



HAL
open science

Evaluation (et Gestion) des risques sanitaires bactériens liés aux itinéraires culturaux de la pomme de terre et d'autres cultures spécialisées

Y. Le Hingrat, Valerie Hélias, Anne-Claire Le Roux, Gilles Cellier, Philippe Prior, C. Rivoal, F. Poliakoff, H. Soubelet, M. Moreau, V. Deveaux, et al.

► To cite this version:

Y. Le Hingrat, Valerie Hélias, Anne-Claire Le Roux, Gilles Cellier, Philippe Prior, et al.. Evaluation (et Gestion) des risques sanitaires bactériens liés aux itinéraires culturaux de la pomme de terre et d'autres cultures spécialisées. *Innovations Agronomiques*, 2012, 25, pp.253-267. hal-01208601

HAL Id: hal-01208601

<https://hal.science/hal-01208601>

Submitted on 29 May 2020

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

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



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

Evaluation (et Gestion) des risques sanitaires bactériens liés aux itinéraires culturaux de la pomme de terre et d'autres cultures spécialisées

Le Hingrat Y.¹, Hélias V.^{1,2}, Le Roux-Nio AC.^{1,2}, Cellier G.^{3,4}, Prior P.³, Rivoal C.⁴, Poliakov F.⁴, Soubelet H.⁴, Moreau M.^{5,6}, Deveaux V.⁶, Latour X.⁵, Gaucher D.⁷, Benigni M.⁸, Martinon V.⁹

¹ FN3PT (Fédération Nationale Producteurs Plant Pomme de Terre), 43-45, rue de Naples, 75009 Paris

² INRA (UMR 1349 IGEPP-) BP 35327, 35653 Rennes-Le Rheu

³ CIRAD / INRA La Réunion - UMR C53 PVBMT - 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre

⁴ ANSES-LSV (Laboratoire Santé des Végétaux), Unité bactériologie, 7, rue J. Dixméras 49144 Angers

⁵ PRES Normand – Université de Rouen LMSM (Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement EA 4312) - 55 rue Saint Germain 27000 Evreux

⁶ COMITE NORD Plants de Pomme de Terre / SIPRE, rue des Champs Potez, 62217 Achicourt

⁷ ARVALIS-Institut du végétal - Station expérimentale, 91720 Boigneville

⁸ APEF (Association des Producteurs d'Endives de France)/ FNPE - Station expérimentale, 62000 Arras

⁹ Force A – Centre universitaire Paris sud, bat.203, 91405 Orsay

Correspondance : yves.lehingrat@fnpppt.fr

Résumé

Ce programme s'est articulé autour d'actions visant à évaluer et donner des éléments de gestion des risques sanitaires concernant deux maladies bactériennes (pourriture brune et jambe noire dues respectivement à *Ralstonia solanacearum* et *Pectobacterium/Dickeya spp.*) qui constituent une menace importante pour de nombreuses cultures, comme la pomme de terre et d'autres cultures spécialisées. D'importants travaux méthodologiques ont permis de comparer différents outils phénotypiques (sérologiques, biologiques) et moléculaires de détection de ces bactéries et de sélectionner des méthodes adaptées selon la matrice testée (plantes, eau ou sol). Le projet a permis aussi de conduire des études sur la diversité des souches bactériennes émergentes et leur épidémiologie pour mieux comprendre les conditions de survie de ces pathogènes dans l'environnement, ainsi que d'explorer des méthodes innovantes de lutte ciblant la virulence ou de décontamination.

Mots-clés : bactérioses, caractérisation (ou diversité), analyse de risque phytosanitaire, itinéraires culturaux, irrigation, outils de détection, pomme de terre, endive

Abstract: Tools for risk assessment and control of phyto bacteria on specialised crops (potato, chicory)

This project aimed at developing tools for the risk assessment and control of two bacterial diseases (bacterial wilt and blackleg due to *Ralstonia solanacearum* and *Pectobacterium/Dickeya spp.*) which constitute important threats for numerous crops, such as potato and other specialized crops. Methodological studies made it possible to compare various serological and molecular detection tools and to select methods depending on the matrix (plants, water or soil). The project also studied diversity of emergent bacterial strains, ran epidemiological survey of the bacteria survival in the environment, and investigated innovative methods for control or decontamination.

Keywords: phytobacteria, diversity studies, phytosanitary risk assesment, crop management, irrigation, detection, potato, chicory (witloof)

Introduction

Contexte du projet

Le projet a été construit autour de deux maladies bactériennes qui constituent une menace importante pour de nombreuses cultures, dont des Solanacées comme la pomme de terre ou la tomate, mais aussi d'autres cultures légumières telles l'endive. L'importance économique peut être considérable pour la profession agricole, justifiant la mise en place d'importants travaux de recherche et de développement pour améliorer les outils de détection et de caractérisation des agents responsables et acquérir des connaissances sur l'épidémiologie de ces maladies afin de développer de nouvelles méthodes de lutte.

A ce titre, la bactérie *Ralstonia solanacearum*, responsable du flétrissement bactérien et de la pourriture brune constitue une menace sérieuse dans le monde pour la plupart des cultures de Solanacées, et notamment la pomme de terre, la tomate et le tabac, mais aussi sur un très grand nombre d'autres espèces hôtes (Cellier, 2010). Le complexe d'espèces *R. solanacearum* produit un flétrissement bactérien chez plus de cinquante familles botaniques et sévit de façon endémique en zones tropicale et inter-tropicale. Les pertes potentielles induites par cette bactérie ont conduit à la classer en organisme de quarantaine en Europe et à la considérer comme «Bioterrorism Select Agent» aux États-Unis. Les mesures préventives adoptées en France entraînent des coûts importants de destruction des lots, analyses, renouvellement des souches, etc. pour chacun des foyers découverts sur notre territoire.

Les bactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, largement répandues dans toutes les zones de production et responsables de pourritures molles de tiges, tubercules ou racines sur diverses cultures comme la pomme de terre ou l'endive, provoquent d'importants dégâts en refus ou déclassements des cultures de plants de pomme de terre, pertes de rendement et pourriture de lots (Toth et al, 2011). Aux Pays-Bas, les pertes dues à ces bactéries ont été multipliées par 5 entre 2002 et 2007 pour passer à près de 30 millions d'euros pour la pomme de terre et 15 millions d'euros pour les bulbes à fleur. En France, entre 50 et 400 hectares de plants sont refusés chaque année pour «jambe noire», sans compter les autres pertes causées par les *Pectobacterium* / *Dickeya* sur plants (déclassements, litiges à destination, renouvellement de plant, incidence variétale, mesures prophylactiques...), mais aussi les pertes dans le secteur consommation ou transformation. Pour d'autres cultures légumières ou ornementales sensibles à ces bactérioses, l'incidence peut aussi être significative et atteindre dans certaines conditions plus de 50% de pertes et 90% de racines infectées pour des cultures comme l'endive.

