorte que l'absence de risque identifiable de propagation de l'organisme soit établie.

3. Le matériel, les véhicules, les récipients, les entrepôts ou des parties de ceux-ci, et tout autre objet, y compris les emballages, déclarés contaminés conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a, ii), ou déclarés probablement contaminés conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a, iii) et point c, iii), doivent être détruits ou décontaminés selon des méthodes appropriées précisées à l'annexe VI, point 3, du présent arrêté. Après décontamination, ces objets ne sont plus considérés comme contaminés.

4. Sans préjudice des mesures mises en œuvre en application des paragraphes 1, 2 et 3, diverses mesures, définies à l'annexe VI, points 4.1 et 4.2, du présent arrêté, ordonnées par les agents chargés de la protection des végétaux doivent être mises en œuvre dans la zone délimitée conformément à l'article 5, paragraphe 1, point a, iv) et point c, iii).

Art. 7. – Les pommes de terre de semence doivent satisfaire aux exigences de l'arrêté du 2 septembre 1993 modifié susvisé et provenir en ligne directe d'un matériel qui a été obtenu dans le cadre d'un programme officiellement approuvé et qui a été déclaré exempt de l'organisme à la suite des tests officiels ou officiellement contrôlés, selon la méthode pertinente décrite à l'annexe II du présent arrêté.

Les tests susmentionnés sont effectués :

a) Dans les cas où la découverte de l'organisme dans sa propre production de pommes de terre de semence a été confirmée :

i) Par des tests portant sur les générations antérieures, y compris la sélection clonale initiale, et par des tests systématiques sur les clones de pommes de terre de semence de base ;

ii) Ou lorsque l'absence de relation clonale a été établie, par des essais portant sur tous les clones de pommes de terre de semence de base ou sur les générations antérieures, y compris la sélection clonale initiale, et

b) Dans les autres cas, soit sur chaque plante de la sélection clonale initiale, soit sur des échantillons représentatifs des pommes de terre de semence de base ou des générations antérieures.

Art. 8. – La détention et la manipulation de l'organisme sont interdites.

Art. 9. – Sans préjudice des dispositions de l'arrêté du 2 septembre 1993 modifié susvisé, des dérogations aux articles 6 et 8 du présent arrêté peuvent être accordées par le ministre de l'agriculture et de la pêche pour des travaux à des fins d'essai ou à des fins scientifiques ou pour des travaux sur les sélections variétales conformément à l'arrêté du 10 juin 1998 susvisé.

Art. 10. – Des mesures complémentaires ou plus rigoureuses requises pour la lutte contre l'organisme ou la prévention de sa propagation (pour autant qu'elles respectent les dispositions de l'arrêté du 2 septembre 1993 modifié susvisé) peuvent être prises par arrêté du ministre de l'agriculture et de la pêche.

Art. 11. – Les dispositions du présent arrêté entrent en vigueur le 21 août 1999.

Art. 12. – L'arrêté du 28 mars 1996 fixant les mesures de lutte contre le *Burkholderia* (ex. *Pseudomonas*) *solanacearum* est abrogé à compter du 21 août 1999.

Art. 13. – La directrice générale de l'alimentation est chargée de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 11 février 1999.

Pour le ministre et par délégation :
La directrice générale de l'alimentation,
M. GUILLOU

ANNEXE 1

Section I

Liste des plantes hôtes de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. visées à l'article 1^{er}

Végétaux (y compris les tubercules), à l'exception des semences proprement dites de l'espèce *Solanum tuberosum* L. : pomme de terre.

Végétaux, à l'exception des semences et des fruits de l'espèce *Lycopersicon lycopersicum* L. Karsten ex Farw : tomate.

Section II

Recherches

1. Les recherches officielles visées à l'article 2, paragraphe 2, point a, sont fondées sur les caractéristiques biologiques de l'organisme et des systèmes particuliers de production dans l'Etat membre concerné et comprennent :

i) Dans le cas de la pomme de terre :

- à des moments opportuns, une inspection visuelle de la culture en phase de croissance et/ou un prélèvement d'échantillons de pommes de terre de semence et d'autres pommes de terre, en cours de végétation ou stockées ; ces échantillons sont soumis à une inspection visuelle, officielle ou officiellement contrôlée, sur tubercules coupés, et
- dans le cas des pommes de terre de semence et, le cas échéant, des autres pommes de terre, des tests en laboratoire officiels ou officiellement contrôlés, suivant la méthode décrite à l'annexe II ;

ii) Dans le cas de la tomate :

- une inspection visuelle, à des moments opportuns, au moins de la culture en phase de croissance de plants destinés à être replantés pour un usage professionnel.

2. La notification des recherches officielles visées à l'article 2, paragraphe 3, comprend :

i) Dans le cas des recherches sur les pommes de terre :

- l'estimation de la superficie totale cultivée, en hectares, des pommes de terre de semence et autres pommes de terre ;
- la stratification par catégorie de semence et pommes de terre de consommation et, le cas échéant, par région ;
- le nombre et le calendrier de prélèvement des échantillons pour les tests ;
- le nombre des inspections visuelles sur le terrain ;
- le nombre (et la taille de l'échantillon) des inspections visuelles sur tubercules ;

ii) Dans le cas des recherches sur, au moins, la culture en phase de croissance des plants de tomates destinés à être replantés pour un usage professionnel :

- l'estimation du nombre total de plants ;
- le nombre d'inspections visuelles ;

iii) Dans le cas des recherches sur des plantes hôtes autres que les pommes de terre et les tomates, y compris les plantes hôtes sauvages de la famille des solanacées :

- l'espèce ;

- le nombre d'échantillons prélevés et la date de prélèvement ;
- la zone ou le cours d'eau où a été effectué le prélèvement d'échantillons, selon le cas ;
- la méthode d'analyse ;

iv) Dans le cas des recherches sur l'eau et les effluents liquides rejetés par les installations industrielles de traitement ou de conditionnement :

- le nombre d'échantillons et la date de prélèvement ;
- la zone ou le cours d'eau ou l'emplacement des installations où a été effectué le prélèvement d'échantillons, selon le cas ;
- la méthode d'analyse.

ANNEXE II

PROCÉDURE DE TEST POUR DIAGNOSTIQUER, DÉTECTER ET IDENTIFIER *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUCHI ET AL.

Domaine d'application de la procédure

La procédure présentée ci-dessous décrit les différentes étapes à suivre pour :

- i) Diagnostiquer le flétrissement bactérien sur les tubercules de pomme de terre ou sur les plantes de pommes de terre et de tomate ;
- ii) Détecter *Ralstonia solanacearum* dans des échantillons de tubercules de pomme de terre ;
- iii) Identifier *Ralstonia solanacearum*.

On trouvera en appendice des indications détaillées concernant la préparation du matériel nécessaire aux tests (milieux de culture, tampons, solutions et réactifs).

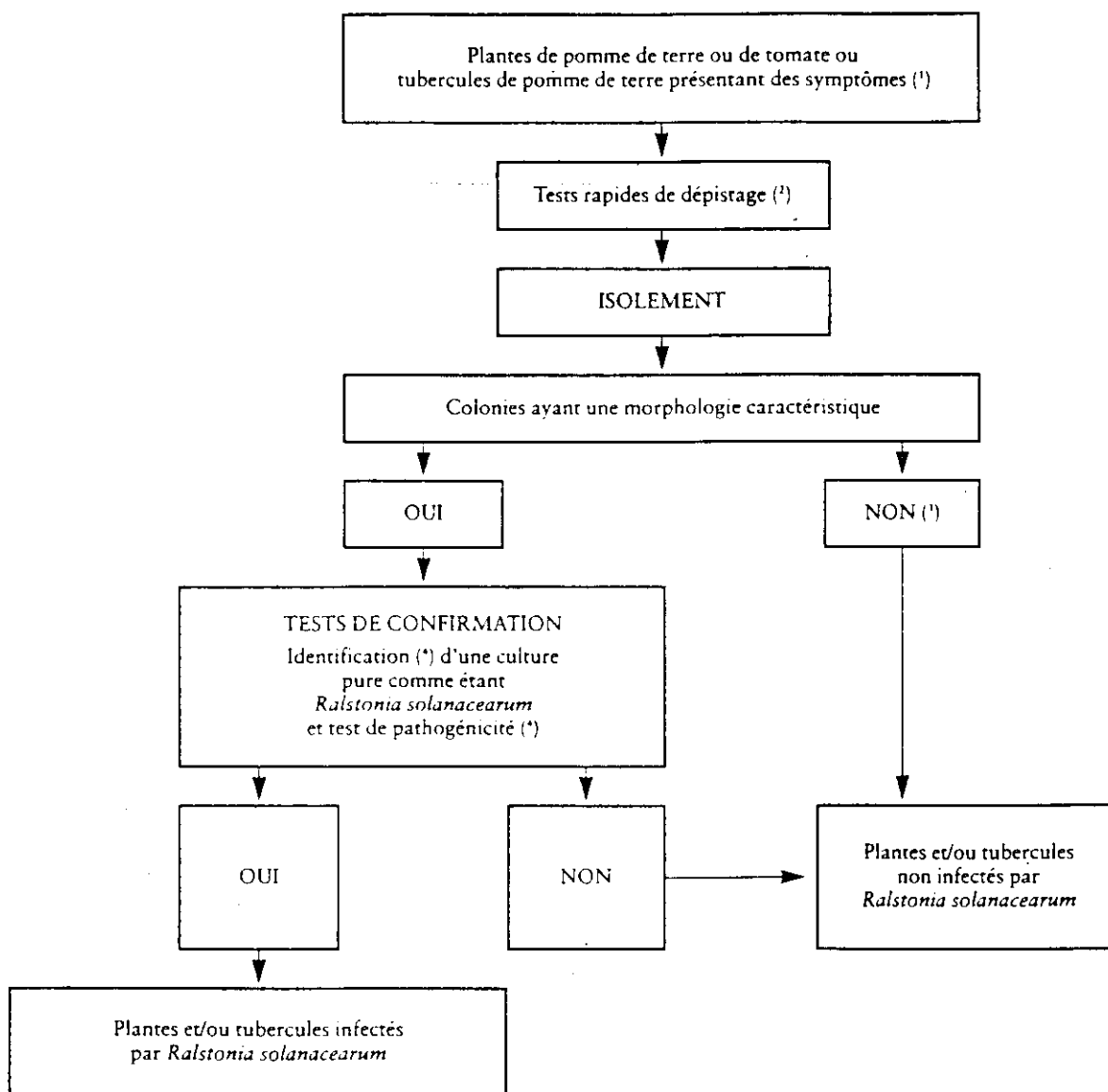
Section I

Application de la procédure de test

1. *Diagnostic du flétrissement bactérien sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomate*

La procédure de test concerne les tubercules de pomme de terre et les plantes de pomme de terre et de tomate présentant des symptômes typiques du flétrissement bactérien ou permettant de soupçonner sa présence. Elle comporte un test rapide de dépistage, l'isolement de l'organisme pathogène à partir du tissu vasculaire infecté sur des milieux de diagnostic et, en cas de résultat positif, l'identification de la culture comme étant *Ralstonia solanacearum*.

Présentation du diagramme fonctionnel



Renvois du diagramme fonctionnel

(1) La description des symptômes figure à la section II.1.

(2) Des tests rapides de tri facilitent le diagnostic présomptif.

Les tests appropriés sont :

- test de purulence des tissus vasculaires caulinaires (section II.2) ;
- test de mise en évidence des granules de poly- β -hydroxybutyrate (section II.2) ;
- test d'immunofluorescence (section III.2) ;
- test ELISA (section III.3) ;
- test PCR (section III.4).

