

CLAVINNOV – Amélioration de la détection et de la protection raisonnée contre le chancre bactérien de la tomate *Clavibacter michiganensis michiganensis* 2018-2022



L'Europe investit dans les zones rurales



Projet PEI financé avec le concours de l'Union européenne avec le Fonds Européen Agricole pour le Développement Rural

Projet labélisé par le GIS PIClég



Chef de file :

Partenaires :



Rapport final du projet 2018-2022

Le présent rapport présente les travaux réalisés dans le cadre du projet CLAVINNOV par l'ensemble des partenaires sur la durée du projet (2018-2022).

1. Rappel du contexte et des enjeux du projet

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) est l'agent responsable du chancre bactérien sur tomate. Les épidémies dues à cette bactérie, imprévisibles et sporadiques, entraînent des dépérissements de plantes et des pertes de production dans les systèmes hors-sol mais aussi en sol. Il n'existe pas de moyen de protection contre Cmm en culture et seules des mesures de prophylaxie, très contraignantes, permettent de contenir partiellement les foyers déclarés. La détection de Cmm ne se fait qu'à l'apparition de symptômes de flétrissements qui marquent un stade déjà avancé de la contamination. Un diagnostic précoce et fiable permettrait d'orienter rapidement le producteur vers la mise en œuvre des méthodes de prophylaxie.

Sur la base d'un partenariat avec l'équipe de bactériologie d'INRAE de Montfavet, l'expérimentation de terrain (APREL) et les producteurs (CETA de Berre, SCA Pardi), le projet CLAVINNOV s'est construit autour de plusieurs objectifs :

- ❖ Proposer un outil innovant de détection du Cmm, utilisable sur le terrain
- ❖ Améliorer la détection du Cmm au champ : fiabilité, rapidité et analyses préventives
- ❖ Proposer des solutions de biocontrôle pour diminuer l'impact de la maladie en culture de tomate

Le projet s'articule en 4 actions techniques :

- **Action 1** : test et optimisation en laboratoire de méthodes biotechnologiques innovantes de détection de Cmm
- **Action 2** : transfert de l'outil biotechnologique pour la détection de Cmm sur le terrain
- **Action 3** : identification sur le terrain de sources d'inoculum primaires et test de l'efficacité des méthodes de décontamination pratiquées
- **Action 4** : évaluation de l'efficacité de nouvelles méthodes de protection des cultures, notamment produits de biocontrôle, en serre de production de tomate

2. Elaboration d'un nouvel outil de détection du Cmm (Action 1)

2.1 Démarche d'agrément à INRAE

Pour pouvoir manipuler au laboratoire des souches bactériennes vivantes de Cmm¹, qui était classée en tant qu'organisme de quarantaine de type A2 (selon l'annexe II de l'arrêté du 29/02/2006 déclinant la directive européenne 2000/29/CE), et avancer sur le travail de détection de ce pathogène, il a été nécessaire de déposer une demande d'agrément pour le laboratoire de bactériologie d'INRAE. Cette démarche a été initiée dès le début du projet avec une préparation de mise en conformité qui a demandé du temps pour rédiger les protocoles et organiser les procédures.

Au total, cinq pièces ou équipements sont concernés : pièce de réception des échantillons, laboratoire, chambre de culture « P3 », autoclave et benne. Une complexité a dû être prise en compte car certains de ces équipements servent aussi à la plateforme de biologie moléculaire et implique l'organisation avec d'autres équipes de recherche.

L'agrément a été demandé pour 3 bactéries de quarantaine : *C. michiganensis*, *C. insidiosus*, *C. sepedonicus*. L'audit a pu être réalisé le 26 mars 2019 et a donné lieu à quelques fiches d'écarts. Les réponses ont été fournies en juillet 2019. L'agrément a été définitivement validé le 28 Octobre 2019.

2.2 Recherche bibliographique

Les membres d'INRAE-PV impliqués dans ce projet se sont tout d'abord investis dans une phase de mise à jour des connaissances disponibles dans la littérature. Ainsi, ils ont collecté et synthétisé des informations concernant, de façon générale, des méthodes de détection compatibles pour une utilisation sur le terrain et de façon plus spécifique, des protocoles de détection de Cmm (i.e. en PCR et qPCR classique, ainsi qu'avec des méthodes d'amplification isothermiques de l'ADN transférables sur le terrain).

Les méthodes de PCR classiques, ainsi que d'amplification isothermique en LAMP et PSR, amplifient l'ADN de cellules vivantes ou mortes. Pour améliorer le diagnostic sur les surfaces inertes, qui sont de possibles réservoirs d'inoculum, on cherche à ne détecter que les cellules vivantes (les cellules mortes ne représentent pas un risque pathogène). La méthode NASBA en amplifiant seulement l'ARN permettrait de ne sélectionner que les cellules vivantes mais les résultats de cette technique peuvent être influencés par la plus forte sensibilité de l'ARN à la dégradation et pourrait donc être altérée par les manipulations terrain. D'autres stratégies sont possibles, basée sur l'utilisation d'Ethidium ou du Propidium MonoAzide (PMA) ou de DNaseI qui se fixe ou dégrade l'ADN des cellules mortes et qui empêche ainsi l'amplification, sous réserve cependant de l'innocuité de ces molécules pour l'environnement et les utilisateurs.

Sur la base de ces informations, plusieurs méthodologies alternatives à tester ont été considérées pour chacune des étapes inhérentes à un test de détection, comme indiqué ci-dessous :

- collecte des échantillons : prélèvements de morceaux de différents types de tissus (limbe foliaire, pétiole, tige, racines, fruits, résidus de culture) à plusieurs étages de la plante selon le stade de culture, et utilisation d'un outil (écouvillon, brosse, coton-tige, tige whatman, disque whatman, scotch blanc) pour effectuer des prélèvements sur surfaces inertes (e.g. plastique des bâches de protection des pains de laine de roche, supports de cultures).

- traitement de l'échantillon : via une étape d'immersion dans de l'eau ultra-pure, du NaCl 0.25%, de l'eau peptonée ou divers tampons ; suivie d'un broyage, d'une incubation à température ambiante ou à 95°C, ou d'une extraction d'ADN sur papier ou sur billes magnétiques. Une période d'incubation des échantillons peut être ajoutée avec un composé chimique (i.e. PMA ou Dnase I) pour inhiber l'amplification d'ADN libre et de cellules mortes non infectieuses.

