



INRAE



UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DES SCIENCES

MASTER BIOLOGIE ET AGROSCIENCES

Spécialité IBION-Tec

Ingénierie Biomoléculaire et Nano-biotechnologies

RAPPORT DE STAGE

De Master deuxième année

Détection *in situ* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et tests de l'efficacité de produits de lutte

Présenté par

Guillot Julia

Unité de Recherche Pathologie Végétale, INRAE PACA

Equipe MISTRAL

Encadré par Dr Lacroix Christelle

Rapporteur : Marie-Hélène Boyer

Rapporteur : Marc Rolland

2023

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais avant toute chose remercier Christelle Lacroix de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce stage, de m'avoir fait confiance pour mener à bien mes objectifs, de m'avoir accompagnée tout au long des étapes et de m'avoir tant appris,

Merci d'avoir été une excellente encadrante, tant professionnellement que personnellement. Je me souviendrai de mon expérience de stage de fin d'études avec beaucoup de nostalgie pour ces moments passés ici grâce à toi,

Merci à l'ensemble des membres impliqués dans le copilotage, Marc Bardin, Jean-François Bourgeay, Thomas Presseccq, Claire Goillon et Aurélie Rousselin, pour m'avoir accompagnée tout au long de mon stage, et de m'avoir transmis leurs conseils et expériences,

Merci au directeur de l'unité Benoit Moury et la directrice adjointe Alexandra Schoeny pour leur accueil au sein de l'unité Pathologie Végétale,

Je remercie également les membres de l'équipe MISTRAL de m'avoir accueillie et apporté leur aide chaque fois que nécessaire.

Merci à Caroline Guilbaud et Cécile Monteil d'avoir pris le temps de me former lors de mes débuts, à Magali Eygrier pour son aide en salle des milieux et ses conseils, à Cindy Morris et Odile Berge pour leurs conseils,

Un grand merci à Nathalie Truglio, Jérémy Théodore et Michel Pascal sans qui les expériences en chambre climatique n'auraient pas pu avoir lieu,

Merci à la team du bureau Orion, Lenny, Lola, Mélanie et à Emma et Solène pour votre bonne humeur et ces bons moments partagés.

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

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

AUIC : Area Under Inhibition Curve, c'est à dire Aire sous la courbe de progression de l'inhibition

Cf : Concentration Finale

CFU : Colony Forming Unit, c'est à dire Unité Formant Colonie

Cmm : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

DNase I : Enzyme de type endonucléase qui digère l'ADN simple et double brin

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

LAMP : Loop Mediated Isothermal Amplification

MISTRAL : Microbiologie des agroéco-Systèmes : TRAnsfert de connaissances sur L'histoire de vie d'agents phytopathogènes vers la protection des plantes et les processus climatiques

TSA : Milieu de culture Tryptone Soja Agar

YPGA : Milieu de culture Yeast Peptone Glucose Agar

YPG : Milieu de culture Yeast Peptone Glucose

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Les chiffres de l'Agreste

Figure 2 : Symptômes du chancre bactérien de la tomate

Tableau 1 : Caractéristiques des amorces utilisées pour les tests LAMP

Figure 3 : Révélation colorimétrique pH-dépendante de l'amplification de l'ADN

Figure 4 : Effet de la concentration de la suspension inoculée (10^8 et 10^7 CFU/ml) et de la méthode d'inoculation sur le nombre de plantes présentant des symptômes de flétrissements unilatéraux, caractéristiques d'une infection par *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* au cours du temps

Figure 5 : Effet de la concentration de la suspension bactérienne inoculée (10^8 et 10^7 CFU/ml) et de la méthode d'inoculation sur le nombre de feuilles par modalité présentant des symptômes de flétrissements unilatéraux, caractéristiques d'une infection par *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* au cours du temps

Figure 6 : Effets des produits de lutte contre Cmm en conditions *in vitro* au cours du temps

Figure 7 : Rapidité et effets des produits de lutte contre Cmm en condition *in vitro*

Figure 8 : Efficacité des produits de lutte *in planta* contre l'apparition des symptômes du chancre bactérien de la tomate

Figure 9 : Evolution des symptômes de nécrose

Figure 10 : Efficacité des produits de lutte *in planta* contre l'évolution des symptômes du chancre bactérien de la tomate

Tableau 2 : Représentation simple de la distribution de *Cmm1125* au sein des plantes au cours du temps

Tableau 3 : Représentation simplifiée du seuil de détection selon les protocoles testés

Figure 11 : Détection de *Cmm* sur les surfaces inertes de la chambre climatique en amont des inoculations de Cmm sur plantes

Figure 12 : Effet de la DNase I sur la révélation colorimétrique des résultats

Figure 13 : Interférence de la colorimétrie pH-dépendante selon la quantité de DNase I

Figure 14 : Dégradation de l'ADN *Cmm1125* [2,5pg/ μ L] par la DNase I [2U] et [1U].

Figure 15 : Détection LAMP après incubation avec la DNase I [2U] de cellules traitées selon différentes modalités (Anios Spray Quick, 95°C 10 mins, Huwa San, Désogerme microserre, H₂O)

DEFINITIONS

Sensibilité : Probabilité que le test de détection soit positif lorsque la cible est présente dans l'échantillon. La quantité minimale de bactéries dans un échantillon qu'un test de détection est capable de détecter.

Réservoir : Un substrat dans lequel des agents biologiques (e.g. micro-organismes pathogènes) peuvent persister et/ou proliférer. Les réservoirs peuvent se trouver dans l'environnement (le sol, les eaux douces ou marines, les matériaux inertes) mais également à la surface ou au sein d'un être humain, d'un animal (peau, appareil respiratoire, salive, sang, laine) ou d'une plante cultivée ou sauvage. (1)

Biocontrôle : Un ensemble de méthodes de protection de la santé des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels. Seules ou associées à d'autres moyens de protection des plantes, ces techniques sont fondées sur les interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel. Ainsi, le principe du biocontrôle repose sur la gestion des populations d'agresseurs plutôt que sur leur éradication. (2)

Prophylaxie : La prophylaxie et la mise en place de méthodes alternatives éprouvées constituent la base de la protection des cultures. L'objectif est de prévenir et de limiter le développement des populations d'organismes nuisibles ainsi que les risques pour la santé humaine et l'environnement. (3)

Epidémie : Maladie qui attaque simultanément plusieurs individus d'une même espèce.

Protection intégrée : Consiste en la prise en considération attentive de toutes les méthodes de protection des plantes disponibles et, par conséquent, l'intégration de plusieurs mesures appropriées qui découragent le développement des populations d'organismes nuisibles. La protection intégrée vise le recours aux produits phytopharmaceutiques et à d'autres types d'interventions à des niveaux justifiés, du point de vue économique et environnemental, de façon à réduire au maximum les risques pour la santé humaine et l'environnement. La protection intégrée des cultures privilégie la croissance de cultures saines en veillant à perturber le moins possible les équilibres des agro-écosystèmes et encourage les mécanismes naturels de lutte contre les ennemis des cultures. (3)

Bactéricide : Qui tue les bactéries.

Bactériostatique : Se dit de tout phénomène ou de toute substance, notamment antibiotique (tétracyclines, chloramphénicol, macrolides), capable d'inhiber la multiplication des bactéries sans les tuer. (4)

Fongicide : Qui tue les champignons pathogènes.

Exsudat : Suintement, Ecoulement.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| MATERIELS ET METHODES | 3 |
| ➤ Matériels biologiques et préparation des milieux | 3 |
| Tomates, variété Climberley | 3 |
| Souche bactérienne | 3 |
| Milieu Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) | 3 |
| Milieu Tryptone Soja Agar (TSA) 1/10 ^{ème} et Tryptone Soja (TS) semi-liquide 1/10 ^{ème} | 3 |
| Stérilisation des milieux et préparation des boites de Petri | 3 |
| Suspension bactérienne de <i>Cmm1125</i> | 3 |
| ➤ Mise au point de l'inoculation de <i>Cmm in-planta</i> en condition contrôlée | 4 |
| ➤ Stratégie intégrée de protection des cultures : combinaison de leviers | 4 |
| - Lutte contre le chancre bactérien de la tomate | 4 |
| Les produits de biocontrôle | 4 |
| Produit phytosanitaire chimique témoin | 5 |
| Efficacité <i>in-vitro</i> des produits de lutte contre <i>Cmm</i> | 5 |
| Efficacité <i>in-planta</i> des produits de protection contre <i>Cmm</i> | 5 |
| - Optimisation de la détection de <i>Cmm1125</i> sur échantillons de plantes | 6 |
| Amplification de l'ADN médiée par boucle (LAMP) | 6 |
| Prélèvement d'échantillons de plantes | 6 |
| Inoculation artificielle des échantillons pour détection de <i>Cmm</i> en LAMP | 7 |
| Regroupement d'échantillons | 7 |
| - Détection uniquement de cellules bactériennes vivantes sur surfaces inertes | 8 |
| Détection de <i>Cmm1125</i> sur surfaces inertes | 8 |
| Obtention de cellules <i>Cmm1125</i> mortes | 8 |
| Interférence de la DNase I sur la colorimétrie en LAMP | 8 |
| Digestion de l'ADN libre par la DNase I | 9 |
| Digestion de l'ADN des cellules traitées, par la DNase I | 9 |
| Vérifications de l'état des cellules de <i>Cmm1125</i> après traitement | 9 |
| RESULTATS | 10 |
| ➤ Développement du chancre bactérien de la tomate en conditions contrôlées | 10 |
| ➤ Effet <i>in-vitro</i> des produits de lutte contre <i>Cmm</i> | 10 |
| ➤ Efficacité <i>in-planta</i> des produits de biocontrôle et de lutte chimique | 11 |
| - Efficacité des produits de protection contre <i>Cmm</i> sur l'apparition des symptômes | 11 |
| - Evolution des symptômes au cours du temps | 12 |
| ➤ Distribution de <i>Cmm</i> intra plante | 13 |
| ➤ Développement du protocole de détection de <i>Cmm1125 in vitro</i> sur plusieurs échantillons et seuil de détection | 13 |
| ➤ Détection de <i>Cmm1125</i> sur surfaces inertes | 14 |
| ➤ Interférences de la DNase I avec la révélation colorimétrique des résultats LAMP | 14 |
| ➤ Dégradation de l'ADN libre de <i>Cmm1125</i> par la DNase I | 14 |
| ➤ Dégradation de l'ADN de cellules de <i>Cmm1125</i> par la DNase I | 15 |
| ➤ Etat des cellules bactériennes de <i>Cmm1125</i> traitées | 15 |
| DISCUSSION | 17 |
| CONCLUSION | 21 |

INTRODUCTION

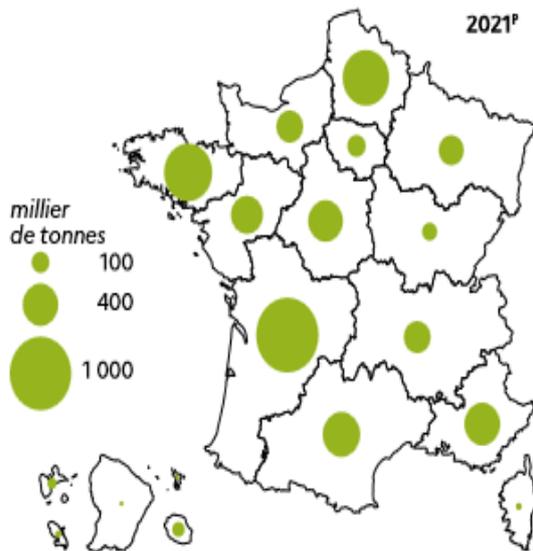
Les recherches menées à l'unité Pathologie Végétale d'INRAE (Avignon) sont basées sur des microorganismes pathogènes de plantes maraichères et fruitières, ainsi que sur leurs interactions avec les plantes hôtes, l'environnement et les pratiques agricoles. L'un des projets de recherche mené au sein de l'équipe MISTRAL a pour but d'améliorer la protection intégrée contre le chancre bactérien de la tomate.

La tomate est la deuxième espèce maraichère la plus consommée au monde et représente une des cultures les plus importantes au sein de l'Union européenne. En France, la tomate est le 1^{er} légume frais depuis plus de 20 ans avec une production qui est passé de 840 à 576 tonnes entre 2000 et 2021 (5) (Fig1). *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm ci-après) est l'un des phytopathogènes les plus dommageables en production de tomates (Davis et al., 2014). Les épidémies de chancre bactérien de la tomate peuvent conduire à une perte de rendement de 100% sans traitement ni gestion appropriée.

Cmm provoque le chancre bactérien de la tomate (Karl-Heinz et al., 2003). Les symptômes (Fig2) typiques de cette maladie correspondent en des flétrissements unilatéraux des feuilles ; des lésions nécrotiques, appelés chancres, sur les tiges ; des retards et des défauts de formation et de maturation des fruits. L'expression et l'intensité des symptômes est toutefois variable au cours du temps et dépendante des conditions de culture (de León et al., 2011). Au début de l'infection, les plantes sont souvent asymptomatiques, puis les symptômes apparaissent de façon plus caractéristique 6 à 8 semaines après contamination (Nandi et al., 2018) et conduisent à une fanaison complète, brutale et irréversible (Fig2a). Cmm peut survivre dans les débris de culture jusqu'à 2 ans (Sen et al., 2015), ainsi que sur les surfaces inertes constitutives des serres de production (bâche plastique, verre, poteaux métalliques). Ces potentiels réservoirs peuvent aboutir à l'induction de nouveaux foyers infectieux les saisons suivantes (Sen et al., 2015).

Il n'existe pas de moyens de lutte direct, efficace et durable contre Cmm. Des produits phytosanitaires à base de cuivre sont utilisés mais leur efficacité est limitée, et ceux-ci sont toxiques pour l'environnement (6). Peu de produits de biocontrôle sont homologués et utilisés en culture de tomate pour ce pathogène, et ce sans que l'efficacité protectrice ou curatrice contre Cmm ne soit réellement connue. Aucune variété résistante ou tolérante à Cmm n'est commercialisée (de León et al., 2011). La gestion de la maladie repose essentiellement sur la prophylaxie (arrachage des plants malades et contigus, isolement des rangs contaminés, désinfection des outils de taille, port de blouse et de gants) ainsi que sur la désinfection des infrastructures des serres entre deux saisons de culture (7). Or, la prophylaxie est mise en place tardivement, c'est-à-dire à partir de l'observation de symptômes caractéristiques sur plantes, ce qui ne permet pas de limiter précocement la propagation de l'épidémie (Werner et al., 2022).

Production française de légumes frais



| | 2000 | 2010 | 2020 | 2021 ¹ |
|------------------------------|--------------------------|--------------|--------------|-------------------|
| | <i>millier de tonnes</i> | | | |
| Tomate | 840 | 846 | 544 | 576 |
| Carotte ¹ | 678 | 624 | 388 | 407 |
| Maïs doux | 454 | 312 | 427 | 462 |
| Salade ¹⁻² | 509 | 442 | 315 | 295 |
| Haricot vert ³ | 464 | 331 | 337 | 371 |
| Oignon | 464 | 329 | 454 | 487 |
| Chou-fleur ¹ | 388 | 356 | 199 | 177 |
| Melon | 287 | 290 | 291 | 272 |
| Chou (n.c. chou-fleur) | 243 | 219 | 169 | 169 |
| Endive (chicon) ¹ | 245 | 209 | 171 | 171 |
| Petit pois | 245 | 209 | 246 | 271 |
| Autres légumes frais | 1 351 | 1 406 | 1 518 | 1 455 |
| Ensemble⁴ | 6 165 | 5 573 | 5 057 | 5 112 |

1. Ces chiffres concernent la campagne et non l'année civile.
 2. Chicorée, cresson, mâche, laitue et autres salades.
 3. Y compris haricot beurre.
 4. Non compris fraise, pomme de terre et racine d'endive, y compris DOM sauf pour l'année 2000.
 Champ : production des exploitations agricoles hors jardins familiaux.
 Source : Agreste - Statistique agricole annuelle

Figure 1 : Les chiffres de l'Agreste. Statistique agricole de l'année 2000 à 2021 sur la production (en millier de tonnes) française de légumes frais.