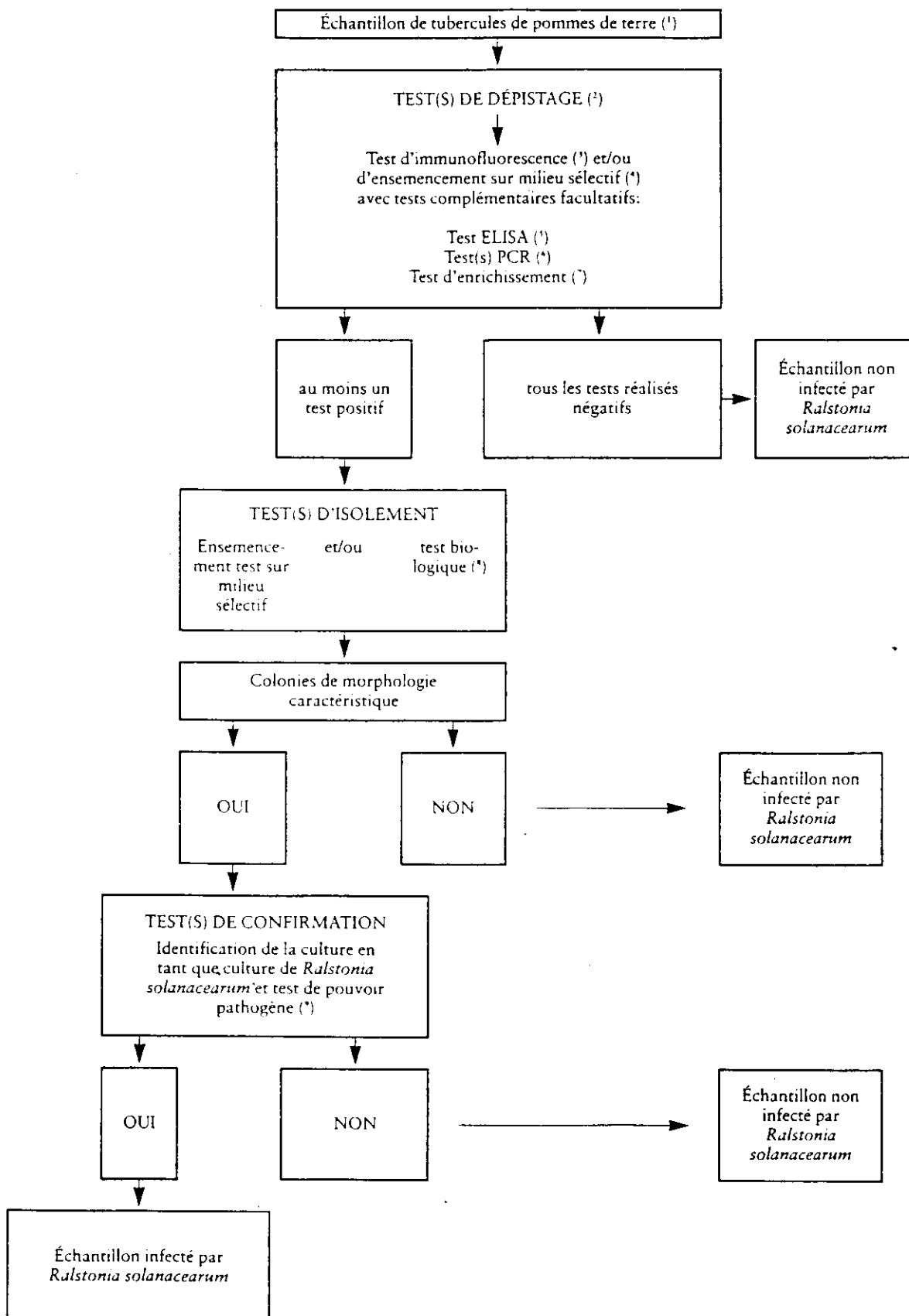
(3) Bien que l'isolement de l'agent pathogène par dilution et étalement sur milieu de culture soit une tâche simple, la mise en culture risque d'échouer à partir des stades d'infection avancés. Les bactéries saprophytes qui se développent sur un tissu malade risquent de se développer beaucoup plus rapidement que l'agent pathogène ou d'inhiber sa croissance sur le milieu d'isolement. Lorsque le test d'isolement est négatif en dépit de symptômes caractéristiques de la présence de la maladie, l'isolement doit être réitéré, de préférence par un test de dilution et étalement sur un milieu sélectif.

(4) L'identification fiable d'une culture pure de *Ralstonia solanacearum* nécessite au minimum l'un des tests dont la liste figure à la section II.4.1, réalisé conjointement avec un test de pouvoir pathogène (section II.4.3). La caractérisation de la souche est facultative mais recommandée pour chaque cas nouveau.

2. Détection et identification de *Ralstonia solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre

La procédure de test vise à détecter des infections latentes de tubercules de pomme de terre au moyen d'un test de tri ou, mieux encore, de plusieurs tests de ce type, dont les résultats, s'ils sont positifs, sont confirmés par l'isolement de l'agent pathogène. En cas d'isolement de colonies caractéristiques, on procède à l'identification d'une culture pure comme étant *Ralstonia solanacearum*.

Diagramme fonctionnel



Renvois du diagramme fonctionnel

(1) Taille de l'échantillon.

La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules. Cependant, la procédure peut être appliquée à des échantillons de moins de 200 tubercules.

(2) Test(s) de tri.

La sensibilité ou la fiabilité d'un seul test n'est pas toujours suffisante pour détecter la présence de *Ralstonia solanacearum* dans un échantillon. Il est donc recommandé de procéder à plusieurs tests. Dans la mesure du possible, ces tests doivent être basés sur des principes biologiques différents.

(3) Test d'immunofluorescence.

Le test d'immunofluorescence est un test de tri bien connu. C'est un avantage par rapport à d'autres types de tests qui ne sont pas encore parfaitement mis au point, ou validés. Ce test est utilisé pour d'autres bactéries de quarantaine, comme *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Compte tenu des paramètres de lecture spécifiés dans cette méthode, il s'agit d'un test sensible (seuil de sensibilité 10^3 - 10^4 cellules/ml de l'extrait final de pomme de terre).

Le facteur décisif pour la fiabilité des résultats du test est la qualité de l'antisérum. Seul un antisérum ayant un titre élevé (au minimum 2 000 pour l'antisérum brut) est acceptable et tous les tests doivent être réalisés au titre de l'antisérum ou à une dilution en dessous. La méthode indirecte est utilisée de préférence. La méthode directe est applicable lorsque la sensibilité et la spécificité du test sont équivalentes à celles de la méthode indirecte.

Le test d'immunofluorescence présente l'avantage d'offrir une interprétation subjective quant à la morphologie et à l'intensité de la fluorescence des cellules qui fournissent des indications sur la spécificité de la réaction. Il est fréquent de constater des réactions croisées avec des bactéries sérologiquement proches, du sol ou associées à des tissus de pomme de terre, présentant une morphologie cellulaire de *Ralstonia solanacearum*. Le test d'immunofluorescence peut faire office de test de tri unique, mais, lorsque la présence de réactions croisées est suspectée, il convient de réaliser un autre test de tri basé sur un principe biologique différent. Dans de tels cas, l'isolement sur milieu sélectif est le test le plus approprié.

(4) Étalement sur milieu sélectif.

Lorsqu'on utilise le milieu sélectif modifié SMSA et la méthodologie spécifiée, on dispose d'un test sensible et sélectif permettant de détecter *Ralstonia solanacearum*. Le résultat est disponible dans un délai de trois à six jours après la préparation de l'échantillon. L'agent pathogène est obtenu directement sous forme de culture et peut être facilement identifié. Pour mettre pleinement à profit les possibilités offertes par ce test, il faut préparer soigneusement les talons de pommes de terre afin de réduire les contaminations par les bactéries secondaires liées au tubercule ; ces bactéries sont des organismes concurrents de *Ralstonia solanacearum* sur le milieu de culture, qui sont susceptibles d'affecter le développement de l'agent pathogène. Certaines souches risquent en outre de se développer insuffisamment dans la mesure où les composants du milieu peuvent également affecter l'organisme cible. Il faut veiller également à différencier *Ralstonia solanacearum* des autres bactéries susceptibles de se développer sur le milieu de culture. L'étalement sur milieu sélectif peut également servir de test de dépistage unique ; toutefois, lorsqu'on obtient un résultat négatif et qu'un effet inhibiteur d'autres bactéries sur la croissance de *Ralstonia solanacearum* est suspecté, il convient d'effectuer un deuxième test de dépistage. En pareille circonstance, le test d'immunofluorescence est le plus indiqué.

(5) Test ELISA.

Le test ELISA est généralement moins sensible que le test d'immunofluorescence (seuil de détection de 10^4 - 10^5 cellules/ml d'extrait final de pomme de terre). Ce test est bon marché et rapide, mais généralement plus sensible au risque de résultats erronés positifs (réactions croisées) ou négatifs (inhibition sous l'effet des molécules phénoliques des extraits de pomme de terre). Les exigences de spécificité d'antisérum sont extrêmement rigoureuses. Le test ELISA ne peut servir de test de dépistage unique.

(6) Test PCR.

Le test PCR est potentiellement très sensible, bien que le test soit facilement inhibé par des composants de plants ou d'extraits de tubercules aboutissant à un résultat négatif erroné. Certains cultivars de pomme de terre contiennent davantage d'inhibiteurs que d'autres. Il est donc nécessaire de les éliminer. La dilution réduit les inhibitions, mais les populations de *Ralstonia solanacearum* sont alors également diluées. Il faut procéder avec le plus grand soin à toutes les étapes de la préparation de l'échantillon et du test pour éviter toute contamination susceptible de produire des résultats positifs erronés. Des résultats faussement positifs peuvent survenir à cause d'homologies de séquences avec d'autres organismes. Pour ces raisons, l'utilisation directe du test PCR comme seul test de dépistage n'est pas possible.

(7) Test d'enrichissement en bouillon nutritif.

L'incubation d'extrait final de pomme de terre dans un milieu nutritif liquide semi-sélectif, tel que le bouillon nutritif modifié SMSA, permet la multiplication de *Ralstonia solanacearum* et, ce qui est peut-être plus important encore, la dilution des inhibiteurs potentiels des tests ELISA et PCR. Le test d'immunofluorescence, le test ELISA et le test PCR permettent donc de détecter la présence de *Ralstonia solanacearum* dans un milieu nutritif liquide d'enrichissement. Nous ne recommandons pas de procéder à un étalement direct à partir de milieux nutritifs enrichis. Ces méthodes d'enrichissement n'ont pas été complètement expérimentées et testées ; elles sont mentionnées ici en raison des possibilités intéressantes qu'elles offrent. Mais, faute d'une expérience suffisante, il n'est pas possible de les utiliser comme seules méthodes de dépistage.

(8) Test biologique.

Le test biologique est utilisé pour l'isolement de *Ralstonia solanacearum* à partir des extraits de pommes de terre par enrichissement sélectif dans une

plante hôte et peut être effectué sur des plants de tomates ou d'aubergines. Il exige des conditions optimales d'incubation conformes aux spécifications de cette procédure. Les bactéries ayant un effet inhibiteur sur *Ralstonia solanacearum* en présence d'un milieu nutritif SMSA ne risquent guère de gêner le déroulement de ce test.

(9) Test(s) de confirmation.

Il est possible d'identifier de manière fiable une culture pure de *Ralstonia solanacearum* en utilisant au moins l'un des tests énumérés à la section II.4.1, associé à un test de pouvoir pathogène (section II.4.3). La caractérisation de la souche est facultative, mais conseillée en présence d'un cas nouveau.