- amplification isothermique de l'ADN : via une méthode LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification ; Notomi et al., 2000), PSR (Polymerase Spiral Reaction ; Liu et al., 2015) ou NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification ; Compton et al., 2006). Au démarrage du projet, des kits spécifiquement conçus pour des tests LAMP étaient déjà disponibles auprès du fournisseur New England Biolabs. Par contre, aucun kit n'était disponible commercialement pour la PSR et la NASBA. Sur la base de la littérature, (Liu et al., 2015 ; Yasuhara-Bell et al., 2014), un mélange réactionnel « maison » a pu être conçu pour la PSR. La NASBA nécessite une méthode d'extraction et d'isolement des ARN produits par les cellules bactériennes, ce qui complique la mise au point et le transfert sur le terrain de cette méthode.

¹ Jusqu'au 14 décembre 2019, le Cmm avait le statut d'organisme de quarantaine sur semences et plants au niveau européen. Le nouveau règlement (UE) 2016/2031 a modifié ce statut et place désormais Cmm en tant qu'organisme réglementé non de quarantaine.

- lecture des résultats des tests LAMP : via colorimétrie, fluorimétrie, ou révélation sur bandelettes. La technique de colorimétrie a été préférée pour éviter l'ouverture des tubes en fin de réaction et le risque de contamination des labos et environnements de travail avec de l'ADN amplifié en forte concentration. Deux kits ont été retenus pour les tests au laboratoire. Le kit colorimétrique (contenant du PhenolRed) permet une distinction nette entre le positif (jaune) et le négatif (rose). Le changement de couleur est dû à une variation de pH, ce qui en fait une technique sensible au pH pouvant être modifié par certaines matières analysées. Un autre kit a donc été testé, en rajoutant au mélange réactionnel incolore de l'hydronaphtol Blue. Les nuances de bleu foncé (négatif) et bleu clair (positif) sont moins nettes mais il existe un filtre disponible sur internet qui permet de transformer ces couleurs.

L'étape d'amplification isothermique est le point crucial pour assurer la spécificité de l'outil. C'est pourquoi les premiers tests et mises au point ont été ciblés sur cette étape.

2.3 Méthodes de détection testées

Sur la base de l'analyse bibliographique ; quatre protocoles de détection spécifique de Cmm ont été considérés (Tableau 1):

- une méthode de PCR classique (Yasuhara-Bell et al. 2014)
- une méthode LAMP (Yasuhara-Bell et al. 2013)
- une méthode en PSR et une autre en NASBA sur la base d'amorces publiées (Yasuhara-Bell et al. 2014).

Les trois premiers protocoles spécifiques de détection de Cmm, par amplification classique (PCR), et isothermique (LAMP et PSR) de l'ADN, ont été testés au laboratoire. Au contraire, le protocole NASBA a été écarté en raison du manque de praticité envisagé sur le terrain pour extraire le matériel génétique (ARN) nécessaire à cette méthode.

Parallèlement, la détection au niveau plus large de l'espèce *Clavibacter michiganensis* (Cm) a été travaillée (Tableau 1) avec deux protocoles PCR et 2 paires d'amorces sélectionnées (Mc Nally et al. 2016, Schneider et al., 1997). Ce choix a été motivé par le fait que certaines souches au sein d'autres sous-espèces de Cm sont décrites comme ayant été isolées à partir de graines de tomate (Jacques et al., 2012), dont au moins une avec la capacité de coloniser la plante (Thapa et al., 2017), sans toutefois d'informations précises sur le potentiel pouvoir pathogène de ces souches sur tomate.

Tableau 1. Récapitulatif des protocoles considérés pour une mise au point au laboratoire.

Cible ^a	Amorces Article	Amplification de l'ADN			
		Classique	Isothermique		
		PCR	LAMP	PSR	NASBA
Cmm	Yasuhara-Bell et al. 2013		X		
	Yasuhara-Bell et al. 2014	X		X	X
Cm	McNally et al. 2016	X			
	Schneider et al. 1997	X			

^a : Cmm (sous-espèce *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*),
Cm (espèce *Clavibacter michiganensis*)

Dans un premier temps, les amorces choisies ont été testées pour leur spécificité en LAMP (Yasuhara-Bell et al. 2013) et en PCR (Yasuhara-Bell et al. 2014, Mc Nally et al. 2016, Schneider et al., 1997) (Tableau 1 et cf. détail ci-dessous). Les résultats obtenus ont conditionné la seconde étape. Pour la détection de Cmm, le couple d'amorce donnant les meilleurs résultats en termes de spécificité en PCR a été utilisé pour des essais de détection en PSR.

Chaque technique a été évaluée sur 3 paramètres :

- spécificité (100% vrai positifs et 100% vrai négatifs). Ceci dépend beaucoup des amorces utilisées pour la PCR, LAMP, et PSR et des conditions de la réaction (e.g. température).

- Sensibilité (seuil de détection minimal). Les tests sur différents substrats permettront de l'évaluer.
- Répétabilité, simplicité, rapidité pour une mise en œuvre sur le terrain

Enfin, à titre de comparaison, un kit de détection de Cmm sur la base de réaction de type antigène-anticorps) disponible commercialement sous la forme de bandelettes (Agdia, ImmunoStrips®) a testé pour sa spécificité et sensibilité.

2.4 Mise au point de protocoles nécessaires à la manipulation de souches au laboratoire

La mise au point d'outils de détection au laboratoire nécessite des étapes de microbiologie pour repiquer et cultiver les souches bactériennes utiles pour les tests de spécificité et de sensibilité (cf. ci-dessous). Un milieu gélosé non sélectif (YPGA) et deux milieux semi-sélectifs (CMM1T, et MBCT) ont été testés (ISHI 4.3.1, 2016 ; Ftayeh et al., 2011) avec quelques modifications pour leur efficacité au regard de la croissance souches Cmm et Cm.

Les résultats montrent que le milieu YPGA permet bien de cultiver la souche Cmm testée, 6 souches Cm ainsi que cinq souches d'autres espèces de bactéries, ce qui est cohérent avec la caractéristique de non-sélectivité. Le milieu CMM1T n'a pas permis de cultiver la souche Cmm testée, et permet en revanche la croissance de quatre souches Cm. Le milieu MBCT permet de cultiver la souche Cmm testée, et seulement de 5 souches Cm et d'une souche d'une autre espèce de bactérie ; ce qui est également cohérent avec le caractère semi-sélectif. Ceci implique un suivi de près des boîtes après ensemencement, la nécessité d'un œil expert pour la reconnaissance visuelle des colonies ressemblant à Cmm et un test (LAMP ou PCR) de confirmation.

Les milieux YPGA et MBCT ont été retenus pour la suite des expérimentations et pour une utilisation au laboratoire.

2.5 Tests de spécificité

Pour tester la spécificité des techniques, la sélection de souches est essentielle. La collection de souches a été constituée avec des suspensions d'ADN de 40 souches de bactéries commandées auprès de la CFBP (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes) et l'extrait l'ADN de 4 autres souches de bactéries présentes dans la collection propre au laboratoire.

