



HAL
open science

Une batterie d'outils de diagnostic pour la certification de la qualité sanitaire du plant de pomme de terre

Didier Andrivon, . Département Spe, . Asirpa (analyse Socio-économique Des
Impacts de La Recherche Publique Agronomique)

► To cite this version:

Didier Andrivon, . Département Spe, . Asirpa (analyse Socio-économique Des Impacts de La Recherche Publique Agronomique). Une batterie d'outils de diagnostic pour la certification de la qualité sanitaire du plant de pomme de terre. [Rapport Technique] auto-saisine. 2015, 17 p. hal-01603763

HAL Id: hal-01603763

<https://hal.science/hal-01603763>

Submitted on 5 Jun 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 - ShareAlike 4.0 International License

ASIRPA

Analyse Socio-économique des Impacts de la
Recherche Publique Agricole

Une batterie d'outils de diagnostic pour la certification de la qualité sanitaire du plant de pomme de terre

Septembre 2015

Didier Andrivon

Etude réalisée dans le cadre de l'évaluation du département *Santé des Plantes et Environnement* de l'INRA
Avec l'appui méthodologique de l'équipe ASIRPA



Ce cas vise à illustrer comment des travaux collaboratifs de long terme, partagés entre l'INRA et une filière professionnelle très structurée, ont permis d'établir les bases d'un élément de compétitivité essentielle de cette filière sur le marché français et international mais aussi de la mise en œuvre de politiques publiques de biovigilance, en garantissant une qualité sanitaire élevée.

La qualité sanitaire est un des éléments clés pour la production de plants de pomme de terre. Cette culture est en effet très exposée, du fait de son mode de propagation végétatif, à un cortège important de parasites viraux et bactériens contre lesquels n'existe aucune méthode curative de lutte. Garantir l'absence – ou tout au moins un niveau très bas- de contamination dans le matériel végétal destiné à la replantation est donc une exigence majeure. Elle s'applique tout particulièrement aux parasites de quarantaine – tels *Clavibacter michiganensis* ou *Ralstonia solanacearum*, mais aussi aux parasites de qualité – tel les virus PVY, PLRV ou PVX-transmis via le tubercule. Pouvoir fournir cette garantie repose sur un processus et des normes de certification des plants, qui requièrent la mise en œuvre d'outils sensibles, spécifiques et fiables de détection des parasites concernés.

Un ensemble de projets collaboratifs s'est développé entre l'INRA et la Fédération nationale des producteurs de Plants de Pomme de Terre (FN3PT), en vue de mettre au point de tels outils. Ces travaux ont porté à la fois sur des réactifs sérologiques contre les principaux virus (PVY et ses variants, PVX, PLRV, PMTV, PVA...), et sur des outils sérologiques, moléculaires ou microbiologiques (élaboration de milieux spécifiques) contre les bactérioses les plus préoccupantes. Ces outils sont actuellement déployés pour la certification des lots de plants, mais servent aussi aux opérations de surveillance sanitaire du territoire vis-à-vis des parasites ciblés. L'emploi de ces réactifs représente donc plusieurs millions de tests annuels (par exemple, 2.6 millions par an pour chacune des deux bactéries de quarantaine *C. michiganensis* et *R. solanacearum*).

Les impacts de ces produits sont de trois ordres :

- **économique pour la filière plant de pomme de terre**, via
 - 1) **l'amélioration de la balance commerciale française des plants de PdT**: 150 000 tonnes exportés en 2010/11 contre 85 000 tonnes dans les années 80 (Chiffre d'affaires moyen à l'export entre les années 90 et 2010= 45M€). La qualité sanitaire expliquerait 50% des exportations soit 140M€ de surplus économique sur 20 ans,
 - 2) **l'implantation de « majors » étrangères en France pour la multiplication de leurs propres variétés ;**
 - 3) **la capacité à éviter des coûts importants** liés à la gestion des foyers de quarantaine: par comparaison avec les Pays-Bas, 100M€ de pertes liées à la mise en quarantaine entre les années 90 et 2010 ;
- **politique**, via l'appui à la mise en œuvre des politiques publiques dans le domaine sanitaire (en particulier vis-à-vis de parasites réglementés de quarantaine) exploitant la construction d'outils adaptés à la surveillance des productions et des territoires et la reconnaissance de l'expertise française lors des négociations sur les normes sanitaires internationales;
- **sanitaire**, via la prévention de crises sanitaires majeures comparables à celles connues aux Pays Bas ou en Allemagne à la fin des années 1990.

Contexte

Contexte scientifique et technologique

La pomme de terre, plante à multiplication végétative, est la cible de nombreux pathogènes transmis par les plants et contre lesquels il n'existe pas de méthode curative de lutte efficace au champ. C'est en particulier le cas de plusieurs virus (PVY, PLRV, PVX...) et de diverses bactéries causant des pourritures des parties aériennes ou des tubercules (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) Par exemple, 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, notamment la pomme de terre, la tomate et le tabac, ce qui en fait une des dix bactéries phytopathogènes les plus importantes au monde (Mansfield et al., 2012). Les pertes potentielles induites par cette bactérie ont conduit à la classer en organisme de quarantaine en Europe (www.eppo.org/quarantine/listA2.htm) et à la considérer comme «Bioterrorism Select Agent» aux États-Unis. Les mesures préventives adoptées en France en cas de découverte d'un foyer dans une exploitation entraînent des coûts importants de destruction des lots, analyses, renouvellement des souches, etc. de l'ordre de 0,5 M€ pour chacun des foyers récemment découverts sur notre territoire.

De même, 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, les radis porte-graines 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, etc, et en font là aussi une des phytobactérioses les plus redoutables au monde (Mansfield et al., 2012). Aux Pays-Bas, les pertes dues à ces bactéries ont été multipliées par plus de 5 entre 2002 et 2007 pour passer de 5 à près de 30 M€ pour la pomme de terre et 15 M€ pour les bulbes à fleur. En France, entre 50 et 400 hectares de plants sont refusés chaque année pour «jambe noire», soit une 'valeur économique' variant de à 0,3 à 2 M€/an pour le seul aspect refus, sans compter les autres pertes (déclassements de plusieurs centaines d'hectares chaque année, litiges à destination, renouvellement de plant, incidence variétale, mesures prophylactiques...). Pour d'autres cultures légumières (endive, radis, artichauts) 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 (Le Hingrat et al., 2012).