Objectifs poursuivis

Comme il n'existe aucune méthode directe de lutte contre les bactéries phytopathogènes, il est important d'éviter leur introduction, leur installation éventuelle dans l'environnement et si nécessaire, leur dissémination à l'échelle du territoire et/ou de l'exploitation. Les principaux objectifs du projet sont donc d'apporter des éléments précis permettant d'évaluer et de gérer les risques sanitaires bactériens liés aux sources potentielles de survie et de contamination dans l'environnement (systèmes aquatiques, sol et substrats, plantes-hôtes). Ce programme s'est articulé autour de quatre types d'actions:

- amélioration et développement de nouveaux outils de détection de ces bactéries dans l'eau et les plantes hôtes et le sol et de la connaissance de la diversité des souches bactériennes émergentes ;
- études épidémiologiques sur les conditions de survie des bactéries dans l'environnement ;

- recherche de méthodes innovantes de lutte ou de décontamination d'eaux et de matériels ;
- actions complémentaires comme l'étude de capteurs de mesure de métabolites produits en réponse à une infection pour mieux comprendre l'origine des contaminations.

Ce projet a permis d'élargir un réseau déjà constitué autour de différents partenaires de la recherche (INRA Rennes, CIRAD-INRA La Réunion, Université de Rouen-LMSM), d'organismes officiels et de surveillance phytosanitaire (Anses-LSV, FN3PT/SOC), d'instituts techniques et organisations professionnelles (FN3PT et ses établissements régionaux, APEF, ARVALIS, GNIS) ou de sociétés innovantes (Force-A) en s'attachant à aborder les différents éléments de gestion des risques bactériens.

1. Détection et analyse de la diversité des souches bactériennes

La première action du programme a consisté à évaluer et améliorer des outils de détection des bactéries *Ralstonia solanacearum* et *Dickeya/Pectobacterium sp.* dans l'eau, les plantes hôtes et le sol et à étudier la diversité des souches bactériennes émergentes.

*1.1. Outils de détection de *Ralstonia solanacearum* dans l'environnement*

Un objectif important du projet était le développement d'outils de détection adaptés pour conduire les études épidémiologiques et évaluer les risques liés à ces maladies bactériennes. Un important travail méthodologique a donc été réalisé sur la détection de *R. solanacearum* dans des matrices complexes.

1.1.1. Constitution d'une collection de souches bactériennes :

Une collection de souches a été mise en place en partenariat entre le CIRAD, le LNPV (Anses-LSV) et l'INRA-FN3PT, avec une collection de travail de référence couvrant la diversité génétique de *R. solanacearum* et une « core-collection » plus restreinte pour l'évaluation d'outils de détection.

1.1.2. Evaluation des outils (amorces et sérums) sur souches pures :

Une évaluation des réactifs sérologiques et moléculaires décrits dans la littérature ou couramment utilisés en détection a été réalisée par l'INRA-FN3PT et le LNPV sur six couples d'amorces PCR et six sérums polyclonaux, en testant leur sensibilité sur des souches listées dans la directive européenne 2006/63/CE ainsi que sur les 30 souches de la Core-collection, leur spécificité ainsi que leur seuil de détection. Les sérums évalués ont présenté une spécificité comprise entre 88 et 100% et peuvent être utilisés en immunofluorescence pour la détection de *R. solanacearum* sur plantes. Les caractéristiques des amorces PCR évaluées sont synthétisées dans la Figure 1.

Cette étude a permis de mieux connaître la performance des amorces les plus couramment utilisées. Ainsi, des amorces comme Y2-OLI, présentant le meilleur seuil de détection (750 fg à 75 pg/réaction PCR) et une sensibilité relative de 98,7 %, sont intéressantes pour la détection de *R. solanacearum*, mais leur moindre spécificité implique de confirmer les résultats positifs par d'autres couples d'amorces. Le choix des amorces doit se faire aussi en fonction de ce que l'on cherche à détecter ou identifier.

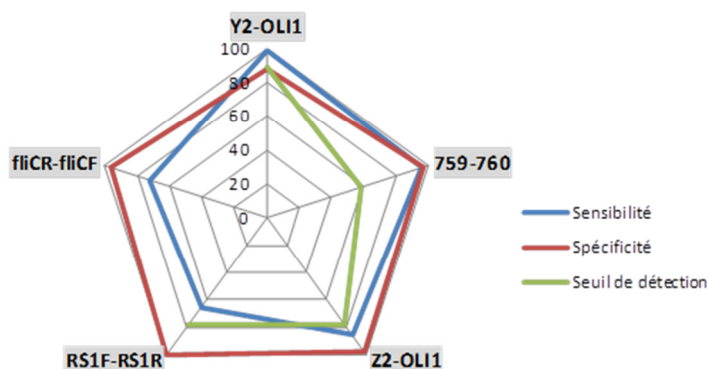


Figure 1: Evaluation de la sensibilité, la spécificité et le seuil de détection de différents couples d'amorces utilisés pour la détection et l'identification de *Ralstonia solanacearum*

1.1.3. Evaluation des méthodes de détection sur différents types de substrats:

L'étape suivante a consisté à évaluer divers protocoles de détection sur plusieurs types de substrats artificiellement contaminés afin de retenir la meilleure technique pour chaque milieu testé (eau, végétal, sol). L'efficacité de différentes méthodes d'extraction d'ADN et la capacité de différents adjuvants et traitements à éliminer le maximum de composés inhibiteurs de la PCR ont été testés. Les tableaux 1a à 1c illustrent une partie des résultats obtenus par la FN3PT (Le Roux, 2009) en fonction des matrices et méthodes utilisées :

Types de sols	Isolement SMSA	IF	CTAB	QIAmp	E + PCR
Limoneux	7.10^4	7.10^6	7.10^4	7.10^4	7.10^2
Argileux	7.10^3	7.10^7	7.10^5	7.10^5	7.10^2
Sableux	5.10^2	5.10^6	5.10^2	5.10^5	5.10^2

Tableau 1a : Seuils de détection des méthodes obtenus sur la matrice sol (en cfu/g de sol)

	Isolement sur SMSA	IF	CTAB	Easy DNA Kit	Dneasy Kit	E + PCR
100%	$1,5.10^4$	$1,5.10^6$	$1,5.10^5$	$1,5.10^5$	$1,5.10^3$	$1,5.10^3$
67%	-	-	$1,5.10^4$	-	-	-

Tableau 1b : Seuils de détection des méthodes obtenus sur la matrice eau

	IF	CTAB	Easy DNA Kit	Dneasy Kit	QIamp	E + PCR
100%	8.10^3	8.10^{3*}	8.10^2	8.10^3	8.10^3	8.10^1
67%	-	8.10^2	-	8.10^2	8.10^2	-

Tableau 1c : Seuils de détection des méthodes obtenus sur la matrice plante

Un classement des méthodes en fonction de leurs critères de performance (seuil de détection, exactitude relative, durée de mise en œuvre et coût) a été établi par le LSV, pour les différentes matrices (cf. exemple sol dans le Tableau 2), en retenant une exactitude relative minimale de 70% et un seuil de détection au moins équivalent à 10^4 à 10^3 ufc/ml (Dubois *et al*, 2009).