Ce total de 44 suspensions d'ADN correspond à :

- 16 souches de Cmm,
- 15 souches appartenant à d'autres sous-espèces au sein de Cm,
- 4 souches appartenant à des genres phylogénétiquement proches de Cm (i.e. *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Rathayibacter tritici*, *Rathayibacter iranicus*),
- 9 souches d'autres espèces de bactéries pouvant infecter la tomate (i.e. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas* spp., *Bacillus subtilis*, *Ralstonia pseudosolanacearum*).

L'identité de ces 9 dernières souches a été testée sur la base du séquençage d'une portion du gène 16S et de la comparaison des séquences obtenues à celles présentes dans les banques publiques de séquences (i.e. NCBI) par BLAST.

L'identité des 16 souches Cmm, des 15 souches de Cm, ainsi que des 4 souches phylogénétiquement proches a également été testée sur la base d'arbres phylogénétiques réalisés avec les séquences générées dans nos conditions et des séquences de mêmes souches obtenues depuis NCBI et ce pour trois gènes de ménage (i.e. *gyrB*, *recA* et *rpoB*). L'identité de l'ensemble des souches a ainsi été confirmée, sauf pour une souche Cm qui s'est révélée être une *Curtobacterium* sp.

La collection de souches se compose donc de 16 souches Cmm, 14 Cm, 5 souches de genres phylogénétiquement proches, et 9 souches d'autres bactéries pouvant infecter la tomate.

Quatre protocoles ont été testés avec les 44 suspensions d'ADN sélectionnées. Les résultats de ces tests montrent que :

- le protocole LAMP permet la détection des 16 Cmm (100% vrais positifs), mais produit également un résultat douteux pour trois souches appartenant à d'autres sous-espèces, et ainsi qu'une détection positive de 2 *Xanthomonas* spp. Cette technique LAMP a été améliorée en diminuant la quantité

d'ADN utilisée. Trop d'ADN diminuait la spécificité des tests car les amorces s'accrochent plus facilement même si elles ne sont pas complètement spécifiques. La méthode LAMP est plus sensible et permet de réaliser une détection avec moins d'ADN. Ce protocole optimisé donne lieu à une bonne spécificité (100% vrais positifs, 0 faux-négatif).

- Le protocole PCR ciblant Cmm permet la détection des 16 Cmm et d'aucune autre souche de bactérie. Ce protocole donne donc satisfaction en termes de spécificité (100% vrais positifs et 100% vrais négatifs).
- Le premier protocole PCR ciblant Cm (Mc Nally et al. 2016) permet la détection de l'ensemble des 30 souches Cmm et Cm, et donne également entière satisfaction en termes de spécificité.
- Le deuxième protocole PCR ciblant Cm (Schneider et al., 1997) permet la détection des 16 Cmm, et de 11 Cm. Les résultats sont douteux pour trois souches Cm. Ce protocole n'a pas été retenu.
- Le protocole PSR de détection de Cmm ne donne pas satisfaction en termes de spécificité, et ce malgré de multiples essais d'optimisation notamment au niveau de la température et du temps d'incubation. Le dernier essai a abouti à la détection de seulement quatre souches Cmm sur les 16 testées, et a également abouti à la détection d'une souche Cm.
- Les tests bandelettes ImmunoStrips (Agdia) permettent la détection de 8 souches Cmm, mais rendent un résultat douteux et négatif pour une et deux souches Cmm respectivement. De plus, ces tests aboutissent à la détection de cinq souches Cm, et rendent un résultat douteux pour trois autres souches Cm. Ce test aboutit donc à des risques de faux positifs et de faux négatifs.

En résumé à l'issue de la première étape :

- le protocole LAMP donne satisfaction en termes de spécificité. Les différents tests au laboratoire ont cependant mis en évidence une perte d'efficacité de ce protocole (notamment avec des faux positifs) en fonction de plusieurs paramètres. Les résultats montrent en particulier l'importance de l'utilisation du kit LAMP avant la date de péremption, de préchauffer l'incubateur à 65°C, d'un couvercle chauffant réglé à 90-95°C, du respect du temps d'incubation de 30 mins, de manipuler avec des blocs froids, de commander deux des amorces avec une purification HPLC, et d'éviter l'utilisation de solutions (e.g. tampons) qui interfèrent avec les changements de couleurs. Tous ces points sont des contraintes, liées au choix de la colorimétrie basée sur le Phenol Red, qui seront à prendre en compte pour le transfert de la méthode sur le terrain et qui sont contrebalancées par la facilité de lecture des résultats en comparaison avec d'autres méthodes. Néanmoins, le respect de ces points de vigilance permet d'obtenir des résultats fiables, et le protocole LAMP pour la détection de Cmm a été retenu.
- Le protocole PCR Cmm et le premier protocole PCR Cm sont retenus, et peuvent être utilisés au laboratoire en l'état.

2.6 Collecte et traitements des échantillons, et analyse de sensibilité de détection

Détection sur surfaces inertes.

L'un des objectifs de ce projet est de pouvoir détecter la présence de cellules bactériennes vivantes, et potentiellement infectieuses, sur une diversité de surfaces inertes constitutives de la structure des serres. Les résultats de ces tests de détection peuvent aboutir à l'identification de sources d'inoculum, et à la possibilité de vérifier l'efficacité de méthodes de désinfection.

Pour cela, différents types de réservoirs potentiels ont été identifiés :

- des matières plastiques (film plastique posé au sol ou entourant le substrat de laine de roche, clips de palissage des plantes, support de bouquets, tubulaires de goutte à goutte)
- des matières métalliques (tige de fer servant à soutenir les supports de culture, crochet où est enroulée la ficelle de palissage)
- la matière minérale servant de substrat pour les cultures (laine de roche)
- les ficelles servant de tuteur pour les plantes

Des échantillons de ces différents types de matière ont été rassemblés par l'APREL dans une serre à St Rémy de Provence (13) et par INRAE. Ces échantillons ont été désinfectés puis inoculés artificiellement par Cmm.

Pour la collecte d'échantillons sur ces différents types de matière, plusieurs outils de prélèvements ont été testés : le coton-tige, le disque whatman, le scotch blanc, la brosse, l'écouvillon. L'efficacité de ces outils pour récupérer des cellules bactériennes sur les différents types de surface testés a été testé à sec, ou avec une humidification à l'aide différents types de solution (NaCl 0.25%, eau ultra-pure, eau peptonée).