Section II

Diagnostic du flétrissement bactérien sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomate

1. Symptômes

1.1. Symptômes sur les pommes de terre.

Plante de pomme de terre. Le premier stade de l'infection se traduit par un flétrissement des feuilles du haut de la plante à température élevée pendant la journée et un retour à l'aspect normal pendant la nuit. Le flétrissement devient rapidement irréversible et se traduit par la mort de la plante. On peut observer un brunissement du tissu vasculaire des tiges de plantes flétries coupées transversalement, et un exsudat laiteux apparaît à la surface de la coupe ou peut en être extrait facilement en pinçant la tige. Lorsqu'une tige coupée est placée dans l'eau verticalement, des filets de productions bactériennes s'écoulent des faisceaux vasculaires.

Tubercule de pomme de terre. Les tubercules de pomme de terre doivent être coupés transversalement, près du talon. Le premier stade d'infection se traduit par une coloration jaune vitreuse à brun clair de l'anneau vasculaire, d'où émerge un suintement crémeux pâle, soit spontanément après quelques minutes, soit lorsqu'on applique une légère pression des doigts à proximité de la coupe, sur l'épiderme du tubercule. Par la suite, la décoloration vasculaire devient plus nettement brune et la nécrose s'étend parfois au tissu parenchymateux. Aux stades avancés, l'infection se propage à partir du talon et des yeux, et l'épiderme des tubercules présente alors des lésions brun rougeâtre légèrement concaves ; de ces lésions peut suinter un liquide bactérien provoquant l'adhérence des particules de sol.

1.2. Symptômes sur les tomates.

Plante de tomate. Le premier symptôme visible est la flaccidité des plus jeunes feuilles. Dans des conditions favorables à l'agent pathogène (température du sol d'environ 25 °C, humidité saturée), l'épinastie et le flétrissement d'un côté de la plante ou de l'ensemble de la plante surviennent en quelques jours et provoquent l'effondrement complet de la plante. Dans des conditions moins favorables (température du sol inférieure à 21 °C), un grand nombre de racines adventices peuvent se développer sur la tige. On peut observer le long de la tige un cordon grasseux qui témoigne de la nécrose du système vasculaire. Lorsque la tige est coupée transversalement, des gouttes d'exsudat bactérien blanc, ou jaunâtre s'écoulent du tissu vasculaire brun décoloré de la tige.

2. Tests rapides de dépistage

Des tests rapides de dépistage facilitent le diagnostic présomptif. Utilisez un ou plusieurs des tests suivants :

Test d'exsudation des tiges :

La présence de *Ralstonia solanacearum* dans des tiges de pommes de terre ou de tomates flétries peut être mise en évidence en procédant au test de présomption suivant :

Sectionner la tige juste au-dessus du sol. Placer l'extrémité de la tige sectionnée dans un bûcher rempli d'eau. Peu de temps après, des filets de productions bactériennes s'écouleront spontanément des faisceaux vasculaires. Aucune autre bactérie responsable de l'infection vasculaire des plants de pommes de terre ou de tomates ne fera apparaître ce phénomène.

Mise en évidence des granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) :

La coloration au bleu du Nil A ou au noir du Soudan B permet de visualiser les granules de PHB présents dans les cellules de *Ralstonia solanacearum*.

Préparer sur une lame de microscope un frottis à partir de l'exsudat ou du tissu placé en suspension ou préparer un frottis d'une culture de quarante-huit heures sur gélose avec levure, peptone et glucose (YPGA) ou sur gélose avec peptone (SPA) (appendice 1). Préparer un témoin positif obtenu avec une souche de biovar 2 de la race 3. Laisser sécher. Passer rapidement à plusieurs reprises le côté inférieur de la lame dans une flamme jusqu'à ce que le frottis soit fixé.

Test au bleu du Nil :

1. Recouvrir le frottis fixé dans une solution aqueuse à 1 % de bleu du Nil A. Incuber 10 minutes à 55 °C.
2. Eliminer la solution colorante. Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
3. Recouvrir le frottis dans une solution aqueuse d'acide acétique à 8 %. Incuber 1 minute à la température du laboratoire.
4. Laver sous un filet d'eau courante et sécher sur du papier absorbant.
5. Réhumecter en déposant une goutte d'eau. Recouvrir d'une lamelle.
6. Examiner le frottis coloré au microscope à épifluorescence sous un film d'huile de 450 nm, à un grossissement de 1 000.

Observer la fluorescence orange vif des granules de PHB. Faire également des observations en lumière normale afin de vérifier le caractère intracellulaire des granules, vérifier que la morphologie des cellules est caractéristique de *Ralstonia solanacearum*.

Test au noir du Soudan :

1. Recouvrir le frottis fixé dans une solution de noir du Soudan B à 0,3 % dans de l'éthanol à 70 %. Incuber 10 minutes à la température du laboratoire.
 2. Egoutter la solution colorante. Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever la quantité d'eau excédentaire au papier absorbant.
 3. Plonger rapidement le frottis dans du xylol. Sécher au papier absorbant.
- Attention, le xylol est un produit dangereux. Travailler sous une hotte de chimiste.
4. Recouvrir le frottis dans une solution aqueuse de safranine à 0,5 % et incuber 10 secondes à la température du laboratoire.
- Attention, la safranine est un produit dangereux. Opérer sous une hotte de chimiste.
5. Laver sous un filet d'eau courante. Sécher au papier absorbant et recouvrir d'une lamelle.
 6. Examiner le frottis coloré au microscope à immersion sous un film d'huile, à un grossissement de 1 000, sous lumière transmise normale.

Les granules de PHB présents dans les cellules de *Ralstonia solanacearum* présentent une coloration bleu noir. Les parois des cellules sont colorées en rose.

Autres tests :

Les autres tests de tri appropriés sont l'immunofluorescence (section III.2), l'ELISA (section III.3) et la PCR (section III.4).

3. Procédure d'isolement

- 3.1. Prélever de l'exsudat ou des morceaux de tissu décoloré, soit à partir de l'anneau vasculaire du tubercule, soit à partir des vaisseaux de la tige. Mettre en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile ou dans un tampon au phosphate 50 mM. Laisser reposer 5 à 10 minutes sur la paillasse.
- 3.2. Préparer une série de dilutions, par exemple au 1/10 et au 1/100 de la suspension, ou plus si cela est jugé nécessaire.
- 3.3. Transférer un volume standard de la suspension et des dilutions sur un milieu de culture général (NA, YPGA et SPA, appendice 1) et/ou sur le milieu tétrazolium de Kelman (appendice 1), et/ou sur le milieu semi-sélectif SMSA (appendice 7). Etaler à l'aide d'une technique d'étalement en nappe ou à l'anse stérile. Si cela est jugé utile, préparer des boîtes de Petri avec chaque milieu, ensemencé avec une suspension bactérienne virulente appartenant au biovar 2, race 3 de *Ralstonia solanacearum*, pour témoin positif.
- 3.4. Incuber les boîtes pendant 3 jours à 28 °C. L'incubation peut être prolongée jusqu'à 6 jours si la croissance est lente, mais les colonies sur milieu SMSA deviennent atypiques et meurent.

Sur milieu nutritif général, les isolats virulents de *Ralstonia solanacearum* forment des colonies fluides, à bord irrégulier, plates, blanchâtres et présentant fréquemment des verticilles caractéristiques.

Sur milieu « tétrazolium de Kelman », les colonies virulentes typiques de *Ralstonia solanacearum* sont de couleur crème, plates, à bord irrégulier, fluides, avec un centre de couleur rouge sang. Les formes avirulentes de *Ralstonia solanacearum* donnent des colonies butyriques, de couleur rouge sombre.

Sur milieu nutritif SMSA, les isolats virulents de *Ralstonia solanacearum* forment des colonies blanc laiteux, plates, fluides, à bord irrégulier et avec un centre rouge à violacé.

Les isolats non virulents de *Ralstonia solanacearum* forment des colonies moins fluides de couleur uniforme rose à rouge sur le milieu nutritif SMSA.

- 3.5. Purifier les colonies de morphologie caractéristique par repiquage sur un milieu nutritif de type général. Eviter les repiquages successifs susceptibles de provoquer une perte de virulence.

4. Test(s) de confirmation**4.1. Identification de *Ralstonia solanacearum*.**

Identifier des cultures pures de *Ralstonia solanacearum* en utilisant au moins l'une des procédures suivantes :

Tests nutritionnels et enzymatiques :

Nota. – Inclure les témoins appropriés dans chacun des tests utilisés.

Les caractéristiques phénotypiques de *Ralstonia solanacearum* listées ci-après sont systématiquement présentes ou absentes.

Pigment fluorescent.....	–
Inclusions de granules de PHB.....	+
Test de métabolisme oxydatif-fermentatif (O/F).....	O + /F –
Catalase.....	+
Oxydase de Kovacs.....	+
Réduction des nitrates.....	+
Utilisation de citrate.....	+
Croissance à 40 °C.....	–

Croissance dans une solution à 1 % de NaCl.....	+
Croissance dans une solution à 2 % de NaCl.....	–
Arginine dihydrolase.....	–
Liquéfaction de gélatine.....	–
Hydrolyse de l'amidon.....	–
Hydrolyse de l'esculine.....	–
Production de levane.....	–

Les milieux et les techniques sont données dans Lelliott et Stead (1987).

Test d'immunofluorescence :

Préparer une suspension de 10⁶ cellules/ml au moyen de la culture réalisée et d'une souche témoin positive. Préparer une série de dilutions au demi de l'antisérum. Suivre la procédure du test d'immunofluorescence (section III.2). Le titre obtenu avec la culture en immunofluorescence doit être identique à celui obtenu avec la souche témoin.

Test ELISA :

Préparer une suspension contenant plus de 10⁶ cellules/ml de la culture bactérienne et d'une souche témoin positive. Appliquer la procédure du test ELISA (section III.3). Les valeurs obtenues en ELISA avec la culture doivent être équivalentes à celles obtenues avec la souche témoin.

Test de PCR :

Préparer une suspension contenant 10⁶ cellules/ml au moyen de la culture bactérienne et d'une souche témoin positive. Appliquer la procédure du test de PCR (section III.4). Le produit PCR de la culture doit avoir la même taille et le même profil de restriction (REA) que ceux obtenus avec la souche témoin positive.

Hybridation fluorescente in situ (FISH-Fluorescent in situ hybridisation) :

Préparer une suspension de 10⁶ cellules/ml au moyen de la culture bactérienne et d'une souche témoin positive. Appliquer la procédure du test FISH (van Beuningen et al., 1995), avec l'amorce PCR OLI-1 (Seal et al., 1993). La culture doit présenter une réaction identique à celle de la souche témoin positive.

Profil protéique :

Les protéines totales de la bactérie sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en conditions dénaturantes (Stead, 1992 a).

Test de profil des acides gras (FAP, fatty acid profiling) :

Cultiver la culture bactérienne et celle d'une souche témoin positive pendant 48 heures à 28 °C sur des boîtes gélosées de trypticase soja, puis appliquer la procédure du test FAP (Janse, 1991 ; Stead, 1992a ; Stead, 1992b). Le profil de la culture doit être identique à celui du témoin positif. Dans les conditions spécifiées, les acides gras caractéristiques sont les suivants : 14:0 30H, 16:0 20H, 16:1 20H et 18:1 20H.