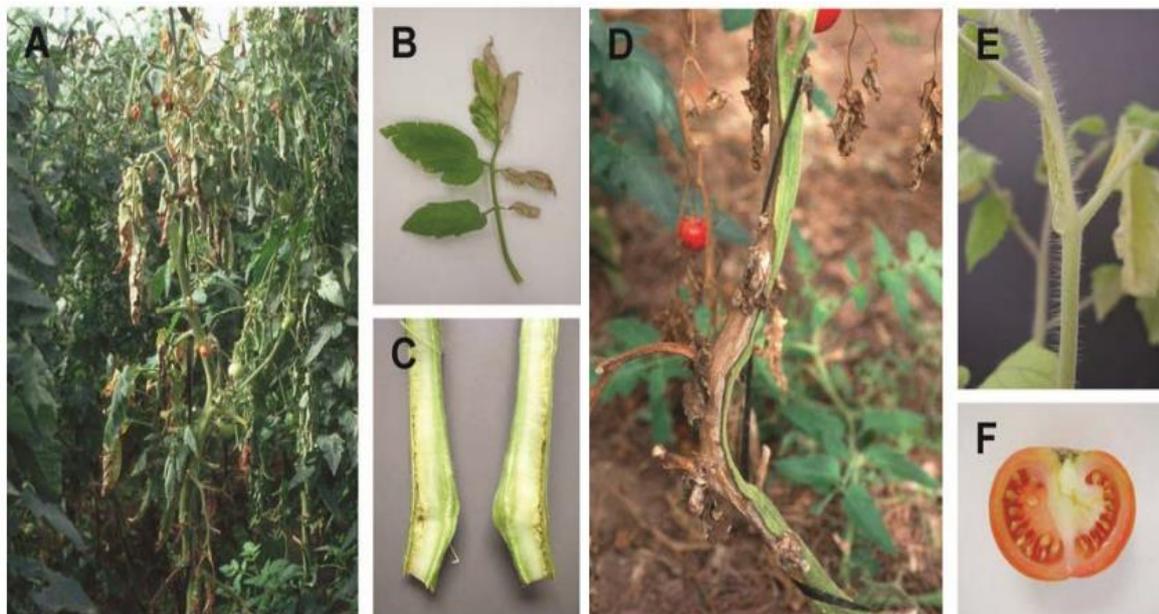


Figure 2 : Symptômes du chancre bactérien de la tomate. Flétrissement du plant de tomate (a). Flétrissement unilatéral des folioles et nécrose (b). Système vasculaire envahi par l'agent pathogène provoquant une décoloration jaune-brun (c). Chancres sur les tiges (d). Exsudat bactérien observés lorsque la tige s'ouvre au début de la formation du chancre (e). Agent pathogène atteignant le fruit et infectant les graines à travers le tissu vasculaire (f). (De Léon et al., 2011)

Il n'existe aucun moyen de vérifier l'efficacité des procédures de désinfection sur surfaces inertes. Aucune des méthodes de détection de *Cmm* actuellement recommandée par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes, ou disponible commercialement (e.g. Flashkit Agdia), n'est compatible avec une utilisation efficace sur le terrain (Sen et al., 2015). Ces problématiques ont conduit au montage du projet CLAVINNOV (7) qui vise la mise en place d'une stratégie intégrée de protection de cultures de tomates pour réduire l'usage des produits phytosanitaires, sur la base d'une combinaison de leviers tels que le biocontrôle, la détection *in situ* de *Cmm* sur différentes matrices, et la prophylaxie.

Les données acquises au cours de ce projet montrent une inhibition de la croissance de *Cmm* en conditions *in vitro* induite par plusieurs produits de biocontrôle, avec un effet variable selon le produit et la dose testée, sans avoir pu tester jusque-là l'efficacité *in planta* de ces produits. Ce projet a également permis de mettre au point deux protocoles de détection de *Cmm* (Lacroix et al., in prep) sur la base de la méthode d'amplification isotherme par boucle (Loop Mediated Isothermal Amplification de l'ADN, LAMP) (Notomi et al, 2000) au sein d'échantillons de plantes et prélevés sur surfaces inertes. La LAMP est un outil efficace qui permet une utilisation sur le terrain, et une lecture des résultats simplifiée par une révélation colorimétrique pH-dépendante. Chaque protocole de détection de *Cmm* est basé sur des échantillons de pétiole et foliole de petite taille, et ce à raison d'un test LAMP par échantillon. Or, la présence de *Cmm* est hétérogène au sein d'une plante (Sen et al., 2015), les plants peuvent largement dépasser un mètre de hauteur à maturité, et une même parcelle peut être constituée de plusieurs milliers de plantes. La détection précoce de foyers d'infection sur le terrain avant l'expression de symptômes nécessite donc une surveillance massive, ce qui implique le test d'un grand nombre d'échantillons. En outre, le test LAMP conduit à un résultat positif en présence d'ADN, libre ou de cellules vivantes ou mortes, ce qui ne permet pas de déterminer si les bactéries qui seraient détectées sur surfaces inertes sont effectivement vivantes, infectieuses et donc susceptibles de contaminer de nouvelles plantes.

Dans un but d'améliorer au long-terme la protection intégrée contre *Cmm*, les objectifs de montage sont i) de mettre au point un protocole pour inoculer *Cmm* sur plants de tomate en conditions contrôlées, et observer les symptômes et les dégâts induits, ii) de tester l'efficacité *in-vitro* et *in planta* de produits de lutte, iii) d'optimiser le protocole de détection de *Cmm* pour augmenter la capacité de traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons de plantes, iv) de tester ce protocole pour détecter la présence de *Cmm* avant l'apparition des symptômes, et pour déterminer la distribution de *Cmm in planta*, et v) de développer un protocole de détection de *Cmm* sur surfaces inertes ciblant uniquement les cellules vivantes.

MATERIELS ET METHODES

➤ Matériels biologiques et préparation des milieux

Tomates, variété Climberley

Les plants de tomates (*Solanum Lycopersicum*) utilisés sont de la variété Climberley (Syngenta) qui est sensible à l'infection par Cmm. Les graines sont semées dans du terreau (Klasman TS3 MB Recette 425, HORTIBREIZ), les plantules sont repiquées 7 jours plus tard et placées en conditions de serre (26°C, lumière naturelle) pendant une semaine, puis à 18°C-28°C nuit/jour jusqu'à utilisation.

Souche bactérienne

La souche utilisée est *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 1125 (Cmm1125 ci-après) qui a été isolée de tissus conducteurs d'un plant de tomate (variété non identifiée) et intégrée dans la collection de phyto bactéries de l'équipe MISTRAL le 10/01/1994. La souche utilisée est conservée à -20°C dans du glycérol 20%. Le genre bactérien *Clavibacter* appartient aux actinomycètes phytopathogènes à Gram positif de la famille des Microbacteriaceae.

Milieu Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA)

Le milieu YPGA est un milieu non spécifique de culture bactéries. Dans un volume d'1L d'H₂O, sont ajoutés 5g d'extrait de levure (#211750, Fisher), 5g de peptone bacto (#211677, Fisher) et 10g de (D+) Glucose (#10335850, Fisher). Le pH est ajusté à 7.2, et 15g d'agar (#214515, Fisher) sont ajoutés.

Milieu Tryptone Soja Agar (TSA) 1/10^{ème} et Tryptone Soja (TS) semi-liquide 1/10^{ème}

Le milieu TSA est un également milieu de culture non sélectif pour les bactéries. Dans un volume d'1L d'H₂O, sont ajoutés 3g de Tryptone soja et 15g d'agar. Le milieu TS est un milieu semi liquide, constitué des mêmes composant que le TSA, sans l'ajout d'agar.

Stérilisation des milieux et préparation des boites de Petri

Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 125°C, puis stockés à 56 T°C jusqu'à utilisation ou immédiatement coulé en conditions stériles dans des boites de Petri (#633180, Greiner BioOne) manuellement sous une hotte (ADS Laminaire) ou à l'aide d'un distributeur automatique (Médiaclave 10L, Integra Bioscience) à raison de 17 ml par boite. Les boites sont séchées à température ambiante dans une salle stérile puis stockées à température ambiante dans une boite en plastique stérile jusqu'à utilisation.

Suspension bactérienne de Cmm1125

Pour réaliser une gamme de suspensions bactériennes de *Cmm1125*, un repiquage est d'abord effectué à partir du tube de conservation de la souche à -20°C ou 4°C sur une à trois boites de Petri contenant du milieu YPGA. Ces boites sont incubées pendant 72h à 28°C. Ensuite, à l'aide

d'une oese, des colonies pures et isolées de taille moyenne sont prélevées et plongées dans 1mL d'eau ultra pure. Deux dilutions sériées de 10 en 10 sont réalisées, et la densité optique de la deuxième dilution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (epENDORF Biophotometer) et ajustée à $DO_{600nm}=0,14$. Des dilutions sériées de 10 en 10 sont réalisées de façon à obtenir une gamme finale de suspensions de concentration décroissante de 10^{10} à 10^2 CFU/mL.

➤ **Mise au point de l'inoculation de Cmm *in-planta* en condition contrôlées**

Les plants de tomates (*S. lycopersicum* var. Climberley) ont été placés en chambre climatique (14/10 heures de jour/nuit). L'effet de différents facteurs ont été étudiés sur l'expression et l'intensité des symptômes induits par Cmm. Ces facteurs correspondent à l'âge des plants (2, 3, 4 et 5 semaines), et la concentration de la suspension bactérienne utilisée pour l'inoculation (0, 1.10^7 , et 1.10^8 CFU/mL). La température est de 26°C jour et 22°C nuit avec une humidité relative de 70%. Les plants inoculés avec une solution de concentration nulle en bactéries correspondent aux témoins négatifs. De plus, trois méthodes d'inoculation ont été testées correspondant au i) dépôt d'une goutte de 10µL de suspension ou solution sur un pétiole de feuille préalablement blessé avec cinq incisions faites avec une aiguille de seringue ou ii) sur le bout de deux pétioles coupés respectivement à une distance de 0,5cm et de 3cm de la tige, et iii) l'insertion d'un morceau de cure-dent préalablement imbibé de la suspension bactérienne dans la tige. Ainsi, 5 stades de plantes, 3 concentrations de bactéries et 3 méthodes d'inoculation ont été testés. Pour les plantes inoculées et témoins, 4 et 2 répliques ont été inoculés par modalité, pour un total de 120 plantes et de 30 plantes, respectivement. Les plantes n'ont pas été arrosées 24 heures avant les inoculations pour favoriser l'absorption de l'inoculum. Les plantes sont été maintenues en chambre climatique pendant 15 jours et arrosées régulièrement avec une solution nutritive composée d'azote (50mg/L), de phosphate (20mg/L), de potassium (90mg/L) et de magnésium (20mg/L).

➤ **Stratégie intégrée de protection des cultures : combinaison de leviers**

- **Lutte contre le chancre bactérien de la tomate**

Les produits de biocontrôle

Rhapsody® (Bayer) est un produit de biocontrôle contenant 14,1 g/l (à raison de 10^9 CFU/g de produit) de la souche QST 713 de l'espèce de bactérie *Bacillus subtilis* (9), ainsi que des composés antimicrobiens comme des lipopeptides (Chen et al., 2008) extraits de suspensions en fermentation de bactéries de cette même souche. Ce produit est homologué depuis 2018 pour

le traitement des parties aériennes des tomates contre les bactérioses (7). Les mécanismes d'action décrits pour ce produit sont une inhibition directe du métabolisme bactérien *via* la présence et la sécrétion de molécules (macrolactines, difficidines) à action bactéricide, et la stimulation des réactions de défenses des plantes (10).

Taegro® (Syngenta) contient 130 g/kg (10^{10} CFU/g de produit) de la souche FZB24 de l'espèce de bactérie *Bacillus amyloliquefaciens*. Il est homologué depuis 2019 pour le traitement des parties aériennes des tomates contre les bactérioses (11), et est conseillé pour le traitement contre Cmm sans plus de détails sur le niveau d'efficacité. Ce produit agit *via* la synthèse de substances à action biocide, la compétition à la surface des organes des plantes empêchant physiquement l'installation de maladies, et l'induction des défenses naturelles de la plante. (11)

Produit phytosanitaire chimique témoin

La Bouillie Bordelaise (RSR Disperss) contient des composés cupriques qui ont des effets fongicides et bactériostatiques. Il est homologué depuis 2002 pour le traitement des parties aériennes des tomates contre les bactérioses. Ce produit agit par contact avec la surface des tissus des plantes et avec le pathogène. La Bouillie Bordelaise est utilisée ici en tant que produit chimique témoin en regard duquel sera comparé l'efficacité des produits de biocontrôle. (12)

Efficacité *in-vitro* des produits de lutte contre Cmm

Pour évaluer l'efficacité *in-vitro* des produits contre *Cmm1125*, la taille de la zone d'inhibition de *Cmm1125* induite par le produit est mesurée au cours du temps. Dans une boîte de Pétri préalablement remplie avec 17mL de TSA 1/10^{ème}, 3mL de TSA 1/10^{ème} semi-liquide contenant 10^8 CFU/mL de bactéries sont ajoutés à la surface. Deux puits par boîtes de Pétri, de diamètre et de profondeur 0,5cm, sont réalisés à l'intérieur de la gélose avec l'arrière d'une pointe de pipette de 200µL. A l'intérieur des puits, 50µL d'un des produits de lutte contre *Cmm1125* sont ajoutés. La concentration des produits utilisés est de 14,1g/L pour le Rhapsody ; 3,7g/L et 1.8g/L pour Taegro® ; et 20g/L et 10g/L pour la Bouillie Bordelaise. Cette expérimentation a été réalisée 2 fois, à raison de six répliques par modalité pour la première expérience et quatre répliques pour la seconde. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant une semaine et l'épaisseur de la zone d'inhibition (mm) entre la zone de dépôt du produit sur le milieu gélosé, et la croissance bactérienne sur la même boîte est mesurée à un, deux, trois et sept jours après le début de l'expérimentation. L'aire sous la courbe est obtenue par la méthode de calculs des trapèzes et un test statistique non paramétrique de Wilcoxon est réalisé sur le logiciel R (13).

Efficacité *in-planta* des produits de protection contre Cmm

Pour évaluer l'efficacité *in-planta* des produits contre *Cmm1125*, l'apparition et l'évolution des symptômes du chancre bactérien de la tomate sont observées et quantifiées. Les produits sont

| Nom des amorces | Séquence ADN (5'-3') | Volume (μL) C = 100μM |
|-----------------|--|--------------------------|
| micALAMP2-F3 | CGACAACAGGAACACAGGT | 2 |
| micALAMP2-B3 | GCCACATTCGATGGTGAGC | 2 |
| micALAMP2-FIP | GAGCAGCATGTCCCACCGGGACACGATGAACGACATCCTC | 16 |
| micALAMP2-BIP | CGTCCGTCCAGACCCAGATCGCTGGACATGTACGGGGTCA | 16 |
| micALAMP2-LoopF | TGACCATGACGGGGGTCT | 8 |

Tableau 1: Caractéristiques des amorces utilisées pour les tests LAMP. Pour réaliser un mix d'amorces 10X, un aliquot de chaque amorce aux concentrations et volumes initiaux indiqués sont mélangés, auxquels sont ajoutés de l'eau ultra pure en quantité suffisante pour atteindre un volume final de 100μl.