Après frottement de chaque outil sur chaque surface, quatre types de protocoles de traitement des échantillons ont ensuite été testés qui incluent :

- La découpe d'un bout de cellulose ou de l'outil suivie de l'extraction des acides nucléiques avec des tampons TNES 10% et de lavage, avant de réaliser un test LAMP
- La découpe d'un bout de cellulose ou de l'outil, et l'immersion de ce fragment directement dans le mélange réactionnel LAMP
- Le trempage bref de l'extrémité de l'outil directement dans le mélange réactionnel LAMP
- Le trempage de l'extrémité de l'outil dans une solution de transport (NaCl 0.25%, eau ultra-pure, eau peptonée) et le prélèvement de 2µl de cette solution pour le test LAMP.

L'ensemble de ces modalités ont été testés de façon factorielle, de façon à vérifier l'absence d'interférence des outils, des solutions d'humidification, des tampons et des solutions de transport avec les changements de couleur, et ce pour les deux kits testés (PhenolRed, et HNB).

Le choix final du protocole a été réalisé sur la base des résultats les plus fiables et transposables sur le terrain. Ainsi, le protocole retenu consiste en la collecte d'échantillons à l'aide d'un écouvillon préalablement humidifié (avec soit du NaCl 0.25%, de l'eau ultra-pure, et de l'eau peptonée), l'immersion de cet écouvillon dans une solution de transport identique à la solution d'humidification, et le prélèvement de 2µl de cette solution pour le test LAMP.

Ce protocole a été testé avec différentes concentrations de bactéries initialement déposées artificiellement sur une surface inerte plastique. Les résultats montrent que le seuil de détection (quantité minimale de bactéries dans l'échantillon pouvant mener à un résultat positif) se situe entre $10^{4.4}$ et $10^{5.5}$ CFU/ml (Colony Forming Unit/ml).

Une observation de la cinétique des bactéries dans chacune des 3 solutions de transport permet d'apporter des premiers éléments pour le choix final de la solution de transport. La synthèse des résultats de trois répétitions de cette expérimentation montrent une réduction de la viabilité des cellules bactériennes après 5h dans le NaCl 0.25% et l'eau ultra pure. Au contraire, l'incubation dans de l'eau peptonée permet le maintien de la population de bactéries à un nombre stable, voire en augmentation. L'eau peptonée est à ce stade privilégiée. Ce choix devra être confirmé en fonction des résultats de la méthode mise au point pour ne détecter que les cellules vivantes (cf. ci-dessous).

Détection de cellules vivantes sur surfaces inertes.

Le protocole mis au point tel que décrit ci-dessus ne permet pas d'obtenir un résultat positif de détection uniquement en présence de cellules bactériennes vivantes et infectieuses. Ceci reste problématique pour l'identification de réservoirs d'inoculum sur surfaces inertes, notamment après le vide sanitaire dans les serres. Pour atteindre cet objectif, une première stratégie a été explorée en 2021. Celle-ci consiste en l'utilisation d'une molécule, le Propodium MonoAzide (PMA), qui après incubation séquentielle au noir et à la lumière avec des cellules bactériennes induit l'inhibition de l'amplification et donc de la détection de l'ADN de cellules mortes. L'efficacité de cette stratégie a été testée en faisant varier différents paramètres : concentration de cellules bactériennes dans la suspension, de PMA, et temps d'incubation au noir et à la lumière. Les résultats ne sont pas reproductibles et donc pas satisfaisants. Les tests d'une deuxième stratégie, basée sur l'utilisation de DNaseI, ont démarrés en 2022. Un mélange réactionnel et un protocole d'incubation a été mis au point. Les premiers résultats sont encourageants, mais demandent à être confirmés et validés pour différentes concentrations initiales de bactéries. En attendant la mise au point d'un protocole pour la détection de cellules vivantes, l'analyse des échantillons prélevés sur le terrain et indiquant un résultat positif sera complétée par des techniques de microbiologie au laboratoire (INRAE) pour déterminer la présence de cellules vivantes et les isoler le cas échéant.

Détection sur échantillons de plantes.

Des échantillons de plantes (pétiole, limbe foliaire vert, limbe foliaire sec mimant des résidus de culture, racine, fruit vert, et fruit rouge) ont été mis à disposition par INRAE et par l'APREL, au gré d'expérimentations en conditions de laboratoire et de terrain.

Plusieurs protocoles de traitements d'échantillons ont été testés sur folioles pour commencer.

- Broyage de l'échantillon dans du tampon de broyage, du NaCl 0.25%, de l'eau ultra-pure, ou de l'eau peptonée ; suivi du prélèvement et de l'immersion directe de 2µl de ce jus dans le mélange réactionnel LAMP
- Broyage de l'échantillon dans du tampon de broyage, du NaCl 0.25%, de l'eau ultra-pure, ou de l'eau peptonée ; suivi du prélèvement et de la filtration du jus obtenu, avant immersion de 2µl dans le mélange réactionnel LAMP
- Broyage de l'échantillon dans du tampon de broyage, du NaCl 0.25%, de l'eau ultra-pure, ou de l'eau peptonée ; suivi de l'utilisation d'un outil d'échantillonnage (disque whatmann ou écouvillon) pour prélèvement et l'immersion dans le mélange réactionnel LAMP
- Prélèvement de sève de tige de tomate, ou de pulpe de fruit de tomate avec une seringue + aiguille et immersion de 2µl obtenu dans le mélange réactionnel LAMP
- Trempage sans broyage de l'échantillon dans 1ml d'eau ultra pure et prélèvement de 2µl de solution pour immersion dans le mélange réactionnel LAMP

Les résultats des quatre premiers protocoles étaient décevants (faux positifs). Par exemple, la sève des tiges et la pulpe des fruits, en raison probablement de leur acidité, interfère avec les changements de couleur et induisent des faux positifs. Le dernier protocole testé donne satisfaction en l'état pour les prélèvements de pétiole, de limbe foliaire frais et sec, et de racine ; et avec une dilution au 10^{ème} de la solution obtenue pour les fruits vers et rouges.

Le seuil de détection de ce protocole (avec dilution pour les fruits verts et rouges) et sans dilution (pour les pétioles, folioles, et racines) se situe entre 10⁴ et 10⁵ CFU/ml. A titre de comparaison, les résultats de nos expérimentations montrent que le seuil de détection des tests bandelettes ImmunoStrips Agdia se situe entre 10⁶ et 10⁷ CFU/ml. Ainsi, le protocole mis au point dans le cadre de ce projet pour la détection de Cmm sur la base d'échantillons de plantes est non seulement spécifique (au contraire des tests bandelettes), mais aussi beaucoup plus sensible.