Extraction	Amorces	Critères de performance				
		Seuil de détection* (ufc / mL)	Exactitude relative* (%)	Rapidité* (Temps passé pour 48 échantillons)	Cherté* (Coût d'extraction par échantillon)	Facilité de mise en œuvre*
13. Easy-DNA kit	Oli1-Y2	$9,4.10^6 / 9,4.10^4$	52,7	7h30	1,5 €	7,6
14. Easy-DNA kit	759-760	-	16,7			
15. QIAamp DNA Mini kit	Oli1-Y2	$9,4.10^3 / 9,4.10^2$	70,4	7h30	3,2 €	6,5
16. QIAamp DNA Mini kit	759-760	$9,4.10^5$	27,8			
17. PowerSoil DNA Isolation kit	Oli1-Y2	$1,2.10^5 / 1,2.10^2$	74	6h30	12 €	7,7
18. PowerSoil DNA Isolation kit	759-760	-	16,7			
19. Wechter	Oli1-Y2	$2,3.10^6 / 2,3.10^4$	53,7	7h	1 €	7,9
20. Wechter	759-760	-	16,7			
21. CTAB	Oli1-Y2	$4,7.10^6$	24	7h30	0,6 €	2
22. CTAB	759-760	-	16,7			
23. Lyse thermique	Oli1-Y2	-	16,7	15min	0,1 €	10
24. Lyse thermique	759-760	-	16,7			

Tableau 2 : résultats synthétiques des extractions testées sur différents types de sol.

Le travail méthodologique réalisé a démontré qu'il n'existait pas de méthode idéale pour l'ensemble des matrices mais a permis de sélectionner des méthodes performantes pour la détection de *R. solanacearum* en fonction des différentes matrices. Deux protocoles présentant les critères de performance les plus élevés ont été retenus par le LSV pour la détection dans l'eau (extraction au Easy-DNA kit et amorces Oli1-Y2 / 759/760) ou dans le sol (QIAamp DNA Mini kit et mêmes amorces). La bio-PCR est une méthode très sensible pour la détection de *R. solanacearum* dans toutes les matrices testées dans cette étude, sous conditions que les bactéries soient vivantes. Ces travaux sont susceptibles de faire évoluer les méthodes officielles.

1.2. Diversité et caractérisation de *Ralstonia solanacearum* dans l'environnement

Un volet plus amont du projet a consisté à étudier la **diversité** génétique, phénotypique et phylogénique des souches de *R. solanacearum* provoquant le flétrissement bactérien de la pomme de terre, en vue de mieux cerner le potentiel évolutif de cette bactérie, et ainsi anticiper les prochains risques d'émergence et mettre en place des outils d'épidémiologie et des innovations en matière de diagnostic, en lien avec les enjeux considérables de cet organisme dans les échanges commerciaux.

1.2.1 Explorer la diversité génétique des souches pathogènes des Solanacées

Ces travaux ont fait l'objet d'une thèse réalisée à l'INRA/CIRAD de la Réunion (G. Cellier, 2010) ayant permis une caractérisation fine de la diversité d'une collection de souches, en ciblant en particulier les souches pomme de terre dites « froides » de *R. solanacearum* du phylotype IIB sequevar 1 et historiquement connue comme Race 3 biovar 2 (Brown rot). Le complexe d'espèces *R. solanacearum* est constitué de quatre phylotypes, globalement bien corrélés avec l'origine géographique des souches

(Figure 2). Chaque phylotype est lui-même subdivisé en sequevars, dont certains sont corrélés à des caractéristiques écologiques (Prior, 2005).

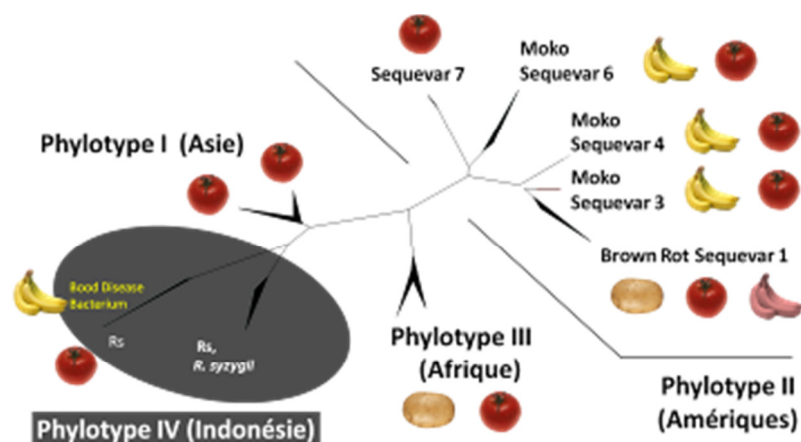


Figure 2 : Schéma des phylotypes de *R. solanacearum*

Cette étude a porté sur plus de 500 souches isolées de différents hôtes, en Europe et sur le Bassin Méditerranéen, qui ont été comparées à des souches de référence. Pour explorer la dynamique évolutive de ce complexe d'espèces, un schéma MLSA-MLST a été développé sur une collection de 88 souches de *R. solanacearum* représentatives des quatre phylotypes et des 51 sequevars décrits.

Une grande majorité de souches appartenant à l'écotype brown rot (IIB-1) est représentée dans l'arbre phylogénétique et reflète un groupe monophylétique de souches aussi bien adaptées aux températures tropicales, comme les autres souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*, mais aussi aux températures froides, connues dans les zones de hauts plateaux et en milieu tempéré. Si les souches pathogènes des *Solanaceae* sont distribuées dans les quatre phylotypes, les souches IIB-1 développent la plus forte virulence et agressivité aux différentes températures sur tomate, aubergine et pomme de terre mais il existe une variabilité significative dans l'agressivité au sein même de ce phylotype. Le phylotype IIB a confirmé être associé de façon privilégiée aux souches capables de flétrir la pomme de terre et d'autres *Solanacées* à température froide alors qu'une diversité plus grande de phylotypes et gamme d'hôtes (voire contournement de résistance) semble être associée aux souches tropicales.

1.2.2 Etude de la diversité phénotypique d'une collection représentative de *R. solanacearum*

Le pouvoir pathogène d'une collection de souches a été testé sur pomme de terre ou tomate en serre confinée à Rennes. Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les variétés de pomme de terre mais, par contre, une plus forte sensibilité de la tomate que la pomme de terre.

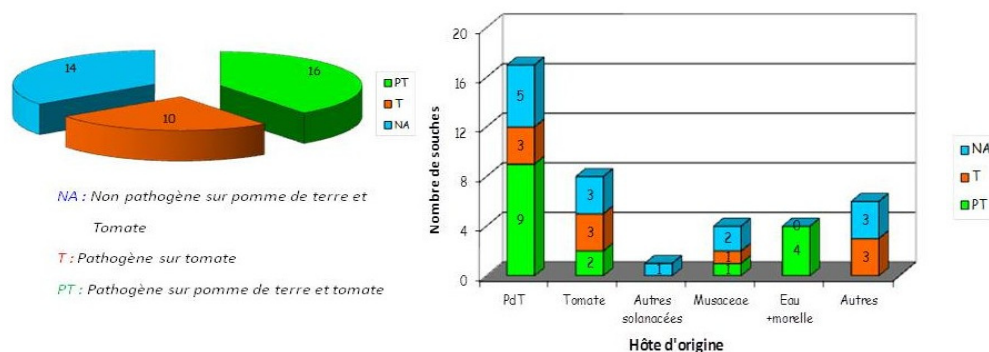


Figure 3 : Agressivité des souches sur tomate et pomme de terre en fonction de l'hôte d'isolement

Un tiers des souches testées ne sont agressives ni sur pomme de terre, ni sur tomate. Une donnée importante des travaux est que des souches isolées d'eaux de rivière ou de morelle peuvent être pathogènes sur tomate et pomme de terre.