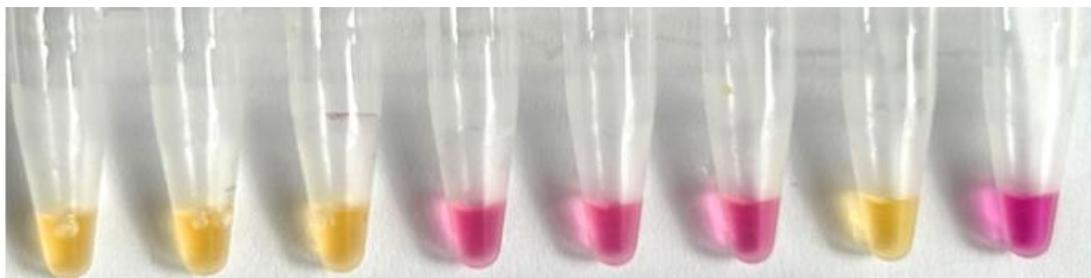


Figure 3 : Révélation colorimétrique pH-dépendante de l'amplification de l'ADN. Photo d'une barrette après incubation à 65°C pendant 30 minutes. La couleur jaune résulte d'une amplification de l'ADN présent dans les tubes, la couleur rose résulte de l'absence d'ADN présent dans les tubes.

appliqués à raison de 2 ml par pulvérisation sur plante en prévention deux jours avant l'inoculation de la bactérie de concentration 10^8 CFU/mL par la méthode des incisions avec une aiguille et dépôt de 10 μ L, ou le jour même de l'inoculation. Les produits de concentration 14,1g/L pour Rhapsody®; 3,7 et 1.8g/L pour Taegro® ; et 20g/L et 10g/L pour la Bouillie Bordelaise sont pulvérisés sur les parties aériennes à raison de 2mL par plante. Cette expérience a été réalisée une fois, avec quatre répliques par modalité . Les plantes sont ensuite incubées en chambre climatique (14 heures de jour, 28/23°C jour/nuit, et 70% d'humidité). L'apparition et l'évolution des symptômes du chancre bactérien de la tomate (flétrissements unilatéraux et/ou nécrose des tiges, Annexe 1) sont mesurés au cours du temps.

- Optimisation de la détection de *Cmm1125* sur échantillons de plantes

Amplification de l'ADN médiée par boucle (LAMP)

L'amplification isotherme de type LAMP est une méthode d'amplification de l'ADN à température constante (Notomi et al., 2015). Les amorces LAMP (Tab1) spécifiques de *Cmm* ont été développées pour amplifier une portion du *micA* (Yasuhara-Bell et al., 2013).

Pour réaliser les amplifications LAMP dans un volume final de 25 μ L, sont ajoutés 12.5 μ L de Master Mix LAMP 2X (kit M1800 Warmstart Colorimetric Phenol Red, New England Biolabs), 2.5 μ L d'un mix d'amorces 10X (Tab1) et 8 μ L d'H₂O ultra pure (#702670, DUTSCHER). Un aliquot de 23 μ l de ce mélange réactionnel est introduit dans chaque puit de barrettes PCR (#I1402-3700, STARLAB), et 2 μ L d'échantillon y sont introduits. Ensuite, 5 μ L d'huile minérale sont ajoutés en surface pour éviter l'évaporation de ce mélange. Chaque barrette est constituée de 8 puits, dont six correspondent à des échantillons, et deux à un témoin négatif (2 μ L d'eau ultra pure) et positif (2 μ L d'ADN *Cmm* dosé à 2.5pg/ μ L). La barrette est centrifugée puis incubée dans un thermocycleur (PTC-200, MJ Research) pendant 30 minutes à 65°C. Lorsque de l'ADN libre ou des cellules bactériennes de *Cmm* sont présents dans l'échantillon et amplifiés, le milieu est acidifié ce qui aboutit à un changement de couleur. Le mélange réactionnel passe du rose (négatif) au jaune (positif) (Fig3). Pour chaque test LAMP et chaque modalité, trois répliques sont testés par échantillon.

Prélèvement d'échantillons de plantes

Le prélèvement d'échantillons de plantes sont réalisés pour étudier le seuil de détection du test de détection après le groupement des échantillons, et pour étudier la répartition *in planta* des bactéries. En serre et en chambres climatiques, les échantillons sont prélevés aléatoirement sur des plants de tomates (*S. lycopersicum* var. Climberley) sains (non inoculés au préalable avec *Cmm*) pour les études du seuil de détection des protocoles, ou ciblés sur les pétioles, les premières folioles et dernières folioles des feuilles sur des plants préalablement inoculés, à

l'aide d'un scalpel et placés dans un sachet. Sous une hotte à flux laminaire, les échantillons sont déposés dans une boîte de Petri vide à raison d'un échantillon par boîte, et découpés (1cm² de foliole, et 1cm de pétiole) avec le matériel (ciseaux et pinces) désinfecté avec de l'Aniospray Quick par immersion dans le produit pendant 5 minutes.

Inoculation artificielle des échantillons pour détection de Cmm en LAMP

Afin de réaliser les mises au point de protocole de détection, les échantillons de plantes prélevés, non inoculés au préalable et non arrosés depuis 24h, sont inoculés artificiellement avec des suspensions bactériennes de *Cmm1125*. A l'aide d'une seringue de 1mL dotée d'une aiguille, 10µL de suspension bactérienne de concentration déterminée est injectée dans le vaisseau principal de la foliole ou au centre du pétiole. Les échantillons correspondants aux témoins négatifs sont inoculés avec 10µL d'eau ultra pure. Les échantillons sont laissés 1 heure à température ambiante pour sécher. Chaque échantillon est ensuite plongé dans 1ml d'eau ultra pure (ratio 1:1), agité pendant une minute, l'eau ultra pure est prélevée puis introduite dans un autre tube et sera utilisée pour réaliser les tests LAMP.

Regroupement d'échantillons

Afin d'augmenter le nombre d'échantillons qui pourra être testé simultanément au sein d'une même expérimentation, il est nécessaire de déterminer le volume d'eau ultra pure minimal nécessaire pour incuber le plus grand le nombre d'échantillons. Pour cela, des groupes de 20, 30, 40 et 50 échantillons de folioles et de pétioles ont chacun été introduits dans un tube Falcon (Fischer Scientific), et le volume minimal d'eau ultra pure nécessaire pour que les échantillons soient immergés a été mesuré progressivement.

Pour déterminer et améliorer la sensibilité du protocole de détection de Cmm sur la base d'échantillons regroupés, une gamme de suspensions bactériennes de concentration décroissante de 10 en 10 a été réalisée (10¹⁰ à 10³ CFU/mL) selon la méthode décrite ci-avant. Les expérimentations ont été réalisées avec 20 échantillons de plantes (pétioles ou folioles) dont seulement un a été inoculé artificiellement au préalable avec l'une des suspensions bactériennes. Les échantillons (N=20) ont ensuite été incubés dans 15mL d'eau ultra pure. L'effet d'une étape de centrifugation ou de filtration a été testé dans le but de concentrer les cellules bactériennes et d'obtenir un seuil de détection le plus bas possible. Les échantillons de 15mL ont été centrifugés 15 mins à 4700g à 15°C (Rotanta 460 Hettich) ou filtrés à l'aide d'une unité de filtration (Nalgene) et un filtre de 0,22µm (#1107, Sartorius Stedium). Les filtres sont ensuite placés dans une boîte de Pétri vide pour resuspendre les bactéries concentrées sur le filtre dans 1mL d'eau ultra pure.

- **Détection uniquement de cellules bactériennes vivantes sur surfaces inertes**

Détection de *Cmm1125* sur surfaces inertes

Ce protocole permet la détection de bactéries sur surfaces inertes (e.g. métal, plastique, verre). Dans un eppendorf, un écouvillon (CLASSIQSwabs, COPAN) stérile est humidifié dans 110µl d'eau peptonée filtrée (500µL d'eau osmosée, 5g de peptone, 5g de NaCl, pH = 7,2) pendant une minute. L'écouvillon est frotté sur la surface à analyser. L'écouvillon est ensuite immergé dans 200µl d'eau peptonée filtrée, et agité pour décrocher le plus de matières prélevées. Un aliquot de 2µL de cette solution constitue l'échantillon qui sera testé en triplicata en LAMP.

Obtention de cellules *Cmm1125* mortes

L'hypothèse de travail pour ne détecter que les cellules vivantes est que la membrane et de la paroi des cellules mortes est plus perméable que celle des cellules vivantes. Cette plus grande perméabilité permet l'entrée d'enzymes dont l'action est de dégrader l'ADN, ce qui réduit toute possibilité de détection positive en LAMP (Villeréal et al., 2013). Les enzymes testées (DNase I, #EN0521 Thermofisher Scientifis ; et Benzonase Nucléase, #E1014 Sigma Aldrich) permettent également de dégrader l'ADN libre (en-dehors de toute cellule vivante ou morte). Pour obtenir des cellules mortes, des suspensions bactériennes de *Cmm1125* de concentration 10^8 CFU/ml sont préparées. Quatre méthodes sont testées pour tuer les cellules : 100µL de suspension bactérienne sont introduits soit dans 900µl d'eau ultra pure et incubés au bain-marie (95°C) pendant 10 minutes ; dans 900µL d'Aniospray Quick (ANIOS) pur et incubés pendant 45 minutes à température ambiante, ou dans 900µL d'Huwa San (WVT industries) pur ou 900µL de Désogermes Microserre (Laboratoires A.C.I) à 0,25% incubé pendant 30 minutes à température ambiante.

Interférence de la DNase I sur la colorimétrie en LAMP

Le kit colorimétrique M1800 Warmstart Colorimetric Phenol Red est sensible à divers produits qui entraînent une variation de pH et donc une interférence de la colorimétrie (Lacroix et al., in prep). L'enzyme DNase I (#EN0521 Thermofisher Scientifis, 1U/µL) est testée pour évaluer les interférences éventuelles avec la révélation colorimétrique des résultats en LAMP. Le mélange réactionnel pour la digestion enzymatique est composé un ou deux µl de buffer MgCL2 10X, et d'un ou de deux µl (=unités) de DNase I, ce qui est complété avec de l'eau ultra pure jusqu'à un volume final de 50µL. Chaque réaction est incubée 30 minutes à 37°C dans un bain sec (BIOER). Après l'incubation, un aliquot de 2µl de chaque échantillon est utilisé pour un test de détection LAMP.

Digestion de l'ADN libre par la DNase I

Après estimation de la quantité nécessaire de DNase I pour ne pas induire d'interférences avec la colorimétrie en LAMP, l'efficacité de la DNase I à cette quantité pour dégrader l'ADN libre et dans les cellules traitées (cf. ci-dessous) est testée dans nos conditions expérimentales. Dans chaque réaction de digestion par la DNase I, l'eau ultra pure est remplacée par 20µL d'ADN *Cmm1125* (6,25pg/µL), et la quantité suffisante pour atteindre le volume final de 50µL. Après incubation 30 minutes à 37°C dans un bain sec (BIOER), les réactions sont testées en détection LAMP.

Digestion de l'ADN des cellules traitées, par la DNase I

Pour digérer l'ADN des cellules traitées, 20µL de solution d'incubation des cellules mortes (bouillies, Aniospray Quick, Huwa San, Désogermes microserre) sont ajoutés au mix réactionnel de la DNase I. Les réactions sont incubées 30 minutes à 37°C dans un bain sec (BIOER) puis testées en détection LAMP.

Vérifications de l'état des cellules de *Cmm1125* après traitement

L'état (mort ou vivant) des cellules des bactéries traitées selon les différentes modalités de traitement est vérifié immédiatement après les expérimentations *via* un étalement de 100µl de chaque modalité sur chacune de 3 boîtes de Petri contenant du milieu YPGA. Ces boîtes sont incubées à 28°C pendant 72 heures à l'issue desquelles les dénombrements de colonies bactériennes sont effectués. De plus, le matériel restant (700µl) pour chaque condition a été filtré à travers un filtre (#1107, Sartorius Stedium) de 0,22µm pour récupérer les cellules bactériennes, et éliminer les résidus de produits désinfection. Le filtre est récupéré puis incubé dans 3ml d'un milieu nutritif liquide YPG à 28°C sous agitation pendant un mois. Pour les témoins positifs, un aliquot de 300µl de chacune de trois suspensions bactériennes (10^3 , 10^2 , et 10^1 CFU/mL) sont incubées dans 3ml dans le milieu YPG et dans les mêmes conditions. Le témoin négatif est constitué de du milieu YPG seul. A 8, 14, 21 et 28 jours après préparation et inoculation des milieux, 100µL est prélevé et étalé en triplicatas sur une boîte de Pétri contenant le milieu nutritif solide YPGA. Les boîtes sont incubées pendant 72 heures à 28°C. Le milieu nutritif liquide (YPG) est renouvelé à 15 jours pour les cellules vivantes.

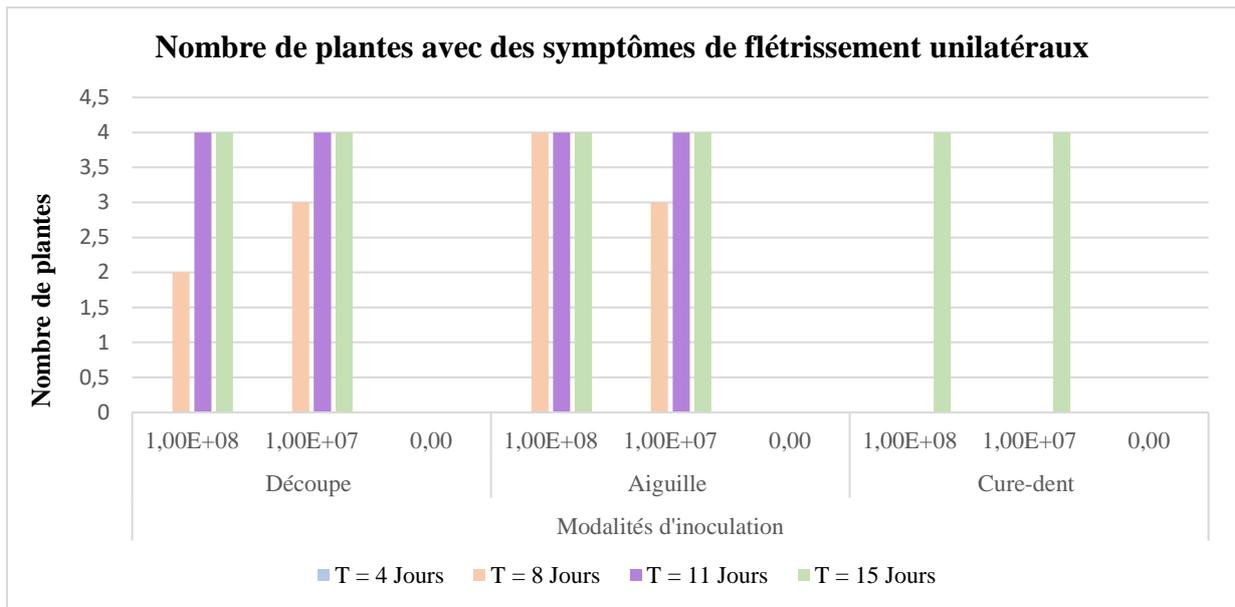


Figure 4 : Effet de la concentration de la suspension inoculée (10^8 et 10^7 CFU/ml) et de la méthode d'inoculation sur le nombre de plantes présentant des symptômes de flétrissements unilatéraux, caractéristiques d'une infection par *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* au cours du temps. Les plants inoculés avec une solution constituée d'eau ultra pure, sans bactéries, correspondent aux témoins. Un total de 4 plantes, âgées de deux semaines, a été inoculée pour chaque modalité. L'apparition des symptômes du chancre bactérien est mesurée et quantifiée 4, 8, 11 et 15 jours après les inoculations.