Enfin, des virus comme le PVY peuvent entraîner des dégénérescence en culture, et des pertes de (Sholthoff et al., 2011). La perte de rendement peut s'élever jusqu'à 80 % selon la sensibilité variétale, et s'accompagner d'une forte diminution de la qualité commerciale des tubercules, y compris pour la consommation en frais ou la transformation industrielle (en cas de nécroses tuberculaires en particulier). Le coût du contrôle des virus en production de semences s'élève à environ 300 €/ha, et les pertes annuelles dues au seul PVY en Grande Bretagne sont de l'ordre de 30 à 40 M€ (Valkonen, 2007).

La méthode de lutte privilégiée contre ces agents très dommageables est donc la sélection sanitaire des plants, fondée sur une qualité rigoureuse du matériel de départ, la protection contre les contaminations, l'élimination au champ ou après récolte des plantes infectées et le contrôle de la qualité des lots tout au long des différentes générations de multiplication (7 à 10 pour la pomme de terre). Cette sélection sanitaire est d'autant plus efficace qu'elle exploite des outils de diagnostic rapides, sensibles et spécifiques de chacun des parasites.

En outre, la composition des populations parasites évolue rapidement, soit par l'apparition de variants naturels dotés de propriétés biologiques nouvelles au sein d'une espèce (p. ex. les variants PVY^{NTN} du PVY, provoquant de graves nécroses sur les tubercules – Le Romancer & Kerlan, 1991), soit par l'émergence d'espèces nouvelles, souvent introduites via du matériel végétal et parfois présentes au sein de complexes (par exemple l'émergence de la nouvelle espèce *Dickeya solani* au sein du complexe des bactéries pectinolytiques – Toth *et al.*, 2011, Van der Wolf *et al.*, 2014). Cette évolution rapide impose une révision périodique de la qualité des outils de détection et de diagnostic. Il en va de même lors de l'émergence de

parasites classés sur les listes de quarantaine, comme c'est le cas pour la gestion des foyers de *Ralstonia solanacearum* depuis l'épidémie massive de 1995 aux Pays Bas, puis dans d'autres pays européens.

Enfin, le développement au cours des 30 dernières années des méthodes sérologiques issues du domaine médical (anticorps monoclonaux) et des technologies basées sur les acides nucléiques (PCR, CAPS, PCR temps réel, etc...) sont autant d'opportunités de construire et de valider des outils fiables, précis et utilisables en routine pour le diagnostic et la détection des parasites problématiques.

Situation concurrentielle

La filière plant de pomme de terre française, qui représente en valeur près de 100 M d'euros par an (source Agreste 2011) et est fortement exportatrice (solde positif d'environ 100 000 tonnes par an – source <http://plantdepommedeterre.org/index/l-export>; deuxième exportateur mondial), est dans une situation de vive concurrence vis-à-vis d'autres producteurs et exportateurs de plants, en particulier les Pays Bas. Un atout reconnu du plant français est sa qualité sanitaire, directement liée au maintien d'un bon état sanitaire des territoires de production, grâce notamment à l'intensité des contrôles et à la qualité des outils de détection. Cette qualité sanitaire a d'ailleurs permis au plant français de gagner ces dernières années des parts de marché à l'export (<http://plantdepommedeterre.org/index/l-export>): son maintien est donc un enjeu de compétitivité essentiel pour cette filière.

Sur le plan des outils de diagnostic, le marché est relativement faible pour le secteur végétal en comparaison avec le secteur médical ou vétérinaire. C'est pourquoi peu d'acteurs spécialisés français ou internationaux (tels Bioreba, Agdia Biofords, SIGMA ou SEDIAG) sont présents, et proposent des gammes de produits – réactifs, milieux de culture - dont l'utilisateur maîtrise mal la composition et l'évolution au cours du temps. Un exemple récent de modification ou d'arrêt de production concernant la pectine, ingrédient essentiel des milieux employés pour détecter certaines bactéries pathogènes, est décrit par Hélias et al (2011). Il est donc important pour un utilisateur régulier de ces outils de disposer de réactifs dont il maîtrise à la fois les caractéristiques techniques, la qualité et la production.

Contexte politique et légal

La certification du plant, selon des normes regroupées dans le règlement technique de certification des semences et plants visé par le Ministère de l'Agriculture, est obligatoire pour pouvoir le commercialiser. Elle est supervisée par le Service Officiel de Contrôle (SOC), qui en délègue la réalisation dans le cas du plant de pomme de terre à la Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (FN3PT) et aux laboratoires agréés des Etablissements Producteurs Régionaux (EPR) de cette Fédération. Ceux-ci se chargent des suivis en culture et de la réalisation des tests de détection en laboratoire.

Pour préserver son atout de qualité sanitaire, le règlement technique français impose fréquemment des normes de certification plus sévères que les normes européennes (<http://plantdepommedeterre.org/index/normes-francaises-et-europeennes>), en particulier en adjoignant aux seuls examens visuels, obligatoires, des tests additionnels de détection des principaux agents pathogènes dans les lots de tubercules eux-mêmes (c'est le cas en particulier pour les virus), ou en allant au-delà du nombre minimal d'analyses requis (cas des bactéries de quarantaine).

De plus, pour les parasites dits réglementés (inscrits sur la liste de quarantaine établie par l'Union Européenne et/ou l'Organisation Européenne pour la Protection des Plantes; <http://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm>), les mesures de lutte obligatoires passent impérativement par la confirmation du statut des cas suspects (diagnostic) et la capacité à tracer la présence ou la persistance du parasite incriminé dans les différents compartiments de l'agro-écosystème (détection). La qualité des outils utilisés et des méthodes de référence pour ce faire est donc essentielle, ainsi que la rapidité des méthodes de confirmation afin d'éviter des blocages prolongés des lots.

Les inputs et la situation productive

Objectifs de la recherche

L'INRA et la Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de terre (FN3PT) ont développé des collaborations dans le domaine de la santé de la pomme de terre depuis le milieu des années 1960, avec l'appui à partir des années 1980 du Groupement National Interprofessionnel des Semences (GNIS). Ces collaborations fonctionnaient bien, et l'INRA disposait d'une expertise importante sur la biologie des parasites et en sérologie. Cette convergence a donc amené les deux partenaires à collaborer activement depuis le milieu des années 1980 pour produire une série d'outils de diagnostic et de détection utilisable pour la certification et la sélection sanitaire du plant de pomme de terre.