Choix final de la colorimétrie et bilan

Sur la base de l'ensemble de ces expérimentations, le kit de détection à base de Phenol Red a été retenu. Les résultats sont en effet légèrement plus fiables avec ce kit, et la lecture des résultats est plus facile en raison des couleurs plus tranchées.

L'ensemble des études menées depuis le début du projet CLAVINNOV a permis de mettre au point et de rédiger 7 nouveaux protocoles standardisés selon les formats Management Qualité Recherche au sein de l'unité INRAE Pathologie végétale. Ces protocoles visent :

- la préparation d'un milieu gélosé non sélectif (YPGA) et semi-sélectif (MBCT) pour la croissance de Cmm en boîte de Petri (N=2 protocoles)
- la détection de l'ensemble des sous-espèces de l'espèce de bactéries *Clavibacter michiganensis* par PCR (N=1 protocole)
- la détection de la sous-espèce *Clavibacter michiganensis susp. michiganensis* (Cmm) par PCR et LAMP (N=2 protocoles)
- Le traitement d'échantillons issus de plantes et de surfaces inertes pour un test de détection LAMP (N=2 protocoles)

3. Transfert de l'outil pour la détection de Cmm sur le terrain (Action 2), identification sur le terrain de sources d'inoculum primaire et évaluation de l'efficacité de méthodes de détection (Action 3)

3.1 Suivi des contaminations en production

Un recensement des cas de Cmm a été réalisé entre 2018 et 2020 au sein du réseau de producteurs suivis par l'APREL, les CETA et l'OP PARDI. Le but de ce recensement était de réaliser un état des lieux de la situation épidémiologique, de cerner des origines de contamination commune, de décrire les pratiques de gestion des producteurs confrontés à ce bioagresseur et d'identifier des parcelles à risques pour les suivis envisagés dans le projet.

	Nombre de tests bandelettes réalisés à l'APREL	Sol	Hors-Sol		Total
			Recyclage de l'eau (désinfection)	Sans recyclage	
2018	10	2	3	3	8
2019	6	0	3	0	3
2020	9	2	3	0	5
2021	7	1	0	0	1
2022	6	0	3	0	3

Tableau 2: Effectifs des parcelles recensées Cmm en fonction du mode de production

Les 20 parcelles recensées sont réparties dans toute la région. Tous les modes de production sont concernés par la problématique du Cmm (Tableau 2), aussi bien en cultures en sol qu'hors-sol avec ou sans recyclage des eaux de drainage. On constate cependant un problème plus fréquent dans les serres hors-sol. Le recyclage avec désinfection des solutions étant une technique majoritaire aujourd'hui, on ne peut pas avancer que les contaminations de Cmm sont plus nombreuses avec le recyclage.

Sur toutes les parcelles identifiées entre 2018 et 2022, la diversité du matériel végétal concerné ne permet pas d'identifier des origines de contamination : 10 variétés commerciales et 2 variétés de porte-greffe issues de 6 sociétés semencières, les plants provenant de plusieurs pépiniéristes.

Les symptômes apparaissent tout au long de la saison à partir des premières récoltes sur des périodes ensoleillées où la plante est en demande : plutôt en mars-avril en culture hors-sol et en milieu d'été pour le sol. Le flétrissement est presque systématiquement observé, souvent accompagné de nécroses foliaires et/ou de vitescence des fruits. En 2020, il y a eu un cas avec des symptômes atypiques : affaiblissement de plante, perte de calibre mais pas de flétrissement marqué.

Les intensités de contamination sont variables :

- 18 parcelles avec moins de 1% des plantes atteintes, souvent moins de 50 plants (foyers)
- 2 parcelles avec une forte contamination : 20 et 50% de plantes atteintes à l'échelle de l'unité de culture (taux inférieur à l'échelle de l'exploitation)

Les mesures de prophylaxie fréquemment mentionnées sont les suivantes :

- Désinfection, avec différents produits cités : Désorgerm, Virkon, Javel, Ammonium quaternaire
- Vide sanitaire

Suite à l'observation de symptômes, les principales actions mises en œuvre sont les suivantes :

- Arrachage des plants malades et des 2 plants adjacents (mis en sac et évacués de la parcelle)
- Balisage de la zone avec de la rubalise et isolement
- Travail dans la parcelle touchée en dernier dans la journée
- Désinfection des outils de taille ou sécateurs spécifiques à la zone touchée

Les mesures de prévention au moment de la sortie d'un foyer semblent être très bien appliquées par les producteurs (isolement, désinfection des outils, des mains, organisation du travail...). Les foyers sont assez bien contenus dans ces exploitations.

Cependant, toutes les exploitations recensées ont été touchées par Cmm avant 2018, démontrant la conservation de ce pathogène au fil du temps malgré les vides sanitaires.

3.2 Tests d'identification

Un test d'identification est fait dans seulement 50% des cas par les exploitants. Ce sont la plupart du temps des tests bandelette Agdia Biofords réalisés à l'APREL, et dans de rares cas un envoi dans un laboratoire. Les producteurs reconnaissent assez aisément les symptômes de la maladie et même sans confirmation, ils mettent rapidement en œuvre les mesures d'isolement des foyers.

Sur les 5 ans considérés, 6 à 10 tests/an sont réalisés à la demande des conseillers sur des échantillons avec des suspicions de Cmm provenant de cultures de la région. Un peu moins de la moitié se révèlent positifs. Les résultats négatifs correspondent à d'autres pathogènes ou une détection insuffisante.

Ainsi, en 2021, un échantillon est décelé négatif par bandelette mais a été analysé positif en laboratoire. Inversement en 2019, après étêtage en fin de culture le test se révèle très positif (ligne Cmm très marquée) et une contre analyse en laboratoire (Vegepolys) apporte un résultat négatif. L'utilisation des tests bandelettes se montre utile mais le risque de faux positifs et de faux négatifs existe bien, tel que démontré au laboratoire.

La notice des bandelettes signale un risque de faux positifs avec une réaction sur des polysaccharides extracellulaires communs à d'autres bactéries, ce qui a été confirmé par les résultats des expérimentations menées au laboratoire d'INRAE. Les bactéries concernées ne sont normalement pas pathogènes des plantes et présentes dans le sol.

3.3 Prélèvement d'échantillons

Prélèvements d'échantillons de plantes sur foyers 2019-2020, avant disponibilité du test LAMP

Un protocole de prélèvement d'échantillons a été défini au sein du projet en 2018. Durant les premières années du projet, l'outil de détection Cmm n'était pas suffisamment avancé pour commencer une utilisation sur le terrain. Cependant, plusieurs prélèvements ont été réalisés en 2019 et 2020 pour être analysés ultérieurement dans les laboratoires d'INRAE et répondre aux questions des professionnels sur cette maladie. Les échantillons ont été congelés et analysés par l'INRAE avec la méthode LAMP en 2021

Une parcelle à St Martin de Crau a été échantillonnée le 11 avril 2019. Au total 9 plantes ont été prélevées sur 2 variétés différentes et dans des zones graduelles autour des foyers. Sur chaque plante, 5 échantillons sont obtenus : feuille supérieure, feuille médiane, feuille basse, fruit mûr et morceaux de racines. Les 47 échantillons ont été remis à INRAE le jour des prélèvements pour congélation.