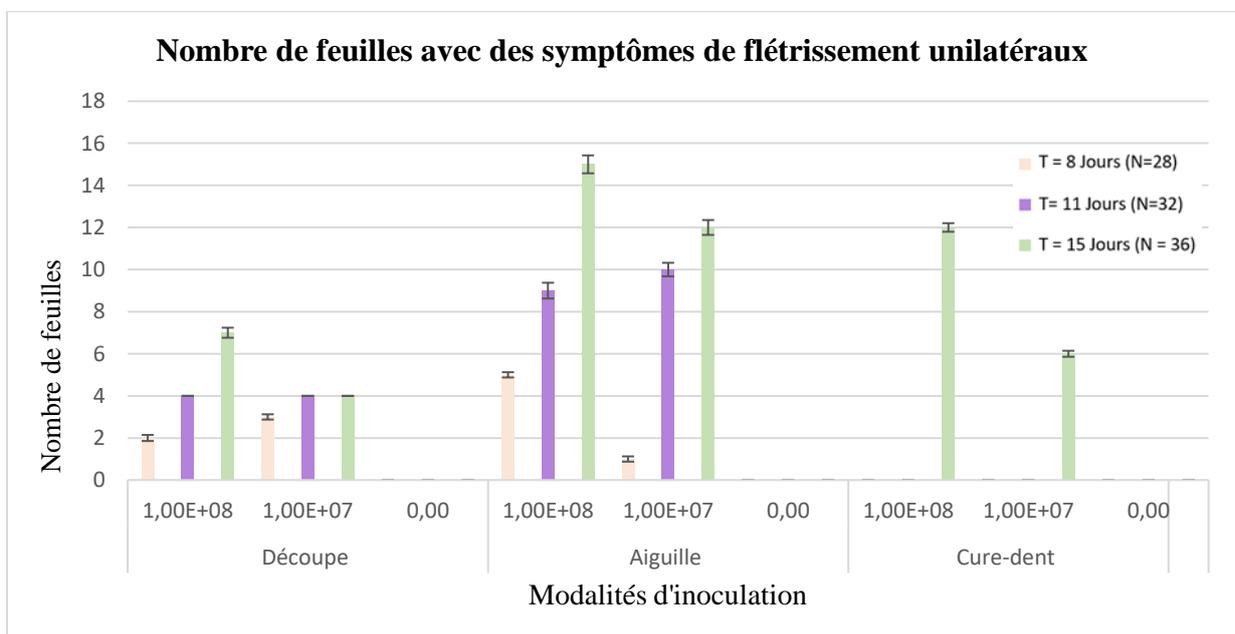


Figure 5 : Effet de la concentration de la suspension bactérienne inoculée (10^8 et 10^7 CFU/ml) et de la méthode d'inoculation sur le nombre de feuilles par modalité présentant des symptômes de flétrissements unilatéraux, caractéristiques d'une infection par *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* au cours du temps. Les plants inoculés avec une solution constituée d'eau ultra pure, sans bactéries, correspondent aux témoins. Un total de 4 plantes, âgées de deux semaines, a été inoculée pour chaque modalité. L'apparition des symptômes du chancre bactérien est mesurée et quantifiée 4, 8, 11 et 15 jours après les inoculations.

RESULTATS

➤ **Développement du chancre bactérien de la tomate en conditions contrôlées**

Cette expérimentation avait pour objectif de déterminer l'effet ; de l'âge de la plante, de la méthode d'inoculation et de la concentration de la suspension bactérienne inoculée ; sur l'apparition et le développement de symptômes de la maladie du chancre bactérien de la tomate.

Quinze jours après l'inoculation, la totalité (N=24) des plantes âgées de 2 semaines lors de l'inoculation présentent de symptômes caractéristiques du chancre bactérien de la tomate, des flétrissements unilatéraux quelle que soit la concentration de la suspension bactérienne (10^8 et 10^7 CFU/ml) et la méthode d'inoculation (Fig4). Aucun symptôme n'est visible quatre jours après l'inoculation. Ceux-ci apparaissent à partir de huit jours et touchent la totalité des plantes au bout de onze jours, lorsque l'inoculation est réalisée par la méthode de la découpe de pétioles ou d'incisions sur le pétiole avec une aiguille.

Parmi les plantes inoculées à l'âge de trois semaines (N= 24), trois plantes ont présenté des symptômes de flétrissement unilatéraux. Celles-ci ont été inoculées avec une suspension de concentration 10^8 CFU/mL par la méthode de la découpe du pétiole (N=1) par la méthode des incisions avec une aiguille (N=2). Aucune plante âgée de quatre (N=24) et cinq (N=24) semaines ne présente de symptômes du chancre bactérien. Aucune plante inoculée avec de l'eau ultra-pure (témoins sans bactéries) n'a montré de symptômes.

Le nombre de feuilles avec des symptômes de flétrissement unilatéral augmente au cours du temps pour les plantes âgées de 2 semaines, et ce pour l'ensemble des modalités d'inoculation. L'augmentation du nombre de feuilles symptomatiques par plante entre le huitième (N=5 feuilles) et le quinzième (N=15 feuilles) jour après inoculation est la plus marquée pour les plantes inoculées avec une suspension de concentration bactérienne de 10^8 CFU/mL par la méthode des incisions (Fig5).

La température et l'humidité relative moyenne relevées à l'entrée de la chambre climatique, où étaient positionnées les plantes âgées de deux semaines, étaient de 28°C et 70%, contre 26°C et 70%, au fond de la chambre où se trouvaient les plantes plus âgées.

➤ **Effet *in-vitro* des produits de lutte contre Cmm**

L'effet de trois produits phytosanitaires de protection sur l'agent du chancre bactérien a été analysée au laboratoire en conditions *in-vitro* (Fig6) en mesurant la taille de la zone d'inhibition

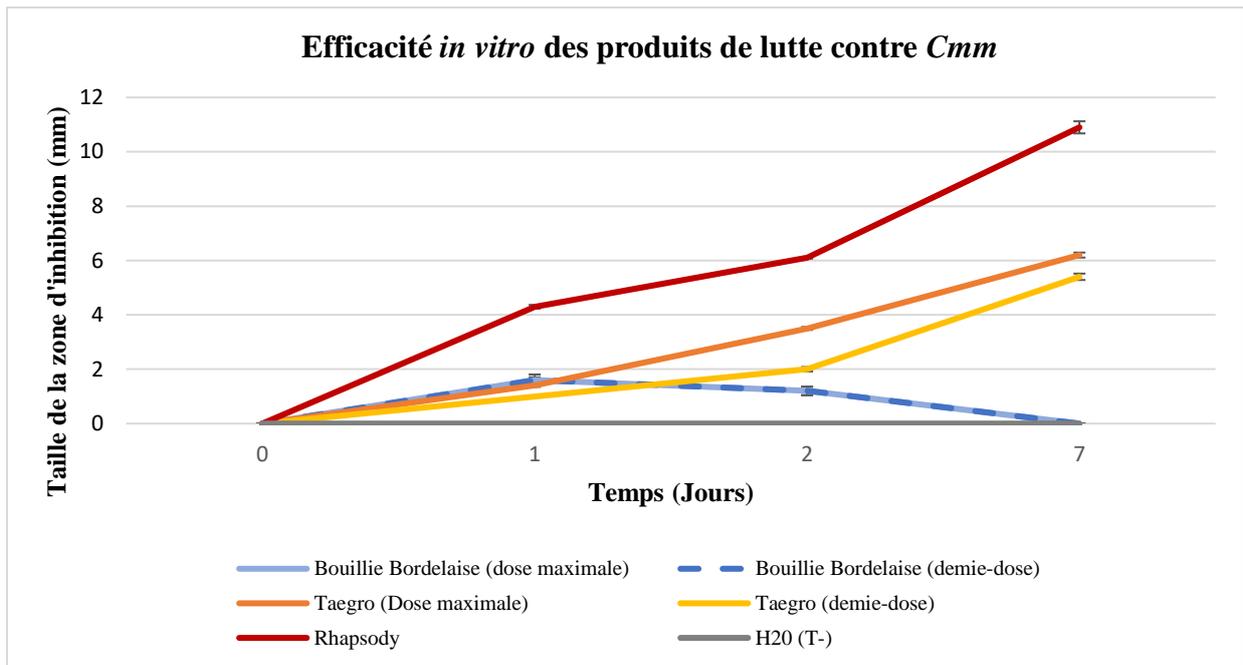


Figure 6 : Effets des produits de lutte contre Cmm en conditions *in vitro* au cours du temps. L'épaisseur de la zone d'inhibition est mesurée au cours du temps (1, 2 et 7 jours) pour un produit phytosanitaire chimique, la Bouillie Bordelaise (20g/L et 10g/L), et deux produits de biocontrôle, Taegro® (3,7g/L et 1,8g/L) et Rhapsody® (14,1g/L). Chaque point de mesure correspond à la moyenne de 10 répliques sur deux expériences, et les barres d'erreurs illustrent l'erreur-standard de chaque moyenne.

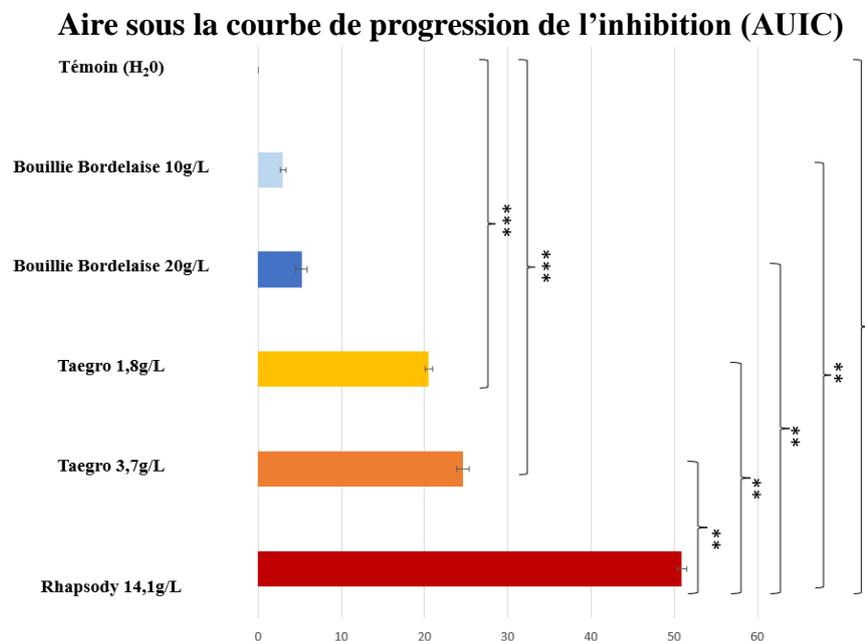


Figure 7 : Rapidité et effets des produits de lutte contre Cmm en condition *in vitro*. L'aire moyenne sous la courbe (AUC) est obtenue à partir des 10 répétitions par modalité de mesures de la taille d'inhibition au cours du temps par la méthode des trapèzes. Les barres d'erreurs illustrent l'erreur-standard de chaque moyenne. Les différences d'efficacité des produits (Bouillie Bordelaise (20g/L et 10g/L), Taegro® (3,7g/L et 1,8g/L) et Rhapsody® (14,1g/L) sont évaluées par un test statistique non paramétrique de Wilcoxon sur le logiciel R (R Core Team 2021).

de Cmm (Annexe 2) ; la bouillie bordelaise à dose maximale autorisée (20g/L) et demi-dose (10g/L), Taegro® également à dose maximale autorisée (3,7g/L) et demi-dose (1,8g/L), et Rhapsody® (14,1g/L) ont été testés.

L'ensemble des produits testés induisent une inhibition de la multiplication de *Cmm1125* 24h et 48h après le début de l'expérimentation. Rhapsody® induit la plus forte inhibition de croissance de Cmm à toutes les dates d'observations (taille de la zone d'inhibition de 4,3mm, 6,1mm, et 10,9mm en moyenne, respectivement à un, deux et sept jours après le début de l'expérience).

La taille de la zone d'inhibition induite par Taegro® est plus faible que celle observée pour Rhapsody® et atteint 1mm, 2mm, et 5,4 mm à demi-dose ; et 1,4mm, 3,5mm, et 6,2 mm à dose maximale ; en moyenne à un, deux et sept jours, respectivement.

La taille de la zone d'inhibition induite par la Bouillie Bordelaise à dose maximale et à demi-dose est de 1,6mm un jour après le début de l'expérimentation, et décroît ensuite pour atteindre 1,2mm à deux jours et un effet nul à sept jours.

Pour chaque produit, la moyenne des aires sous la courbe de progression de l'inhibition (AUC) calculée sur la base de 10 répétitions par modalité atteint 10, 11.8, 21, et 28 pour la Bouillie Bordelaise à 10g/L et 20g/L, Taegro ® à 1,8g/L et 3,7g/L, respectivement (Fig7).

La valeur moyenne d'AUC est la plus forte (47,5) pour Rhapsody® (14,1g/L). Les valeurs des aires sous la courbe de progression de l'inhibition ne sont pas statistiquement différentes (Annexe 3) pour les deux concentrations de Bouillie Bordelaise étudiées entre elles (*Wilcoxon*, *p-value* = 1), et entre ces deux modalités et le témoin (*Wilcoxon*, *p-value* = 0,504).

Les valeurs d'AUC sont statistiquement différentes entre le témoin et les produits de biocontrôle, pour Taegro ® 3,7g/L (*Wilcoxon*, *p-value* <0.001), Taegro ® 1,8g/L (*Wilcoxon*, *p-value* <0.001), et le Rhapsody 14,1g/L (*Wilcoxon*, *p-value* <0.001). Les valeurs d'AUC ne sont statistiquement différentes entre les deux concentrations de Taegro testées (*Wilcoxon*, *p-value* = 0.927).

➤ **Efficacité *in-planta* des produits de biocontrôle et de lutte chimique**

- Efficacité des produits de protection contre Cmm sur l'apparition des symptômes
Les plants de tomate (var. Climberley) âgées de 2 semaines ont été inoculées avec la méthode des incisions avec une aiguille avec une suspension bactérienne de *Cmm1125* ajustée à 10^8

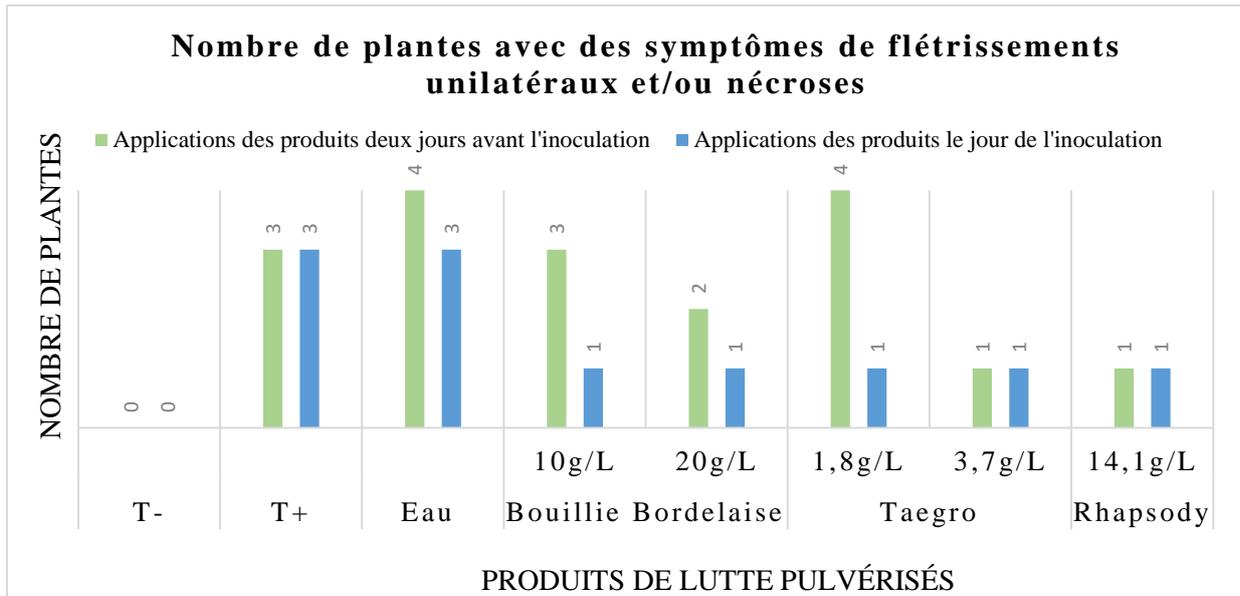


Figure 8 : Efficacité des produits de lutte *in planta* contre l'apparition des symptômes du chancre bactérien de la tomate. Les plants de tomate (var. Climberley) ont été maintenus en chambre climatique à 14h de jour, 28/23°C jour/nuit et 70% d'humidité. Les plantes ont été inoculées avec 10µL d'une suspension bactérienne ajustée à 10⁸ CFU/mL, ou 10µL d'eau ultra pure pour les témoins positifs et négatifs. La modalité eau correspond à des témoins positifs sur lesquels a été pulvérisé de l'eau ultra pure. L'eau ultra-pure et les produits de lutte contre *Cmm* ont été appliqués 2 jours avant l'inoculation ou le jour même, sur deux lots de plantes différents. En tout, quatre plantes ont été inoculées par modalité. Les symptômes de flétrissements unilatéraux et de nécrose sont observés 7 jours après l'inoculation.