L'enjeu essentiel des travaux décrits ici était de permettre aux établissements français producteurs de plant de pomme de terre de disposer en propre d'outils fiables, sensibles et évolutifs pour la détection des principaux parasites de la pomme de terre, en vue d'une certification des lots avec un haut niveau d'exigence sanitaire. Le fait de disposer en propre de ces outils est important pour la filière, afin de ne pas dépendre d'intervenants extérieurs pour leur fabrication et donc de pouvoir en assurer la fiabilité et la traçabilité.

Ces travaux sont focalisés sur deux groupes de parasites transmis fréquemment par le plant: virus (en particulier le virus Y, problématique dans toutes les régions de production de plant et génétiquement très variable – Scholthof et al., 2011), et bactéries de quarantaine (*Clavibacter* et *Ralstonia*) et de qualité (*Pectobacterium* et *Dickeya*), contre lesquelles la sélection sanitaire des plants reste le pilier fondamental de toute stratégie de lutte.

Ressources mobilisées

L'essentiel du travail a été réalisé sous forme de conventions bilatérales de recherche entre l'INRA et la FN3PT, établies à partir de 1984 et renouvelées au fur et à mesure du développement des projets, puis élargies à partir de 2011 par une convention cadre et en 2012 par la labellisation d'une UMT (INNO PLANT) entre la FN3PT et l'INRA – IGEPP. Le financement de ces travaux provient principalement des moyens propres des partenaires INRA et FN3PT, et fait parfois appel à des financements de l'ensemble de la filière (GNIS, CNIPT via ARVALIS) négociés en amont de la signature des conventions de recherche ou au soutien public (ex : apport du Conseil Régional de Bretagne pour la production d'anticorps monoclonaux : 2006-2007, 18 mois, 20 k€ et 2009-2012 : 36 mois, 130 k€). Un soutien a également pu être obtenu auprès de France AgriMer ou d'autres Conseils Régionaux sur certains projets.

En virologie :

Les travaux sur le thème ont débuté en 1984 suite à l'arrivée à Rennes d'un chargé de recherche en virologie végétale, accompagnée par un soutien de l'ONIFLHOR (aujourd'hui FranceAgriMer) pour la construction d'une serre dédiée, l'acquisition de matériel spécifique et un soutien de fonctionnement en appui aux travaux expérimentaux sur les 5 premières années. Ils ont bénéficié de l'embauche par la FN3PT d'un ingénieur accueillie dans l'équipe de virologie rennaise nouvellement créée. La première convention de recherche sur la production de réactifs sérologiques pour la détection du Virus Y de la pomme de terre (PVY) a été signée à cette occasion, et a permis la production de la première gamme de réactifs polyclonaux contre les divers virus majeurs de la pomme de terre utilisés par la FN3PT.

La production de réactifs monoclonaux, plus spécifiques, a démarré vers 1988 en collaboration avec le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Rennes (aujourd'hui Etablissement Français du Sang). Il s'est intensifié avec le recrutement par la FN3PT d'un ingénieur accueilli à l'INRA sous convention de recherche (1990-1994), puis d'une technicienne (depuis 1995) pour la production des réactifs et leur conditionnement pour utilisation par les EPR, mais aussi leur validation lors d'essais inter-laboratoires et leurs contrôles qualité.

La découverte au début des années 1990 de variants du PVY provoquant des nécroses graves sur les tubercules (maladie dite PTNRD : Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease) a suscité un travail important de caractérisation de ces isolats et de leurs propriétés génétiques et biologiques, dans le cadre de 4 thèses co-encadrées, toutes financées par la FN3PT sur des contrats de type CIFRE. Cet effort a été maintenu via le recrutement d'un ancien doctorant CIFRE comme ingénieur de recherche par la FN3PT depuis 2004 (y compris quatre ans sur financement contractuel INRA). Ces travaux sont à la base des tests moléculaires de caractérisation développés en France.

En bactériologie :

Dans les années 1980, l'INRA avait développé divers outils sérologiques de détection contre des parasites de la pomme de terre, dont des sérums polyclonaux dirigés contre *Clavibacter michiganensis*, utilisés par les laboratoires de la Fédération. L'épidémie massive de *Ralstonia solanacearum* aux Pays Bas et dans d'autres pays européens de 1995 a amené la FN3PT à recruter un ingénieur de recherche, pour développer et améliorer une nouvelle gamme d'outils de détection et de quantification des bactéries de quarantaine dans les plantes, mais aussi les sols et les eaux. Ce travail, initié en collaboration avec l'INRA d'Angers, station de référence en bactériologie, et l'ANSES se poursuit jusqu'à ce jour, avec l'appui de deux techniciennes de la FN3PT également accueillies à l'INRA.

Enfin, le travail a concerné des bactéries non réglementées, mais très problématiques en culture : les bactéries pectinolytiques des genres *Pectobacterium* (ex *Erwinia*) et *Dickeya*, responsables de pourritures molles des tubercules et de pourriture des tiges (jambe noire). Engagé dans les années 1980 par l'équipe INRA dirigée par B. Jouan, ce travail s'est renforcé dans les années 1990 avec le financement d'une thèse de doctorat, puis le recrutement par la FN3PT de cette doctorante comme ingénieur de recherche dans le cadre d'un programme national, soutenu initialement aussi par le GNIS et le CNIPT, sur la détection, l'épidémiologie et la lutte contre ces bactéries.

Les compétences de l'INRA

Les différents programmes se sont appuyés sur des compétences présentes et mobilisables au sein de l'INRA, dans les domaines de la virologie classique et moléculaire, de la bactériologie, de la biologie moléculaire, de l'immunologie et de l'épidémiologie. Ils ont bénéficié également d'appuis techniques de qualité, en particulier pour les travaux de virologie.

Réseau d'acteurs mobilisés

L'essentiel du travail de développement et de validation des outils a été réalisé dans les laboratoires de l'INRA au Rheu, où sont accueillis les techniciens et ingénieurs de recherche embauchés par la FN3PT sur ces programmes, et en étroite concertation avec le personnel de terrain et de laboratoire de la FN3PT et ses EPR (prospections en culture, analyses complémentaires, fourniture de matériel végétal, travaux épidémiologiques, expérimentations en station et chez les producteurs, enquêtes et base de données...). La validation des outils est passée par une collaboration active avec les EPR (laboratoire de certification), le LNPV (aujourd'hui ANSES) pour les validations croisées (parasites de quarantaine), et des réseaux européens ou internationaux (Euphresco, PVYwide, ...) pour des compléments de recherche et/ou l'accès à des collections larges.