1.2.3 Génomique comparative et développement d'outils de diagnostic innovants

Une analyse comparative des génomes de six souches de *R. solanacearum* a été réalisée avec le Genoscope (Remenant, 2010) et a contribué à la différenciation de 20 groupes de souches, qui ont ensuite été déployés pour concevoir de nouveaux outils de diagnostic, de type puce ADN.

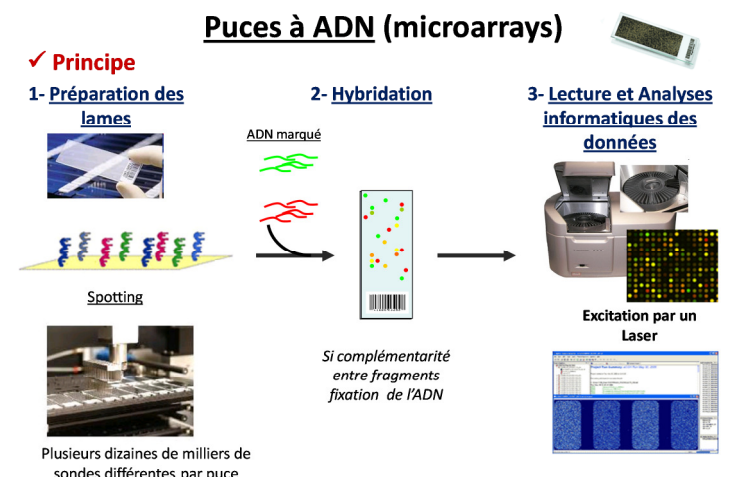


Figure 4: Schéma du principe de la technique des puces ADN

1.2.4 Etude de pré-développement d'une version diagnostic de puce ADN

Après la mise en place d'un atelier « Puce à ADN - recherche » avec une seconde génération de puces ADN (de type Agilent) fin 2010 sur la plate-forme du CIRAD à la Réunion dans le cadre du projet PARASOL, le présent projet a permis de contribuer au pré-développement de la version diagnostic de la puce ADN pour l'épidémiologie et le diagnostic haut débit des souches de *R. solanacearum*. Ce pré-développement d'une puce à ADN-Diagnostic a compris notamment :

- le recueil du cahier des charges des partenaires du projet et utilisateurs potentiels de la technique ;
- des essais d'optimisation de préparation des échantillons ;
- des tests de comparaison de cette technique avec les méthodes officielles de diagnostic.

Cette étude a permis de valider le potentiel de valorisation d'une puce 'Diagnostic', pour caractériser finement et rapidement la diversité génétique et phylogénique de bactéries phytopathogènes comme

R. solanacearum (Cellier, 2012), qui pourrait aider à prévenir l'introduction de souches pathogènes et/ou émergentes. Le cahier des charges établi avec les laboratoires chargés des analyses officielles de détection/diagnostic a montré que le déploiement en routine d'un outil de type puce à ADN nécessite encore des avancées significatives dans le coût d'un diagnostic ainsi que des travaux complémentaires en termes de sensibilité et de spécificité, voire de détection simultanée de plusieurs pathogènes de la pomme de terre. Enfin, la définition de nouveaux groupes de diagnostic, liés ou non à des propriétés biologiques, peut être l'occasion de faire évoluer les méthodes officielles d'analyse, et à terme d'introduire de nouveaux outils comme les puces ADN.

1.3. Outils de détection des bactéries *Pectobacterium* et *Dickeya*

Le deuxième modèle du projet a concerné les bactéries pectinolytiques des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, agents de pourritures molles sur la pomme de terre et sur l'endive.

1.3.1. Constitution d'une collection de souches bactériennes

Une collection de souches des bactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* a été établie grâce à un inventaire mené en culture de pomme de terre, complété de souches provenant d'autres plantes hôtes (endive, radis, oignon, tabac) fournies par des partenaires du projet.

1.3.2. Evaluation d'outils de détection sur souches pures

- Détection sélective des bactéries *Pectobacterium* et *Dickeya* par isolement sur CVP

Le projet a été l'occasion de finaliser les tests de validation d'une nouvelle source de pectine pour l'isolement des bactéries pectinolytiques sur un milieu semi-sélectif CVP (Crystal Violet Pectate). Les travaux de mise au point et la validation de deux formulations de CVP ont été valorisés au travers d'un article (Hélias *et al.*, 2012) et de la commercialisation de la pectine DIPECTA (www.biofords.com).

- Méthode de caractérisation de *Dickeya* par REP-PCR

Un nouvel outil de caractérisation de *Dickeya* par REP-PCR (Tsrör *et al.*, 2009) a été évalué. Les résultats obtenus sur des souches de référence provenant de la CFBP ont montré l'intérêt de cet outil, pour analyser la diversité infraspécifique, et permis de l'utiliser ensuite au cours de l'inventaire.

- Méthode biochimique de caractérisation de *Dickeya*

Un travail méthodologique visant à optimiser les tests biochimiques destinés à la caractérisation des souches de *Dickeya* (Samson *et al.*, 2005) a été effectué. Les améliorations apportées ont été mises en œuvre pour la caractérisation biochimique des souches de *Dickeya* de l'inventaire.

1.3.3. Evaluation des méthodes de détection sur différents substrats

Une détection directe des bactéries à l'aide de tests moléculaires a été effectuée sur les plantes ayant fait l'objet d'isollements, en s'appuyant sur l'expertise acquise sur *Ralstonia*.

1.4. Diversité des bactéries *Pectobacterium* et *Dickeya*

Les souches bactériennes issues de l'inventaire ont été caractérisées à l'aide de divers outils.

1.4.1. Identification des souches bactériennes par tests rapides de diagnostic moléculaire

Les résultats de l'identification (à l'aide des amorces ADE1-2, Y1-2 et Y45-46) des souches isolées à partir de pomme de terre sont présentés dans le Tableau 3.

	2008	2009	2010
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (Pa)	29	15	82
<i>Pectobacterium car. subsp. carotovorum</i> (Pcc)	57	37	64
<i>Dickeya</i> (Dck)	26	5	130

Tableau 3 : Résultats de caractérisation moléculaire des souches isolées en culture de pomme de terre

Les résultats montrent, à côté des souches de *Pa* classiquement associées aux dégâts de jambe noire en climat tempéré, la présence de *Pcc* et de *Dck*. *Pectobacterium* est majoritairement détecté au cours de la période même si de fortes variations interannuelles sont observées dans la répartition des espèces/genres bactériens. Sur les autres hôtes, la caractérisation moléculaire des souches a révélé la prépondérance de *Pectobacterium* (*Pcc*) dans les souches isolées de radis, oignon ou tabac. Les souches isolées d'endive ont majoritairement été identifiées dans le genre *Dickeya*.