Taille des nécroses au cours du temps

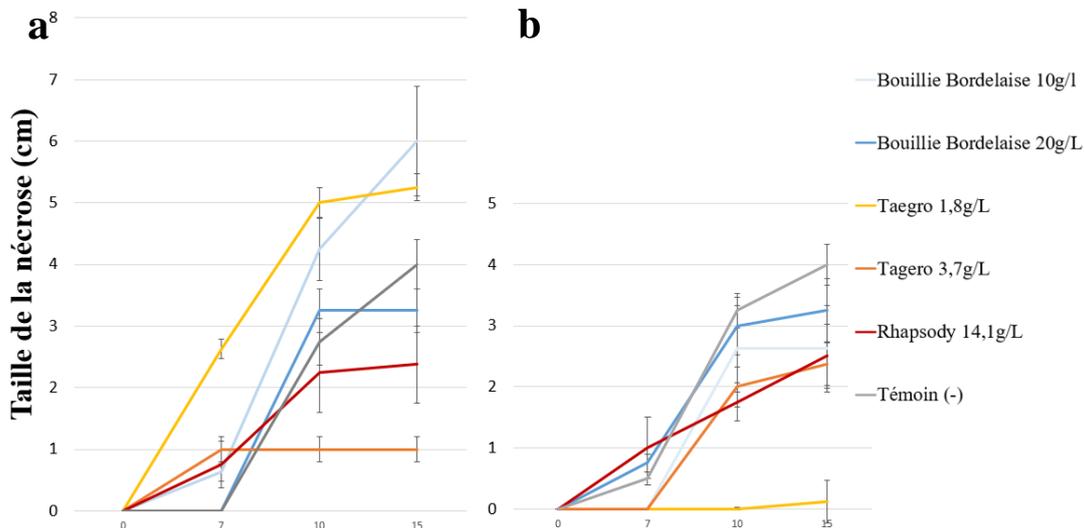


Figure 9 : Evolution des symptômes de nécrose. Les plants de tomate (var. Climberley) ont été incubés en chambre climatique à 14h de jour, 28/23°C jour/nuit et 70% d'humidité. Les plantes ont été inoculées avec 10µL d'une suspension bactérienne ajustée à 10⁸ CFU/mL, ou 10µL d'eau ultra pure pour les témoins négatifs. Les produits de lutte contre *Cmm* ont été appliqués 2 jours avant l'inoculation (a) ou le jour même (b), sur deux lots de plantes différents. En tout, quatre plantes ont été inoculées par modalité. La taille des nécroses, en cm, est mesurée au cours du temps, 7, 10 et 15 jours après l'inoculation.

CFU/ml, et placées dans une chambre climatique à 28/23 °C jour/nuit et 70% d'humidité relative. Les produits de lutte biologique à base de cuivre ou de biocontrôle ont été appliqués soit deux jours avant l'inoculation, soit le jour même sur deux lots différents. A J-2 et J0, de l'eau ultra pure a également été pulvérisée sur quatre plantes (témoins eau) (Fig8).

Lorsque les produits de lutte ont été appliqués deux jours avant l'inoculation, le nombre total de plantes avec des symptômes de flétrissements unilatéraux et/ou de nécroses est légèrement inférieur pour la Bouillie Bordelaise 20g/L (2/4), pour Taegro® 3,7g/L et pour Rhapsody® 14,1g/L (1/4, respectivement) ; contre 3 et 4 plantes sur 4 respectivement pour les témoins positifs (inoculation de Cmm, aucune pulvérisation) et eau (inoculation de Cmm, pulvérisation d'eau) (Fig8). Le nombre de plantes symptomatiques (3/4) pour la modalité Bouillie Bordelaise 10g/L et témoins positifs est identique. La totalité des plantes (4/4) traitées en préventif à J-2 avec le Taegro 1,8g/L ont exprimé des symptômes.

Lorsque les produits sont appliqués le même jour que l'inoculation de la suspension bactérienne, une seule plante par modalité a présentée des symptômes. Les plantes traitées par la Bouillie Bordelaise 10g/L, 20g/L ou la demi-dose du Taegro® montrent une réduction de l'apparition de symptômes. Les plantes traitées par la dose maximale de Taegro® et le Rhapsody® ont le même nombre de plantes atteinte par la chancre bactérien (N=1) que les produits soient appliqués en préventif ou le jour de l'inoculation.

- Evolution des symptômes au cours du temps

L'évolution de l'intensité des symptômes peut être étudiée sur la base de la mesure de la taille des nécroses présentes sur les plantes (Fig9) et du nombre de feuilles avec des symptômes de flétrissements unilatéraux (Fig10) au cours du temps.

Lorsque les produits sont appliqués en préventif (Fig9a), la taille des nécroses pour le Taegro 1,8g/L et la Bouillie Bordelaise 10g/L dépasse la taille des témoins positifs. L'efficacité du Taegro 3,7g/L contre l'évolution de la taille des nécroses (1cm du 7^{ème} jour au 15^{ème} jour) est la plus grande . Les plantes traitées par le Rhapsody présentent une évolution des tailles des nécroses inférieures à celles des témoins positifs. L'ensemble des plantes traitées par tous les produits le jour de l'inoculation, montre une évolution de la taille des nécroses inférieures à celle des plantes sans traitement (Fig9b).

Le nombre moyen de feuilles par plantes avec symptômes augmente au cours du temps entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jours lorsque la Bouillie Bordelaise (20g/L et 10g/L), Taegro® (1,8g/L) et pour Rhapsody®, respectivement de 2 à 6 feuilles, 2 à 7 feuilles, 3 à 11 feuilles et de 1 à 2 feuilles.

Nombre de plantes avec des symptômes de flétrissements unilatéraux

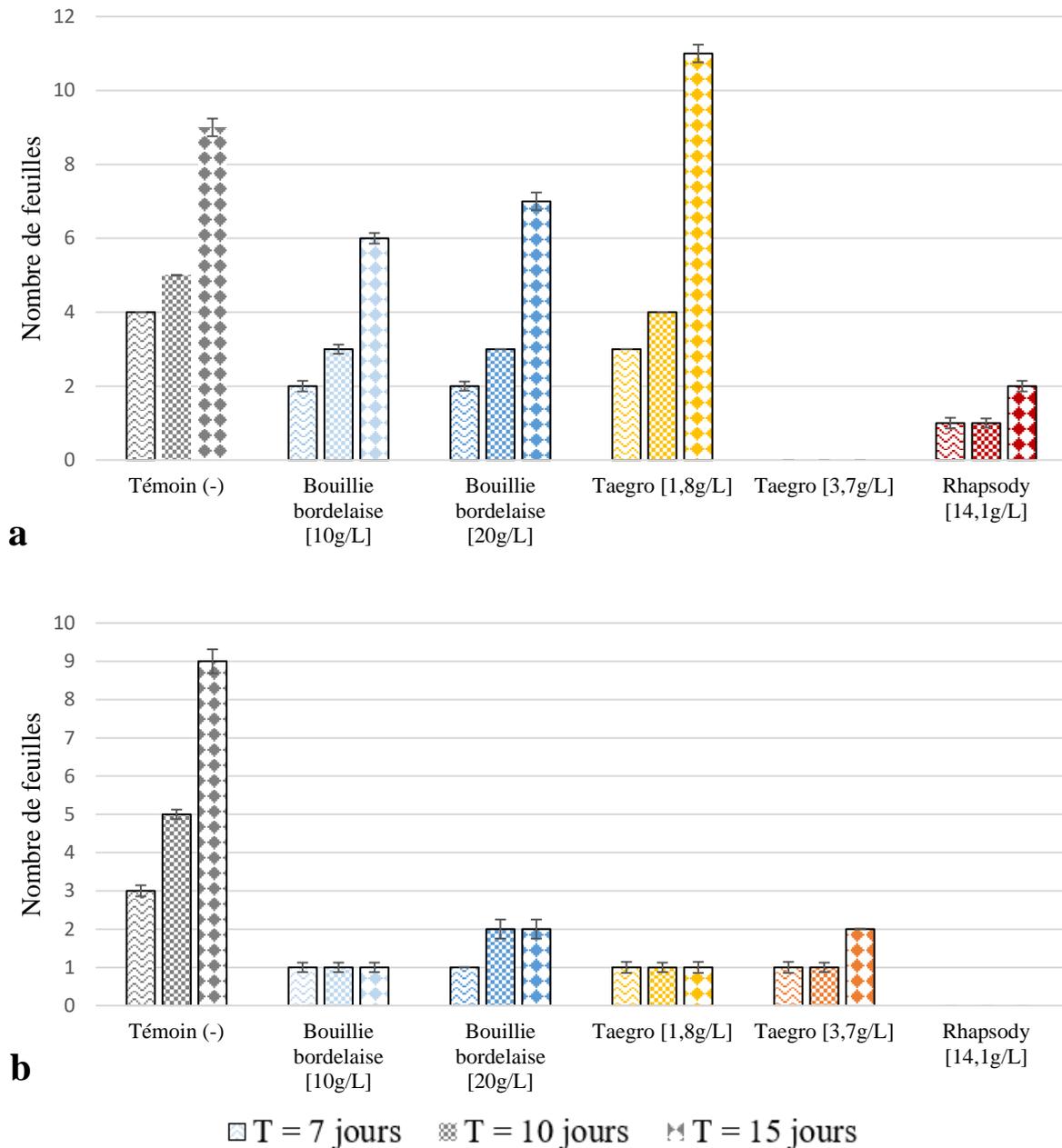


Figure 10 : Efficacité des produits de lutte *in planta* contre l'évolution des symptômes du chancre bactérien de la tomate. Les plants de tomate (var. Climberley) ont été incubés en chambre climatique à 14h de jour, 28/23°C jour/nuit et 70% d'humidité. Les plantes ont été inoculées avec 10 μ L d'une suspension bactérienne ajustée à 10⁸ CFU/mL, ou 10 μ L d'eau ultra pure pour les témoins. Les produits de lutte contre *Cmm* ont été appliqués 2 jours avant l'inoculation (a) ou le jour même (b), sur deux lots de plantes différents. En tout, quatre plantes ont été inoculées par modalité. Le nombre de feuilles présentant des flétrissements unilatéraux est quantifié au cours du temps, 7, 10 et 15 jours après l'inoculation. La taille des histogrammes représente le nombre moyen de feuilles par plante, et les barres d'erreurs illustrent l'erreur-standard de chaque moyenne

Les plantes traitées par Taegro® (3,7g/L) en préventif ne présentent aucun symptôme de flétrissements unilatéraux (Fig10a).

Lorsque les produits sont appliqués le jour de l'inoculation (Fig10b). L'évolution des symptômes entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jours est réduite pour toutes les modalités. Les plantes traitées par la Bouillie Bordelaise 10g/L et Taegro® 1,8g/L ne montrent aucune évolution au cours du temps, une seule feuille présente des symptômes jusqu'au 15^{ème} jour. Celles traitées par la Bouillie Bordelaise 20g/L et Taegro® 3,7g/L présentent seulement deux feuilles atteintes de flétrissements unilatéraux et Rhapsody® permet d'inhiber complètement l'apparition de ces symptômes.

➤ **Distribution de Cmm intra plante**

Les différents prélèvements réalisés sur les plantes inoculées ou non avant et après l'apparition des symptômes permettent de suivre la distribution et la migration de *Cmm1125* au sein des plantes (Tab2).

Trois jours après l'inoculation (Tab2a), aucun symptôme n'est visible sur les plantes inoculées et les bactéries inoculées sont détectées. Huit jours après l'inoculation (Tab2b), les premiers symptômes (Flétrissements unilatéraux et/ou nécroses) ont été exprimés sur les plantes inoculées. Les résultats de détection montrent une migration de la bactérie du point d'inoculation vers la tige puis vers les feuilles plus jeunes, selon une distribution hétérogène.

En effet, Cmm a été détectée au sein de la tige pour les trois plantes, puis au niveau de différents pétioles et folioles de différentes feuilles. Pour la plante n°1, un résultat positif en LAMP est obtenu seulement au niveau du pétiole de la cinquième feuille. Pour la plante n°2, Cmm est détectée dans la dernière foliole de la troisième feuille. Enfin, pour la plante n°3, Cmm est présente dans le pétiole et la dernière foliole de la quatrième feuille, et dans la première et la dernière foliole de la troisième feuille. Pour toutes les plantes, la bactérie n'est pas détectée dans les racines.

➤ **Développement du protocole de détection de *Cmm1125* in vitro sur plusieurs échantillons et seuil de détection**

Une première expérience a montré que le volume minimal d'eau ultra-pure nécessaire pour immerger ensemble 30 pétioles ou 25 folioles est de 20mL, et de 30 et 40mL pour 50 pétioles ou 50 folioles. Le volume optimal pour immerger 20 échantillons (pétioles et folioles mélangés) est de 15mL.

Les tests de détection réalisés sur la base de 20 échantillons (pétioles et folioles) immergés dans

| | Feuille n°3 | | | Feuille n°4 | | | Tige | Racine |
|----------------------------------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|------|--------|
| | P | F n°1 | F n°5 | P | F n°1 | F n°5 | | |
| 1 C=10 ⁸ CFU/mL | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 C=10 ⁸ CFU/mL | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 C=0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 C=0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - |

a

| | Feuille n°3 | | | Feuille n°4 | | | Feuille n°5 | | | Tige | Racine |
|----------------------------------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|------|--------|
| | P | F n°1 | F n°5 | P | F n°1 | F n°6 | P | F n°1 | F n°4 | | |
| 1 C=10 ⁸ CFU/mL | + | - | - | | | - | + | - | | + | - |
| | + | - | - | | | - | + | - | | + | - |
| | + | - | - | | | - | + | - | | + | - |
| 2 C=10 ⁸ CFU/mL | + | | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| | + | | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| | + | | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 3 C=10 ⁸ CFU/mL | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - |
| | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - |
| 4 C=0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 C=0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

b

Tableau 2 : Représentation simple de la distribution de *Cmm1125* au sein des plantes au cours du temps. Les plantes (var. Climberley) sont inoculées avec une suspension bactérienne ajustée à 10⁸ CFU/mL (a. 1,2 ; b.1,2,3), ou une solution d'eau ultra pure (a. 3,4 ; b. 4,5). Elles sont incubées à 28°C et 70% d'humidité. La répartition intra plante de la bactérie est étudiée avant l'apparition des symptômes, trois jours après l'inoculation (a) ou après l'apparition des symptômes, huit jours après l'inoculation (b). Les échantillons sont prélevés sur plusieurs feuilles et folioles . P = pétiole ; F n°1 = première foliole ; F N°4/5/6 = dernière foliole ; Case grise = Résultats non exploitables.

