Outils de diagnostic

Le développement d'outils de détection et de caractérisation des parasites majeurs des plants de pomme de terre sont deux axes de travail importants pour la compétitivité de la filière plant sur le marché français et international. Les travaux collaboratifs de long terme, partagés entre l'INRA et cette filière, ont été renforcés par la création en 2012 d'une Unité Mixte Technologique, l'UMT InnoPlant, qui a tenu les 20 et 21 mai 2014 son premier Carrefour de la Recherche à Paris. Sur le thème "Quelles innovations pour conforter la qualité et la compétitivité de la filière plants de pomme de terre de demain?" ont été évoqués les travaux en cours et les perspectives en matière de qualité sanitaire, d'amélioration variétale et d'itinéraires de production. Cet article s'attache plus particulièrement à faire le point sur la mise en œuvre d'outils sensibles, spécifiques et fiables de détection des parasites concernés et à évaluer l'impact qu'ils ont pu avoir sur la compétitivité de la filière.

Par Didier Andrivon (INRA / UMT InnoPlant)

avec l'aide de Yves Le Hingrat, Laurent Glais, Valérie Hélias, Anne-Claire Le Roux et Bernard Quéré (FN3PT-RD3PT / UMT InnoPlant) et de Laurence Colinet et Ariane Gaunand (INRA / cellule ASIRPA)

Au service de la qualité sanitaire du plant

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 que Clavibacter michiganensis ou Ralstonia solanacearum, mais aussi aux parasites de qualité tels les virus PVY, PLRV ou PVX - transmis via le tubercule ou le complexe Pectobacterium/Dickeya. Pouvoir fournir et avérer cette garantie repose sur un processus et des normes de certification des plants, qui nécessitent la mise en œuvre d'outils sensibles, spécifiques et fiables de détection des parasites concernés.

Mesure de l'impact par la méthode ASIRPA

Cette méthode, décrite en détail sur la page Internet dédiée au projet, vise à qualifier et quantifier les impacts des travaux de recherche dans le secteur de l'agriculture et de l'alimentation. Elle part du

L'UMT InnoPlant

L'UMT InnoPlant est une Unité Mixte Technologique créée en 2012 pour renforcer l'innovation et la compétitivité du plant français de pomme de terre, en particulier en matière de qualité sanitaire et de résistance variétale aux bioagresseurs. Elle associe la FN3PT / RD3PT (Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre) et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). À cette unité collabore aussi le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences) et l'ACVNPT (Association de Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre) en tant que partenaires associés. L'animation de l'UMT est assurée par Yves Le Hingrat (FN3PT), Didier Andrivon et Marie-Claire Kerlan (Inra). Pour en savoir plus: www.umt-innoplant.fr

principe que la chaîne d'innovation impliquant nécessairement une diversité d'acteurs (équipes de recherche, de développement, structures de mises en marché...), aucun de ces acteurs ne peut s'attribuer seul une innovation, mais chacun peut évaluer sa contribution à cette innovation. C'est ainsi qu'est né le concept de "chemins d'impact", décrivant l'enchaînement des interventions et des contributions.

La méthode ASIRPA travaille par études de cas sur des innovations à impacts avérés, et donc sur une capacité à les documenter (publications, rapports, statistiques, règlements, sites internet, témoignages des utilisateurs). Elle s'intéresse par ailleurs à tous les types d'impacts: économiques bien sûr, mais aussi politiques ou réglementaires, environnementaux, sociétaux, sanitaires, etc. Elle vise à évaluer les contributions des différents acteurs : elle débute donc par une description du contexte. l'identification et interview des acteurs clés et de leurs apports (inputs) puis des productions (outputs) avant d'analyser les intermédiaires avant permis de diffuser ou de mettre en marché ces produits. Enfin, elle distingue les impacts primaires (conséquences immédiates et performance par rapport au but initial visé) et les impacts secondaires, conséquences indirectes mais importantes de ces innovations.

Diagnostic pour la qualité sanitaire des plants

La filière plant en France représente un chiffre d'affaires annuel d'environ 100 millions d'euros. La France est le second exportateur mondial de plant de pomme de terre, dans un marché très compétitif.