1.4.2.- Etude de l'agressivité des souches de *Dickeya*

Des tests de virulence menés sur pomme de terre montrent une variabilité de virulence selon les températures testées, avec une virulence des souches de *Dickeya* plus élevée à 30°C qu'à 20°C alors qu'inversement, *Pa* est plus virulente à 20°C. Les analyses d'agressivité menées sur les souches de *D. dianthicola* et '*D. solani*' suggèrent une variabilité d'agressivité des souches non liée aux espèces.

1.4.3.- Caractérisation phénotypique des souches de *Dickeya* par tests biochimiques

Sur les 100 souches de *Dickeya* issues de l'inventaire en culture de pomme de terre et caractérisées biochimiquement, 61 souches appartiennent aux biovars 1 ou 7 (correspondant à *D. dianthicola*). 39 souches présentent des profils biochimiques similaires au biovar 3, correspondant selon Samson *et al.*, (2005) aux espèces *D. zaeae* ou *D. dadantii*, ou au nouveau taxon '*D. solani*' récemment mis en évidence en Europe (Toth *et al.*, 2011). Les souches d'endive présentent des profils de biovars 1 similaires aux souches types de *D. dianthicola*.

1.4.4.- Caractérisation des souches de *Dickeya* par REP-PCR

La caractérisation des souches de *Dickeya* isolées de pomme de terre par REP-PCR a montré deux profils distincts. Un des profils correspond à celui de *D. dianthicola*, espèce déjà décrite sur pomme de terre en France alors que le second profil correspond à celui du taxon émergent '*D. solani*'. Les profils obtenus pour les six souches isolées d'endives correspondent à ceux de *D. dianthicola*.

Les résultats des analyses REP-PCR et des tests biochimiques montrent une totale concordance et leur utilisation simultanée permet une identification précise des souches de *D. dianthicola* ou '*D. solani*'. Les caractérisations montrent que *D. dianthicola* reste l'espèce de *Dickeya* majoritaire en parcelles. La présence de '*D. solani*' demeure minoritaire au sein du cortège bactérien responsable de la jambe noire contrairement à la situation décrite dans certains pays européens (Hélias *et al.*, 2012). Ces résultats peuvent avoir un impact fort sur les règles d'importation de certains pays.

2. Survie des bactéries dans l'environnement et risque associé à l'irrigation

L'objectif de ces études était de comprendre les conditions de survie et de multiplication des bactéries dans les différents milieux susceptibles de les héberger, et en particulier au niveau des systèmes aquatiques ainsi que les conditions de manifestation de la maladie.

2.1 Etude du risque épidémiologique lié à l'eau d'arrosage (en conditions contrôlées)

2.1.1. *Ralstonia solanacearum*

Des études visant à évaluer le risque épidémique lié à l'arrosage de cultures sensibles par une eau contaminée par *R. solanacearum* ont été menées en conditions contrôlées, en arrosant des plantes de pomme de terre avec de l'eau contaminée. Les résultats montrent que des concentrations bactériennes de l'ordre de 10^6 cfu/L sont contaminantes et ce dès le premier arrosage. Seule une plante a été infectée après arrosage par de l'eau contaminée à 10^4 cfu/L. Les tests effectués sur la descendance des plantes ont mis en évidence des contaminations latentes. Ces résultats confirment toute l'importance de la sélection sanitaire basée sur la détection de ce type de parasites (Figure 5).

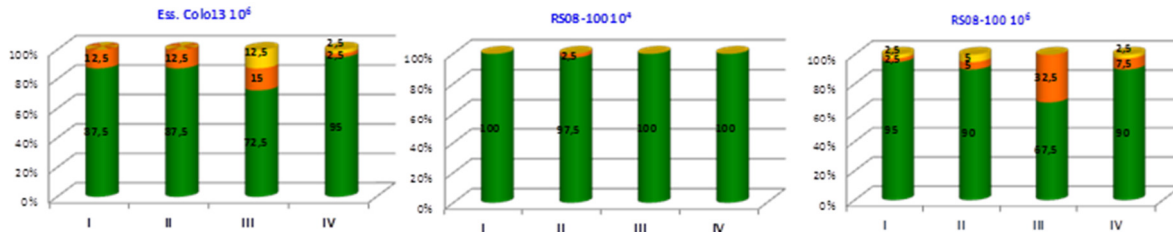


Figure 5 : Répartition des plantes saines (●) et malades (visuellement (●) ou détectés contaminées (●)) selon le nombre d'arrosages et la souche bactérienne

2.1.2. *Pectobacterium* et *Dickeya*

Un essai similaire a été mis en place en serre à Rennes pour évaluer le risque épidémique lié à l'arrosage de plantes de pomme de terre avec de l'eau artificiellement contaminée par des bactéries (*Pa* ou *Dck*). Aucun symptôme n'a été relevé en végétation ni à la récolte, mais la descendance a présenté quelques infections latentes sur la récolte. Les faibles concentrations bactériennes utilisées ainsi que le faible nombre d'arrosages peuvent expliquer ces résultats qu'il serait intéressant de reproduire.

2.2. Etude du risque épidémiologique lié à l'eau d'arrosage (au champ)

Des expérimentations ont été conduites en conditions naturelles en 2008 et 2009 à Boigneville, en collaboration entre Arvalis, la FN3PT et l'INRA de Rennes, afin d'évaluer le risque épidémiologique associé à l'irrigation. Des tubercules contaminés artificiellement par *P. atrosepticum* et *Dickeya* sp., seuls ou en mélange, ont été implantés dans des parcelles irriguées ou non, et en menant celle-ci soit de façon raisonnée soit en excès à la levée et à la tubérisation. Une plus grande incidence de maladie a été notée en végétation en 2009 (Figure 6) dans les modalités contaminées avec *Dickeya* mais par contre avec un effet très limité de l'irrigation, y compris sur les contaminations latentes, contrairement à 2008. Les pluies abondantes en 2009 peuvent expliquer cette situation.

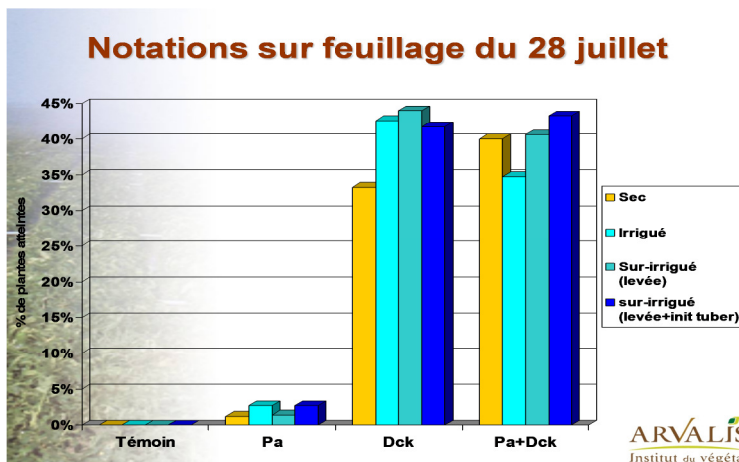


Figure 6 : Notations de maladie selon la conduite de l'irrigation et les souches bactériennes inoculées

Ces deux années d'essais n'ont pas démontré un rôle déterminant de l'irrigation dans l'expression de la maladie au champ mais questionnent sur le rôle qu'elle peut jouer dans le niveau de contamination de la récolte, avec un effet possible d'un excès d'eau sur les contaminations latentes.