Outputs de la recherche

Production scientifique

Matérialisée par de nombreuses publications dans des revues scientifiques (cf bibliographie), elle a également porté sur le développement de tests moléculaires fondés sur la connaissance de la diversité génétique des agents pathogènes visés. Dans le domaine de la **virologie**, le développement de ces tests s'est concentré sur le virus Y, compte tenu de la multiplicité des variants chez ce virus. Ont ainsi été développés successivement des outils de PCR sur des régions ciblées du génome pour la détection spécifique des isolats PVY_N (Glais et al., 1996), PVY_{NTN} et PVY_W (Glais et al., 2005), puis des outils par détection de SNP dans les gènes responsables de la nécrose (outils dits Frit' N – Rolland et al., 2008 ; brevet INRA/FN3PT en 2004), et enfin, plus récemment, des outils basés sur la PCR temps réel et des séquences spécifiques des différents variants (Balme-Sinibaldi *et al.*, 2006). Ces outils sont utilisés actuellement essentiellement en recherche pour le suivi des différents types de variants, mais peuvent également être déployés en confirmation de cas douteux. Une interaction directe entre l'INRA et la FN3PT a également été mobilisée pour la protection des nouveaux outils, en particulier le dépôt conjoint du brevet Frit'N.

Dans le domaine de la bactériologie, des amorces spécifiques de *R. solanacearum* ont été développées en collaboration avec l'INRA d'Angers (Boudazin et al., 1999). Des amorces et des kits spécifiques pour la détection de diverses espèces de *Pectobacterium*, en particulier *P. atrosepticum*, ont également été mis au point et validés (Fréchon et al., 1998 ; Hélias et al., 1998).

Par ailleurs, une banque élargie d'anticorps monoclonaux anti PVY a été constituée lors des projets soutenus par le Conseil Régional de Bretagne, et fournit la matière pour constituer des 'cocktails' évolutifs de réactifs adaptés à la détection d'une gamme de variants large.

Réactifs sérologiques et milieux sélectifs

Ils sont constitués de séries de réactifs sérologiques et/ou de tests moléculaires de détection des divers parasites ciblés, avec amélioration et extension progressive de la gamme.

En virologie :

- Une série de réactifs polyclonaux a été produite à partir de 1984 contre les principaux virus de la pomme de terre : PVY (1985), PLRV (1986), PVX (1987), PVA (1989), et renouvelée et améliorée en continu depuis en fonction des besoins.
- Des réactifs monoclonaux ont été produits à partir de 1988 contre le PVY (Ounouna *et al.*, 2002), et de 1992 contre le PLRV. Ces réactifs sont toujours utilisés aujourd'hui dans les tests de certification du plant par les Etablissements Producteurs Régionaux de la FN3PT, seuls ou en association avec des anticorps polyclonaux pour couvrir une gamme large de détection.

La composition de ces réactifs (cocktail d'anticorps monoclonaux de spécificité différente) est ajustée suite à un suivi régulier en culture des variants présents (territoire français + isolats étrangers selon les opportunités) et des identifications de nouveaux types de souches virales grâce au Réseau mondial PVYwide, mis sur pied et coordonné par l'INRA.

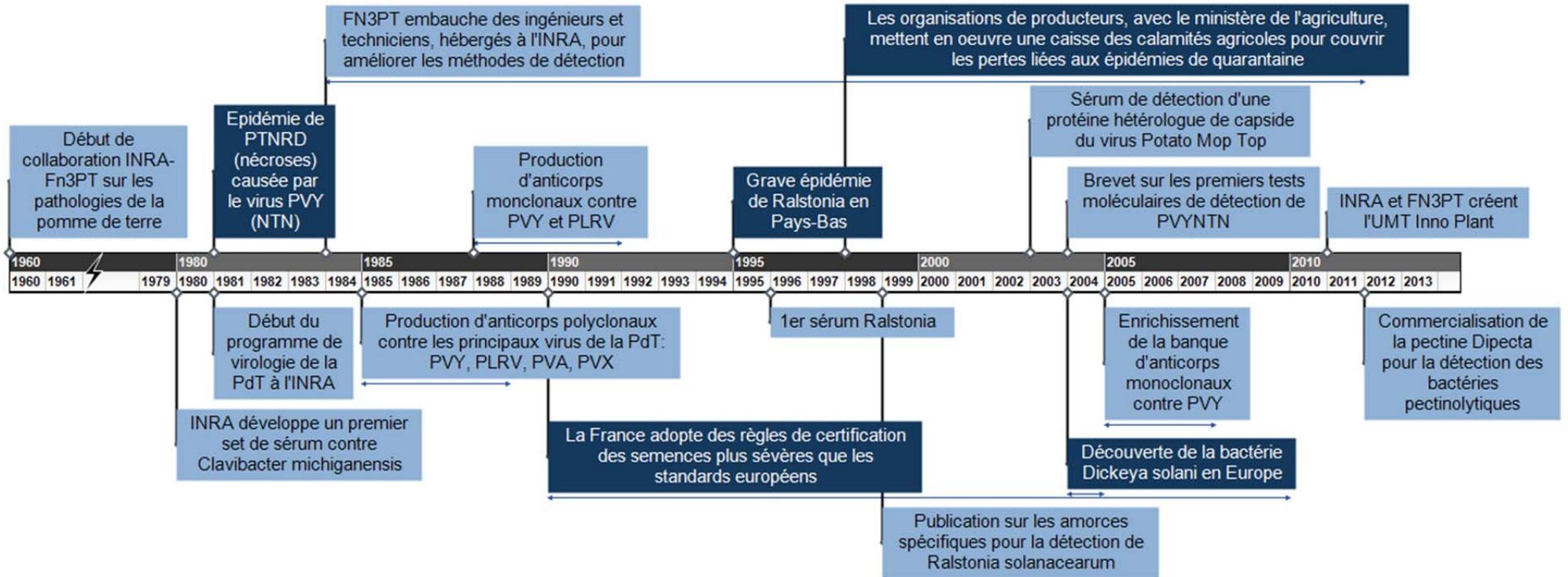
- Enfin, des réactifs de détection du virus du Mop Top ont été produits par expression hétérologue du gène de capsid dans *E. coli* (Hélias *et al.*, 2003). Ces réactifs fonctionnent en ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, méthodologie facilement miniaturisable permettant une révélation colorimétrique de la présence d'antigènes – p.ex. les capsides protéiques de virus pathogènes -grâce à des anticorps spécifiques), mais nécessitent l'emploi conjoint d'un sérum polyclonal pour la préparation des plaques. Ils complètent les tests moléculaires développés par d'autres équipes internationales.