4.2. Caractérisation de la souche.

La caractérisation de la souche est facultative mais conseillée en présence d'un cas nouveau. Utilisez au moins l'un des tests suivants :

Détermination du biovar :

On distingue différents biovars de *Ralstonia solanacearum* en fonction de leur aptitude à utiliser et/ou à oxyder trois hexoses alcools et trois sucres (Hayward, 1964 & 1994) :

	BIOVAR				
	1	2	3	4	5
Utilisation de :					
- maltose.....	-	+	+	-	+
- lactose.....	-	+	+	-	+
- cellobiose.....	-	+	+	-	+
- mannitol.....	-	-	+	+	+
- sorbitol.....	-	-	+	+	-
- dulcitol.....	-	-	+	+	-

Des tests supplémentaires différencient le biovar 2 en trois phénotypes secondaires (Hayward, 1994) :

	BIOVAR 2	BIOVAR 2-A	BIOVAR 2-T
Utilisation du tréhalose...	-	+	+
Utilisation de l'inositol.....	+	-	+
Utilisation du D-ribose.....	-	-	+
Activité pectolytique.....	Faible	Faible	Forte

Détermination de la race :

La race (Buddenhagen et al., 1962) est déterminée sur la base du résultat d'un test de pouvoir pathogène effectué sur des plants de tomates ou d'aubergines et sur des plants de tabac grâce à un test de réaction d'hypersensibilité (HR) sur des feuilles de tabac (Lozano et Sequeira, 1970) :

	RACE (*)		
	1	2	3
Réaction sur :			
- plantes de tomates/aubergines.....	Flétrissement	Pas de réaction	Flétrissement
- plantes de tabac.	Flétrissement	Pas de réaction	Pas de réaction
- feuilles de tabac.	Nécrose (48 heures) et flétrissement (7-8 jours)	Hyper-sensibilité (12-24 heures)	Chlorose (2-8 jours)
(*) La race 4 (pathogène du gingembre et de quelques autres hôtes) et la race 5 (pathogène du mûrier seulement) ne sont pas incluses.			

La caractérisation de la race par le test du pouvoir pathogène ou par le test d'hypersensibilité sur tabac peut n'être pas très répétable, aussi la race peut-elle être déduite du biovar et de l'hôte naturel d'origine.

La caractérisation de la culture peut être complétée comme suit : Empreinte génomique :

Les procédés suivants permettent de réaliser une différenciation moléculaire des souches à l'intérieur du complexe *Ralstonia solanacearum* :

Analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) (Cook et al., 1989) ;

PCR sur des séquences répétitives (rep-PCR) [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., 1995 ; Smith et al., 1995)].

4.3. Test du pouvoir pathogène.

Ce test est réalisé pour la confirmation des diagnostics de *Ralstonia solanacearum* et pour confirmer la virulence des cultures identifiées en tant que *Ralstonia solanacearum*.

Préparer un inoculum de 10⁶ cellules/ml à partir de la culture et d'une souche témoin positive. Inoculer 5 à 10 plantes de tomates ou d'aubergines au stade, de préférence, de la troisième vraie feuille ou plus (section III.6). Incuber pendant une période pouvant atteindre 2 semaines à une température de 22 à 28 °C à raison d'un arrosage quotidien, en maintenant une humidité relative élevée. Observer l'apparition de symptômes de flétrissement et/ou d'épinastie, de chlorose et de rabougrissement.

Isolement à partir des plantes symptomatiques, comme suit :

- prélever un morceau de tige à 2 cm du point d'inoculation ;

- réduire et dilacérer dans un petit volume d'eau stérile ou de tampon phosphates 50 mM. Puis étaler sur des boîtes, incuber, et rechercher l'apparition des colonies typiques de *Ralstonia solanacearum*.

Section III

Détection et identification de *Ralstonia solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre

Nota. - La taille de l'échantillon standard est de 200 tubercules. Cependant, la procédure peut être appliquée à des échantillons de moins de 200 tubercules.

1. Préparation de l'échantillon pour le test

Nota. - L'extrait concentré de pomme de terre obtenu suivant cette procédure peut servir également à la détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opérations préalables éventuellement utiles :

- Incuber l'échantillon à une température de 25 à 30 °C pendant une période pouvant atteindre 2 semaines afin de faciliter la multiplication des faibles populations de *Ralstonia solanacearum* ;

- Laver les tubercules à l'eau courante en utilisant des désinfectants et des détergents appropriés. Sécher les tubercules à l'air.

- Enlever la peau du tubercule au niveau du talon au moyen d'un scalpel ou d'un couteau à légumes propre et désinfecté, de façon à faire apparaître les tissus vasculaires. Découper soigneusement un petit cône de tissu vasculaire (de 3 à 5 mm de diamètre) au niveau du talon de chaque tubercule. Prélever aussi peu que possible de tissu non vasculaire. Procéder ainsi pour chacun des tubercules de l'échantillon.

Nota. - Il est possible à ce stade de procéder à un examen visuel des tubercules (section II.1). Mettre de côté les tubercules présentant des symptômes et les tester à part (section II).

- Rassembler les talons dans un récipient fermé. Il est préférable de traiter immédiatement les talons. Sinon, il est possible de les entreposer pour une période de moins de 24 heures ou de moins de 72 heures, à 4 °C.

- Traiter les talons en suivant l'une des procédures ci-dessous :

- Placer les talons dans un récipient approprié :

Ajouter un volume suffisant de tampon de macération (appendice 2) de façon à recouvrir les talons.

Réduire les talons dans un mixeur de type Waring Blender ou dans un mixeur de type Ultra Thurrax jusqu'à homogénéisation complète. Eviter une homogénéisation excessive.

Laisser le macérat reposer pendant 15 à 30 minutes.

- Placer les talons dans un récipient approprié.

Ajouter un volume suffisant de tampon de macération pour couvrir les talons.

Placer les cônes sur un agitateur rotatif.

Incuber à une vitesse de 50 à 100 tours par minute pendant 4 heures à une température de 20 à 22 °C ou pendant 16 à 24 heures à une température de 4 °C.

- Placer les talons dans un sac de macération jetable résistant (par exemple sac Stomacher de 105 mm x 150 mm, stérilisé par radiations ionisantes).

Broyer les talons soigneusement au moyen d'un outil approprié, par exemple un marteau, jusqu'à homogénéisation juste complète.

Ajouter une quantité suffisante de tampon de macération de façon à recouvrir les talons broyés.

Laisser le macérat décanter de 15 à 30 minutes.

- Extraire les bactéries des cônes provenant des talons par l'une des méthodes suivantes :

- Transférer doucement le macérat dans un tube de centrifugation en laissant les débris dans le récipient ou dans le sac. Si le macérat décanté reste trouble, le centrifuger à 180 g au maximum pendant 10 minutes, à une température inférieure à 10 °C.

Centrifuger le macérat décanté, ou le liquide surnageant issu de la première phase de centrifugation, à une vitesse de 7 000 g pendant 15 minutes ou à 10 000 g pendant 10 minutes à une température inférieure à 10 °C.

Jeter le liquide surnageant sans déranger le culot.

- Filtrer le macérat dans un dispositif filtrant (pores de diamètre 40-100 µm). Accélérer la filtration à l'aide d'une pompe à vide.

Recueillir le filtrat dans un tube de centrifugation.

Laver le filtre au moyen du tampon de macération.

Centrifuger le filtrat à une vitesse de 7 000 g pendant 15 minutes ou à une vitesse de 10 000 g pendant 10 minutes à une température inférieure à 10 °C.

Jeter le liquide surnageant sans déranger le culot.

- 1.5. Remettre en suspension le culot dans un tampon de 1 ml (appendice 2).

Le diviser en deux parties égales et placer chacune dans un microtube.

Utiliser l'un des microtubes pour effectuer le test. Pendant ce temps, conserver la partie restante de cet extrait à une température de 4 °C.

Ajouter de 10 à 25 % (en volume) de glycérol stérile à l'autre microtube. Vortexer et conserver à une température de -18 °C (plusieurs semaines) ou de -70 °C (plusieurs mois).

2. Test d'immunofluorescence

Utiliser un antisérum anti-*Ralstonia solanacearum* de préférence dirigé contre la race 3/biovar 2. Déterminer le titre requis sur une suspension contenant 10⁶ cellules/ml de la souche homologue de *Ralstonia solanacearum*, au moyen d'une dilution appropriée de l'antisérum conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), conformément aux recommandations du fabricant. L'antisérum brut devrait avoir un titre d'immunofluorescence d'au moins 1 : 2 000.

Utiliser des lames à plusieurs puits pour microscope comportant de préférence 10 fenêtres d'au moins 6 mm de diamètre.

Placer sur chaque lame un témoin conjugué FITC. Il convient de répéter le test avec une préparation témoin PBS en cas d'occurrence de cellules positives sur la préparation témoin conjugué FITC.

Préparer des lames témoins positives distinctes avec une suspension contenant 10⁶ cellules/ml d'une souche de race/biovar appropriée de *Ralstonia solanacearum*. Prévoir une lame de ce type pour chaque série de tests.

- 2.1. Préparer les lames en utilisant l'une des méthodes suivantes :

i) Extraits finals contenant relativement peu d'amidon :

Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 µl est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm – choisir une quantité plus importante pour les puits de plus grand diamètre) de la suspension d'extrait final. La rangée suivante peut servir de double ou servir à un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 1.

ii) Dans le cas des autres extraits :

Préparer des dilutions décimales (1/10, 1/100 et 1/1 000) de l'extrait final dans la solution tampon. Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 µl est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm – choisir une quantité plus importante pour les puits de plus grand diamètre) de la suspension d'extrait pur et de chaque dilution. La rangée suivante peut servir de double ou servir à un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 2.

- 2.2. Laisser sécher les gouttes. Fixer les cellules bactériennes sur la lame en chauffant, en passant à la flamme, ou avec de l'éthanol à 95°.

- 2.3. Procédure du test d'immunofluorescence.

i) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée en 2.1 i) :

Préparer une série de dilutions au demi de l'antisérum dans un tampon d'immunofluorescence (appendice 3) : 1/4 du titre (T/4), 1/2 du titre (T/2), titre (T) et deux fois le titre (2T).

ii) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée en 2.1 ii) :

Préparer la dilution de travail de l'antisérum dans un tampon d'immunofluorescence. La dilution de travail est la dilution de l'antisérum offrant la spécificité optimale et égale habituellement à la moitié du titre.

Figure 1

Préparation de la lame de test conformément aux indications fournies en 2.1 i) et 2.3 i)

Dilution standard de l'extrait concentré en suspension

	FITC	T/4	T/2	T	2T	
Échantillon 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Double de l'échantillon 1 ou échantillon 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	→ Dilutions doubles de l'antisérum

Figure 2

Préparation de la lame de test conformément aux indications fournies en 2.1 ii) et 2.3 ii)

	FITC	Dilution standard de l'antisérum				
	Pur	Pur	1/10	1/100	1/1 000	⇒ Dilution décimale de l'extrait en suspension
Echantillon 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Double de l'échantillon 1 ou échantillon 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 2.3.1. Disposer les lames sur du papier absorbant.

Couvrir les puits de lame de test avec des dilutions d'antisérum. Appliquer le tampon PBS sur les puits FITC. La quantité d'antisérum appliquée doit être équivalente à la quantité d'extrait concentré.

- 2.3.2. Incuber sous un couvercle pendant 30 minutes à la température ambiante.

- 2.3.3. Éliminer les gouttelettes d'antisérum et rincer soigneusement les lames dans une solution tampon pour immunofluorescence. Laver 5 minutes dans une solution tampon IF-Tween et après laver 5 minutes dans une solution tampon IF (appendice 3).

Éliminer avec soin le tampon excédentaire.

- 2.3.4. Poser les lames sur du papier absorbant humide.

Couvrir les puits correspondant à l'échantillon et ceux du puits témoin FITC avec du conjugué FITC à la dilution utilisée lors du titrage. La quantité de conjugué appliquée aux puits doit être identique à la quantité d'antisérum utilisée.

- 2.3.5. Laisser incuber 30 minutes sous un couvercle à la température ambiante.

- 2.3.6. Éliminer les gouttes de conjugué. Rincer et laver comme indiqué ci-dessus (2.3.3.).

Enlever soigneusement l'humidité excédentaire.

- 2.3.7. Déposer à la pipette 5 à 10 µl d'un tampon phosphate 0.1 M avec glycérol (appendice 3) ou un support similaire, sur chaque puits ; recouvrir d'une lamelle.

- 2.4. Lecture du test d'immunofluorescence.