2.3. Epidémiologie : étude et suivi de bactéries dans l'environnement

Afin de compléter l'évaluation du risque épidémiologique de ces maladies bactériennes associées à l'eau d'arrosage, un suivi pluriannuel de systèmes aquatiques a été réalisé pour étudier la contamination éventuelle d'eaux de surface et plantes associées, par la recherche directe des bactéries après filtration d'eau ou par piégeage dans des racines de morelles douce amère (*Solanum dulcamara*), disposées sur des radeaux placés à la surface de l'eau.

Des suivis pluriannuels conduits sur trois sites ont mis en évidence la présence de *Pectobacterium* (*Pa* et *Pcc*) et *Dickeya* dans ce type d'environnement : *Pcc* peut être détecté à la fois dans l'eau et les morelles, alors que *Pa* et *Dickeya* ont été préférentiellement détectées dans les plantes de morelles.

Un suivi de la survie de *R. solanacearum* a également été effectué dans l'environnement d'un ancien foyer. Les résultats obtenus sur des échantillons d'eau et des morelles douces amères analysés par différentes techniques montrent l'intérêt de la technique bio-PCR pour détecter de faibles concentrations bactériennes et des variations inter et intra-annuelles, en lien avec le climat.

La survie de bactéries dans l'environnement aquatique a donc été démontrée et pose la question du risque biologique associé à un faible niveau de contamination.

3. Nouveaux procédés de lutte et de décontamination

Cette action abordait l'étude de solutions innovantes de décontamination, en cas de découverte de foyer ou de façon préventive pour limiter le risque de développement de maladies bactériennes. Le programme a concerné deux aspects étudiés depuis quelques années par le Comité Nord et l'université de Rouen (Laboratoire LMSM et Plate-forme de Technologie «Normandie Sécurité Sanitaire » NS2).

3.1 Lutte biologique par stratégie d'anti-virulence

Ce volet consistait à poursuivre l'exploration de nouvelles stratégies de lutte contre les bactéries macergènes des végétaux, en cherchant à limiter non pas leur présence mais leur activité virulente sur la plante ou dans les substrats. Les moyens mis en œuvre ici consistent à perturber les communications cellulaires bactériennes permettant à l'agent pathogène de coordonner ses attaques et de surpasser les défenses naturelles de la plante. Ces méthodes sont basées sur les connaissances acquises au LMSM en collaboration avec l'ISV-CNRS de Gif-sur-Yvette en matière de Quorum-Sensing (QS) de l'agent pathogène associé à la production de *N*-acyl homosérine lactones (NAHSL), dont la concentration dans le milieu induit - à partir d'un certain niveau perçu par les bactéries (le quorum sensing) - la production d'enzymes lytiques, permettant la macération des tissus végétaux. Ce mécanisme permet d'envisager diverses stratégies de lutte alternative (Dessaux, 2007). Des travaux préalables avaient été réalisés sur *P. atrosepticum* et avaient permis d'isoler de l'environnement de la pomme de terre des bactéries protectrices limitant les dégâts occasionnés sur tubercules. Ces bactéries du genre *Rhodococcus* dégradent les signaux NAHSL employés par le pathogène. Or, du fait de la variabilité évoquée ci-dessus des espèces bactériennes responsables de dégâts, il a été décidé d'étendre la stratégie de lutte biologique contre *P. atrosepticum* aux autres bactéries macergènes rencontrées actuellement au champ : *P. carotovorum* et *Dickeya*. Le projet a donc porté sur la caractérisation des molécules de communication employées par une collection de souches appartenant aux espèces *P. atrosepticum* (4), *P. carotovorum* (4) et genre *Dickeya* (4). L'étude a porté sur les molécules signalétiques identifiées à ce jour, notamment pour l'espèce *P. atrosepticum* pour laquelle les signaux majoritaires appartiennent à la famille des NAHSL, pour vérifier si cette famille

est aussi impliquée dans la virulence des autres espèces mais en recherchant aussi l'identification d'autres molécules. Trois familles de signaux ont été caractérisées (Crépin et al., 2012):

Famille des NAHSL (Autoinducteurs de type 1, AI-1) : Le Quorum-Sensing de type I fonctionne avec de petites molécules diffusibles (NAHSL) appelées aussi autoinducteurs 1 (AI-1), parce que l'augmentation de leur densité dans l'environnement stimule la production de l'enzyme responsable de leur synthèse. Cette étude montre que les différentes espèces bactériennes produisent des NAHSL similaires, avec une forte homogénéité au sein d'une même espèce bactérienne. Les *Pectobacterium atrosepticum* produisent majoritairement de la 3-oxo-octanoyl-HSL. Les *Pectobacterium carotovorum* et *Dickeya* produisent en majorité la même molécule mais plus courte de 2 carbones (Figure 7). Par ailleurs, pour chacune des espèces, des traces d'autres NAHSL ont été détectées.

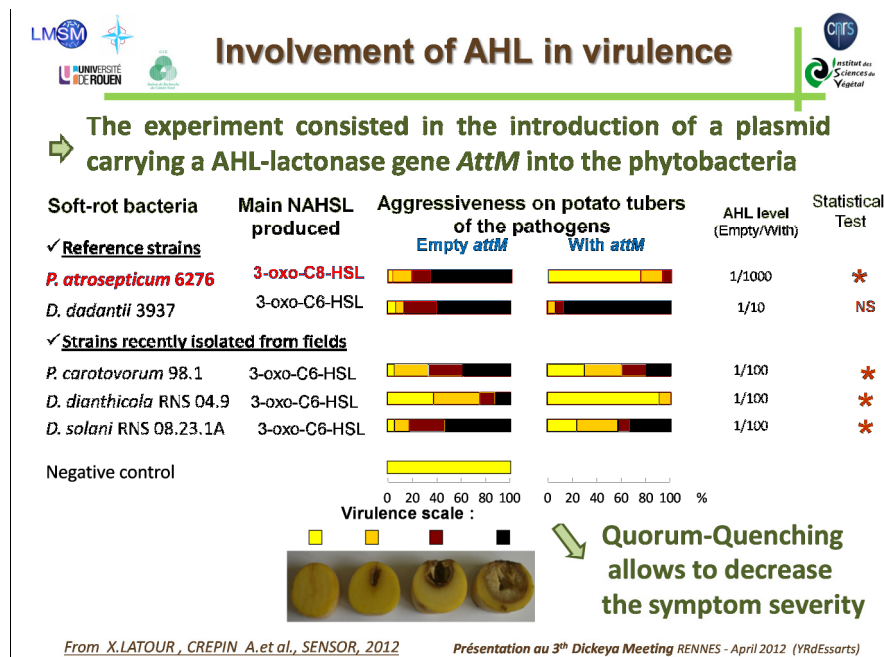


Figure 7 : Implication de NAHSL dans la virulence bactérienne (3^d *Dickeya* meeting, Rennes, 2012)

Famille des Furanones de type Autoinducteurs 2 (AI-2) : Le Quorum-Sensing de type II implique des furanones signalétiques désignées comme autoinducteurs-2 (AI-2), diffusibles au travers des membranes cellulaires, jouant un rôle prépondérant dans le mécanisme du QS. Sa synthèse permet, par exemple chez d'autres bactéries, la production de toxine, l'expression du flagelle ou l'assimilation du fer. Comme pour les NAHSL, toutes les souches testées de *Dickeya* et *Pectobacterium* produisent de l'AI-2, en quantité variable selon la souche. Par contre, la production d'AI-2 n'est pas liée au genre ou à l'espèce bactérienne.