En bactériologie :

Les premiers sérums polyclonaux dirigés contre *Clavibacter* ont été produits dans les années 1980 par L. Hingand, et utilisés à cette période par les laboratoires de la FN3PT pour le contrôle des plants. Entre 1995 et

2010, en lien avec la forte augmentation du nombre d'analyses requises du fait de la situation sanitaire inquiétante dans plusieurs pays européens (fig 1 et 2), trois séries d'anticorps polyclonaux anti – *Ralstonia solanacearum*, et deux séries d'anticorps anti *Clavibacter* ont été produites, testées et validées en collaboration entre la FN3PT et l'INRA, puis utilisées par les EPR pour les contrôles des parcelles de plant. Par ailleurs, un nouveau milieu semi-sélectif très efficace a été mis au point pour l'isolement des bactéries pectinolytique *Pectobacterium* et *Dickeya* (Hélias *et al.*, 2012).

Chronologie :



Légende

- Les événements dans lesquels l'INRA est directement impliqué
- Les événements contextuels

Circulation des connaissances et intermédiaires

Les réactifs et méthodes développés sont destinés à une utilisation directe par la FN3PT et ses EPR, pour les opérations de certification du plant français et la gestion de litiges commerciaux. L'objet principal n'est pas de vendre ou de licencier ces outils à des tiers. Toutefois, la pectine à la base des nouveaux milieux pour l'isolement des bactéries pectinolytiques a fait l'objet d'un accord de distribution avec la société AGDIA-BioFords en 2012 (ligne Dipecta : <http://www.agdia-biofords.com/produits-services/detection-des-pathogenes/>).

Ils sont également valorisés dans des projets collaboratifs, tels que par exemple des ring tests officiels de comparaisons de réactifs incluant l'INRA Rennes, les EPR, l'ANSES (Station de Quarantaine de la Pomme de Terre, Clermont-Ferrand), plus quelques labos étrangers (Suisse-Agroscope, Changins ; Belgique-Centre wallon de Recherches agronomiques, Libramont), ou la validation de ces outils sur des populations étrangères d'agents pathogènes (Brésil, Algérie...).

Impacts 1

Appui à la mise en œuvre de politique sanitaire vis-à-vis des parasites de quarantaine

Pour chacune des 13 000 parcelles françaises de production de plants, un lot de 200 tubercules subit un test de contrôle d'absence de bactéries de quarantaine (*Ralstonia* et *Clavibacter*) avec les réactifs sérologiques décrits plus haut, soit au total environ 2.6 Millions de tubercules testés /an pour chaque bactérie, deux sérums différents par bactérie étant désormais employés pour limiter les risques de réactions croisées. Ces sérums sont également utilisés par l'ANSES en cas de suspicion de présence de bactéries de quarantaine en culture (de plant, de pommes de terre de consommation ou destinées à la transformation), afin de pouvoir mettre en œuvre les mesures de lutte obligatoire si la suspicion est confirmée. Même limités à quelques cas par an, ces résultats douteux nécessitent d'être infirmés ou non rapidement afin de ne pas prolonger inutilement la consignation des lots.

La France a ainsi pu rester relativement à l'abri des épidémies de bactéries de quarantaine, contrairement à plusieurs autres pays européens fortement exportateurs de plants de pomme de terre, dont les Pays Bas ou l'Allemagne, où après 1995 plusieurs dizaines de cas ont été déclarés annuellement (Figs 1 et 2).

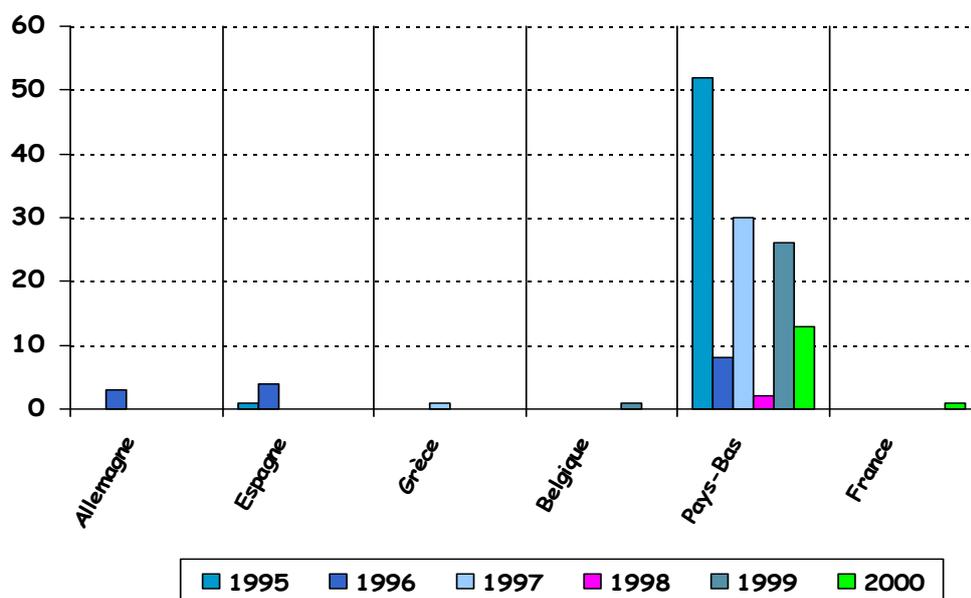


Figure 1 – Nombre de cas déclarés de présence de *Ralstonia solanacearum* sur plant de pomme de terre en Europe, 1995-2000 (source SDQPV).