15 ml d'eau ultra-pure, dont un seulement a été inoculé artificiellement avec un aliquot d'une suspension bactérienne de différentes concentrations montre que le seuil de détection se situe entre 10^5 et 10^4 CFU/mL (Tab3). L'ajout d'une étape de centrifugation ou de filtration des 15mL produit des résultats identiques (seuil de détection entre 10^5 et 10^4 CFU/mL).

➤ **Détection de Cmm1125 sur surfaces inertes**

Deux prélèvements ont été réalisés en amont de l'introduction et de l'inoculation des plantes en chambre climatique à l'aide d'un écouvillon sur les tablards de part et d'autre de la chambre. Chaque échantillon a été testé en triplicatas en LAMP (Fig11). Les résultats des témoins positif et négatif sont comme attendus. Les triplicatas des deux prélèvements sont tous associés à un résultat négatif, ce qui indique l'absence de contamination de Cmm sur les surfaces inertes testées.

➤ **Interférences de la DNase I avec la révélation colorimétrique des résultats LAMP**

L'introduction de 2µl de DNase I (quantité 5U) seule, de buffer MgCL₂ 10X seul, ou d'un mélange avec la DNase I et le buffer MgCL₂ 10 X (1 :1) dans les tests LAMP, sans aucun ADN de Cmm et sans étape d'activation de l'enzyme (37°C 30 mins), aboutit à des résultats négatifs (Fig12), révélant à ce stade une absence d'interférence des produits testés sur la colorimétrie du kit LAMP. Après l'incubation à 37°C pendant 30 minutes pour activer l'enzyme, la modalité DNase I + Buffer MgCL₂ 10X montre des interférences de la colorimétrie (faux positifs).

La quantité d'enzyme DNase I (de 5 à 1 unité.s), en mélange avec le buffer MgCL₂ 10 X, a un effet sur l'induction d'interférence avec la colorimétrie (Fig13). Lorsque 5 unités d'enzyme DNase I, activée par l'étape d'incubation à 37°C 30 mins, sont introduites dans le mélange réactionnel, les trois répétitions montrent des faux positifs, indiquant un effet reproductible de l'interférence avec la colorimétrie. Lorsque l'effet de 4 et 3 unités de DNase I est testé, une répétition sur trois montre un faux positif. En présence de 2 unités ou d'une unité de DNase I, aucune des répétitions ne montrent de faux positifs et donc d'interférence avec la colorimétrie (e,f). La quantité maximale d'enzyme DNase I pouvant être utilisée sans biaiser les interprétations des résultats LAMP est de deux unités.

➤ **Dégradation de l'ADN libre de Cmm1125 par la DNase I**

L'enzyme DNase I est utilisée pour dégrader l'ADN des cellules mortes, dont la membrane et paroi perméable permet la pénétration de l'enzyme dans les cellules bactériennes. L'efficacité de l'utilisation de la DNase I, à raison d'une ou de deux unités dans le mélange réactionnel, pour dégrader l'ADN libre de Cmm a été testée (Fig14). Les résultats de l'incubation LAMP

| Modalités \ CFU/mL | CFU/mL | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|---|-----|
| | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² | 10 | 1 | 0,1 |
| Sans étape supplémentaire | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Avec filtration | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Avec centrifugation | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | + | + | + | - | - | - | - | - |

Tableau 3 : Représentation simplifiée du seuil de détection selon les protocoles testés. Le seuil de détection des protocoles est étudié *in vitro* en utilisant une gamme de suspensions bactériennes de 10⁶ à 0,1 CFU/mL. Chaque suspension a été inoculée au sein d'un seul échantillon (foliole ou pétiole) de plantes. Pour chaque modalité, l'échantillon inoculé a été regroupé avec 19 échantillons sains et immergés dans un volume de 15 ml. Le seuil de détection a été déterminé en LAMP sur la base d'un aliquot de 2µl sans étape supplémentaire, soit avec une étape supplémentaire de centrifugation à 4700g pendant 15 minutes, ou de filtration à travers un filtre dont les pores mesurent 0,22µm. Le code couleur (rose et jaune) et le symboles - et + indiquent le résultat, négatif ou positif respectivement, pour les trois répliques de tests LAMP par échantillon.

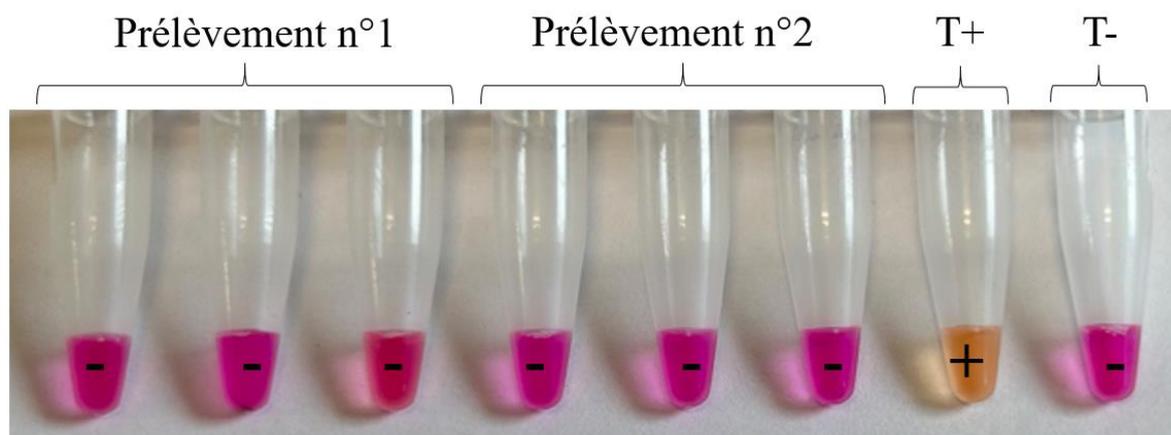


Figure 11 : Détection de *Cmm* sur les surfaces inertes de la chambre climatique en amont des inoculations de *Cmm* sur plantes. Photographie d'une barrette à l'issue de l'incubation avec le mix LAMP à 65°C pendant 30 minutes. Deux prélèvements réalisés sur les tables de chaque côté de la chambre climatique (n°1 et n°2) ont été testés, le contrôle positif contient 2µL d'ADN de *Cmm1125* [2pg/µL] et le contrôle négatif contient 2µL d'eau ultra pure.

en présence d'échantillons constitués de 2µl d'un extrait d'ADN de *Cmm* (2,5pg/µl), après l'activation de la DNase I, sont négatifs. Les quantités testées (2U et 1U) d'enzyme DNase I sont suffisantes pour dégrader 6.25 pg d'ADN *Cmm1125*.

➤ **Dégradation de l'ADN de cellules de *Cmm1125* par la DNase I**

Les cellules de *Cmm1125* ont été préalablement traitées avec un processus physique (95°C 10 mins) ou des produits de désinfection (Anios Spray Quick, San, Désogerme microserre, H2O) dans le but d'obtenir des cellules bactériennes mortes. L'effet d'une incubation avec la DNase I (2 unités) pour dégrader l'ADN de ces cellules et induire un résultat négatif après l'incubation LAMP a été testée (Fig15), et ce en comparaison des témoins positifs (cellules vivantes non traitées) et négatifs (eau).

Un premier test LAMP est réalisé, avant l'incubation avec la DNase I, sur l'ensemble des modalités. L'ADN des cellules vivantes et des cellules traitées 95°C 10 mins a été amplifié. Les résultats obtenus pour les cellules traitées avec l'Aniospray Quick et l'Huwa San montrent une interférence avec la colorimétrie (résultats rose/orange). Les cellules traitées avec le produit Désogermes Microserre ne sont pas détectées lors de cette amplification LAMP.

Un second test LAMP a été réalisé après l'incubation avec la DNase I. Un résultat de détection positif a été obtenu, comme attendu, sur la base des échantillons constitués de cellules vivantes. Les cellules traitées avec l'Aniospray Quick et le Désogermes Microserre présentent des résultats positifs et donc incohérents avec les résultats attendus (négatifs).

Les cellules traitées avec l'Huwa San induisent des résultats négatifs en détection LAMP, avant et après l'incubation avec la DNase I, ce qui ne permet pas de conclure sur l'effet de l'incubation avec cette enzyme.

➤ **Etat des cellules bactériennes de *Cmm1125* traitées**

Les cellules traitées par un processus physique (95°C 10 mins) ou par des produits de désinfection (Aniospray Quick, Huwa San et Désogermes Microserre) sont incubées dans un milieu nutritif liquide (YPG) pendant 1 mois, de façon à vérifier l'état vivant, mort, ou viable mais non cultivable.

Un tapis bactérien de plus en plus dense est observé chaque semaine après un étalement d'un aliquot des milieux liquides contenant les cellules vivantes sur les boîtes de Petri contenant le milieu solide YPGA. Les boîtes de Petri YPGA sur lesquelles ont été étalées un aliquot du milieu nutritif liquide incubé seul ne présentent aucune colonie de morphologie similaire à *Cmm*, et aucune autres colonies bactériennes ou fongiques, indiquant l'absence de

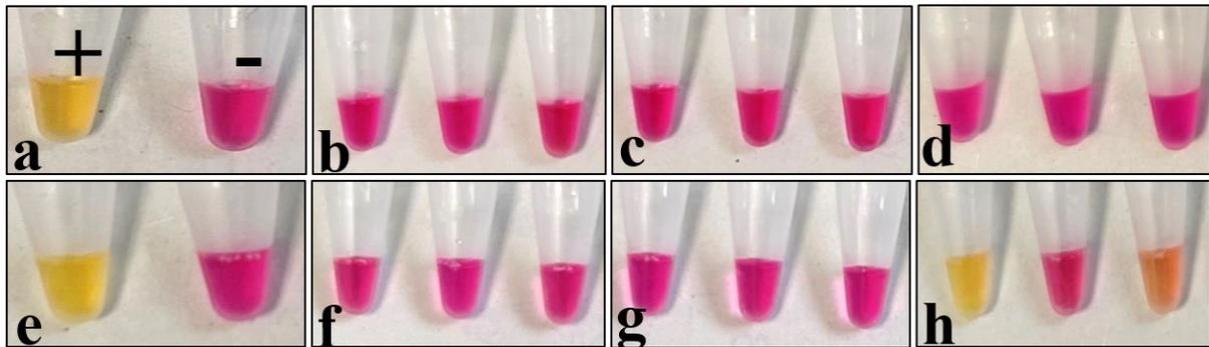


Figure 12 : Effet de la DNase I sur la révélation colorimétrique des résultats. (a,e) Témoin positif (jaune) avec 2 μ L d'ADN de *Cmm1125* [2pg/ μ L] et témoin négatif (rose) avec 2 μ L d'eau ultra pure. Le mélange réactionnel contient (b,f) la DNase I [1U/ μ L] seule ; (c,g) le Buffer MgCL2 10X seul ; et (d,h) la DNase I [1U/ μ L] + le Buffer MgCL2 10X. Résultats LAMP (a,b,c,d) sans et (e,f,g,d) avec et avec une incubation d'activation de la DNase I à 37°C pendant 30 minutes.

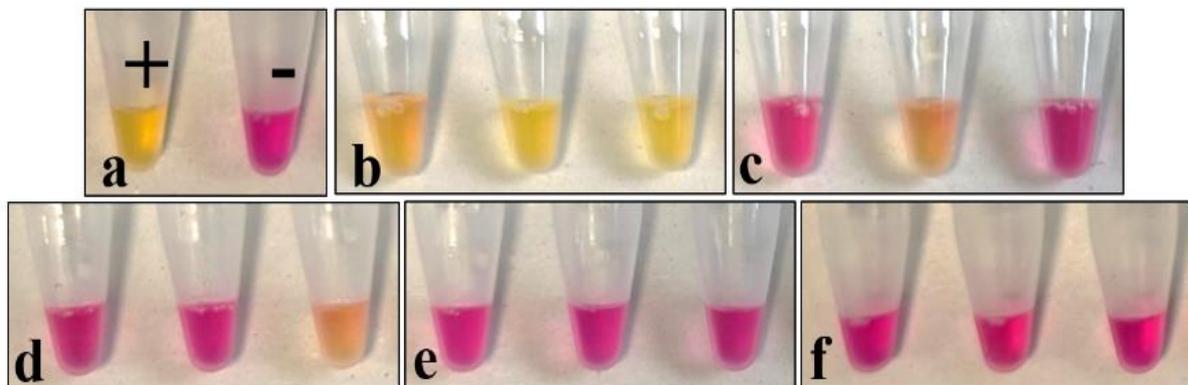


Figure 13 : Interférence de la colorimétrie pH-dépendante selon la quantité de DNase I. (a) Témoin positif (jaune) contenant 2 μ L d'ADN de *Cmm1125* [2pg/ μ L] et témoin négatif (rose) contenant 2 μ L d'eau ultra pure. (b) Mix contenant la DNase I [5U] + le Buffer MgCl2 10X (1:1). (c) Mix contenant la DNase I [4U] + le buffer MgCl2 10X (1:1). (d) Mix contenant la DNase I [3U] + le buffer MgCl2 10X (1:1). (e) Mix contenant la DNase I [2U] + le buffer MgCl2 10X (1:1). (f) Mix contenant la DNase I [1U] + le buffer MgCl2 10X (1:1).

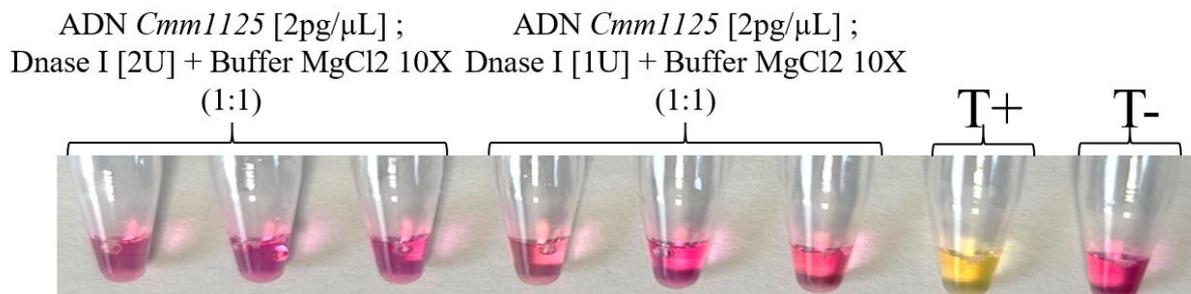


Figure 14 : Dégradation de l'ADN *Cmm1125* [2,5pg/ μ L] par la DNase I [2U] et [1U]. Le témoin positif (jaune) contient 2 μ L d'ADN de *Cmm1125* [2,5pg/ μ L] et le témoin négatif (rose) contient 2 μ L d'eau ultra pure. Les résultats de l'incubation LAMP après la dégradation de l'ADN *Cmm1125* par la DNase I, sont négatifs. Les quantités d'enzyme 2U et 1U ne font pas d'interférence avec la colorimétrie pH-dépendante et sont suffisantes pour dégrader l'ADN *Cmm1125*.

contaminations. Ces résultats sont valables tout au long des deux expériences.