Examiner les lames de test avec un microscope équipé d'une source lumineuse épifluorescente et de filtres adaptés pour travailler avec l'isothiocyanate de fluorescéine, sous huile à un grossissement de 500 à 1 000. Examiner les puits selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour.

Commencer par contrôler la lame témoin positif. Les cellules doivent présenter une fluorescence vive, surtout leur pourtour.

Nota. – Le test doit être recommencé si la coloration n'est pas bonne.

Contrôler tout d'abord l'absence de cellules fluorescentes dans les puits témoins FITC. La présence de cellules fluorescentes dans le témoin FITC indique une liaison non spécifique du conjugué ou la présence de cellules autofluorescentes ou de cellules contaminantes.

Nota. – Dans ce cas, le test doit être recommencé.

Rechercher la présence de cellules présentant une fluorescence vive, ayant une morphologie caractéristique de *Ralstonia solanacearum* dans les puits échantillons. L'intensité de fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positive pour une dilution d'antisérum identique. Les cellules dont la coloration est incomplète ou dont la fluorescence est faible ne doivent pas être prises en considération à moins qu'elles ne soient particulièrement nombreuses (voir l'interprétation du test IF).

Interprétation du test d'immunofluorescence :

i) Le test d'immunofluorescence est négatif pour tout échantillon ne contenant aucune cellule présentant une fluorescence vive et une morphologie caractéristique.

ii) Si l'échantillon contient des cellules avec une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, déterminer le nombre moyen de cellules par champ microscopique et calculer le nombre de cellules (N)/ml d'extrait concentré remis en suspension (appendice 4).

Une population d'approximativement 10³ cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension est considérée comme étant la limite de détection pour le test IF :

- pour des échantillons contenant N > 10³ cellules/ml, le test d'immunofluorescence est considéré positif ;
- pour des échantillons contenant N < 10³ cellules/ml, le test d'immunofluorescence peut être considéré comme positif.

iii) Si un grand nombre ($N > 10^5$ cellules par ml) de cellules incomplètement ou faiblement fluorescentes est observé au titre de l'antisérum, un second test doit être réalisé :

- soit un test basé sur un autre principe biologique ;
- soit un test IF préparé avec un autre antisérum ou avec une dilution au dixième du culot.

3. Test ELISA

(d'après Robinson-Smith *et al.*, 1995)

Utiliser un antisérum anti-*Ralstonia solanacearum* dirigé de préférence contre la race 3/biovar 2. Déterminer le titre avec une suspension contenant 10^6 cellules/ml préparée avec la souche homologue de *Ralstonia solanacearum*.

Il est conseillé d'utiliser les plaques de microtitration NUNC-Polysorp.

Utiliser comme témoin négatif un extrait de pomme de terre saine et un témoin PBS.

Utiliser une suspension contenant plus de 10^6 cellules/ml d'une souche appropriée (race/biovar) de *Ralstonia solanacearum* à titre de témoin positif. Tester de la même façon que les échantillons, mais en les séparant soigneusement sur la plaque de microtitration.

3.1. Pipetter 100 à 200 μ l de l'extrait final et le déposer dans un microtube.

Chauffer 4 minutes à 100 °C. Plonger le microtube dans la glace.

3.2. Ajouter un volume identique de tampon carbonate concentré 2 fois (appendice 5). Homogénéiser au vortex.

3.3. Déposer des aliquots de 100 μ l sur au moins deux puits de la plaque de microtitration. Incuber une heure à 37 °C ou une nuit à 4 °C.

3.4. Éliminer les extraits concentrés des puits. Laver ces derniers à trois reprises. Utiliser PBS-Tween (appendice 5), en laissant la dernière solution de lavage dans les puits pendant au moins 5 minutes.

3.5. Préparer la dilution appropriée d'antisérum anti-*Ralstonia solanacearum* dans la solution tampon de saturation (appendice 5). Déposer 100 μ l de dilution antisérum dans les puits.

Incuber 1 heure à 37 °C.

3.6. Éliminer l'antisérum contenu dans les puits. Laver les puits comme indiqué ci-dessus (3.4).

3.7. Préparer la dilution appropriée de l'antisérum conjugué à la phosphatase alcaline dans le tampon de saturation. Déposer 100 μ l de la dilution conjuguée dans les puits.

Incuber une heure à 37 °C.

3.8. Éliminer le conjugué versé dans les puits. Laver ces derniers comme indiqué ci-dessus (3.4 et 3.6).

3.9. Préparer la solution du substrat de la phosphatase alcaline (appendice 5). Déposer 100 μ l dans les puits. Incuber 30 minutes à une heure à l'obscurité, à la température du laboratoire.

3.10. Mesurer l'absorbance à 409 nm.

Interprétation du test ELISA :

Le test ELISA est négatif si la densité optique de l'échantillon est inférieure au double de celle du témoin négatif.

Le test ELISA est positif si la densité optique de l'échantillon est supérieure au double de celle du témoin négatif.

4. Test PCR

(d'après Seal *et al.*, 1993)

Nota. - Il faut utiliser des cônes de pipettes à filtre pour toutes les étapes de la préparation des échantillons et pour les autres manipulations concernant la PCR.

Préparer une suspension de 10^6 cellules/ml de la race 3/biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* à titre de témoin positif. Tester de la même façon que l'échantillon.

4.1. Déposer à la pipette 100 μ l de l'extrait concentré en suspension dans un microtube.

Il est également possible de déposer 90 μ l de l'extrait concentré remis en suspension dans un microtube contenant 10 μ l d'une solution à 0,5 M de NaOH. Mélanger en retournant le microtube à plusieurs reprises.

4.2. Chauffer pendant 4 minutes à 100 °C. Transférer immédiatement le microtube sur la glace.

4.3. Préparer au moins deux dilutions au dixième (par exemple au 1/10 et au 1/100 ou plus si nécessaire), dans de l'eau distillée stérile ou dans de l'eau ultrapure.

4.4. Préparer le mélange destiné à la PCR (appendice 6) dans un microtube stérile, en ajoutant les composants suivants dans l'ordre indiqué ci-dessous :

Pour un volume de réaction de 50 μ l.

COMPOSANT	QUANTITÉ	CONCENTRATION finale
Eau distillé stérile ou ultra épurée..	30,8 μ l-33,8 μ l	
10 x Tampon PCR	5,0 μ l	1 x
d-ATP	1,0 μ l	0,2 mM
d-CTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-GTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-TTP	1,0 μ l	0,2 mM
Amorce OLI-1 (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Amorce Y-2 (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Polymérase taq (5U/ μ l)	0,2 μ l	1,0 U
Volume total	45 μ l-48 μ l	

Pour un nombre plus important de réactions :

Calculer la quantité de chaque composant nécessaire au nombre requis de réactions.

Mélanger les composants et verser de 45 à 48 μ l du mélange dans des microtubes stériles de test de PCR.

Conserver sur glace les microtubes contenant le mélange réactionnel destiné à la PCR.

Pour des volumes de réaction de 25 μ l :

Réduire proportionnellement les quantités de chaque composant.

4.5. Amplification par PCR.

4.5.1. Facultatif. Centrifuger pendant quelques instants les microtubes contenant les échantillons bouillis et le témoin positif.

Ajouter dans l'ordre prescrit de 2 à 5 μ l des échantillons, du témoin eau et du témoin positif aux différents microtubes contenant le mélange de PCR. Placer les microtubes dans le bloc chauffant du cycleur.

4.5.2. Exécuter le programme suivant :

1 cycle de :

i) 2 minutes à 96 °C : dénaturation de la matrice.

50 cycles de :

ii) 20 secondes à 94 °C : dénaturation ;

iii) 20 secondes à 68 °C : hybridation avec les amorces ;

iv) 30 secondes à 72 °C : extension de l'ADN complémentaire.

1 cycle de :

v) 10 minutes à 72 °C : extension finale.

1 cycle de :

vi) maintien à 4 °C.

Nota. - Ces paramètres correspondent à un appareil Perkin Elmer 9600. D'autres types de cycleur thermique peuvent exiger la présence d'une goutte d'huile minérale dans les microtubes ou une modification de la durée des étapes ii), iii) et iv) du profil d'amplification.

4.5.3. Retirer les microtubes du cycleur thermique. Analyser le produit de la PCR. Si l'analyse n'est pas faite immédiatement, les microtubes doivent être conservés à 4 °C en vue d'une utilisation le jour même ou à -18 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

4.6. Analyse du produit de réaction PCR.

Les produits d'amplification par PCR sont détectés par électrophorèse en gel d'agarose et par coloration au bromure d'éthidium.

4.6.1. Préparer un gel d'agarose approprié en amenant doucement à ébullition l'agarose dans une solution tampon d'électrophorèse tris-acétate.

4.6.2. Refroidir l'agarose fondu à une température de 50 à 60 °C. Verser dans le moule du bloc d'électrophorèse et introduire le peigne. Laisser la solution se solidifier.

4.6.3. Retirer le peigne. Recouvrir le gel de tampon tris-acétate jusqu'à ce qu'il soit à peine recouvert (2-3 mm) par la solution tampon.

4.6.4. Déposer des gouttes de 3 μ l du tampon de lest sur du parafilm. Ajouter 12 μ l du produit de PCR provenant des échantillons, du témoin positif ou du témoin eau et mélanger en aspirant doucement avec l'extrémité de la pipette avant de déposer dans le gel. Les volumes indiqués peuvent être modifiés afin de les ajuster à la capacité des puits du gel d'agarose.

4.6.5. Remplir soigneusement les puits du gel. Introduire pour référence dans l'un des puits au moins un marqueur de poids moléculaire approprié.

4.6.6. Raccorder le générateur et la cuve d'électrophorèse. Mettre le gel sous une tension de 5 à 8 V/cm jusqu'à ce que le front de l'indicateur de suivi se trouve à moins de 1 cm de l'extrémité du gel.

4.6.7. Couper l'alimentation. Débrancher les fils de la cuve d'électrophorèse.

Retirer soigneusement le gel. Le tremper pendant 30 à 45 minutes dans une solution de bromure d'éthidium.

Nota. – Il faut porter des gants jetables pour manipuler le bromure d'éthidium qui est un agent mutagène puissant.

4.6.8. Décolorer dans l'eau distillée pendant 10 à 15 minutes.

4.6.9. Visualiser les fragments d'ADN amplifiés sous lumière ultraviolette. Le produit de PCR de *Ralstonia solanacearum* en présence des amorces OLI-1 et Y-2 à une longueur de 288 bp. Vérifier à nouveau par rapport au marqueur d'ADN et par rapport au témoin positif.

Nota. – Le témoin eau doit être négatif dans tous les cas. Sinon le test est à recommencer.

4.6.10. Photographier le gel si l'obtention d'un enregistrement permanent est nécessaire.

4.6.11. Confirmer l'authenticité du fragment amplifié par analyse de restriction enzymatique (REA – *Restriction enzyme analysis*).

4.7. Analyse de restriction enzymatique.

4.7.1. Transférer 8,5 µl du produit de PCR (4.5.3) dans un autre microtube. Ajouter 1 µl d'une solution tampon enzymatique concentrée (10 × et 0,5 µl d'enzyme de restriction Ava II).

4.7.2. Mélanger en aspirant doucement avec l'extrémité de la pipette. Si des gouttelettes subsistent sur les parois du microtube, le passer à la centrifugeuse à impulsions. Incuber pendant une heure à 37 °C.

4.7.3. Analyser le fragment de PCR digéré par électrophorèse en gel d'agarose comme indiqué au point 4.6.

Interprétation du résultat du test PCR :

Le test PCR est négatif si le fragment caractéristique de 288 bp n'est pas détecté et si le fragment est détecté pour la souche témoin positive de *Ralstonia solanacearum*.

Le test PCR est positif si le fragment caractéristique de 288 bp est détecté et si l'analyse d'enzyme de restriction du fragment amplifié est identique à celle de la souche témoin positive de *Ralstonia solanacearum*.