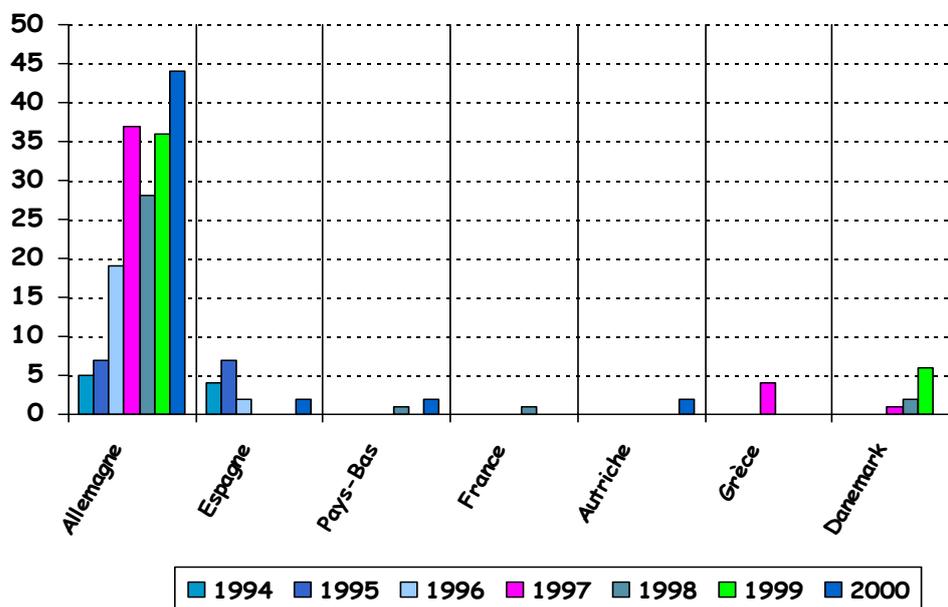


Figure 2 – Nombre de cas déclarés de présence de *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* sur plant de pomme de terre en Europe, 1995-2000 (source SDQPV).

Appui à la mise en œuvre de politique sanitaire vis-à-vis des parasites de qualité :

La certification de tous les lots français de plants de pomme de terre repose sur des tests réalisés avec les réactifs issus de ces travaux collaboratifs pour les virus majeurs (PVY et ses variants principaux - PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{N-W}; PVX ; PLRV), soit 1.2 M de tests /an.

Les contrôles rigoureux de la qualité des réactifs sont un élément clé de sécurisation des analyses officielles, et sont intégrés dans le dispositif d'agrément des laboratoires par le SOC et de leur accréditation COFRAC (norme 17025), avec toutefois une interrogation sur la nécessité de faire accréditer à l'avenir cette production de sérums pour répondre aux exigences normatives.

Impact économique :

L'augmentation régulière des exportations de plants français (150 000 tonnes exportés en 2010/11 contre 75 000 tonnes dans les années 90) fait aujourd'hui de la France le 2^e exportateur mondial, avec près d'un tiers de sa production exportée (60M€ de chiffre d'affaires à l'export en 2010). Cette conquête de nouveaux marchés est due à un ensemble de facteurs (variétés, promotion, prospection...), parmi lesquels la qualité sanitaire joue un rôle important mais difficilement chiffrable. On peut toutefois citer plusieurs exemples dans lesquels cet argument a été déterminant sur des marchés majeurs. Ainsi, un agrément du gouvernement israélien a été obtenu pour l'importation de plants français suite à un dossier technique axé sur le dispositif général de certification, mais aussi sur les moyens mis en œuvre vis-à-vis des maladies à virus et des isolats nécrogènes de PVY. Un agrément similaire a été obtenu des autorités égyptiennes après une expertise technique (Analyse de risque Phytosanitaire) visant les *Dickeya*, agents de pourriture des tiges et des tubercules invasifs en Europe. Compte-tenu de l'essor des exportations avec l'amélioration progressive de la qualité sanitaire des plants français, on peut poser l'hypothèse que la qualité des plants explique 50% des volumes d'export français. Ainsi, en considérant un chiffre d'affaires moyen annuel à l'export de 45 M€/an et une valeur ajoutée générée par un producteur de plant de l'ordre de 30%, le surplus économique généré sur 20 ans (depuis les premiers tests INRA dans les années 80) par la croissance des exportations environne 140M€.

La qualité sanitaire élevée du plant français ne se traduit pas par un prix de vente plus élevé, ce prix étant déterminé essentiellement par les variétés et les politiques commerciales, avec comme base le prix du plant néerlandais. Le gain qualitatif permet toutefois d'accéder à de nouveaux marchés (cf supra), mais aussi de limiter les imports de plant au bénéfice du développement de la production en France. Il est significatif de ce point de vue que plusieurs 'majors' étrangères (Agrico, HZPC, Meijer) aient choisi au cours des 10 dernières années de s'implanter en France pour la multiplication de leurs propres variétés.

Enfin, la politique de détection précoce et de gestion rigoureuse des foyers de quarantaine, si elle a un coût immédiat (la caisse de calamités agricoles estime chaque cas avéré à 500 à 600 K€, comprenant la destruction des récoltes, le manque à gagner suite à l'interdiction prolongée de culture de plant sur les parcelles – voire les exploitations - touchées), est à terme bénéfique pour la filière. Il suffit pour s'en convaincre de calculer le coût annuel que représenterait une situation de détection de plusieurs dizaines de cas annuellement, comme la connaissent certains pays voisins (Fig. 1 et 2). Ainsi, si la France avait été dans la même situation sanitaire que les Pays-Bas entre 1995 et 2000 (22 foyers de parasites de quarantaine détectés par an en moyenne, sur une surface de culture de plants 2 fois supérieure à la France) elle aurait subi des pertes annuelles d'environ $22 \times 500.000 / 2 = 5.5 \text{ M€} / \text{an}$, soit environ 100M€ de pertes évitées sur 20 ans.

Impacts 2

Reconnaissance et transfert de l'expertise française

Les techniques françaises sont régulièrement adoptées à l'étranger par les instances chargées du contrôle des plants. Ainsi, le milieu liquide d'enrichissement à base de la pectine Dipecta, permettant la multiplication spécifique des bactéries pectinolytiques, est utilisé aujourd'hui par plusieurs laboratoires étrangers (NAK aux Pays Bas ; Suisse ; Israël ; Afrique du Sud...) pour tester la présence des bactéries sur les lots de plants.

Par ailleurs, l'expertise technique française est valorisée dans les discussions internationales portant sur les évolutions réglementaires : CEE-ONU, Union européenne/DG-SANCO, etc C'est le cas par exemple pour la détection du virus Y, ou des bactéries pectinolytiques. La France a participé directement à l'organisation en Egypte du récent workshop CEE-ONU sur la certification des plants.

Enfin, cette expertise est mobilisée pour des analyses de risque (par exemple l'Analyse de Risque Phytosanitaire *Dickeya* en Egypte (2011-2012), en collaboration avec l'ANSES) et la formation des contrôleurs étrangers à l'utilisation des tests, en appui à la professionnalisation des structures de contrôle locales.