Famille des auxines : Les travaux ont montré la production d'une auxine, l'acide-3-indole acétique, spécifiquement produite par les isolats appartenant aux quatre espèces étudiées du genre *Dickeya*. Cette molécule, d'habitude produite par les végétaux, est soupçonnée jouer un rôle équivalent aux AI-1 dans le mécanisme du QS chez les rares isolats insensibles aux NAHSL par exemple. Sa production est antagoniste à celle des AI-2 (Crépin et al., 2012).

Ces travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes et signaux impliqués dans la communication cellulaire des bactéries étudiées, pour à terme mettre en place des stratégies de lutte basées sur la perturbation des communications établies au sein des populations pathogènes. Deux thèses prolongent ces travaux en lien avec ces techniques de lutte biologique par anti-virulence, portant sur la poursuite de la caractérisation des signaux impliqués (A. Crépin au LMSM d'Evreux en

partenariat avec le Comité Nord) ou leur application dans des stratégies associées de lutte (Y. Raoul des Essarts au CNRS de Gif/Yvette en partenariat avec la FN3PT et le Comité Nord).

3.2 Recherche de méthodes innovantes de décontamination

Les travaux sur des procédés de décontamination physique ont été réalisés par le LMSM et le Comité Nord qui collaborent depuis plusieurs années sur l'étude de différentes technologies (lumière pulsée, plasmas froids,..) pour décontaminer différents types de surface ou liquide au sein notamment de la PFT N2S. Dans une première phase, des technologies basées sur les **plasmas froids** ont été évaluées pour la décontamination d'eaux artificiellement contaminées, par traitement des échantillons par décharges électriques glissantes puis comparaison de la qualité des eaux et solutions avant et après traitement, nécessité ou non d'une filtration, cinétiques de destruction bactérienne, résistance potentielle de certaines bactéries, analyses chimiques. Dans l'ensemble, les résultats observés dans le cas de la décontamination par plasma athermique révèlent des réductions massives de la population bactérienne en des temps très courts (Moreau *et al.*, 2010). Les cinétiques de destruction ont montré que d'une part la souche *Pectobacterium atrosepticum* CFBP1526^T est plus résistante au traitement par glidarc que les souches *P. carotovorum* 2404 et *Dickeya* sp. 2804 et d'autre part qu'une destruction totale de la population initiale de bactéries (soit environ 10 unités logarithmiques) est possible en moins de 5 minutes. Cependant, lors du passage du stade de pilote de laboratoire à un niveau pré-industriel, différents problèmes se sont présentés d'une part pour la conception d'outils adaptables à de très gros volumes et d'autre part pour la sécurité des manipulateurs. Ceci a conduit à se rediriger vers d'autres technologies plus adaptables à l'échelle industrielle, comme la **lumière pulsée** (par flashage des surfaces par des impulsions de lumière très intenses) et la **photocatalyse** (voire d'U.V spécifiques), qui ont fait l'objet d'évaluation pour la décontamination de l'air ou d'eaux de lavage des tubercules. Des travaux complémentaires ont été poursuivis après le projet pour évaluer l'apport de la filtration pour des eaux chargées ou du couplage de méthodes et optimiser l'appareillage pour accroître les capacités de décontamination et arriver à des méthodes transférables à l'échelle agricole.

La recherche de techniques efficaces et applicables en pratique au traitement d'eaux d'irrigation, de lavage ou à la décontamination de matériel demeure essentielle pour des cultures à fort enjeu sanitaire, comme par exemple les pommes de terre ou des milieux favorables comme les solutions nutritives utilisées pour le forçage des endives. Les risques sanitaires démontrés plus haut renforcent l'intérêt d'étudier des modes de traitement des eaux permettant de sécuriser la qualité des eaux d'irrigation.

4. Etude de capteurs optiques et outils de prévision

Un volet du projet a consisté à prospecter l'intérêt de **capteurs de mesure optique** pour mesurer précocement des signaux de la plante comme la production de métabolites par la plante, produits en réaction à des agressions par des stress ou attaques de bioagresseurs. Des expérimentations ont été conduites pour étudier la faisabilité de la détection de la présence de pathogènes au champ par des mesures non destructives avec des capteurs optiques développés par la société FORCE-A qui mesurent les polyphénols, les flavonols et la chlorophylle des végétaux par utilisation de leurs propriétés d'absorbance et de fluorescence. Certains polyphénols sont produits par la plante en réponse à la présence d'un pathogène. Une étude a été réalisée sur la plate-forme expérimentale de Boigneville (Arvalis) avec un capteur de type MULTIPLEX[®]. Des mesures de suivi cinétique ont été réalisées sur les plants de pomme de terre à 3 dates de mesures pour 4 modalités d'irrigations (*S* : *Témoin non irrigué* ; *N* : *Irrigation normale* ; *L* : *N + sur-irrigation à la levée* ; *LT* : *N + sur-irrigation à la levée et à l'initiation de la tubérisation*) croisées avec 4 inoculations par différentes souches bactériennes, seules ou associées (*1* : *Témoin non contaminé* ; *2* : *P. atrosepticum* ; *3* : *Dickeya* ; *4* : *P. atrosepticum + Dickeya*).

Les deux années d'essai ont permis de progresser dans la connaissance des signaux et des possibilités de mesures du Multiplex. Des différences ont été obtenues avec des signaux mesurés selon l'état des plantes (stress ou infection) et le régime hydrique. Un lien entre la sénescence des plantes et les signaux Multiplex a été mis en évidence avec une teneur en polyphénols augmentant significativement sur la dernière date de mesures alors que la teneur en chlorophylle diminue significativement. Toutefois, les différences de certains signaux Multiplex (Flav et BRR) observés entre les pieds sains et pieds malades ne sont pas toujours reproductibles et il est nécessaire de poursuivre l'acquisition de données avant d'arriver à un outil utilisable en pratique.