5. Test d'étalement sur milieu sélectif

(d'après Elphinstone et al., 1996)

5.1. Effectuer le test en utilisant une technique appropriée d'ensemencement par dilution, par exemple en procédant comme suit :

i) Préparer au moins deux dilutions au dixième, par exemple au 1/10 et au 1/100, de l'extrait concentré mis en suspension dans la solution tampon. Déposer à la pipette un volume standard (par exemple de 50 à 100 µl) de l'extrait concentré mis en suspension et de chacune des dilutions sur un milieu nutritif sélectif SMSA (appendice 7) et étaler sur une boîte, sur toute la surface du support.

Si cela est jugé nécessaire, réaliser également un étalement en stries avec une anse platinée de 10 µl. Flamber l'anse entre chaque série de stries.

ii) Verser un volume standard (50-100 µl) de l'extrait concentré sur un milieu sélectif nutritif modifié SMSA, puis l'étaler au moyen d'une tige de verre sur toute la surface du milieu nutritif. Ensemencer au moins deux boîtes de milieu SMSA modifié sans flamber la tige entre deux étalements du même échantillonnage.

5.2. Au moyen de la même technique d'ensemencement par dilution, appliquer une suspension de 10⁶ cellules/ml d'une souche de race 3/biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* à titre de témoin positif sur une autre série de boîtes de milieu nutritif SMSA modifié.

5.3. Incuber les boîtes à 28 °C. Commencer le relevé des observations après trois jours. En cas de résultats négatifs, prolonger l'incubation jusqu'à six jours. Les souches virulentes de *Ralstonia solanacearum* forment des colonies de couleur blanc laiteux, planes, irrégulières et fluides avec des centres rouges à violacés nettement apparents, présentant des stries internes ou des verticilles.

5.4. Purifier les colonies présentant une morphologie caractéristique en les repiquant sur un milieu nutritif de type général (appendice 1).

5.5. Identifier les cultures pures (section II.4.1) et confirmer la présence de cultures positives au moyen d'un test de pouvoir pathogène (section II.4.3).

Interprétation du résultat du test de dilution-étalement :

Le test de dilution-étalement est négatif si aucune colonie bactérienne n'est apparue au bout de six jours, ou si aucune colonie caractéristique de *Ralstonia solanacearum* n'est isolée, sous réserve qu'aucune colonie d'autres bactéries n'ait été susceptible d'inhiber leur développement et que *Ralstonia solanacearum* est isolé à partir des témoins positifs.

Le test de dilution-étalement est positif si l'on peut isoler des colonies caractéristiques de *Ralstonia solanacearum*.

6. Test biologique

(d'après Janse, 1988)

6.1. Utiliser 10 plantes tests des plantules sensibles de tomates ou d'aubergines, au stade de la troisième vraie feuille. S'abstenir d'arroser les plantes tests durant les 24 heures précédant l'inoculation.

6.2. Répartir 100 µl d'extrait concentré entre les différentes plantes tests. Inoculer dans la tige entre les cotylédons et en plusieurs autres endroits.

6.3. Inoculer par la même technique 10 plantules avec une suspension de 10⁶ cellules/ml d'une souche de race 3/biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* à titre de témoin positif et 10 autres avec le tampon de reprise des culots, à titre de témoin négatif. Séparer les plantes du témoin positif des autres plantes pour éviter des contaminations croisées.

6.4. Poursuivre la culture des plantules jusqu'à 4 semaines à une température de 22 à 28 °C et avec un arrosage quotidien et une humidité relative élevée. Séparer les plantes témoins positives des autres plantes, en évitant toute contamination. Observer l'apparition des symptômes du flétrissement : épinastie, chlorose et/ou atrophie.

6.5. Isoler la bactérie à partir des plantules des plantes infectées (section II). Identifier les cultures pures d'après leur morphologie caractéristique (section II.4.1) et confirmer la présence de cultures de *Ralstonia solanacearum* au moyen d'un test de pouvoir pathogène (section II.4.3).

6.6. Si cela est jugé nécessaire, vérifier l'absence d'infection sur des lots de plantes tests ne présentant aucun symptôme d'infection. Prélever sur chaque plante échantillon, 2 cm au-dessus du point d'inoculation, une section de tige de 1 cm. Homogénéiser les tissus en les plaçant dans une solution tampon de macération. Procéder à un test d'ensemencement par dilution (section III.5.1). Si le test est positif, identifier les cultures d'après leur morphologie caractéristique (section II.4.1) et confirmer la présence de cultures de *Ralstonia solanacearum* au moyen d'un test de pouvoir pathogène (section II.4.3).

Interprétation des résultats du test biologique :

Le test biologique est négatif si les plantes tests ne sont pas infectées par *Ralstonia solanacearum* sous réserve que les plantes témoins inoculées soient infectées par *Ralstonia solanacearum*.

Le test biologique est positif si les plantes échantillons sont infectées par *Ralstonia solanacearum*.

7. Test d'enrichissement

(d'après J. G. Elphinstone et al., 1996)

7.1. Verser 100 µl d'extrait dans 3 ml de milieu nutritif modifié SMSA (appendice 7).

7.2. Incuber pendant au moins 48 heures sans toutefois dépasser 72 heures à une température de 28 °C, sans refermer hermétiquement le bouchon du tube, pour permettre son aération.

7.3. Fermer hermétiquement le bouchon et vortexer. Préparer des aliquots pour le test d'immunofluorescence (section III.2), le test ELISA (section III.3) et/ou le test PCR (section III.4).

8. Test du pouvoir pathogène

Voir section II.4.3

Appendice 1

MILIEUX NUTRITIFS D'ISOLEMENT ET DE CULTURE DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Gélose nutritive (NA) :

Gélose nutritive (Difco) : 23 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Préparer le milieu par volumes d'un demi-litre dans des flacons d'un litre ;

Dissoudre les ingrédients ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant quinze minutes ;

Refroidir à 50 °C. Verser dans les boîtes.

Gélose à base de levure-peptone-glucose (YPGA) :

Extrait de levure (Difco) : 5 g ;

Bacto peptone (Difco) : 5 g ;

D(+)-glucose (monohydraté) : 10 g ;

Bacto agar (Difco) : 15 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Préparer des milieux d'un demi-litre dans des flacons d'un litre ;

Dissoudre les ingrédients ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant quinze minutes ;

Refroidir à 50 °C. Verser dans les boîtes.

Gélose à base de saccharose-peptone (SPA) :

Saccharose : 20 g ;

Peptone : 5 g ;

K₂HPO₄ : 0,5 g ;

MgSO₄·7H₂O : 0,25 g ;

Bacto agar (Difco) : 15 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Préparer des milieux d'un demi-litre dans des flacons d'un litre ;

Dissoudre les ingrédients. Ajuster le pH à 7,2-7,4, si nécessaire ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes ;

Refroidir à 50 °C. Verser dans les boîtes.

Milieu tétrazolium de Kelman :

Acides casaminiques (Difco) : 1 g ;

Bacto Peptone (Difco) : 10 g ;

Dextrose : 5 g ;

Bacto agar (Difco) : 15 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Préparer des milieux d'un demi-litre dans des flacons d'un litre ;

Dissoudre les ingrédients ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant quinze minutes ;

Refroidir à 50 °C ;

Ajouter une solution aqueuse de chlorure de triphényltétrazolium (Sigma), stérilisée par filtration, pour obtenir une concentration finale de 50 mg par litre ;

Verser dans les boîtes.

Appendice 2

MATÉRIEL NÉCESSAIRE À LA PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Tampon de macération : tampon au phosphate 50 mM à pH 7,0 :

Ce tampon est utilisé pour la macération des tissus :

Na₂HPO₄ : 4,26 g ;

KH₂PO₄ : 2,72 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant quinze minutes ;

L'ajout de 5 % de polyvinyl pyrrolidone-40 000 MWT (PVP-40) est recommandé en cas d'application du test de PCR direct pour réduire l'incidence de l'inhibition de l'amplification par les molécules aromatiques de l'extrait.

L'ajout d'un défloculant, d'un agent antimousse ou d'un anti-oxydant est recommandé dans les cas où les procédures d'homogénéisation Waring Blender ou Ultra Turrax sont utilisées pour la macération des cônes de tissu de pommes de terre.

Flocons de Lubrol : 0,5 g par litre ;

DC silicone antimousse : 1 ml par litre ;

Pyrophosphate tétrasodique : 1 g par litre ;

Passer à l'autoclave séparément. Ajouter jusqu'à obtention de la concentration souhaitée.

Tampon de reprise du culot : tampon au phosphate 10 mM à pH 7,2 :

Ce tampon est utilisé pour la resuspension et la dilution des culots de talons de pommes de terre :

Na₂HPO₄·12H₂O : 2,7 g ;

NaH₂PO₄·2H₂O : 0,4 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant quinze minutes.

Appendice 3

MATÉRIEL NÉCESSAIRE AU TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE

Tampon IF : PBS 10 mM à pH 7,2 :

Ce tampon est utilisé pour la dilution des antisérums :

Na₂HPO₄·12H₂O : 2,7 g ;

NaH₂PO₄·2H₂O : 0,4 g ;

NaCl : 8 g ;

Eau distillée : 1 litre ;

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins ;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant quinze minutes.

Tampon IF-Tween :

Ce tampon est utilisé pour le lavage des lames. Ajouter 0,1 % de Tween 20 au tampon IF.

Glycérine tamponnée au phosphate 0,1 M à pH 7,6 ;

Ce tampon est utilisé comme fluide de support sur les puits de la lame IF pour renforcer la fluorescence :

Na₂HPO₄·12H₂O : 3,2 g ;

NaH₂PO₄·2H₂O : 0,15 g ;

Glycérol : 50 ml ;

Eau distillée : 100 ml.

Appendice 4

DÉTERMINATION DU DEGRÉ DE CONTAMINATION LORS DU TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE

Superficie (S) d'un puits d'une lame multipuits :

$$= \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

où D = diamètre du puits.

Superficie(s) du champ de l'objectif :

$$= \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

où d = diamètre du champ.

Calculer le diamètre du champ (d) par mesure directe ou en appliquant les formules suivantes :

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

où i = coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24) ;

où K = coefficient du tube (1 ou 1,25) ;

où G = grossissement (100 ×, 40 ×, etc.) de l'objectif.

$$\text{De (2), on tire : } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

$$\text{De (3), on tire : } d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{G K} \quad (4)$$

Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par champ (c).

Calculer le nombre de cellules fluorescentes typiques par puits (C).

$$C = c \frac{S}{s}$$

Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par millilitre d'extrait concentré (N) :

$$N = C \times \frac{1000}{y} \times F$$

où y = volume d'extrait concentré sur le puits ;

où F = facteur de dilution de l'extrait concentré.

Appendice 5

MATÉRIEL NÉCESSAIRE AU TEST ELISA

Tampon carbonate double concentration à pH 9,6 :

Na₂CO₃ : 6,36 g ;

NaHCO₃: 11,72 g;
Eau distillée: 1 l;
Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes;
Du sulfite de sodium à une concentration finale de 0,2 % peut être ajouté comme antioxydant si l'extrait contient une fraction élevée de molécules aromatiques.

10 × PBS à pH 7,4 :

NaCl: 80 g;
KH₂PO₄: 2 g;
Na₂HPO₄·12H₂O: 29 g;
KCl: 2 g;
Eau distillée: 1 l;

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Diviser en parties aliquotes, selon les besoins;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

PBS-Tween (PBS-T) :

10 × PBS: 100 ml;
10 % de Tween 20: 5 ml;
Eau distillée: 895 ml.

Tampon de blocage (anticorps) (doit être fraîchement préparé) :

10 × PBS: 10 ml;
Polyvinyle pyrrolidone-44 000 MWT (PVP-44): 2 g;
10 % de Tween 20: 0,5 g;
Poudre de lait: 0,5 g;
Eau distillée: jusqu'à 100 ml.