Les boîtes de Petri sur lesquelles ont été étalées à J0 un aliquot des cellules traitées ne présentent aucune colonie. A J+7, les trois boîtes de Petri sur lesquelles ont été étalées un aliquot du milieu incubé avec cellules traitées 95°C 10 mins présentent un léger tapis bactérien constitué de petites colonies de couleur blanchâtre et grise. Cet aspect est atypique par rapport à la morphologie attendue des colonies de *Cmm* (jaune), ce qui induit l'hypothèse que ce phénomène soit dû à une contamination. Aucune colonie n'est visible n'est observée sur les boîtes de Petri étalées avec un aliquot du milieu nutritif liquide incubé avec les cellules traitées par les produits de désinfection. A J+14, trois colonies isolées apparaissent sur une boîte de Pétri contenant des cellules bouillies, positives en détection LAMP. Aucune colonie ne se développe à partir des cellules traitées par les produits de désinfection. A J +21, un léger tapis bactérien apparaît sur une boîte des cellules bouillies et 3 colonies apparaissent à partir des cellules traitées par l'Aniospray quick, toutes positives en détection LAMP. Aucune colonie ne se développe à partir des cellules traitées par l'Huwa San ou le Désogermes Microserre.

Au bout d'un mois, un faible tapis bactérien et un tapis dense apparaissent sur deux boîtes de cellules bouillies, et 27 colonies, positives en LAMP, apparaissent sur une boîte à partir de cellules traitées par l'Aniospray Quick. A la fin de l'expérimentation, les cellules bouillies recommencent à se multiplier, de même pour les cellules traitées à l'Aniospray Quick. Les cellules traitées par le Désogermes microserre et l'Huwa San ne présentent pas de colonies.

Ces résultats suggèrent que les cellules de *Cmm1125* traitées à 95°C 10 mins ou avec l'Aniospray Quick sont viables mais non cultivables immédiatement après traitement, et se multiplient à nouveau après incubation 1 mois dans un milieu nutritif liquide.

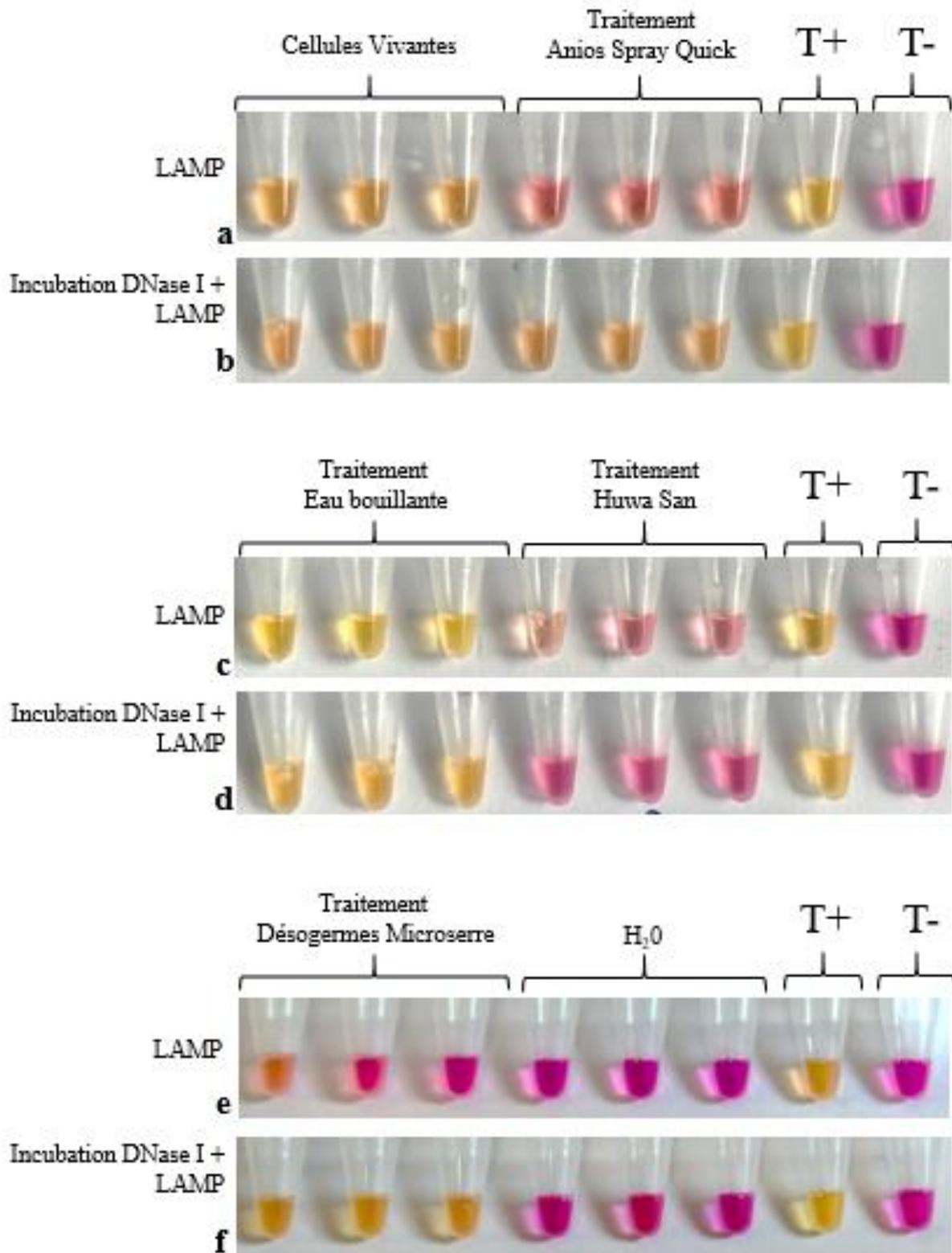


Figure 15 : Détection LAMP après incubation avec la DNase I [2U] de cellules traitées selon différentes modalités (Anios Spray Quick, 95°C 10 mins, Huwa San, Désogermes microserre, H₂O). Des cellules vivantes (a,b) et de l'eau ultra-pure (e,f) sont utilisés en tant que témoin positif et négatif, respectivement. Les résultats LAMP sont obtenus avant (a,c,e) et après l'incubation avec la DNase I (b,d,f).

DISCUSSION

La lutte contre le chancre bactérien de la tomate est un enjeu national et international, cette bactériose est l'une des maladies les plus redoutées en production de tomate. Le temps de latence entre le début de l'infection et l'apparition des symptômes, et l'absence de moyens de détection *in situ* efficaces y compris sur les surfaces inertes, complique la gestion de la maladie. La mise en place de la prophylaxie est ainsi tardive, la dissémination de la maladie ne peut être limitée précocement, ce qui peut entraîner des pertes considérables pour les producteurs, et d'éventuels réservoirs d'inoculum ne peuvent être identifiés. L'objectif général est de renforcer la protection des plantes contre cette maladie sur la base de la combinaison de différents leviers, tels que la détection de Cmm sur les surfaces inertes et au sein des plantes, la prophylaxie précoce (arrachage des plants, isolement des zones contaminées) qui limitera la propagation des épidémies, et le biocontrôle.

Afin d'étudier l'efficacité des produits de lutte contre le chancre bactérien, le premier objectif a été de mettre au point un protocole pour inoculer Cmm au sein de plantes de tomate en chambre climatique et pour observer l'apparition et l'évolution des symptômes. Les résultats ont permis de statuer sur un stade de plantes de deux semaines, une température de jour de 28°C, une humidité relative de 70%, et une inoculation par incisions des pétioles d'une suspension bactérienne de concentration 10^8 CFU/mL. Les symptômes caractéristiques d'une infection par Cmm, flétrissements unilatéraux et/ou nécroses des tiges, apparaissent une semaine après l'inoculation et évoluent rapidement au cours des cinq jours qui suivent. Ces paramètres sont reproductibles en conditions de laboratoire et facilement mis en place pour les prochaines expérimentations.

L'étude en conditions *in vitro* de l'effet des produits de lutte contre le chancre bactérien, dans le cadre du deuxième objectif, montre qu'au cours des premières 24 heures, la Bouillie Bordelaise, inhibe partiellement, mais pas totalement, Cmm. Cet effet de réduction de la population bactérienne disparaît à partir de deux jours (plus aucune zone d'inhibition), et Cmm prolifère à nouveau. Ce phénomène pourrait être dû à une adaptation et au développement d'une résistance aux composés cupriques contenus dans la Bouillie Bordelaise, comme démontré dans la littérature pour plusieurs modèles de bactéries (Ordax et al., 2006). Cette réduction de l'inhibition induite par la Bouillie Bordelaise pourrait être également dû au séchage, et donc à une perte d'efficacité du produit. Les produits à base d'agents bactérien, de *Bacillus subtilis* pour Rhapsody® et de *Bacillus amyloliquefaciens* pour Taegro®, montrent l'effet d'inhibition le plus important, et statistiquement significatif, en conditions *in vitro* de la croissance de *Cmm1125* dès les premières 24 heures et jusqu'à sept jours.

Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus pour le test de l'efficacité des produits de lutte *in planta*. Les premiers résultats obtenus dans nos conditions expérimentales sur la base d'une expérimentation et de quatre répétitions par modalités, montrent que la Bouillie Bordelaise montre une efficacité limitée, comparée à celle des produits de biocontrôle, contre le chancre bactérien de la tomate lorsqu'elle appliquée le même jour de l'inoculation de Cmm, et son effet est réduit lorsque le produit est appliqué en prévention deux jours avant l'inoculation. L'efficacité du cuivre serait due à son action directe sur les bactéries et aussi à un durcissement des surfaces foliaires (Leroux, 2003).

In planta, les résultats de cette première expérimentation montrent que les produits de biocontrôle Rhapsody® et Taegro ® à dose maximale, appliqués deux jours ou le jour-même de l'inoculation, induisent les effets les plus importants pour la réduction des symptômes de flétrissements unilatéraux et de nécroses. L'effet ces deux produits pourraient être expliqués par leurs actions bactéricides directs, ainsi que par l'induction des défenses des plantes qui explique probablement les effets préventifs observés. Si ces résultats et hypothèses étaient confirmés par d'autres répétitions et expérimentations, ces produits pourraient avoir un effet intéressant pour la lutte contre le chancre bactérien de la tomate, en préventif ou en contact direct. Les perspectives de ce travail seront également d'étudier l'effet préventif de ces produits plus en amont, en traitant les plantes cinq jours ou une semaine avant l'inoculation, mais aussi en curatif, en traitant les plantes après l'inoculation, voire après l'apparition des symptômes. L'objectif au long terme est de proposer aux producteurs des solutions de lutte et de protection contre le chancre bactérien de la tomate.

Le troisième objectif était d'étudier la distribution de Cmm *in planta*. Trois jours après l'inoculation, avant l'apparition des symptômes, Cmm est détectée en LAMP uniquement au niveau du point d'inoculation. La migration de la bactérie au sein de la plante après inoculation est lente. En conditions de production, le temps d'incubation entre la contamination et l'apparition des symptômes peut être beaucoup plus long (de l'ordre de plusieurs semaines) (De Léon et al., 2011), ce qui peut permettre à la bactérie de coloniser les vaisseaux conducteurs de sève et d'être détectable dans plusieurs tissus et organes avant l'apparition des symptômes. Après l'apparition de ces symptômes, huit jours après l'inoculation, les trois plantes testées présentent une répartition hétérogène de Cmm, et ce au sein des pétioles et folioles des étages foliaires supérieurs à celui de l'inoculation. Ces résultats sont concordants avec ce qui est décrit dans la littérature pour plusieurs modèles dont Cmm (Wolf et al., 2012) où la présence de Cmm est décrite principalement dans les feuilles, mais également dans la tige. Cela démontre l'utilité

de déterminer une zone d'échantillonnage à privilégier lors de l'échantillonnage, ou de grouper plusieurs échantillons d'une même plante, pour assurer une détection efficace de Cmm. En particulier, Cmm est détectée au sein de la tige des trois plantes testées sept jours après l'inoculation, mais n'est pas détectée au sein des racines. Ces résultats indiquent une piste pour une zone d'échantillonnage à privilégier. Cependant, le prélèvement d'échantillons de tige entraînera le sacrifice de la plante, ce qui n'est pas compatible avec les objectifs de rendement des producteurs. L'utilité de grouper des échantillons dont le prélèvement est compatible avec un test de détection sans compromettre la production (pétiole et foliole) est à déterminer dans les expérimentations futures en conditions de terrain. Dans nos conditions de laboratoire, le protocole mis au point dans le cadre du quatrième objectif, permet de grouper des échantillons (e.g. N=20) dans un même volume d'eau (15mL), et d'obtenir un seuil de détection de 10^5 CFU/mL, qui est identique à celui du protocole de test d'échantillons individuels. De plus, l'efficacité de détection de Cmm dans d'autres tissus et organes, comme les bourgeons, pourra être étudiée.

Une perspective intéressante sera d'étudier la taille minimale de la population bactérienne nécessaire pour induire des symptômes de flétrissement unilatéraux. Par exemple, la quantité de Cmm sur des graines infectées est variable, entre 10^2 et 10^4 CFU par graine, et une population de 10^2 CFU/graine semble être le seuil minimum pour la transmission de l'agent pathogène à partir de graines (De Léon, 2011 ; Kaneshiro et al., 2008). Ainsi, la sensibilité du protocole officiel de détection de Cmm développé par l'ANSES doit pouvoir être en-deçà de 10^2 CFU par graine (Foucher et al.). Si la taille de la population de Cmm au sein d'échantillons de plantes est inférieure au seuil de détection obtenu (10^5 CFU/mL), d'autres développements méthodologiques pour réduire ce seuil seront à développer. Les étapes de centrifugation ou de filtration des prélèvements ne permettent pas d'abaisser le seuil. Néanmoins, des premiers résultats avec l'ajout de glycogène lors d'une centrifugation sont encourageant pour réduire le seuil de détection à 10^3 CFU/mL. Les contraintes liées à une centrifugation (e.g. taille, coût, transport du matériel nécessaire) seront à étudier pour évaluer la faisabilité de cette étape pour une détection réalisée sur le terrain.

Enfin, le dernier objectif du stage est de développer une solution de détection fiable pour détecter la présence uniquement de cellules vivantes Cmm sur les surfaces inertes (bâches, outils) en amont ou en cours de production. Le test de détection mis au point précédemment permet de détecter Cmm avec un seuil de détection de 10^5 CFU/mL, sans distinction entre des cellules vivantes, des cellules mortes et/ou de l'ADN libre résiduel d'une précédente

contamination. Ce protocole est simple, fiable et transposable sur l terrain mais les résultats peuvent induire des précautions supplémentaires non justifiées (nouvelles désinfections totales) si la détection positive a été obtenue sur la base de cellules mortes ou d'ADN libre. Les méthodes testées pour cibler uniquement les cellules vivantes et infectieuses sont basées sur l'hypothèse que la membrane et la paroi des cellules mortes est perméable aux enzymes de dégradation de l'ADN (Villareal et al., 2013). Les multiples expériences réalisées avec la digestion des cellules par la DNase I montrent qu'elle peut être utilisée seulement pour exclure la possibilité d'une détection positive en présence d'ADN libre. Des résultats incohérents ont été obtenus avec une digestion avec la DNase I pour les cellules traitées de manière à induire la mort cellulaire. Cependant, les expérimentations d'enrichissement de cellules traitées par une méthode physique (95°C 10 mins) et par des produits de désinfection montrent que les cellules bouillies, et les cellules traitées à l'Aniospray Quick sont en réalité dans un état viable mais non cultivable immédiatement après traitement, et se multiplient à nouveau après plusieurs semaines passées en incubation dans un milieu nutritif liquide. Dans cet état, la membrane et la paroi des bactéries ne sont pas dégradées, et restent imperméables aux enzymes utilisées pour dégrader l'ADN des cellules mortes. De précédents travaux dans la littérature ont en effet montré que certaines bactéries dans cet état sont capables de revenir à un état métaboliquement actif et cultivables (Dong et al., 2019). Les difficultés d'obtention de cellules mortes compliquent le test de méthodes de détection permettant de ne détecter que les cellules vivantes. Des optimisations supplémentaires seront nécessaires pour obtenir des cellules mortes, et tester l'efficacité de la DNase I ou d'autres d'enzymes de dégradation des acides nucléiques.