⇒ Résultats : tous les échantillons sont ressortis négatifs.

Une parcelle à Entressen (cas le plus grave de 2020) a été échantillonnée le 13 janvier 20. Le nombre d'échantillons a été volontairement réduit par rapport au protocole initial du fait de contraintes de stockage et d'analyse à INRAE. Les volumes de matière végétale ont aussi été réduits pour éviter un encombrement inutile et un sous-échantillonnage à l'INRAE. Au total 5 plantes ont été prélevées dans des zones graduelles autour des foyers. Un total de 23 échantillons sont obtenus avec prélèvement de différents organes : feuille supérieure, feuille médiane, feuille basse, fruit mûr et morceaux de racines.

⇒ Résultats : Deux échantillons sont ressortis positifs, un sur feuille et un sur racine, correspondant à une même plante. Cette plante était située dans un très petit foyer de la variété Climberley et ne présentait pas de symptôme, alors que d'autres prélèvements ont été faits sur des gros foyers avec symptômes et sont ressortis négatifs.

Une autre parcelle a été échantillonnée à Mallemort en 2020 avec des symptômes atypiques (affaiblissement de plante, perte de calibre, mais pas de flétrissement marqué) sur une plante en distinguant 3 organes (feuille, tige, fruit). Tous les échantillons ont été remis à l'INRAE le jour des prélèvements pour congélation.

⇒ Résultats : tous les échantillons sont ressortis négatifs en LAMP Cmm.

Interprétation

L'opposition des résultats majoritairement négatifs sur des cas de contamination marquée est surprenante. La longue conservation des échantillons au congélateur -20°C a peut-être abouti à une moindre efficacité de détection. Cette conservation a également sans doute réduit la viabilité des cellules bactériennes au sein des échantillons ainsi donc que les probabilités de détection de Cmm sur la base de cultures en milieu gélosé en boîte de Petri. Ces résultats pointent néanmoins vers la question de la distribution homogène ou hétérogène de Cmm *in planta* au sein de différents organes et étages foliaires. Cette question pourra être abordée au gré d'un stage de Master 2 en 2023 dont le financement a été obtenu auprès du Gis PicLég.

Prélèvements d'échantillons de plantes sur foyers en 2022 avec utilisation du test LAMP

En 2022, trois séries d'échantillons prélevés sur le terrain ont été analysés avec le protocole LAMP élaboré par INRAE.

Le 31 Janvier 2022, les collègues d'INRAE et de l'APREL se sont conjointement rendus dans une serre à Montfavet qui présente un historique de foyers d'infection lors de précédentes années, et ce souvent au même endroit de la serre. Le producteur a rapporté avoir été très vigilant pour les procédures de décontamination des structures de la serre pour éviter tout réservoir d'inoculum en intersaison avant l'installation des plants en décembre 2021. Les prélèvements ont été réalisés sur surface inerte et sur plantes dans une zone restreinte de la serre, où des foyers émergent fréquemment.

- 30 échantillons ont été collectés sur 5 types de surfaces inertes (bâche plastique, poteaux métalliques, ficelle, verre, goutteur plastique) à raison de 5 échantillons par surface.
- 30 échantillons de plantes (pétiole et limbe foliaire) ont également été collectés, sur 5 plantes à raison de 6 échantillons par plante.

Les tests LAMP ont été effectués l'après-midi même dans les locaux de l'APREL, ce qui a permis un transfert de savoir-faire pour la technique de détection en LAMP. Les premiers résultats ont révélé beaucoup de faux positifs. Après vérifications ultérieures au sein du laboratoire INRAE, seuls trois des échantillons prélevés sur surface inerte ont donné lieu à une détection positive en LAMP, ce qui n'a pas été confirmé par la mise en culture de ces échantillons sur milieu MBCT en boîte de Petri. Aucun des échantillons de plantes ne s'est révélé positif.

Cette expérience a conduit aux informations suivantes :

- l'identification de la nécessité d'utiliser un incubateur doté d'un couvercle dont la température peut être réglée à 90/95°C (tel que décrit plus haut).
- Une hypothèse possible que l'ADN de Cmm peut être détecté, mais que celui-ci n'est pas systématiquement inclus au sein de cellules bactériennes vivantes ou cultivables.

Le 07 février 2022, des échantillons ont été collectés dans une serre à Monteux chez un producteur qui a aussi été confronté dans le passé à des foyers d'infection de Cmm. Un total de 60 échantillons a été collecté selon un protocole similaire à celui appliqué le mois précédent à Montfavet.

- 6 échantillons ont été prélevés sur chacune des 5 types de surfaces inertes (bâche plastique, tuyau plastique, goutteur, métal de poteaux et de supports de culture),
- 6 échantillons ont été collectés sur chacune de 5 plantes sans symptômes.

En attendant d'avoir résolu le problème de bain sec, les tests ont été réalisés dans les locaux d'INRAE, avec la contribution des membres de l'APREL pour un plus ample apprentissage des manipulations.

L'ensemble des échantillons sur surfaces inertes ont conduit à un résultat négatif.

Cinq échantillons, issus de trois plantes différentes ont conduit à un résultat positif ou légèrement douteux. Deux répétitions de tests LAMP sur ces échantillons positifs ou douteux ont permis de confirmer seulement très partiellement ces résultats.

L'hypothèse pour expliquer ces résultats est la possible faible taille de populations de Cmm au sein des plantes et donc une faible quantité de bactéries au sein des échantillons. Ainsi, le manque de reproductibilité peut s'expliquer si cette quantité de bactéries se situe autour du seuil de détection mis en évidence pour notre protocole (3.7×10^4).

Le 30 juin 2022, des échantillons ont été collectés dans le même serre à Monteux, uniquement sur plantes cette fois en raison de l'apparition d'un foyer d'infection. Les plantes symptomatiques étaient localisées dans la partie de la serre non traitée préventivement avec le Rise P.

- 60 échantillons de plantes ont été prélevés sur 5 plantes symptomatiques (dans la partie non traitée) et sur 5 plantes sans symptômes (dans la partie traitée), à raison de 6 échantillons par plante.