Solution substrat de phosphatase alcaline à pH 9,8 :

Diéthanolamine: 97 ml;
Eau distillée: 800 ml;

Mélanger et ajuster le pH à 9,8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl);

Porter à 1 litre avec de l'eau distillée;

Ajouter 0,2 g de MgCl₂;

Dissoudre 2 comprimés de substrat de phosphatase de 5 mg (Sigma) par 15 ml de solution.

Appendice 6

MATÉRIEL NÉCESSAIRE AU TEST PCR

Oligonucléotide amorce :

Amorce OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3';
Amorce Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3';
Pour matériel: voir Seal et al. (1993).

Appendice 7

MATÉRIEL NÉCESSAIRE AUX TESTS D'ENSEMENCEMENT SÉLECTIF ET D'ENRICHISSEMENT

Milieu sélectif SMSA (Engelbrecht 1994, modifié par Elphinstone et al. 1996) :

Milieu de culture :

Acides casaminiques (Difco) : 1 g;
Bacto peptone (Difco) : 10 g;
Glycérol : 5 ml;
Gélose (Difco) : 15 g;
Eau distillée : 1 l;

Préparer le milieu par volumes d'un demi-litre dans des flacons d'un litre;

Dissoudre les ingrédients et contrôler le pH. Si nécessaire, ajuster le pH à 6,5 avant l'autoclavage. *Ralstonia solanacearum* ne se développera pas bien sur le milieu à pH > 7,0;

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes;

Réfrigérer à 50 °C;

Ajouter les ingrédients suivants (tous de Sigma) pour obtenir les concentrations finales spécifiées :

Violet cristallisé :	5 mg par l		
Sulfate de polymyxine B :	100 mg par l	(approximativement 600 000 unités)	Sigma P-1004
Bacitracine (*) :	25 mg par l	(approximativement 1 250 unités)	Sigma B-0125
Chloramphénicol :	5 mg par l		Sigma C-3175

Péniciline-G :	0,5 mg par l	(approximativement 825 unités)	Sigma P-3032
Sels de tétrazolum :	50 mg par l		

Dissoudre les ingrédients dans de l'éthanol à 70 % aux concentrations données pour le volume de milieu préparé. Certains ingrédients (polymyxine B et chloramphénicol) doivent être légèrement chauffés et agités.

Bouillon SMSA (Elphinstone et al., 1996).

Effectuer la même préparation que pour le milieu sélectif, mais supprimer la gélose ou les sels de tétrazolum. Répartir dans des tubes Universal de 30 ml à usage unique, à raison de 3 ml par tube.

(*) Si jugée nécessaire, une augmentation de la concentration de bacitracine à 300 ppm peut réduire la contamination par bactéries saprophytes sans réduire la récupération de *Ralstonia solanacearum*.

RÉFÉRENCES

- Buddenhagen, I. W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D., Elizabeth, B. and Sequeira, L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113-121.
- Dinesen, I. G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133-142.
- Elphinstone, J. G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D. E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M. C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.
- Hayward, A. C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265-277.
- Hayward, A. C., 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127-135.
- 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.
- Janse, J. D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.
- Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293-695.
- Lelliot, R. A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford 216 p.
- Louws, F. J.; Fulbright, D. W.; Stephens, C. T. and De Bruijn, F. J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528-536.
- Lozano, J. C. and Sequeira, L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.
- Mirza, M. S.; Rademaker, J. W. L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029-1034.
- Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S. M. D., 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
- Seal, S. E.; Jackson, L. A.; Yong, J. P. W. and Daniels, M. J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. pickettii* 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.
- Smith, J. J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262-4268.

Stead, D.E. 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.

Stead, D. E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281-295.

Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse, J.D., 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent *in-situ* hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungs-forschung* 2, 266-269.

ANNEXE III

1. Dans tous les cas d'apparition suspectée pour lesquels on a constaté, lors du ou des test(s) de dépistage pratiqué(s) selon la méthode décrite à l'annexe II pour le matériel végétal énuméré ou, dans tous les autres cas, selon toute autre méthode officiellement agréée, une réaction positive à confirmer ou infirmer par cette méthode, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées :

- dans la mesure du possible, le lot, ou une partie de celui-ci (d'où l'échantillon a été prélevé) dans son emballage d'origine avec étiquette ;
- dans la mesure du possible, la partie restante des échantillons ;
- tout extrait résiduel et matériel supplémentaire préparé pour le ou les test(s) de dépistage, tels que les lames préparées en vue de tests d'immunofluorescence, et
- toute documentation pertinente,

et ce, jusqu'à l'achèvement de ladite méthode.

2. En cas de confirmation de la présence de l'organisme, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées :

- le matériel visé au point 1 ;
- un échantillon de la tomate contaminée ou un échantillon d'aubergine infecté par l'inoculation d'extrait de tubercule ou de plante, le cas échéant, et
- la culture isolée de l'organisme,

et ce, pendant au moins un mois après la procédure de notification.

ANNEXE IV

Les éléments sur lesquels porte l'enquête visée à l'article 5, point a, i), sont les suivants, lorsqu'ils sont pertinents :

i) Lieux de production :

- culture, actuelle ou passée, de pommes de terre qui sont liées par clonage à des pommes de terre déclarées contaminées par l'organisme ;
- culture, actuelle ou passée, de tomates provenant de la même source que les tomates déclarées contaminées par l'organisme ;
- culture, actuelle ou passée, de pommes de terre ou de tomates placées sous contrôle officiel en raison de la présence suspectée de l'organisme ;
- culture, actuelle ou passée, de pommes de terre qui sont liées par clonage à des pommes de terre qui ont été cultivées dans des lieux de production déclarés contaminés par l'organisme ;
- culture de pommes de terre ou de tomates situées à proximité de lieux de production contaminés, et notamment des lieux de production partageant du matériel et des installations de production soit directement, soit par l'intermédiaire d'un entrepreneur commun ;
- utilisation, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, d'eaux superficielles provenant d'une source dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée ;
- utilisation, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, d'eaux superficielles provenant d'une source utilisée en commun avec des lieux de production dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée ;
- submersion actuelle ou passée par des eaux superficielles dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée, et

ii) Eaux superficielles utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation d'un ou plusieurs champs ou lieux de production dont la contamination par l'organisme est confirmée ou qui ont submergé ceux-ci.

ANNEXE V

1. La détermination de l'étendue de la contamination probable visée à l'article 5, point a, iii) et point c, iii), comprend les éléments suivants, lorsqu'ils sont pertinents :

- le matériel végétal énuméré cultivé en un lieu de production déclaré contaminé conformément à l'article 5, point a, ii) ;
- le(s) lieu(x) de production ayant, dans le système de production, un lien avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, point a, ii), y compris ceux partageant l'équipement et les installations de production soit directement, soit par l'intermédiaire d'un entrepreneur commun ;
- le matériel végétal énuméré produit dans le(s) lieu(x) de production visé(s) au tiret précédent, ou présent dans ledit (lesdits) lieu(x) pendant la période où le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, point a, ii), était présent dans les lieux de production visés au premier tiret ;
- les entrepôts où le matériel végétal énuméré provenant des lieux de production visés ci-dessus est manipulé ;
- tout matériel, véhicule, récipient, entrepôt ou partie de ceux-ci, ainsi que tout autre objet, y compris l'emballage, qui peut avoir été en contact avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, point a, ii) ;
- tout matériel végétal énuméré entreposé dans des structures ou objets visés au tiret précédent ou en contact avec eux, avant leur nettoyage ou leur désinfection ;
- à la suite de l'enquête et des essais visés à l'article 5, point a, i), dans le cas de la pomme de terre, les tubercules ou les plants ayant un lien de parenté ascendant ou collatéral, par clonage, et, dans le cas de la tomate, une source commune avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, point a, ii), et pour lequel, bien que les résultats des tests concernant la présence de l'organisme aient été négatifs, il apparaît que la contamination est probable par le biais d'un lien clonal ;
- le(s) lieu(x) de production du matériel végétal énuméré visé au tiret précédent ;
- le(s) lieu(x) de production du matériel végétal énuméré utilisant, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, de l'eau déclarée contaminée conformément à l'article 5, point c, ii) ;
- le matériel végétal énuméré produit dans des champs submergés par des eaux superficielles dont la contamination par l'organisme est confirmée.

2. La détermination de la propagation possible visée à l'article 5, point a, iv), et point c, iii), comprend :

i) Dans les cas visés à l'article 5, point a, iv), la prise en considération des éléments suivants :

- la proximité d'autres lieux de production où le matériel végétal énuméré est cultivé ;
- la production et l'utilisation communes des stocks de pommes de terre de semence ;
- les lieux de production utilisant, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation de matériel végétal énuméré, des eaux superficielles dans les cas où il existe ou existait un risque d'écoulement d'eaux superficielles à partir des lieux de production déclarés contaminés conformément à l'article 5, point a, ii), ou un risque de submersion de ceux-ci ;

ii) Dans les cas où des eaux superficielles ont été déclarées contaminées conformément à l'article 5, point c, ii) :

- le(s) lieu(x) de production produisant du matériel végétal énuméré adjacents aux eaux superficielles déclarées contaminées ou risquant d'être submergés par ces eaux ;
- tout bassin d'irrigation discrète associé aux eaux superficielles déclarées contaminées.

3. Le détail de la notification comprend :

- la date du signalement de l'apparition suspectée, conformément à l'article 4, et les dates du prélèvement d'échantillons et de la confirmation de la présence de l'organisme conformément à l'article 5, selon le cas ;
- une description des éléments de la contamination déclarée et de la zone délimitée.

4. Le détail de la notification supplémentaire comprend :

- pour tout envoi ou lot de pommes de terre déclaré contaminé, les certificats phytosanitaires, le numéro de passeport ou d'enregistrement des producteurs de pommes de terre, entrepôts collectifs et centres d'expédition, selon le cas ;

- pour tout envoi ou lot de plants de tomates déclaré contaminé, les certificats phytosanitaires et le numéro de passeport, conformément à la liste de l'annexe V, partie A, chapitre I^{er}, point 2.2, de la directive 77/93/CEE ;
- la dénomination variétale et la catégorie pour les stocks de pommes de terre de semence et, si possible, dans tous les autres cas ;
- toutes les autres informations que la Commission pourrait souhaiter en ce qui concerne le foyer déclaré.

ANNEXE VI

1. Les dispositions visées à l'article 6, paragraphe 1, sont les suivantes :

- incinération, ou
- utilisation comme aliment destiné aux animaux après un traitement thermique de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque de survie de l'organisme, ou
- enfouissement profond dans un site d'élimination ne présentant aucun risque d'écoulement sur des terres agricoles ou de contact avec des sources d'eau susceptibles d'être utilisées pour l'irrigation de terres agricoles, ou
- transformation industrielle par livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations d'élimination des déchets officiellement agréées qui sont en conformité avec les dispositions de l'annexe VII, ou
- d'autres mesures, pour qu'il soit établi qu'elles ne présentent pas de risque identifiable de propagation de l'organisme ; ces mesures sont immédiatement notifiées à la Commission et aux autres Etats membres.