Conclusions

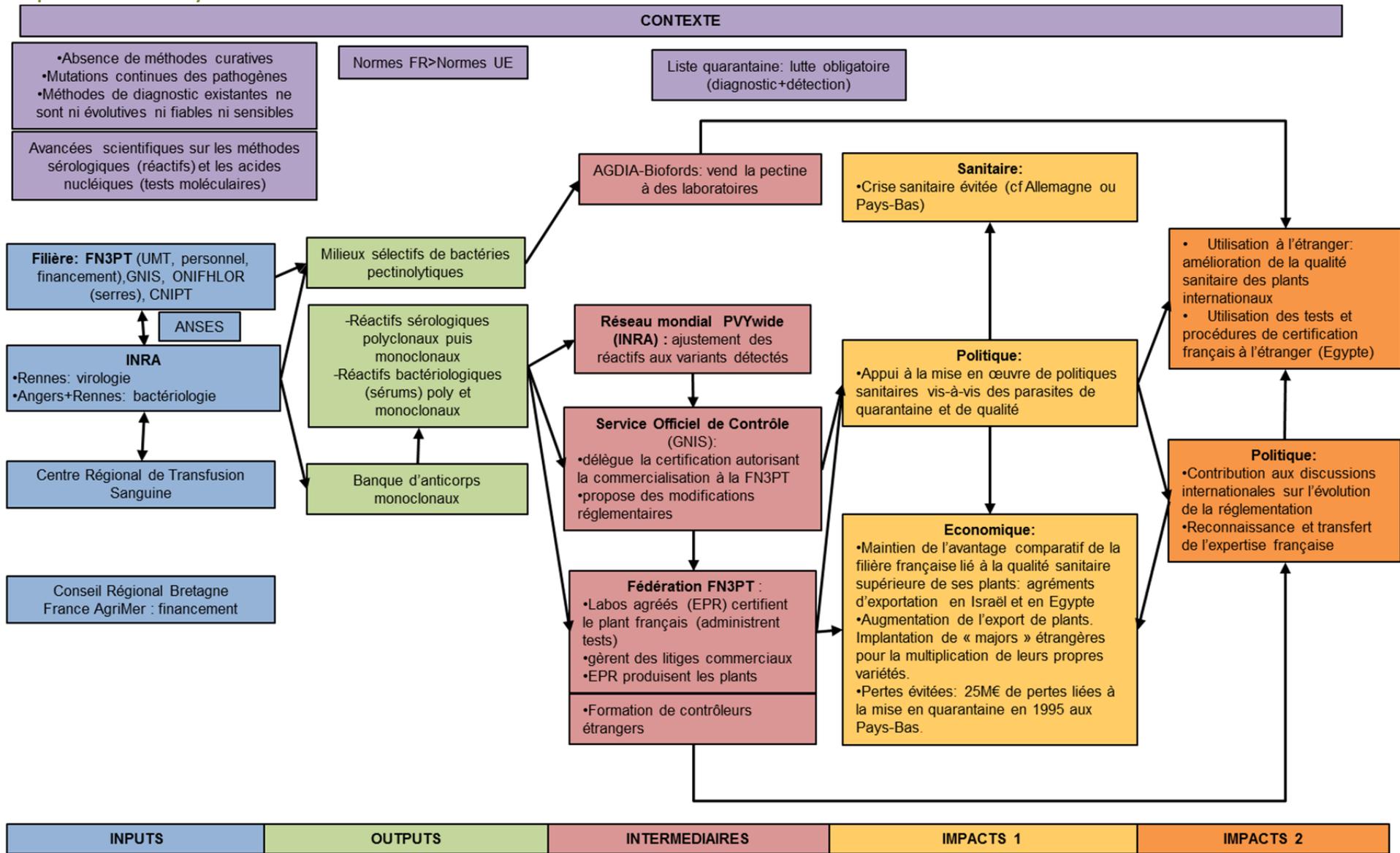
Ce cas illustre la diversité des impacts (réglementaires et donc politiques, environnementaux et économiques) d'une activité de recherche finalisée menée en partenariat de long terme entre l'INRA et un acteur clé d'une filière professionnelle. Ces collaborations, s'étalant sur plus de trente ans désormais, ont formé la base d'un partenariat solide, récemment concrétisé par la constitution d'une Unité Mixte Technologique entre la FN3PT et l'INRA (INNO-PLANT : <http://www.umat-innoplant.fr/UMT-InnoPlant>) dont le programme de travail inclut, entre autres actions, la poursuite du développement et de la validation d'outils de diagnostic et de détection toujours plus variés et performants.

Il est remarquable que les outils basés sur la sérologie (anticorps mono- et polyclonaux) et la microbiologie (pectine Dipecta) restent aujourd'hui encore, à l'heure de l'explosion des données moléculaires, les méthodes de choix pour le contrôle de routine de l'état sanitaire des plants de pomme de terre. Ceci s'explique par deux raisons principales : d'une part, même si nous (et d'autres) avons développé des outils moléculaires (CAPS, SNP et PCR temps réel), la maîtrise de ces instruments impose non seulement une technologie assez complexe, mais aussi et surtout la disposition d'équipements lourds pour des tests en routine (machine PCR temps réel, séquenceurs). Le gain de précision ne compense donc pas actuellement la facilité de mise en œuvre et le coût relativement modique des techniques 'classiques'. D'autre part, la capacité à amplifier les

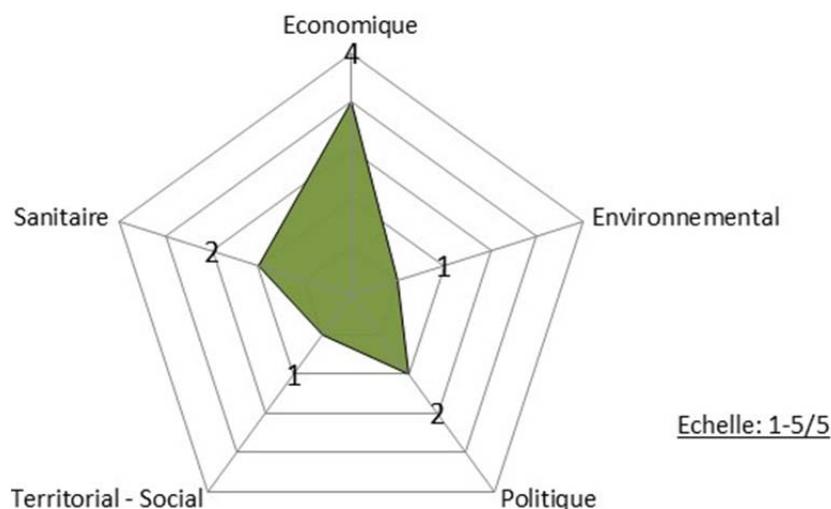
acides nucléiques, surtout de manière quantitative, reste aléatoire dans des échantillons issus d'environnements complexes (sols, extraits de tubercules, etc...), ce qui augmente le risque d'erreur de diagnostic ou de détection. Nous continuons néanmoins à investir dans la mise au point d'outils moléculaires, l'amélioration continue des méthodes d'extraction des ADN à partir d'échantillons complexes laissant l'espoir que les difficultés liées à la composition même des échantillons deviendront de plus en plus aisément surmontables. La question des coûts, mais aussi de la rapidité d'obtention du résultat définitif sont également en voie de résolution avec la diminution continue du coût des machines, la capacité de robotiser un grand nombre d'étapes et l'augmentation des débits.