CONCLUSION

La combinaison de leviers alliant détection précoce, prophylaxie et biocontrôle permettrait d'améliorer et de renforcer la gestion de la maladie du chancre bactérien de la tomate.

Les expérimentations ont permis de déterminer les paramètres optimums pour inoculer Cmm au sein de plantes de tomate en conditions contrôlées et pour observer les symptômes induits. Ces paramètres (plants de deux semaines, suspension bactérienne ajustée à 10^8 CFU/ml, inoculation par incision sur le pétiole, 28/23°C jour/nuit, 14h de jours, 70% d'humidité) permettent d'observer des symptômes dès huit jours après l'inoculation des plantes.

Dans nos conditions expérimentales *in vitro*, les produits de biocontrôle Rhapsody® et Taegro® et la Bouillie Bordelaise (produit chimique à base de cuivre) montre une inhibition directe et d'intensité décroissante de la survie et la multiplication de Cmm. Ces résultats sont concordants avec les résultats préliminaires montrant une efficacité plus forte *in planta* pour Rhapsody® et/ou Taegro®, que ces produits aient été appliqués deux jours avant ou le jour-même de l'inoculation, pour réduire l'apparition et l'évolution des symptômes induits par Cmm. L'effet de la Bouillie Bordelaise contre l'apparition et l'évolution des symptômes du chancre bactérien *in planta* est plus limité, surtout lorsque ce produit est appliqué deux jours avant l'inoculation. Les résultats préliminaires de la distribution de Cmm au sein des plantes montrent une migration hétérogène de la bactérie, du point d'infection vers les parties aériennes après l'inoculation. Ces résultats pourraient permettre de suggérer des étages foliaires et des tissus à échantillonner préférentiellement, et supportent le besoin de grouper les échantillons, pour assurer une détection précoce et efficace de Cmm. Le protocole mis au point permet de grouper plusieurs dizaines d'échantillons, en conservant un seuil de détection de 10^5 CFU/mL, similaire au test de détection initialement prévu pour un seul échantillon.

Avant installation de plants de tomate en serre, et en cours de production, le test de détection sur surfaces inertes a pour objectif d'identifier des éventuels réservoirs d'inoculum et de tester l'efficacité des désinfections réalisées. L'ajout d'une étape de digestion des prélèvements avec la DNase I d'écarter la possibilité d'obtenir un résultat positif de détection en présence d'ADN libre sur les surfaces. Cependant, le protocole ne permet pas, en l'état actuel du développement, d'obtenir un résultat positif uniquement en présence uniquement de cellules bactériennes vivantes et infectieuses.

L'ensemble de ces données sont en cours de consolidation sur la base de répétitions des mêmes expérimentations. A terme, ces résultats permettront d'envisager des pistes pour proposer des solutions pour la préservation de la santé des productions de tomate contre la maladie du chancre bactérien sur la base de schémas de protection intégrée.

BIBLIOGRAPHIE

- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., and Sessa, G. 2008. Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development. *Plant Physiology* 146, 1797–1809.
- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gond, G. H., Wang, P., Yu, Z. L. Isolement et caractérisation d'antibiotiques lipopeptidiques produits par *Bacillus Subtilis*. 2008. *Lettres en microbiologie appliquée*. Volume 7, numéro 3.
- De Leon, L., M. Lopez, Maria, Siverio, F., and Rodriguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seedborne Tomato Pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., and Liao, X. 2020. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, 149–183.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA* 12.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.D., and Lang, H. 1974. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry* 47, 91–97.
- Foucher, J., Serandat, I., Valette, N., Baldwin, T., Andro, C., Olivier, V., Grimault, V. Development and validation of the French official detection method of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seeds. (Poster).
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 106, 179–191.
- Kaneshiro, W. S., Ingram, D. M., and Alvarez, A. M. 2008. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* threshold levels required for transmission by naturally-infested tomato seed. (Abstr.) *Phytopathology* 98:S78.
- Leroux, P. 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. Mode d'action des produits agrochimiques vis-à-vis des phytopathogènes. *Comptes Rendus Biologiques*. Tome 326, numéro 1.
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., and Yuan, Z. 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Mol Plant Pathol* 19, 2036–2050.

- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., and Kanda, H. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 53, 1–5.
- Oliver, J.D. 2000. The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria, pp. 277–300. In Colwell, R.R. and Grimes, D.J., eds, *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Springer US, Boston, MA.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., & Biosca, E. G. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3482–3488.
- Sen, Y., Van Der Wolf, J., Visser, R.G.F., and Van Heusden, S. 2015. Bacterial Canker of Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, Resistance, and Interactions. *Plant Disease* 99, 4–13.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 479–491.
- Villarreal, J. V., Jungfer, C., Obst, U., & Schwartz, T. 2013. DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *Journal of microbiological methods*, 94(3), 161–169.
- Werner, N.A., Fulbright, D.W., Podolsky, R., Bell, J., and Hausbeck, M.K. 2002. Limiting Populations and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Seedling Tomatoes in the Greenhouse. *Plant Disease* 86, 535–542.
- Wolf, JM., Zouwen, PS., Ludeking, DJW., Hamelink, R., and Schenk, MF., 2012. Distributie van *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenplanten. *Plant Res. Int. Rep.* 448.
- Yasuhara-Bell, J., Kubota, R., Jenkins, D.M., and Alvarez, A.M. 2013. Loop-Mediated Amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* Gene Is Highly Specific. *Phytopathology*® 103, 1220–1226.

WEBOGRAPHIE

- (1) Santé et Sécurité au travail, Réseau Ressources Risques Biologique. URL : <https://www.esst-inrs.fr/3rb/afftexte.php?p1=reservoirs>. Consulté le 21.02.2023.
- (2) Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire. Qu'est-ce que le biocontrôle ? URL : <https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-le-biocontrole>. Consulté le 21.02.2023.
- (3) Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire, Protection intégrée. URL : <https://agriculture.gouv.fr/protection-integree-principes-et-definitions>. Consulté le 21.02.2023.
- (4) Larousse. Définition de Bactériostatique. URL : <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/bact%C3%A9riostatique/7402>. Consulté le 20.06.2023
- (5) Ministère de l'agriculture, Agreste. URL : <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/>. Consulté le 20.02.2023
- (6) Chambre de l'agriculture. L'utilisation du cuivre en viticulture : réduction de doses, seuil de toxicité et réglementation. URL : https://pays-de-la-loire.chambres-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/National/FAL_commun/publications/Pays_de_la_Loire/2012/depliant_12_utilisation_cuivre_viti_AB_115_2012.pdf. Consulté le 17.04.2023.
- (7) Ecophytopic. Le chancre bactérien de la tomate. URL : https://ecophytopic.fr/sites/default/files/Note_nationale_Clavibacter_vf-1-pdf_nocache%3D1175698119_cle83a73b_cle89ac15.pdf. Consulté le 20.06.2023.
- (8) INRAE, unité Pathologie Végétale. URL : https://www6.paca.inrae.fr/pathologie_vegetale/Projets-Innovation/Projets-de-recherche-nationaux/CLAVINNOV. Consulté le 20.02.2023.
- (9) Bayer, Rhapsody® : un produit de biocontrôle efficace pour la protection colza. URL : https://www.bayer-agri.fr/cultures/rhapsodyr-un-produit-de-biocontrole-efficace-pour-la-protection-colza_4946/. Consulté le 20.06.2023.
- (10) Ephy-ANSES. URL : <https://ephy.anses.fr/ppp/serenade-aso>. Consulté le 17.04.2023.
- (11) Ephy-ANSES. URL : <https://ephy.anses.fr/ppp/taegro>. Consulté le 17.04.2023.
- (12) Ephy-ANSES. URL : <https://ephy.anses.fr/ppp/bouillie-bordelaise-rsr-disperss>. Consulté le 17.04.2023.
- (13) R Core Team (2021). R : A language and environment for statistical. URL : <https://www.R-project.org/>.

ANNEXES

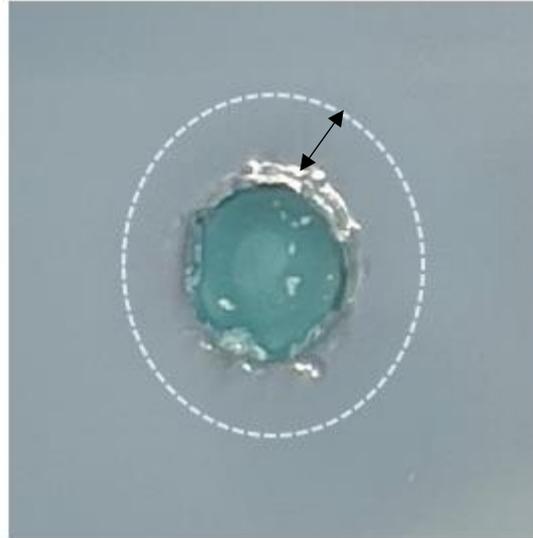


Annexe 1 : Photographies de symptômes caractéristiques du chancre bactérien de la tomate obtenues en conditions contrôlées. Flétrissements unilatéraux sur une feuille (a) et nécrose sur le pétiole d'une feuille et la tige (b) de deux plantes inoculées avec une suspension bactérienne de 10^8 CFU/mL par la méthode des incisions à l'aiguille et maintenues à 14h de jour, 28°C/23°C Jour/Nuit et 70% d'humidité.

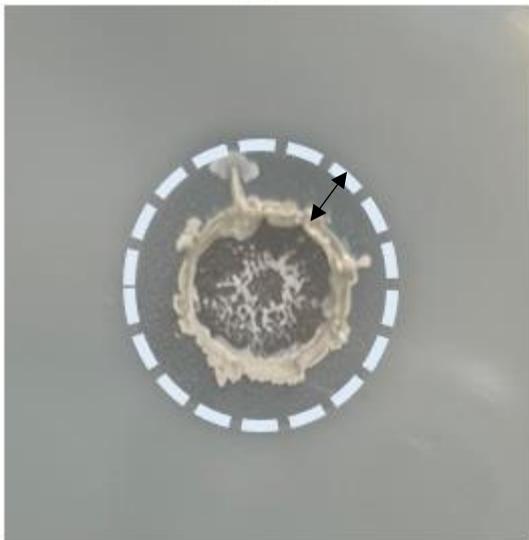
H₂O



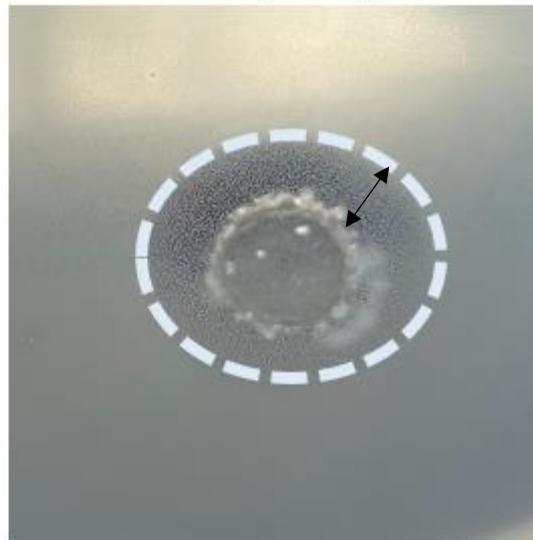
Bouillie Bordelaise



Taegro®



Rhapsody®



Annexe 2 : Photographie de la zone de l'inhibition des produits de lutte contre Cmm. Taille de la zone d'inhibition (cercle en pointillé) un jour après le début de la confrontation pour le témoin négatif H₂O (a), un produit phytosanitaire chimique, la Bouillie Bordelaise (b), et deux produits de biocontrôle, Taegro® (c) et Rhapsody® (d).

| Groupe n°1 | Groupe n°2 | P. adj. | Signif. |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| Témoin (-) | Bouillie Bordelaise [20g/L] | 0,504 | ns |
| Témoin (-) | Bouillie Bordelaise [10g/L] | 0,504 | ns |
| Témoin (-) | Taegro [3,7g/L] | 0,000878 | *** |
| Témoin (-) | Taegro [1,8g/L] | 0,000891 | *** |
| Témoin (-) | Rhapsody [14,1g/L] | 0,000398 | *** |
| Bouillie Bordelaise [20g/L] | Bouillie Bordelaise [10g/L] | 1 | ns |
| Taegro [3,7g/L] | Taegro [1,8g/L] | 0,927 | ns |
| Rhapsody [14,1g/L] | Taegro [3,7g/L] | 0,003 | ** |
| Rhapsody [14,1g/L] | Taegro [1,8g/L] | 0,003 | ** |
| Rhapsody [14,1g/L] | Bouillie Bordelaise [20g/L] | 0,002 | ** |
| Rhapsody [14,1g/L] | Bouillie Bordelaise [10g/L] | 0,002 | ** |

Annexe 3 : Résultats (p-valeur ajustée et significativité) de tests de Wilcoxon réalisés sur la base des aires sous la courbe de l'épaisseur de la zone d'inhibition induit par chaque produit de lutte au cours du temps. Les tests sont réalisés avec 10 valeurs d'aire sous la courbe par modalité. Les produits de lutte sont chacun comparés au témoin. Les différentes concentration d'un même produit, et les produits de biocontrôle entre eux sont comparés.

RESUME

Clavibacter michiganensis subsp. *Michiganensis* (Cmm) est responsable de la maladie du chancre bactérien de la tomate, et est l'un des phytopathogènes les plus dommageables pour cette culture. La gestion de cette maladie repose essentiellement sur l'usage de méthodes prophylactiques car elle est limitée par l'absence de méthodes de détection efficaces et applicables sur le terrain. L'objectif est de renforcer la protection intégrée des productions de tomates sur la base de la détection *in situ* de Cmm via la méthode de biologie moléculaire d'amplification de l'ADN médiée par boucle (LAMP). Le protocole de détection sur surfaces inertes et sur échantillons de plante a été optimisé, en ajoutant une étape de digestion des prélèvements par la DNase I pour exclure la présence d'ADN libre résiduel, et en augmentant le nombre d'échantillons pouvant être testé simultanément. L'étude de la répartition intra-plante de la population de bactéries montre une répartition hétérogène, de la tige vers les feuilles jeunes, ce qui renforce la nécessité de grouper des échantillons d'une même plante pour une détection efficace. Enfin, les produits de biocontrôle étudiés montrent une efficacité *in vitro* et *in planta* plus grande que le produit chimique testé pour lutter contre le chancre bactérien de la tomate. Ces résultats sont à consolider, et pourront au long-terme contribuer à l'évolution des pratiques agricoles pour renforcer la protection intégrée des cultures de tomates contre le chancre bactérien.

Mots clés : Chancre bactérien de la tomate, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, Détection, *in situ*, LAMP, Biocontrôle, Prophylaxie, Protection intégrée.

ABSTRACT

Clavibacter michiganensis subsp. *Michiganensis* (Cmm) causes bacterial canker disease of tomato, is one of the most damaging plant pathogens for this crop. The management of this disease is essentially based on the use of prophylactic methods because it is limited by the absence of effective and applicable detection methods in the field. The objective is to strengthen the integrated protection of tomato productions based on the *in situ* detection of Cmm based on the molecular biology method of loop-mediated DNA amplification (LAMP). The detection protocol on inert surfaces and on plant samples has been optimized, by adding a sample digestion step with DNase I to exclude the presence of residual free DNA, and by enhancing the number of samples that can be tested simultaneously. The study of the intra-plant distribution of the bacterial leaf population shows a heterogeneous distribution, from the stem to the young, which reinforces the need to group samples from the same plant for effective detection. Finally, the demonstrated biocontrol products demonstrate greater *in vitro* and *in planta* efficacy than the tested chemical in controlling tomato bacterial canker. These results could contribute in the long term to the evolution of agricultural practices to strengthen the integrated protection of tomato crops against bacterial canker.

Keywords: Bacterial canker of tomato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, Detection, LAMP, Biocontrol, Prophylaxis, Protection.