2. L'utilisation ou l'élimination appropriées du matériel végétal énuméré visé à l'article 6, paragraphe 2, sous le contrôle des organismes officiels compétents de l'Etat membre ou des Etats membres concerné(s) et moyennant une communication adéquate entre les organismes officiels compétents de manière à garantir ce contrôle à tout moment ainsi que l'agrément de l'organisme officiel compétent de l'Etat membre où les pommes de terre doivent être conditionnées ou transformées quant aux installations d'élimination des déchets visées aux premier et deuxième tirets, comportent :

i) Pour les tubercules de pomme de terre :

- leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la consommation et leur conditionnement, dans des sites disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets, en emballages prévus pour une livraison et une utilisation directes sans réemballage et destinés à une telle livraison et utilisation directes, ou
- leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la transformation industrielle après livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets, ou
- une autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a pas de risque identifiable de propagation de l'organisme et sous réserve de l'agrément desdits organismes officiels compétents. Ces mesures sont immédiatement notifiées à la Commission et aux autres Etats membres ;

ii) Pour d'autres parties de plantes comprenant la tige et les débris de feuillage :

- leur destruction, ou
- une autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a pas de risque identifiable de propagation de l'organisme ; ces mesures sont notifiées à la Commission et aux autres Etats membres.

3. Les méthodes appropriées de décontamination des objets visés à l'article 6, paragraphe 3, sont le nettoyage et, le cas échéant, la désinfection, de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque identifiable de propagation de l'organisme ; elles sont appliquées sous la surveillance des organismes officiels compétents des Etats membres.

4. Les diverses mesures à mettre en œuvre par les Etats membres dans la zone délimitée établie conformément à l'article 5, point a, iv), et point c, iii), auxquelles il est fait référence à l'article 6, paragraphe 4, sont les suivantes :

4.1. Dans les cas où des lieux de production ont été déclarés contaminés conformément à l'article 5, point a, iii) :

a) dans un champ ou une unité de production en culture protégée déclaré(e) contaminé(e) conformément à l'article 5, point a, iii), soit :

i) Pendant au moins les quatre campagnes suivant la contamination déclarée :

- des mesures sont prises en vue d'éliminer les plants spontanés de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, et

- ne peuvent être plantés :

- ni tubercule ni plant de pommes de terre ;
- ni plant ni semence de tomates ;
- en prenant en considération les caractéristiques biologiques de l'organisme :
 - ni d'autres plantes hôtes ;
 - ni des plantes de l'espèce *Brassica* pour lesquelles il existe un risque identifié de survie de l'organisme ;
 - ni culture pour laquelle il existe un risque identifié de propagation de l'organisme ;

- durant la première campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates suivant la période indiquée au tiret précédent et à la condition que le champ ait été déclaré exempt de plants spontanés de pommes de terre et de tomates et d'autres plantes hôtes, y compris des plantes adventices de la famille des solanacées, pendant deux campagnes consécutives au moins avant la plantation :

- dans le cas des pommes de terre, des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation, et
- des recherches officielles comportant des essais sont effectuées conformément à l'article 2, paragraphe 1 ;
- durant la campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates suivant celle visée au tiret précédent et après un cycle approprié de rotation, dans le cas des pommes de terre, des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées pour la production de semence ou de pommes de terre de conservation et, dans le cas des pommes de terre et des tomates, des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2, paragraphe 1, soit :

ii) Pendant les cinq campagnes suivant celle de la contamination déclarée :

- des mesures sont prises en vue d'éliminer les plants spontanés de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, et
- le champ est mis et maintenu, durant les trois premières années, soit en jachère nue, soit en céréales selon le risque identifié, soit en pâturage permanent, auquel cas il est fréquemment fauché ras ou mis en pâturage intensif, soit enherbé pour la production de semence, puis, pendant les deux années suivantes, planté de plantes non hôtes de l'organisme pour lesquelles il n'y a pas de risque identifié de survie ou de propagation de l'organisme ;
- durant la première campagne de récolte de pommes de terre ou de tomates suivant la période visée au tiret précédent :
 - dans le cas des pommes de terre, des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées pour la production de semence ou de pommes de terre de conservation, et des recherches officielles comportant des tests sont effectuées conformément à l'article 2, paragraphe 1 ;

b) Dans les autres champs :

- au cours de la campagne suivant la contamination déclarée :
 - aucun tubercule ou plant de pomme de terre ni aucune autre plante hôte de l'organisme n'est planté(e), et des mesures sont prises en vue d'éliminer les plants spontanés de pommes de terre et de tomates ainsi que les autres plantes hôtes, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, selon le cas, ou
 - dans le cas des tubercules de pommes de terre, des pommes de terre de semence officiellement certifiées peuvent être plantées exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation à condition que les organismes officiels compétents acquièrent la certitude que le risque constitué par les plants spontanés de pommes de terre et de tomates et autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, a été éliminé. La récolte sur pied est inspectée à des moments opportuns, et des plants spontanés de pommes de terre sont soumis à des essais visant à détecter la présence de l'organisme ; en outre, dans le cas des pommes de terre, les tubercules récoltés sont inspectés ;

- pendant la première campagne suivant celle visée au premier tiret :
 - dans le cas des pommes de terre, seules des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées, en vue de la production de pommes de terre de semence ou de conservation ;
 - pendant au moins la deuxième campagne suivant celle visée au premier tiret :
 - dans le cas des pommes de terre, seules des pommes de terre de semence officiellement certifiées ou des pommes de terre de semence cultivées sous contrôle officiel à partir de pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées en vue de la production de pommes de terre de semence ou de conservation ;
 - pendant chacune des campagnes visées aux tirets précédents, des mesures sont prises pour éliminer les plants spontanés de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, et des recherches officielles telles que prévues à l'article 2, paragraphe 1, sont effectuées ; dans les cas où les pommes de terre de semence sont plantées en vue de la production de semence, des tests sont effectués sur les tubercules ;
- c) Immédiatement après la déclaration de contamination conformément à l'article 5, point a, ii), et pendant chacune des campagnes suivantes jusqu'à, et y compris, la première campagne pour laquelle la récolte de pommes de terre ou de tomates dans le(s) champ(s) déclaré(s) contaminé(s) est autorisée, comme indiqué au point a :
- toutes les machines et installations de stockage sur le lieu de production servant à la production des pommes de terre ou des tomates sont nettoyées et, si nécessaire, désinfectées selon des méthodes appropriées au point 3 ;
 - des contrôles officiels des programmes d'irrigation ou de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de ces programmes, sont mis en place en tant que de besoin pour prévenir la propagation de l'organisme ;
- d) Dans une unité de production en culture protégée déclarée contaminée conformément à l'article 5, point a, ii), permettant le remplacement total du milieu de culture :
- aucun tubercule ou plant de pomme de terre ni aucune autre plante hôte de l'organisme, y compris les plants et semences de tomate, n'est planté(e), sauf si ladite unité a été soumise à des mesures sous contrôle officiel visant à l'élimination de l'organisme et de tout matériel végétal hôte, y compris, au moins, le remplacement complet du milieu de culture et du matériel associé ainsi que le nettoyage et, le cas échéant, la désinfection de ladite unité et de tout l'équipement, et si, par la suite, elle a été agréée pour la production de pommes de terre ou de tomates par les organismes officiels compétents, et
 - la production de pommes de terre est issue de pommes de terre de semence officiellement certifiées ou de minitubercules ou de microplantes provenant de sources testées ;
 - des contrôles officiels des programmes d'irrigation et de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de tels programmes, sont mis en place en tant que de besoin pour prévenir la propagation de l'organisme.
- 4.2. A l'intérieur de la zone délimitée, sans préjudice des mesures énumérées au point 4.1, les Etats membres :
- a) Immédiatement après la contamination déclarée et pendant au moins trois campagnes :
- aa) Dans les cas où la zone délimitée a été déterminée conformément à l'article 5, point a, iv) :
- font surveiller par leurs organismes officiels compétents les installations pratiquant la culture, le stockage et la manutention de tubercules de pommes de terre ou de tomates, ainsi que les locaux des entreprises exploitant sous contrat du matériel utilisé pour la production de pommes de terre ou de tomates ;
 - exigent le nettoyage et, en tant que de besoin, la désinfection du matériel et des entrepôts de ces installations par les méthodes appropriées visées au point 3 ;
 - exigent que seules des semences certifiées ou des semences cultivées sous contrôle officiel soient plantées pour toutes les cultures de pommes de terre dans ladite zone, et que soient soumises à des tests les pommes de terre de semence récoltées sur des lieux de production dont il a été établi qu'ils sont probablement contaminés en vertu de l'article 5, point a, iii) ;
 - exigent, dans toutes les entreprises de la zone, la manutention séparée des pommes de terre de semence et des pommes de terre de conservation ;
 - procèdent à des recherches officielles conformément à l'article 2, paragraphe 1 ;

- ab) Dans les cas où des eaux superficielles ont été déclarées contaminées conformément à l'article 5, point c, ii), ou incluses parmi les éléments de propagation possible de l'organisme conformément à l'annexe V, point 2 :
- procèdent à une enquête annuelle à des moments opportuns, y compris au prélèvement d'échantillons d'eaux superficielles et de plantes hôtes appropriées de la famille des solanacées dans les sources appropriées ainsi qu'à des tests effectués :
 - pour le matériel végétal énuméré, selon la méthode pertinente décrite à l'annexe II, ou
 - dans les autres cas, selon toute autre méthode officiellement agréée ;
 - mettent en place des contrôles officiels des programmes d'irrigation et de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de l'utilisation de l'eau déclarée contaminée pour l'irrigation et le traitement par pulvérisation du matériel végétal énuméré et, le cas échéant, d'autres plantes hôtes, pour prévenir la propagation de l'organisme ; cette interdiction peut être réexaminée sur la base des résultats obtenus au cours de ladite enquête annuelle ;
 - dans les cas où des effluents liquides sont contaminés, mettent en place des contrôles officiels de l'élimination des déchets d'entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal énuméré ;

b) Etablissent, en tant que de besoin, un programme de remplacement de tous les stocks de pommes de terre de semence sur une période appropriée.

ANNEXE VII

Les installations d'élimination des déchets officiellement agréées et visées à l'annexe VI, point 1, quatrième tiret, respectent les dispositions suivantes, de manière à prévenir le risque de propagation de l'organisme :

- i) Les déchets de transformation de pommes de terre et de tomates (y compris les épluchures de pommes de terre ainsi que les pommes de terre et tomates éliminées) et tous autres déchets solides de pommes de terre et de tomates sont éliminés :
- par enfouissement profond dans un site d'élimination ne présentant aucun risque d'écoulement sur des terres agricoles ou de contact avec des sources d'eau susceptibles d'être utilisées pour l'irrigation de terres agricoles. Les déchets sont acheminés directement vers le site dans des conditions d'isolement prévenant tout risque de perte des déchets, ou
 - par incinération ;
- ii) Effluents liquides de transformation : avant leur élimination, les effluents liquides contenant des solides en suspension sont soumis à un procédé de filtration ou de décantation afin d'éliminer ces solides. Ces derniers sont éliminés ainsi qu'il est précisé au point i).

Les effluents liquides sont ensuite :

- chauffés à une température minimale de 70 °C pendant au moins 30 minutes, avant leur élimination, ou
- éliminés d'une autre manière sous réserve d'agrément officiel et sous contrôle officiel, de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque de contact des déchets avec des terres agricoles ou des sources d'eau qui pourraient être utilisées pour l'irrigation des terres agricoles ; les modalités en sont notifiées aux autres Etats membres ainsi qu'à la commission.

Arrêté du 12 mars 1999 relatif aux conditions d'attribution de l'aide à l'amélioration de l'encépagement d'exploitations viticoles dans la région délimitée « Cognac » pour la campagne 1998-1999

NOR : AGRP9900590A

Le ministre de l'économie, des finances, et de l'industrie et le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Vu l'arrêté du 27 mars 1996 modifié portant décision d'instaurer une aide à l'amélioration de l'encépagement d'exploitations viticoles ;

Vu l'avis du conseil de direction de l'Office national interprofessionnel des vins en date du 20 janvier 1999,

Arrêtent :

Art. 1^{er}. - Les plantations ou surgreffages destinés à produire des vins de table, réalisés dans la région délimitée « Cognac » des départements de la Charente, de la Charente-Maritime, de la Dor-