L'État (via le Service Officiel de Contrôle) a délégué les opérations de certification à la FN3PT et ses EPR. Cette certification repose sur des normes nationales souvent plus sévères que les exigences communautaires, mais aussi sur la disponibilité d'outils de détection sensibles et spécifiques, dont l'évolution génétique des populations parasites impose la révision et la réévaluation périodique. Cependant, le marché pour de tels outils reste limité en comparaison



Carrefour de recherche de l'UMT InnoPlant. De gauche à droite, Didier Andrivon et Dominique Blancard (Inra), Anne-Claire Le Roux, Valérie Hélias, Laurent Glais (FN3PT / RD3PT - InnoPlant) et Elsa Rulliat (Anses).

avec les marchés de la santé humaine ou vétérinaire, et peu d'acteurs commerciaux y sont donc présents.

Apports des acteurs clés ou "Inputs"

Un ensemble de projets collaboratifs s'est développé au cours des 40 dernières années 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 été conduits dans le cadre de conventions de recherche, établies depuis 1984 et renforcées par un accord-cadre signé en 2011 et par la création en 2012 de l'UMT InnoPlant, dont c'est l'un des axes de travail. Les travaux ont été conduits au sein d'équipes mixtes, en grande partie grâce à des ingénieurs et techniciens recrutés par la FN3PT / RD3PT et affectés au sein d'équipes de recherche INRA. C'est d'ailleurs ce dispositif qui perdure au sein de l'UMT InnoPlant, hébergée par l'UMR IGEPP.





Bactéries pectinolytiques et maladie de la jambe noire

Important enjeu pour la certification des plants de pomme de terre, les pertes liées aux bactéries Pectobacterium et Dickeya responsables des symptômes de jambe noire et de pourritures molles sont évaluées à plusieurs dizaines de millions d'euros au niveau européen (refus, déclassements). Connaître la diversité des populations bactériennes en cause est important pour permettre de mettre en évidence des possibles émergences. L'épidémiovigilance conduite par la FN3PT/RD3PT permet ainsi grâce à des inventaires en culture conduits en lien avec les 3 EPR d'identifier les genres et espèces associés à la jambe noire et leurs parts relatives chaque année. Les bactéries Pectobacterium restent majoritaires, même si la présence de Dickeya est relevée chaque année. Les inventaires montrent également une incidence des différentes espèces bactériennes très variable selon les années.

Diversité des souches

Les études de caractérisation génétique et phénotypiques conduites visent dans un second temps à connaître la diversité des souches bactériennes collectées. Ces travaux ont notamment amené l'équipe française de Valérie Hélias à être parmi les premières en Europe à mettre en évidence la nouvelle espèce Dickeya solani. Des tests d'agressivité menés sur une centaine de souches montrent qu'il existe de fortes variations entre les souches au sein de chaque espèce et que les différences entre Dickeya solani et Dickeya dianthicola, (espèce historiquement identifiée en Europe sur cette culture) ne sont pas significatives. Plus récemment, les travaux de séquençages conduits ont mis en évidence la présence de l'espèce Pectobacterium wasabiae, également décrite ailleurs en Europe, Amérique et en Afrique. La présence potentielle de la sousespèce Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum sur pomme de terre a également été montrée. L'importante diversité de Pectobacterium mise en évidence dans ces travaux montre



Symptôme de jambe noire: Les études conduites sur Pectobacterium et Dickeya montrent la nécessité d'intégrer l'ensemble du cortège bactérien responsable des dégâts pour maîtriser la maladie.

l'intérêt de conduire des études taxonomiques permettant de clarifier et identifier de façon complète le complexe d'espèces/sous-espèces de *Pectobacterium* associé aux dégâts. La connaissance de la diversité des populations bactériennes présentes est par ailleurs importante pour permettre ensuite le développement d'outils de diagnostics spécifiques des espèces et genres bactériens en cause.

Identification rapide par la CAPS

Un nouvel outil d'identification rapide de *Dickeya solani* de *Dickeya dianthicola* a été mis au point par l'équipe de Rennes. Spécifique, (100 % des souches sont identifiées), ce test CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequences) permet une détection directe dans différents supports (plantes malades, contaminations latentes sur tubercules). La méthode ne nécessite pas d'équipement spécifique et son transfert vers les EPR est en cours. L'expertise reconnue de Valérie Hélias ont amené l'intégration de

l'équipe dans les projets collaboratifs nationaux et internationaux et a également contribué à appuyer la réponse de la France (DGAL) et de l'Europe vis-à-vis de la volonté égyptienne d'instaurer une norme "0" pour Dickeya solani. Un suivi pluriannuel et multisites de lots associant la France (FN3PT/ RD3PT et EPR) et la Suisse (Université de Berne, ACW) a eu pour objet de suivre l'évolution des contaminations bactériennes sur plusieurs années, afin de mieux comprendre les facteurs critiques dans le déclenchement de la maladie et d'évaluer l'évolution quantitative des contaminations. Les résultats sur trois années mettent en

avant des symptômes majoritairement liés à *Dickeya* et *Pectobacterium atrosepticum*, avec de fortes différences de niveaux de maladie entre les 5 sites et les 3 années pour un même lot. Les données agro-météorologiques sont en cours d'analyse pour évaluer la part du plant et des facteurs pédoclimatiques sur la maladie.