Les tests LAMP ont été réalisés dans les locaux de l'APREL avec un nouveau bain sec doté d'un couvercle chauffant. Tous les échantillons prélevés sur plantes sans symptômes se sont révélés négatifs. Seuls deux des échantillons prélevés sur des plantes dans la zone contaminée ont rendu un résultat positif et douteux.

Un test Agdia effectué sur un de ces échantillons s'est révélé positif.

Par la suite, des étalements sur milieu gélosé ont été faits dans les laboratoires d'INRAE sur la base de ces échantillons douteux. Les colonies ne ressemblaient pas à Cmm. La comparaison des séquences d'ADN montre des similitudes avec *Agromyces tumefasciens*, *Curtobacterium sp.* et dans un autre cas avec *Cm subsp insidiosus*.

Compte-tenu du manque de spécificité du test Agdia démontré au sein d'INRAE, une hypothèse possible est que le foyer d'infection ait été causé par une autre bactérie que Cmm. La question de l'identité de l'agent pathogène responsable des symptômes observés en serre reste donc ouverte et fait l'objet d'une recherche de financement pour poursuivre les investigations sur le terrain.

4. Evaluation des méthodes de protection (Action 4)

Une première liste de produits qui pourraient être utilisés en culture de tomate avec une action intéressante sur Cmm été réalisée par l'APREL à partir de la bibliographie disponible et des homologations sur le site e-phy. Sont listés des produits à base de :

- *Bacillus amyloliquefaciens* avec une AMM phyto en culture de tomate
- *Bacillus amyloliquefaciens* dans la catégorie MFSC
- *Bacillus subtilis*
- cuivre
- l'acide tartrique est aussi évoqué avec des essais en cours en arboriculture et melon

Les essais en production sont compliqués à mettre en place du fait de la contamination très aléatoire du pathogène à l'échelle d'une parcelle. Un dispositif avec 2 modalités dans une serre "zone témoin non traitée" // "zone traitée" n'est pas judicieuse. En effet, si le Cmm est présent dans la zone témoin et pas dans la zone traitée, il est difficile de conclure à un effet du traitement ou une contamination localisée. Inversement, si le Cmm n'est pas présent dans la zone témoin, on ne peut pas conclure qu'il y ait eu absence de Cmm dans la zone traitée ou présence de Cmm contrôlée par le traitement.

L'ambition dans cette action était d'utiliser l'outil de détection LAMP de Cmm dans les essais sans nécessairement se baser sur les symptômes, et d'en suivre les évolutions suite au traitement choisi.

Cependant, il n'a pas été possible de mettre en œuvre cette action en 2020 comme prévu : lors de la plantation des cultures en novembre 2019, les travaux sur l'outil de détection n'étaient pas suffisamment avancés pour le permettre. A l'automne 2020, il en est de même suite au confinement COVID du printemps. Néanmoins les partenaires du projet (chercheurs et CDD d'INRAE, ingénieur et stagiaire de l'APREL) se sont mobilisés pour avancer dans cette action en engageant des tests en conditions de laboratoire avec les produits déjà sélectionnés.

4.1 Tests de produit de biocontrôle et de désinfection *in vitro* au laboratoire (INRAE)

Différents protocoles ont été mis au point et utilisés pour l'évaluation de l'effet d'inhibition de la croissance de Cmm par plusieurs produits de biocontrôle et de désinfection. Les produits choisis figurent dans les tableaux ci-dessous

Produits de protection

Produit	Matière active	AMM	Données produit (e-phy)	Doses testées
AMYLO-X CERTIS	<i>B. amyloliquefaciens ssp plantarum</i> souche D747 50 x10 ⁹ UFC/g Poudre mouillable	AMM phyto Oïdium, pourriture grise et sclerotiniose	Nb 6 applications (7j), BBCH min 10-max89, DAR 1j, 2.5 kg/ha	25 et 150 mg / 10 mL
SERENADE Max BAYER	<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713 15.67% m/m.	SDN Bacteriose et pourriture grise	Nb 8 applications, DAR 1j, 2 kg/ha	20 et 100 mg / 10 mL
RHAPSODY BAYER	<i>Bacillus subtilis</i> Souche QST 713 (1x10 ⁹ UFC/g)	SDN Bacteriose et pourriture grise	Nb 6 applications, DAR 1j, 8L/ha	80 microL /10 mL
RISE P ALLEMAND Plant Care	<i>B. amyloliquefaciens</i> souche IT45 20x10 ⁹ UFC/g Poudre mouillable	AMM MFSC	200 g/ha	16 et 100 mg /10mL
	Acide tartrique	Substance de base		2.5, 5, 7.5, 10 g/L
Bouillie bordelaise	Cuivre	Substance de base	20 kg/ha	2.5, 5, 7.5, 10 g/L

Produits de désinfection

Produit de désinfection	Matière active	Doses	Temps testés
Eau de javel	9.6% chlore actif	2.6% et 5%	30 s, 2 min , 5 min
Aniospray 29	226 mg/g ethanol + autres	pur	30 s, 2 min , 5 min
Aniospray Quick	550 mg/g ethanol + autres	pur	30 s, 2 min , 5 min
Deterg'anios	0 mg/g ethanol + agents abcteriostatiques et fongistatiques + autres	pur	30 s, 2 min , 5 min
Acide tartrique	Acide tartrique C ₄ H ₆ O ₆	2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 g/L	15 min, 30 min, 60 min
Acide lactique	Acide lactique C ₃ H ₆ O ₃	3,2 ; 10 et 30 g/L	30s, 1.5 min, 5 min
Menno florades	Acide benzoïque	1% et 2%	3 min, 4h
Enno rapid	Alcool denaturé + acide benzoïque et citrique	pur	30s, 5 min
Desogerme sp.vegetaux	Chlorure d'alkyl dimethyl benzyl ammonium Chlorhydrate de polyhexamethylene biguanide	1%	15 min
Desogerme microserre	Glutaraldehyde Chlorure d'alkyl dimethyl benzyl ammonium Chlorure de didecyl dimethyl ammonium	0.25% et 3%	5 min
Huwa san	Peroxyde d'hydrogene + particules d'argent	5 ppm et 100 ppm	5 min, 30 min et 2h
Virkon	Peroxymonosulfate de pentapotassium + autres	pur	10 min et 30 min

Ces essais ont été réalisés in vitro (boite de Petri, et microtube), ce qui ne permet pas nécessairement d'extrapoler les résultats et de prédire leur efficacité en situation de terrain.