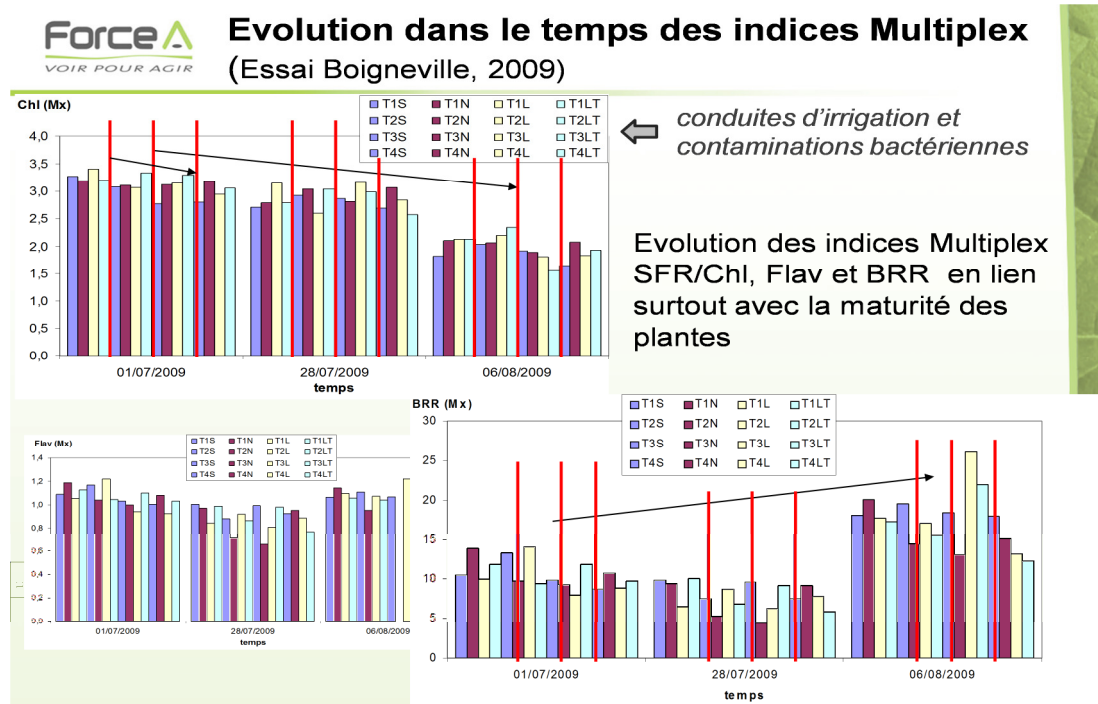


Figure 8 : Evolution dans le temps des indices Multiplex (Travaux conduits à Boigneville en 2009).

Conclusion

Le projet a permis d'obtenir des résultats en matière d'outils opérationnels pour la détection et la caractérisation des maladies bactériennes étudiées, de confirmer le rôle épidémiologique joué par les systèmes aquatiques et d'acquérir des données intéressantes sur de nouvelles stratégies de lutte ou d'évaluation des contaminations.

Des avancées significatives ont été obtenues en termes de détection de pathogènes dans des matrices complexes ou de caractérisation du cortège bactérien existant ou émergent, permettant de mieux évaluer les risques phytosanitaires associés et répondre ainsi à des enjeux forts en matière de qualité sanitaire et de compétitivité sur les marchés export.

Des résultats prometteurs ont aussi été acquis dans l'élaboration de stratégies innovantes, comme la lutte biologique par anti-virulence ou le développement de puces à ADN pour le diagnostic même si d'autres étapes restent à franchir avant de déployer en routine de telles innovations, en rupture avec les pratiques et outils actuels.

Enfin, ces travaux ont été l'occasion d'organiser et renforcer des partenariats qui se poursuivent au-delà du projet sous forme de collaborations bilatérales, de la construction de nouveaux projets ainsi que dans la mise en place de l'UMT Innoplant ou du réseau EBP. Les avancées obtenues ont aussi fait

l'objet de nombreuses publications scientifiques et de vulgarisation pour valoriser les résultats au-delà des cultures étudiées ou plus largement dans le cadre de réseaux ou initiatives transversales.

Références bibliographiques

Anon. Council Directive 2000/29/EC. Protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community.

Cellier G., 2010. Description des écotypes du phylotype II dans le complexe d'espèces de *Ralstonia solanacearum* : Diversité et évolution. *Thèse soutenue le 13 décembre 2010*- Université de la Réunion

Cellier G., Remenant B., Chiroleu F., Lefeuvre P., Prior P., 2012. Phylogeny and population structure of brown rot and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2367-2375.

Cirou A., Uroz S., Chapelle E., Latour X., Orange N., Faure D., Dessaux Y., 2010 Quorum sensing as a target for novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium* Book Series: Plant Pathology in the 21st Century. *Contributions to the 9th International Congress of Plants Pathology*

Crépin A., Barbey C., Beury-Cirou A., Hélias V., Taupin L., Reverchon S., Nasser W., Faure D., Latour X., 2012. Quorum Sensing Signaling Molecules Produced by Reference and Emerging Soft-Rot Bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS ONE* 7, e35176.

Dessaux Y., Cirou A., Uroz S., Chapelle E., Latour X., Faure D., 2007. Quorum sensing as a target for novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium*. *Biology of Plant Microbe Interactions* .6-chap.8, APS Press.

Dubois E., Rivoal C., Legendre B., Soubelet H., 2009. Amélioration des techniques de détection de *R. solanacearum* dans les eaux de surface et les sols. Poster - *Conférence SFP*, Lyon 2009

Hélias V., Hamon P., Huchet E., Van der Wolf J., Andrivon D., 2012. Two new effective semi-selective crystal violet pectate (CVP) media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathol.* 61, 339-345

Hélias V., Hamon P., Laurent A., Morel B., Andrivon D., 2012. '*Dickeya solani*': Emergence d'un nouvel agent bactérien responsable de pourritures molles et de jambe noire en culture de pomme de terre. *10èmes Rencontres Plantes-Bactéries*, 30 Janvier-3 Février 2012, Aussois, France : 91.

Le Roux-Nio A.C., Huchet E., Le Hingrat Y., Andrivon D., 2010. Sanitary risks connected to latent infections of potato tubers by *R. solanacearum* along several years of multiplication. *12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (ICPPB)*, 7-11 June 2010 - Saint Denis -Ile de la Réunion

Le Roux A-C, 2009. Detection of *Ralstonia solanacearum* in different environments. *EPPO Conference on Diagnostics*, York, Royaume-Uni, 10-13 May 2009.

Moreau M., Turpin A.-S., Chevalier S., Colas de la Noue A., Perrier Cornet J.M., Gervais P., Orange N., 2010. Effectiveness of athermal and innovating decontamination technologies on spores and vegetative cells. *VIII^e congrès de la Société Française de Microbiologie*, Marseille, 02-04 Juin 2010

Prior P., Fegan M., 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae* 695, 127-136.

Remenant B. Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot S., Barbe V., Médigue C., Prior P., 2010. Genomes of three diverse tomato pathogens within the *R. solanacearum* species complex reveal evolution in action. *NM-BMC genomics* 11, 379.

Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L, 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al., 1953) Brenner I. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1415–27.

Toth I.K., van der Wolf J., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrer L., Elphinstone J., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol* 60, 385-399.

Tsrer L., Erlich O., Lebiush S., Hazanovsky M., Zig U., Slawiak M., Grabe G., Wolf J.M. van der, Haar J.J. van de, 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology* 123, 311–320.