■ Mise au point d'un test CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequences)

'D. solani' →

Potato Planet O46 • mai 2O14

Ces équipes se sont insérées chaque fois que nécessaire au sein de réseaux internationaux (par exemple projets Euphrescos ou groupe d'experts *Dickeya*), qu'elles ont parfois créés elles-mêmes (PVY wide organization).

Productions ou "outputs"

Les 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 pour la seule certification des plants représente plusieurs millions de tubercules testés par an (par exemple, 2,6 millions de tubercules testés par an pour chacune des deux bactéries de quarantaine C. michiganensis et R. solanacearum).

Intermédiaires

Les réactifs et les méthodes développées sont conçus pour une utilisation directe par la FN3PT et ses EPR. Toutefois, un accord pour la distribution commerciale de Dipecta, une nouvelle source de pectine à haute performance pour l'isolement des bactéries pectinolytiques, a été signé en 2012 avec la société Agdia-Biofords. Ces réactifs et ces méthodes sont également mobilisés dans divers projets collaboratifs, comme par exemple des essais en réseaux officiels (ring tests) destinés à les évaluer vis-à-vis d'autres outils ou méthodes concurrentes. Ils sont aussi repris à l'étranger,

comme au Brésil ou en Algérie. Enfin, ils sont mobilisés par les autorités nationales pour la mise en œuvre de plans de surveillance réglementaires.

Impacts primaires

• Impact sanitaire: préservation de la qualité du territoire

Pour chacun des 13000 lots de plants de pomme de terre produits annuellement en France, un échantillon de 200 tubercules est testé pour s'assurer de l'absence de parasites de quarantaine, grâce aux outils sérologiques développés et évalués auparavant. Ces outils sont également mobilisés pour confirmation ou infirmation de la présence de ces parasites chaque fois qu'une situation suspecte se présente. La certification de l'ensemble des lots repose donc directement sur ces réactifs. Grâce à ces mesures, la France a su très largement se garantir contre les épidémies dues à ces parasites que d'autres pays producteurs de plants, en particulier les Pays-Bas et l'Allemagne, ont eu à subir depuis 1995.

Impact économique: amélioration des marchés à l'export et pertes évitées

Dans un grand nombre de cas, la qualité sanitaire a été l'argument décisif dans le gain de marchés majeurs. Si l'on se base sur l'augmentation des exportations et en estimant que la moitié de ces gains provient de la qualité sanitaire, pour un chiffre d'affaires annuel de 45 millions d'€ et une valeur ajoutée de 30 %, le bénéfice économique net pour la filière sur les vingt dernières années peut être évalué à environ 140 millions d'euros. Il convient d'ajouter à ce chiffre les pertes évitées par la prévention des cas donnant lieu à indemnisation.





Une bonne connaissance de la diversité du PVY pour des outils de diagnostic fiables

Une attention particulière est portée au virus Y de la pomme de terre (PVY) du fait qu'il soit responsable de 85 % des infections virales sur cette culture et qu'il ait un fort impact économique en raison notamment de sa capacité à induire des symptômes de nécrose annulaire superficielle sur les tubercules (PTNRD) de variétés sensibles, les rendant non commercialisables. Rappelons que le PVY peut être transmis par 40 espèces de pucerons sur le mode non persistant et infecte 500 espèces végétales, ce qui ne facilite pas la lutte contre ce pathogène. La grande variabilité des souches de PVY a conduit l'équipe de Laurent Glais (FN3PT/RD3PT) à axer ses recherches sur le renforcement des outils de diagnostic et de caractérisation des isolats de PVY. Le contrôle sanitaire des semences étant essentiellement basé sur les caractéristiques sérologiques du PVY (test ELISA), une attention particulière est portée sur la fiabilité de détection de ces outils. Pour renforcer cette fiabilité, un projet collaboratif de 4 ans soutenu par la Région Bretagne et en collaboration entre la FN3PT, Bretagne-Plants, l'Inra de Rennes et de Nantes a consisté en une caractérisation sérologique poussée d'une large gamme d'isolats de PVY, d'origine géographique variée et de différentes plantes hôtes. Il a permis de développer une banque de plus de 70 anticorps monoclonaux, prêts à être utilisés dès lors qu'un isolat PVY particulier serait signalé. Le travail de recherche s'achève cette année et les EPR vont disposer de nouveaux anticorps dans leurs kits, permettant d'élargir leur spectre de détection. À côté de la détection sérologique, l'autre voie d'analyse est celle moléculaire. L'étude de la diversité