En résumé, ces expérimentations ont permis de montrer que :

- La bouillie bordelaise induit un effet inhibiteur sur la croissance de Cmm, et ce de façon de plus en plus efficace en fonction d'une concentration croissante de bouillie bordelaise (de 2.5 à 10g/L, et d'un temps plus long d'incubation avec les bactéries (au-délà de 30 min).
- Les produits AmyloX, Rapsody, RiseP, et Serenade Max inhibent la croissance de Cmm de façon plus efficace pour des concentrations de 150mg/10ml, 80µl/10ml, 16 ou 100 mg/10ml, et 100mg/10ml ; respectivement.
- Les produits de désinfection suivants induisent un effet bactéricide total pour Cmm aux concentrations et temps d'incubation cités :
 - eau de javel (2.6%, 30s)
 - aniospray 29 et aniospray quick (pur, 30s)
 - acide tartrique (10g/L, 60min)
 - acide lactique (10g/L, 30s)
 - Menno Florades (1%, 3min)
 - Enno Rapid (pur, 30s)
 - Désogerme Microserre (5min, 0.25%)
 - Désogerme végétal (15min, 1%)
 - Virkon Greenhouse (pur, 10min)
 - Huwa San (2h, 100ppm).
- Le produit de désinfection Deterg'anios sans ethanol n'est pas efficace à 100% et peut se contaminer rapidement avec différents micro-organismes.

Des expérimentations d'applications de produits de biocontrôle sur plantes suivie d'inoculations de Cmm sont prévues en 2023 dans le cadre d'un stage de Master 2 financé par le Gis Piclé de façon à évaluer l'efficacité préventives de ces produits *in planta*.

4.2 Test de produit de biocontrôle en serre de production (APREL)

Des essais en conditions de production ont été mis en place par l'APREL malgré la difficulté liée à la contamination très aléatoire du pathogène à l'échelle d'une parcelle. Dans une parcelle homogène (serre hors-sol, même variété et date de plantation), le dispositif permet de différencier une partie de la parcelle traitée et une autre partie non traitée. Les observations sont réalisées sur l'apparition de symptômes de Cmm.

- Si le Cmm n'est pas observé, il n'est pas possible de conclure à l'efficacité du traitement.
- Si le Cmm est observé dans la modalité témoin, cela ne garantit pas l'efficacité du produit testé dans l'autre modalité car la contamination n'est pas garantie dans les 2 modalités
- Si le Cmm est observé dans la parcelle traitée, il est possible de conclure à une insuffisance d'efficacité du produit testé, mais sans comparaison possible avec une parcelle témoin contaminée.

En 2021, deux sites sont choisis parmi les sites identifiés comme sensibles depuis le début du projet. Il s'agit de cultures de tomates hors-sol plantées mi-Novembre 2020.

Site 1 : Montfavet, variété grappe Axii, bloc de 2500 m² (1250 m² traité)

Site 2 : Mallemort, variété grappe Clyde, bloc de 7000 m² (3500 m² traité)

Le produit choisi est Rise P (Lallemand Plant care) à base de *Bacillus amyloliquefaciens*. Ce produit avait donné des résultats intéressants dans les tests en boîte de Petri en 2020 (INRAE) à 16 ou 100 mg/10mL.

Les parcelles d'essai reçoivent chacune des applications mensuelles au goutte à goutte du produit Rise P à partir du mois de janvier (applications préventives) à la dose de 200 g/ha.

Dans les 2 cas de figure, aucun symptôme de Cmm n'a été observé. On se trouve donc dans la situation où aucune conclusion n'est possible. Le résultat est cependant positif dans la mesure où ces parcelles sont connues pour être sensibles aux attaques de Cmm et n'ont pas été touchées.

Il semble que dans les 2 cas, la désinfection pendant le vide sanitaire ait été renforcée, ce qui peut certainement expliquer l'absence de Cmm. Sur le site 1 notamment les goutteurs ont été nettoyés à la javel de manière approfondie (brossage et trempage des piques)

En 2022, cet essai a été renouvelé dans une serre à Montoux plantée en janvier 2022. Bloc de 5000 m² dont la moitié est traitée avec Rise P (3 applications préventives à 200 g/ha en avril mai et juin 2022). Des plantes symptomatiques ont été observées mi-juin uniquement dans la modalité témoin. Des échantillonnages ont pu être effectués avec l'INRAE sur les foyers mais les tests LAMP n'ont pas permis de confirmer la présence de Cmm (cf. ci-dessus 3.3). Cet essai n'apporte pas non plus de conclusion sur l'efficacité des applications de Rise P dans la prévention et le contrôle de Cmm en culture de tomate.

6. Communication

Le projet a été labellisé par le GIS PIClég et permet une reconnaissance de sa valeur scientifique et de sa portée pour la filière Fruits et Légumes. En termes de communication, le logo PicLég est apposé à chaque présentation du projet.

6.1. Communications écrites

Sites internet et newsletter

- Description du projet sur les sites internet de l'APREL et de la Chambre Régionale (2018, 2019)

Articles dans la presse agricole

- 3 articles dans Cultures Légumières :
 - o 2019, N°171 p10
 - o 2021, n°183, p22
 - o 2022, n°188, p28-29
- Article dans Vaucluse Agricole 2022, n°2817, p9

Articles et publications techniques

- Flyer de présentation du projet (2018) distribué aux producteurs lors des journées techniques et réunions de partenaires de l'APREL
- Un protocole sanitaire a été rédigé par l'APREL, la Chambre d'agriculture 13 et le SRAL pour gérer les maladies de la tomate qui se transmettent par contact dans les serres de production de tomate. Initialement orienté pour le virus ToBRFV, il inclut le Cmm avec des conditions de transmission comparables (août 2019)

- Informations sur le projet dans le BSV Tomate PACA (2018, 2019, 2020, 2021)
- Article dans le 13'Maraîchage : n°74, nov-déc 2022, pp.6-9

Articles scientifiques

- Publication dans une revue scientifique internationale à comité de lecture en cours d'écriture.

6.2. Communications orales

Expérimentateurs et scientifiques

- Présentation aux journées PICLég le 21 et 22 Novembre 2019 à Lyon par l'APREL.
- Poster présenté aux Rencontres plantes-bactéries, Aussois, mars 2023 *LAMP based tools for the in situ detection of Clavibacter michiganensis subsp michiganensis in tomato productions*

Conseillers et producteurs

- Présentation du projet au Conseil d'administration de l'APREL, 29 novembre 2017
- Présentation lors d'un tour de plaine avec les producteurs du groupe Rougeline, juin 2018
- Présentation lors de la commission phytosanitaire du 5 juillet 2018
- Réunion de concertation technique sur l'outil en visioconférence le 26/03/21 : 13 participants
- Présentation des résultats du projet au Café technique du 21/06/22 : 32 participants
- Présentation des résultats à l'Assemblée Générale de l'APREL, 28 mars 2023