Le choix de développer des méthodologies et outils 'propriétaires' reste une garantie à la fois de maîtrise de la performance (et donc de crédibilité des résultats annoncés), mais également un argument de promotion de la filière à l'étranger. Cet élément est essentiel dans une filière fortement exportatrice sur des marchés variés, tant par les exigences de qualité que par le niveau technique des pays destinataires.

Impact Pathway



Vecteur d'impacts



Dimension d'impact	Importance	
Economique	4/5	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la balance commerciale française des plants de PdT: 150 000 tonnes exportés en 2010/11 contre 85 000 tonnes dans les années 80 (Chiffre d'affaires moyen à l'export entre les années 90 et 2010= 45M€). La qualité sanitaire expliquerait 50% des exportations soit 140M€ de surplus économique sur 20 ans • Implantation de « majors » étrangères en France pour la multiplication de leurs propres variétés. • Coûts évités: par comparaison avec les Pays-Bas, 100M€ de pertes liées à la mise en quarantaine entre les années 90 et 2010
Politique	2/5	<p>Appui à la mise en œuvre de politique sanitaire vis-à-vis des parasites de quarantaine et de qualité. Appui à l'élaboration de politiques internationales à travers l'expertise française reconnue à la CEE-ONU, Union européenne/DG-SANCO, ESPG.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mobilisation faible dans le débat public : absence de débat public sur les normes sanitaires des plants de PdT. La connaissance ne correspond pas à une fenêtre politique particulièrement favorable. • Appui à la mise en œuvre de politique sanitaire vis-à-vis des parasites de quarantaine et de qualité. Outils techniques au service de la mise en œuvre de politiques nationales vis-à-vis des parasites de quarantaine et de qualité. Utilisation systématique des tests par l'ensemble de la filière française. • Appui à l'élaboration de politiques internationales à travers l'expertise française reconnue à la CEE-ONU, Union européenne/DG-SANCO, ESPG <p>Impact faible à moyen terme dans la diffusion des idées : Pas de changement des termes du débat. Forte notoriété des travaux INRA mais essentiellement au sein de la filière FN3PT</p> <p>Enjeu limité des politiques publiques concernées : Divers enjeux économiques et sanitaires emboîtés mais d'amplitude limitée (affectant seulement la filière pomme de terre). Absence d'émotion publique.</p>
Sanitaire	2/5	<ul style="list-style-type: none"> • Crise sanitaire évitée (cf Allemagne/Pays-Bas)

Source des données :

Bibliographie

Balme-Sinibaldi V., Tribodet M., Croizat F., Lefeuvre P., Kerlan C., Jacquot E., 2006. Improvement of Potato virus Y (PVY) detection and quantification using PVYN- and PVYO-specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods* **134**: 261-266.

Boudazin G., Le Roux A.-C., Josi K., Labarre P., Jouan B., 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 373-380.

Fréchon D., Exbrayat P., Hélias V., Hyman L.J., Jouan B., Llop P., Lopez M.M., Payet N., Pérombelon M.C.M., Toth I.K., van Beckhoven J.R.C.M., van der Wolf J.M., Bertheau Y., 1998. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research* **41**: 163-173.

Glais L., Kerlan C., Tribodet M., Tordo V.M.J., Robaglia C., Astier-Manifacier S., 1996. Molecular characterization of potato virus Y-N isolates by PCR-RFLP - Differentiation of PVYN isolates by PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 655-662.

Glais L., Tribodet M., Kerlan C., 2005. Specific detection of the PVYN-W variant of Potato virus Y. *Journal of Virological Methods* **125**: 131-136

Hélias V., Hamon P., Huchet E., Wolf J.V.D., Andrivon D., 2012. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology* **61**: 339-345.

Hélias V., Jacquot E., Guillet M., Le Hingrat Y., Giblot-Ducray D., 2003. Production of recombinant Potato mop-top virus coat protein in *Escherichia coli* and generation of antisera recognising native virus protein. *Journal of Virological Methods* **110**: 91-97.

Hélias V., Le Roux A.-C., Bertheau Y., Andrivon D., Gauthier J.P., Jouan B., 1998. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 685-699.

Leromancer M., Kerlan C., 1991. Superficial Ringspot necrosis of potato tubers – a recent disease caused by Potato Virus Y. *Agronomie* **11**: 889-900.

Le Hingrat Y., Hélias V., Le Roux-Nio A.C., Cellier G., Prior P., Rivoal C., Poliakoff F., Soubelet H., Moreau M., Deveaux V., Latour X., Gaucher D., Benigni M., Martinon V., 2012. Evaluation (et Gestion) des risques sanitaires bactériens liés aux itinéraires culturels de la pomme de terre et d'autres cultures spécialisées. *Innovations Agronomiques* **25** : 253-267

Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V, Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 614-629.

Ounouna H., Kerlan C., Lafaye P., Loukili M.J., El Gaaied A., 2002. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of Potato virus Y coat protein and their use in PVY strain differentiation. *Plant Pathology* **51**: 487-494.

Rolland M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E., 2008. A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable Potato virus Y group and variant characterization. *Journal of Virological Methods* **147**: 108-117.

Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **12**: 938-954.

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

Valkonen J.P.T., 2007. Viruses: economical losses and biotechnological potential. In *Potato Biology and Biotechnology –advances and perspectives* (D. Vreugdenhil, ed.), pp. 619-640. Elsevier, NL.

Van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsrör L., Manulis S. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 768-774.

Entretiens réalisés:

Y. Le Hingrat, responsable R&D FN3PT

L. Glais, A.-C. Le Roux, V. Hélias – ingénieurs de Recherche, FN3PT

B. Quéré, Directeur, FN3PT

Cas rédigé par D. Andrivon, avec l'appui des personnes sus-citées et d'A. Gaunand et L. Colinet (cellule ASIRPA INRA).