de ces isolats par séquençage de tout ou partie de leur génome a permis de mettre en évidence l'importance des recombinaisons et des mutations dans l'évolution du PVY. L'équipe travaille notamment sur les déterminants moléculaires du PVY impliqués dans l'expression de la nécrose annulaire sur tubercule (PTNRD). Un premier déterminant a été identifié mais doit être enrichi afin de délivrer à la filière plant un outil de diagnostic spécifique des isolats responsables de cette nécrose tuberculaire.



Œilletonnage des lots de tubercules pour réaliser la préculture.

Tests moléculaires sur tubercules

Pour gagner du temps dans le diagnostic viral des plants, une tendance en Europe est de procéder à des tests moléculaires sur tubercules plutôt que d'appliquer un test sérologique (Elisa) sur feuilles en préculture. Les services néerlandais annoncent avoir arrêté de procéder à des tests Elisa pour généraliser les tests PCR en temps réel. En France, cette méthodologie est également développée et est en cours de validation. Une bonne corrélation est apparue entre ces tests moléculaires et les tests Elisa réalisés en préculture. Cependant une validation plus appronfondie est nécessaire pour s'assurer de la fiabilité de l'outil dans diverses situations. Un frein important à l'application de l'outil reste le coût relativement élevé de cette méthode. La solution pour contourner ce problème sera de réaliser un groupage de tubercules (à définir selon le seuil de sensibilité de la technique et la précision requise dans le taux de viroses) et s'orienter vers la détection simultanée de plusieurs virus (PCR multiplexe). Dans un premier temps, la filière plant française envisage de réserver ces tests moléculaires aux lots partant pour l'exportation précoce de septembre et début octobre. Elle estime également que conserver des précultures permet de détecter d'autres indicateurs comme des dégâts d'herbicides.



Plantules témoins pour les tests de préculture. La France estime que la préculture permet de repérer d'autres dégâts que ceux occasionnés par les virus, notamment les dérives herbicides.

Chaque cas déclaré de présence d'un parasite de quarantaine coûte environ 500 000 euros, sur la base des chiffres de la caisse de calamités agricoles qui gère les indemnisations. Si la France avait été dans la même situation sanitaire que les Pays-Bas, avec 22 cas annuels déclarés (fondé sur le nombre de nouveaux cas déclarés de présence de Ralstonia entre 1995 et 2000, seules années pour lesquelles des chiffres complets sont disponibles), le coût annuel des indemnisations aurait été de 5,5 millions d'€, soit environ 100 millions d'€ sur 20 ans. L'impact économique total sur cette période peut donc être évalué à environ 250 millions d'euros, ce qui n'est pas négligeable!

• Impact politique et réglementaire: appui à l'épidémiovigilance

La surveillance du territoire pour les parasites ciblés par ces outils est effectuée en grande partie dans le cadre des projets nationaux portés par la filière et l'INRA (PVY, Pectobacterium/

Dickeya, parasites de quarantaine), ou dans le cadre des contrôles liés à la certification. Ces outils participent donc activement à l'effort national d'épidémiovigilance, mais aussi à la mise en œuvre des mesures statutaires pour la lutte contre les parasites réglementés.

Impacts secondaires

Les techniques développées en France sont maintenant adoptées dans de nombreux autres pays: c'est ainsi que les laboratoires aux Pays-Bas, en Suisse, en Israël ou en Afrique du Sud utilisent désormais la pectine Dipecta pour isoler les bactéries pectinolytiques *Pectobacterium* et *Dickeya* ou réaliser les tests de détection sur les lots de tubercules. L'expertise française est reconnue par la Commission Économique des Nations Unies pour l'Europe (UNECE) pour la révision régulière des réglementations. La France a également contribué directement à l'organisation d'un récent atelier de l'UNECE en Égypte sur la certification des plants. **



